

## PRINCIPII DE GENETICA MEDICALA

### Cuprins

**Capitolul 1 - Genetica umană și importanța ei în medicina modernă**  
Mircea Covic

**Capitolul 2 - Structura și organizarea celulară a ADN**  
Mircea Covic, Ionel Sandovici, Trandafir Angheloni

**Capitolul 3 - Structura, analiza și localizarea genelor**  
Mircea Covic, Dragoș Ștefănescu

**Capitolul 4 - Expresia informației ereditare (funcția genei)**  
Mircea Covic, Ionel Sandovici

**Capitolul 5 - Transmiterea informației ereditare**  
Mircea Covic, Marius Bembea, Victor Pop, Mihai Voloșciuc

**Capitolul 6 Variabilitatea genetică**  
Mircea Covic, Iuliana Dimofte, Julieta Puiu, Ionel Sandovici

**Capitolul 7 - Genetica populațiilor**  
Julieta Puiu, Emilia Severin, Mircea Covic

**Capitolul 8 - Rolul factorilor genetici în producerea bolilor**  
Mircea Covic, Ortansa Stoica, Ionel Sandovici, Vlad Gorduza

**Capitolul 9 - Consultul și sfatul genetic**  
Mircea Covic, Marius Bembea, Ionel Sandovici, Dragoș Ștefănescu

**Capitolul 10 - Bolile cromosomice**  
Mircea Covic, Iuliana Dimofte, Vlad Gorduza

**Capitolul 11 - Bolile**  
Ionel Sandovici, Paula Grigorescu-Sido, Victor Pop, Dragoș Ștefănescu

**Capitolul 12 - Bolile Mitocondriale**  
Dragoș Ștefănescu

**Capitolul 13 - Bolile multifactoriale**  
Marius Bembea, Adrian Covic, Mircea Covic

**Capitolul 14. Genetica dezvoltării și anomaliiile congenitale**  
Ionel Sandovici, Mircea Covic, Dragoș Ștefănescu, Andra Hurjui

**Capitolul 15 Retardul mental**  
Mircea Covic, Cristina Rusu

**Capitolul 16 Genetica sistemului imun**  
Petre Cianga, Mircea Covic

**Capitolul 17 Genetica bolii canceroase**  
Ionel Sandovici, Dragoș Ștefănescu, Mircea Covic

**Capitolul 18. Profilaxia bolilor genetice**  
Dragoș Ștefănescu, Mircea Covic

**Capitolul 19. Tratamentul bolilor genetice**  
Ortansa Stoica, Ionel Sandovici, Mircea Covic, Georgiana Taușer

**capitolul 20. Probleme și dileme etice în genetica medicală**  
Vasile Astărăstoae, Cristina Gavrilovici, Ortansa Stoica, Mircea Covic

**Prof. dr. Mircea Covic**  
Catedra de Genetică umană  
Universitatea de Medicină și  
Farmacie „Gr.T.Popa” Iași

**Prof.dr. Dragoș Ștefănescu**  
Institutul medico-legal  
„Mina Minovici”  
București

**dr. Ionel Sandovici**  
Catedra de Genetică umană  
Universitatea de Medicină și  
Farmacie „Gr.T.Popa” Iași

---

Biolog Trandafir Angheloni

Prof.dr. Vasile Astărăstoae

Conf.dr. Marius Bembea

Dr. Elena Braha

Șef lucrări dr. Petre Cianga

Conf.dr. Adrian Covic

Prof.dr. Iuliana Dimofte

Dr. Cristina Gavrilovici

Șef lucrări dr. Vlad Gorduza

Prof.dr Paula Grigorscu-Sido

Dr. Andra Hurjui

Conf. dr. Victor Pop

Conf. dr. Julieta Puiu

Șef lucrări dr. Cristina Rusu

Prof. dr. Emilia Severin

Conf dr. Ortansa Stoica

Șef lucrări dr. Mihai Voloșciuc

Dr. Georgiana Taușer

## CAPITOLUL 1

# GENETICA UMANĂ ȘI IMPORTANȚA EI ÎN MEDICINA MODERNĂ

## A. CONȚINUTUL GENETICII UMANE.

### 1. GENETICA – ȘTIINȚA EREDITĂȚII ȘI VARIABILITĂȚII

#### 1.1. EREDITATEA

**Ereditatea** este proprietatea unui individ de a transmite la urmași caracterele sale personale precum și cele ale speciei căreia îi aparține. Acest proces realizează *similitudinea biologică* dintre părinți și descendenți.

Părinții nu transmit însă la copii caractere ci *informațiile* (conținute în genele din gameți) necesare pentru realizarea caracterelor. În acest context, *ereditatea este un proces informațional* care presupune stocarea, expresia și transmiterea informației ereditare, pentru realizarea caracterelor ale unui individ. *Ereditatea este deci o funcție*, esențială pentru viață.

a). **Acidul deoxiribonucleic (ADN)** este *substratul molecular al eredității*. Această macromoleculă, alcătuită din două catene polinucleotidice dispuse spațial sub forma unei duble spirale helicoidale ("elicea vieții"), îndeplinește trei roluri majore (figura 1.1):

- *ADN deține informația genetică codificată* pentru realizarea caracterelor specifice unui organism. Unitatea fundamentală de informație ereditară este **gena** - un segment de ADN care determină un anumit caracter. Modificarea structurii unei gene normale, numită **mutație**, produce o variantă genică ("alelă"), normală sau anormală.
- *ADN exprimă informația ereditară*, prin sinteza unor proteine specifice, care vor forma caracterele morfologice și funcționale ale organismului ("o genă → o proteină → un caracter") (figura 1.1.a).
- *ADN conservă informația ereditară* în succesiunea generațiilor de celule și organisme. Procesul se realizează prin *biosinteza* a două molecule noi și identice de ADN prin *replicare semiconservativă*, urmată de *distribuția* lor egală și totală, prin *diviziune celulară* (figura 1.1.b). Replicarea și diviziunea se efectuează cu mare precizie, asigurând fidelitatea de transmitere a informației; ele pot suferi totuși *erori*, care generează mutații.

b). **Aparatul genetic al celulei** cuprinde structurile celulare ce conțin ADN, *nucleul și mitocondriile*. Elementul principal al aparatului genetic este nucleul, centrul de comandă și control al majorității activităților celulare.

În **nucleul interfazic**, fiecare moleculă de ADN se asociază specific cu anumite proteine (histone) și formează, prin spiralizări și plieri succesive, **o fibră de cromatină**. La începutul diviziunii fibra de cromatină se condensează și formează un *cromosom*.

**Cromosomii** reprezintă *substratul morfologic al eredității*; ei sunt organite permanente ale nucleului dar vizibile numai în diviziune. *Numărul și forma cromosomilor sunt elemente caracteristice fiecărei specii*. La om, în celulele somatice sunt *46 de cromosomi* ( $2n =$  număr diploid); în celulele sexuale mature (gameți) numărul de cromosomi este redus, prin meioză, la *23 de cromosomi* ( $n =$  număr haploid). Termenul de *genom uman* este folosit, în prezent, pentru a descrie *totalitatea* informației genetice din celulele umane. El este alcătuit dintr-un

*genom nuclear* și un *genom mitocondrial*. Pentru a face distincția dintre genomul celulelor somatice și al gameților se mai folosesc termenii de *genom diploid* și *genom haploid*.

**Mitocondriile** conțin o mică parte din ADN celular (0.5%).

## 1.2. VARIABILITATEA

**Variabilitatea** reprezintă fenomenele care produc *diferențele genetice* dintre indivizii unei populații, precum și între populații diferite.

Sursele principale de variabilitate sunt *mutațiile*, *recombinările genetice* (care au loc în meioză, în timpul formării gameților) și *migrațiile* unor indivizi dintr-o populație în altă populație (după încrucișarea lor se produc modificări în structura genetică a descendenților). Datorită proceselor de variabilitate *fiecare individ are o structură genetică unică și caracteristică*..

## **2. GENETICA UMANĂ - DISCIPLINĂ FUNDAMENTALĂ, CLINICĂ ȘI MEDICO-SOCIALĂ.**

**Genetica umană studiază ereditatea și variabilitatea ființelor umane.** Ea este o știință fundamentală și aplicativă, care are un *rol major* în teoria și practica medicală.

a). **Genetica umană este o disciplină fundamentală** deoarece studiază *structurile, mecanismele și legile* de bază ale stocării, transmiterii și expresiei informației ereditare pentru formarea, dezvoltarea și funcționarea organismului uman. Genetica umană are un rol important pentru *baza conceptuală a medicinei* deoarece oferă o nouă perspectivă medicinei moderne, dominată de biologia moleculară a celulei, genetică și imunologie.

b). **Genetica umană este și o disciplină clinică** deoarece studiază relația dintre ereditate și boală sau, mai exact, *rolul mutațiilor în producerea bolilor sau predispoziției la boală*. Se cunosc peste 10.000 de *boli determinate sau condiționate genetic*, care *afectează 5-8% din nou-născuți*; ele au o mare *diversitate* și se regăsesc în aproape toate specialitățile medicale. **Genetica medicală** - ca parte a geneticii umane - este însă *o specialitate clinică distinctă* care se ocupă de diagnosticul și îngrijirea *pacienților* cu boli genetice precum și de *famiile* lor, prin sfat genetic, diagnostic prenatal, screening neonatal sau diagnostic presimptomatic. Genetica este domeniul de activitate al unor specialiști dar fiecare medic practician trebuie să folosească o **abordare (gândire) genetică** în relația sa cu pacientul și familia acestuia.

c). **Genetica umană / medicală este și o disciplină medico-socială** deoarece bolile genetice au devenit, în ultimii 20 de ani, "*probleme majore de sănătate publică*"<sup>1</sup> Ele sunt numeroase, în ansamblul lor frecvente (peste 5% nou născuți) și au deseori *consecințe grave pentru individul afectat și familia sa*. Datorită caracterului lor *cronic și invalidant*, bolile genetice influențează negativ morbiditatea și mortalitatea infantilă și necesită *cheltuieli medicale importante*; de aceea, bolile genetice sunt *o povară importantă pentru societate*; În aceste condiții eforturile specialiștilor și organizatorilor de sănătate publică trebuie să se finalizeze printr-un *sistem național de prevenire și depistare precoce a bolilor genetice*.

## **B. OMUL, EREDITATEA ȘI MEDIUL.**

### **1. INDIVIDUALITATEA GENETICĂ ȘI BIOLOGICĂ.**

#### 1.1. INDIVIDUALITATEA GENETICĂ.

---

<sup>1</sup> Pentru ca o boală sau un grup de boli să fie o "problemă de sănătate publică" trebuie să îndeplinească trei condiții: să aibe o frecvență mare, să necesite cheltuieli importante pentru îngrijirea bolnavilor și să poată fi prevenită eficient, prin programe speciale.



Fiecare ființă umană se formează dintr-o celulă inițială, **zigotul**, rezultat prin fecundarea gameților haploizi: nucleul spermatozoidului se unește cu cel al ovulului și formează nucleul zigotului, prima celulă a unei noi ființe. La zigot *se reface astfel numărul diploid de 46 de cromosomi*, caracteristic speciei umane, și se *stabilește sexul genetic: XX sau XY*. De fapt, se formează 23 perechi de **cromosomi omologi**, *identici* ca mărime, formă și conținut genetic dar *diferiți ca origine*, unul matern și altul patern. Rezultă că fiecare caracter este determinat *de o pereche de gene*, ce ocupă aceeași poziție (*locus*) în cromosomii omologi; ele se numesc **gene alele**.

Zigotul reunește în nucleu genele parentale din gameți într-o *combinație nouă, unică și constantă* denumită **individualitate genetică sau genotip**. Citoplasma zigotului este *exclusiv* de origine maternă. Deci, mitocondriile din zigot, care conțin ADN, și ulterior mitocondriile tuturor celulelor somatice *provin de la mamă*.

Cromosomii zigotului conțin în genele lor *informația ereditară* necesară pentru formarea caracterelor noului organism, precum și pentru **programul genetic** al dezvoltării sale viitoare: fiecare individ parcurge în cursul existenței sale biologice mai multe *etape succesive, obligatorii, diferite calitativ și precis definite în timp*, ce constituie **dezvoltare ontogenetică**.

## 1.2. INDIVIDUALITATEA BIOLOGICĂ.

Genetica modernă a demonstrat că **fiecare om este unic** atât prin structura sa genetică cât și prin mediul în care s-a dezvoltat în timp.

*Mediul* cuprinde totalitatea factorilor ecologici (naturali) și mai ales psihologici și socio-culturali, care acționează asupra omului, într-o anumită perioadă a dezvoltării sale ontogenetice. El determină unele caractere ale organismului și influențează realizarea caracterelor condiționate primar de *ereditate*.

Cele două "forțe" care participă la formarea caracterelor noastre se condiționează reciproc. *Ereditatea determină un potențial* pentru formarea unor caractere, care se finalizează variat, în funcție de condițiile specifice de mediu socio-economic și cultural în care se dezvoltă o anumită persoană. Rezultă deci că *unicitatea omului este bio-psiho-socială*.

*Ansamblul unic de caractere specifice, produse prin interacțiunea permanentă, dar în proporții diferite, dintre ereditate (genotip) și mediu se numește individualitate biologică sau fenotip*.

## 1.3. IMPORTANȚA CONCEPTULUI DE INDIVIDUALITATE GENETICĂ ȘI BIOLOGICĂ.

Analiza rolului eredității și mediului în determinismul caracterelor umane ne-a permis să precizăm două idei foarte importante: *unicitatea bio-psiho-socială* a fiecărei ființe și *interacțiunea permanentă, dar în proporții variate, a eredității și mediului* (între "înnăscut și dobândit") în geneza caracterelor umane, normale și patologice. Aceste idei de bază ale conceptului de individualitate biologică au influențe importante în gândirea și practica medicală. Dar conceptul în sine are aplicații și în alte sectoare ale activității umane: culturale, politice și sociale.

**In medicină**, individualitatea biologică a fiecărei persoane explică:

- *diferențele de răspuns* ale fiecărui organism la agresiunile mediului și, deci, *vulnerabilitatea diferită* a oamenilor la îmbolnăvire;
- *determinismul bolilor comune*, prin interacțiunea dintre structura genetică a unui individ (ce determină o anumită predispoziție la boală) și factorii agresivi din mediu;
- *manifestările variabile și gravitatea diferită* ale aceleiași boli la pacienți diferiți;
- *răspunsul diferit, particular, la același tratament* aplicat unor bolnavi diferiți, suferind de

aceeași boală<sup>2</sup>. *"Nu există tratamente general valabile pentru o boală ci terapii adaptate la bolnavi"*, în funcție de capacitatea lor de metabolizare a unui medicament.

Aforismul mai vechi **"nu există boli ci numai bolnavi"** capătă astfel o explicație corectă, eminent genetică, și determină acțiuni precise și *individualizate* în diagnosticul și tratamentul bolnavilor și, mai ales, în profilaxia bolilor. În acest ultim domeniu, se ajunge la o *prevenție personalizată și la o medicină predictivă*: în funcție de expresia unor elemente ale structurii genetice individuale, moștenită de la părinți, se va putea stabili *ce riscuri de îmbolnăvire are o anumită persoană*. Toate aceste elemente au influențe importante și în planul eticii medicale.

**In viața socială, diversitatea genetică și socio-culturală a indivizilor** este o premiză valoroasă de integrare, armonizare și progres social. *Oamenii sunt diferiți și aceasta le permite să aibă fiecare un rol social util și să se completeze armonios în societate*. Diferiți nu înseamnă însă și inegali. *"Egalitatea este un concept moral care a fost inventat tocmai pentru că ființele umane nu sunt identice"* (F.Jacob). Genele nu sunt egale sau inegale ci pur și simplu diferite, determinând calități și aptitudini diferite. Diversitatea este cel mai valoros capital al speciei umane.

Mediul socio-cultural și educațional adecvat este deosebit de important în realizarea potențialului genetic individual (vezi *Caseta 1.1*). *"Spiritul și cultura îi permit omului să nu fie total dependent de moștenirea sa ereditară, dobîndindu-și adevărata libertate de ființă bio-psiho-socială"* (Wilson). În acest context exagerarea rolului factorilor genetici, de către așa numita **socio-biologie**, considerându-se că structura genetică cu care s-a născut un individ va determina (ca un destin implacabil) tot ce va face el în cursul vieții, precum și fundamentarea inegalităților sociale pe baza așa-zisei inegalități genetice a oamenilor sunt idei absurde și periculoase.

### **CASETA 1.1.**

#### **Individualitatea bio-psiho-socială.**

*Fiecare ființă umană este unică datorită structurii sale genetice și mediului în care a trăit. Factorii de mediu socio-economici și psiho-culturali au o pondere importantă în formarea individualității noastre bio-psiho-sociale. Ea determină cel puțin două consecințe majore în viața socială.*

- *Metodele educaționale în familie și școală trebuie reevaluate. Mediul familial în care cresc copiii trebuie să fie în primul rând cultural. Pentru dezvoltarea lor intelectuală părinții trebuie să le ofere copiilor cultură. S-a constatat că în condiții relativ identice de mediu social, diferențele de inteligență (Q.I.) dintre copii se corelează semnificativ cu ocupația părinților și gradul de cultură al familiei. Devine evident că nivelul cultural scăzut al unor părinți sau declinarea obligațiilor educaționale pe seama școlii, au efecte negative asupra dezvoltării copiilor. În școală, învățământul ar trebui diferențiat în funcție de posibilitățile, calitățile și aptitudinile elevilor. Uniformizarea metodelor educaționale - generează inegalități individuale.*
- *Capacitățile și aptitudinile individuale trebuie folosite adecvat, după formula "omul potrivit la locul potrivit", deoarece fiecare om poate fi valoros într-un anumit domeniu. Aceasta presupune selecția, formarea și promovarea valorilor, înțelegînd prin "valori" orice calități deosebite, utile societății. "Curajul de a recepționa valoarea și de a sprijini direct afirmarea ei este o demonstrație de mare și adevărat patriotism" (M. Malița).*

## **2. DETERMINISMUL CARACTERELOR FENOTIPICE.**

Caracterele fenotipice normale sau anormale ale organismului sunt produse prin

<sup>2</sup> Recent s-a demonstrat că diferiți bolnavi cu hipertensiune arterială esențială răspund diferit la medicamentele de bază folosite în această afecțiune: beta-blocanți, inhibitori ACE și blocanți de canale de calciu. Necesitatea unei *terapii individualizate* devine astfel evidentă.

acțiunea eredității (genotipului) și mediului. În funcție de ponderea celor doi factori cauzali se pot deosebi teoretic trei categorii de caractere (figura 1.2): caractere pur ereditare; caractere determinate de interacțiunea ereditate - mediu; caractere pur ecologice (neereditare).

### 2.1. CARACTERE FENOTIPICE PUR EREDITARE.

Caracterele pur ereditare sunt *determinate exclusiv de structura genetică*, normală sau modificată, a unui individ, deci de către genotip. Caracterele pur ereditare sunt de trei feluri: caractere de specie, caractere ereditare normale, caractere anormale / boli genetice.

a). **Caracterele de specie** sunt *strict genetice*: fiecare specie are o anumită structură genetică, ordonată într-un *set fix și caracteristic de cromosomi*, cu o anumită morfologie. Această configurație specifică realizează o "barieră" reproductivă între specii.

b). **Caracterele ereditare normale** sunt determinate *monogenic și transmise mendelian*. Ele sunt reprezentate de diferite *sisteme grupale*: grupele sanguine (ABO, Rh, MN, etc.), serice (haptoglobine, transferine, ș.a.), enzimatic (fosfatază acidă, etc.) și tisulare (antigenele HLA).

Marea majoritate a acestor sisteme sunt *polimorfice*, găsindu-se în populație în mai multe variante (de ex., grupele A, B, AB și O pentru sistemul ABO); un individ posedă însă numai *o anumită variantă* dintr-un sistem. Datorită numărului mare de sisteme polimorfice (>30) și de variante în fiecare sistem, *un individ posedă o combinație specifică de variante, este un unicat biologic!!!*

Acest lucru poate fi demonstrat parțial și indirect în felul următor: să presupunem că o persoană X prezintă variantele cele mai comune în populație pentru 30 de caractere [O, Rh+, MN, Se, Le, ... pentru grupele sanguine; Gm-1, Hp 2.1, C3 ... pentru proteinele serice; PA-c, AK-11, PGM 1 pentru enzime; HLA: A1 A3, B7 B8... pentru grupele tisulare]. Probabilitatea de a întâlni o altă persoană identică, cu aceeași configurație de variante, este egală cu produsul frecvențelor populaționale ale fiecărui caracter; rezultatul este edificator 1 : 700.000.000.

Studiul caracterelor ereditare normale are *importanță teoretică* pentru localizarea (cartografierea) genelor pe cromosomi și explicarea unor fenomene genetice (inclusiv a transmiterii mendeliene) dar, mai ales, o *valoare practică* deosebită în: identificarea persoanelor, expertiza paternității și filiației, transfuzii și transplantate, diagnosticul diferențial al gemenilor monoziigoți (MZ) și dizigoți (DZ), identificarea persoanelor vulnerabile la diferite îmbolnăviri,

c). **Caracterele ereditare anormale** sunt prezente *numai la unii indivizi*. Ele sunt produse de *mutații* și reprezentate de bolile cromosomice, bolile monogenice și bolile mitocondriale.

- **Bolile cromosomice** sunt produse de *adiția (trisomie) sau pierderea (monosomie) unui cromosom întreg sau a unei părți din cromosom*; de ex., sindromul Down (trisomia 21) sau sindromul Turner (monosomia X).
- **Bolile monogenice** sunt produse de *mutația unei gene (din genomul nuclear) cu efect major*, care determină boala prin anomalii ale unor proteine de structură (hemoglobină, colagen, factori de coagulare, etc.) sau enzime (erori înnăscute de metabolism etc.). Aceste mutații se *transmit* în succesiunea generațiilor după tipul mendelian<sup>3</sup>: autosomal dominant (de ex., *hipercolesterolemie familială*), autosomal recesiv (de ex. *fibroza chistică*) sau legat de X (de ex. *hemofilia*). Cu toate că sunt "pur" genetice, manifestarea unora din aceste boli poate fi influențată *pozitiv prin intervenție medicală*, deci de anumite condiții de mediu.

De exemplu: **Fenilcetonuria** (PCU) este o boală ereditară (OMIM # 261600) care evoluează spre retard mintal sever; ea poate fi prevenită prin depistarea la naștere a bolnavilor și folosirea unui regim dietetic fără fenilalanină; ambele acțiuni medicale influențează manifestarea acestei boli genetice și purtătorii mutației pot fi normali, în anumite condiții de mediu.

<sup>3</sup> Despre transmiterea monogenică, mendeliană, a caracterelor normale și bolilor monogenice vom discuta mai târziu, în capitolul 5. Aici vom preciza doar că există un catalog al tuturor bolilor monogenice (OMIM – On line Mendelian Inheritance of Man) în care fiecare afecțiune este de înregistrată print-un număr de cod.

- **Bolile mitocondriale** sunt un tip particular de boli monogenice produse de mutații în *genomul mitocondrial*, care afectează producerea de energie în mușchi și nervi; ele au un rol important în îmbătrânirea celulară. Bolile mitocondriale se moștenesc într-un mod particular: *de la mamă la toți copiii, dar băieții afectați nu transmit boala.*

## 2.2. CARACTERE DETERMINATE DE INTERACȚIUNEA EREDITATE - MEDIU

Numeroase caractere fenotipice, normale sau anormale, sunt produse de *interacțiunea*, în proporții diferite, dintre ereditate și mediu (figura 1.2). De aceea aceste caractere sunt numite **caractere multifactoriale**.

a). **Caracterele multifactoriale normale** sunt determinate de *interacțiunea* variabilă dintre ereditate și mediu; ex.: talia, greutatea, tensiunea arterială, inteligența, etc. În realizarea acestor caractere multifactoriale *ereditatea determină o parte din caracter*, mai mare sau mai mică (denumită **heritabilitate**), precum și *limita superioară* sau **potențialul genetic** până la care poate fi dezvoltat acel caracter, în cele mai favorabile condiții de mediu (figura 1.3). Mediul produce *o altă parte* din caracter și determină sau nu *atingerea* limitei superioare sau *realizarea potențialului genetic* individual.

De exemplu: talia - este condiționată genetic în proporție de 67% . Fiecare individ are o "*limită superioară*" determinată genetic, până la care poate crește și pe care *nu o poate depăși*. Ea este o caracteristică *familială*, fiind determinată de talia părinților și condițiile în care crește copilul. Atingerea acestei limite depinde de mediul de viață al individului. Așa se explică faptul ca gemenii monozigoti (care au o ereditate identică), crescuți în medii diferite vor avea înălțimi diferite, iar populații genetic diferite ce trăiesc în același mediu vor avea talii diferite.

Ereditatea nu determină deci un caracter unic ci *un șir de capacități fenotipice* numit "**normă de reacție**" a individului la mediu sau potențial genetic. De aceea, Aristotel avea dreptate spunând că "*... natura omului nu este cea cu care s-a născut ci aceea pe care el o poate dezvolta*". Potențialul nostru genetic ne permite să ne *adaptăm* la cele mai variate condiții de mediu, dar, firește, nu putem depăși anumite limite. În condiții obișnuite nici nu există un asemenea risc; *există însă pericolul de a folosi incomplet, subliminal, potențialul genetic al organismului.*

b). **Caractere multifactoriale anormale** sunt reprezentate de *anomaliile congenitale* izolate (de ex., malformațiile congenitale de cord, spina bifida, despiciăturile labio-maxilo-palatine etc) și de numeroase *boli comune ale adultului* (hipertensiunea arterială esențială, boala coronariană, diabetul zaharat, ulcerul gastric / duodenal, unele cancere, etc.)

În producerea acestor boli factorii ereditari (reprezențați de obicei prin mai multe gene) și factorii de mediu *interacționează* permanent și complex. Deaceia, aceste afecțiuni au un determinism etiologic (cauzal) complex și se numesc **boli multifactoriale** ( $\geq 5\%$  din populație). Ele pot avea o *distribuție familială* dar NU se transmit mendelian (!). De cele mai multe ori, factorii genetici realizează o **predispoziție genetică**, o *vulnerabilitate* individuală la îmbolnăvire. Bineînțeles, nu toți indivizii predispuși se îmbolnăvesc deoarece este necesară și intervenția factorilor de mediu care transformă predispoziția în boală (figura 1.4). Boala apare deci prin *interacțiunea* obligatorie dintre ereditate și mediu (PG+M=B).

Astfel, persoanele cu *grupa sanguină O și nesecretori* (deoarece nu elimină antigenele de grup sanguin prin secreții) fac mai frecvent *ulcer duodenal*, dar sunt mai rezistenți la infecțiile virale. Indivizii "*negustători*" (care nu simt gustul amar al unor substanțe) se îmbolnăvesc mai des de gușă nodulară decât cei "*gustători*", dacă consumă substanțe naturale antitiroidiene (care au gust amar). Indivizii cu *Hp2-2* au un risc crescut de boală coronariană. Riscul relativ al persoanelor care posedă antigenul *HLA B27* de a face boli reumatismale cronice este de 120 ori mai mare decât cei care nu au acest antigen.

Identificarea *factorilor* care determină predispoziția genetică la îmbolnăvire, precum și a *persoanelor* genetic predispușe, reprezintă modalități importante pentru **profilaxia** bolilor comune ale adultului, prin *descoperirea și evitarea factorilor de mediu care transformă predispoziția în boală*. Deoarece *genele ce determină boala sau predispoziția la boală se transmit în familie*, se poate spune că "*nu există boli ci ...familii de bolnavi*". Acest fapt este

deosebit de important în practica medicală întrucât *extinde obligatoriu atribuțiile medicului* de la bolnav la familia lui.

**c) Bolile prin mutații somatice** sunt produse prin efectul cumulativ al unor *mutații somatice succesive, în gene diferite*, unele determinate de factori de mediu, altele prin erori de replicare a ADN. Ex. marea majoritate a cancerelor, multe boli autoimune și procesul de îmbătrânire. Aceste boli se produc *după concepție*, sunt *limitate la celulele somatice* și deci *NU se transmit la descendenți*; într-un procent mic de cazuri o mutație inițială (importantă dar nu suficientă pentru producerea bolii) se poate moșteni de la unul din părinți, producând o predispoziție genetică la boală (ex., mutația genei BRCA1 în cancerul de sân familial).

### 2.3. CARACTERE FENOTIPICE DETERMINATE DE MEDIU.

**a). Caractere "ecologice".** *Mediul extern* este reprezentat de diferiți agenți fizici, chimici sau biologici care pot produce deseori îmbolnăviri: arsuri, traumatisme, boli de iradiere, intoxicații, infecții. Aceste boli sunt *aparent negenetic*.

Dar, foarte probabil exceptând accidentele, *efectele agresiunilor exogene asupra organismului sunt influențate de structura genetică, specifică fiecărei persoane*. Genotipul individual determină *o eficiență diferită* a mecanismelor de apărare imună sau de metabolizare a unor substanțe, deci *un mod specific de răspuns la agresiuni*, influențând apariția, manifestarea și gravitatea îmbolnăvirilor. Datorită acestei *influențe genetice* se consideră că aproape nu există caractere "pur" ecologice.

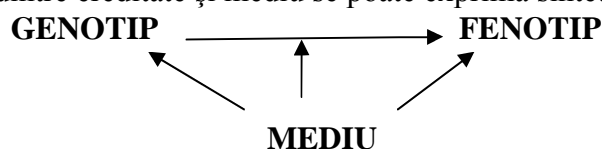
Astfel, în *infecții* s-a constatat, din cele mai vechi timpuri, că în diferite epidemii nu se îmbolnăvesc *toți* cei care vin în contact cu microorganismele patogene și că gravitatea bolii *variază* de la un individ la altul. Astăzi se știe că vulnerabilitatea sau rezistența la infecții este determinată de constituția genetică a fiecărei persoane și, în special, de structura proprie de antigene HLA, "*sistemul de supraveghere, alarmă și apărare imunologică a organismului*" (vezi cap.8). Unele combinații (de ex.: A1 - B8 - DR3) produc un răspuns umoral puternic și cei care le posedă sunt mai bine protejați de acțiunea microorganismelor patogene, dar pot face boli autoimune; alte combinații (de ex.: A3 - B7 - DR2) dau un răspuns mult mai slab. Ce genială previziune a avut Claude Bernard afirmând, la sfârșitul secolului 19: "*microbul nu-i nimic, terenul este totul*".

**b). Ecogenetică și farmacogenetică.** Studiul *variațiilor individuale determinate genetic* la acțiunea factorilor externi se realizează astăzi de o ramură a geneticii umane numită **ecogenetică**. De ex. *alergenii* induc astm la persoanele susceptibile (atopie); *laptele* sau *alcoolul* nu sunt tolerate de persoanele cu deficiențe în lactază și, respectiv, alcooldehidrogenază..

- Ecogenetica include și **farmacogenetica** care studiază *diferențele genetice individuale* în răspunsul organismelor la acțiunea medicamentelor. Această problemă va fi discutată pe larg în **capitolul 8**, aici vom aminti un singur exemplu: *deficiența în glucoză-6-fosfat dehidrogenază (G6PD)* a globulului roșu (boală recesivă legată de X)(OMIM # 305900). Persoanele cu această deficiență nu prezintă obișnuit nici o manifestare clinică; după expunerea la anumite medicamente (antimalarice, furazolidon etc), substanțe chimice (naftalen), consumul alimentar de bob (*Vicia Fava*) sau infecții; ele dezvoltă o anemie hemolitică acută.
- Numeroase observații au demonstrat că "*nu există tratamente general valabile pentru o boală ci terapii adaptate la bolnavi*", în funcție de capacitatea lor de metabolizare a unui medicament.

### **3. RELATIA GENOTIP → FENOTIP ← MEDIU.**

Interacțiunea dintre ereditate și mediu se poate exprima sintetic prin relația:



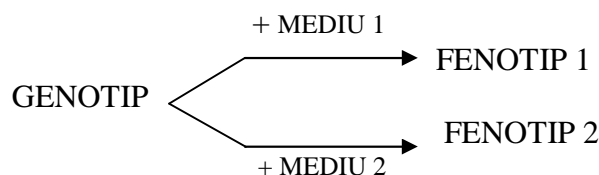
Reamintim că prin *genotip* se înțelege structura genetică unică și caracteristică unui individ, care se stabilește în momentul fecundării și rămâne *stabilă* în cursul dezvoltării. Prin termenul de *fenotip* se definește totalitatea caracterelor manifeste și specifice ale unui organism determinate de interacțiunea genotipului cu mediul în care trăiește acel organism. Dependent de ereditate și mediu *fenotipul este variabil*, se poate schimba.

### 3.1. RELAȚIA GENOTIP → FENOTIP.

Relația genotip → fenotip<sup>4</sup> este o relație *cauzală*, dar *nu este totală* deoarece unele gene (*recessive*) nu se manifestă fenotipic, iar o parte din caracterele fenotipice sunt produse de mediu. Caracterele fenotipice determinate de genotip sunt *caractere pur ereditare* (ex.: grupele sanguine, serice, enzimatică, tisulare).

Relația genotip → fenotip este însă mult mai *complexă*. Fără a intra în detalii (pe care le vom discuta ulterior) vom menționa succint trei fenomene: heterogenitatea genetică, o genă-mai multe boli și norma de reacție.

- **Heterogenitatea genetică** este fenomenul prin care genotipuri diferite se pot manifesta fenotipic identic. De ex: mutații în genele pentru factorii VIII și IX ai coagulării, gene situate în loci diferiți pe cromosomul X, se manifestă clinic asemănător, prin hemoragii importante la traumatisme minime (datorită perturbării coagulării); aceste două mutații diferite produc **hemofiliile** A și B. Conceptul de heterogenitate genetică are o deosebită *importanță practică* pentru realizarea unui diagnostic etiologic (cauzal) precis al unor boli diferite cu manifestare identică; pe această bază se va putea face un tratament eficient (adecvat cauzei) și se va realiza o evaluare corectă a riscului de recurență, prin sfatul genetic.
- **O genă, mai multe boli.** Mutații diferite în aceeași genă pot produce boli diferite. De ex., mutații variate în gena β-globinei produc *drepanocitoză*, *β-talasemie*, *methemoglobinemie*. Un alt exemplu: mutații diferite în gena *RET* produc o formă familială de cancer medular a tiroidei (izolată sau asociată sindroamelor MEN2A și MEN2B; MEN - de la *Multiple Endocrine Neoplasia*) precum și megacolonul congenital (boala Hirschprung)
- **Norma de reacție** (potențialul genetic) se caracterizează prin faptul că un genotip nu determină întotdeauna un anumit fenotip; datorită interacțiunii cu alte gene și cu mediul, un același genotip poate determina fenotipuri diferite sau, mai exact, variații de manifestare ale aceluiași caracter. De aceea se consideră că genotipul determină un potențial fenotipic sau o normă de reacție la mediu. "*Genotipul este 'partitura', iar fenotipul este 'simfonia' pe care noi o auzim, marcată de personalitatea șefului de orchestră, minunată sau fără strălucire, după calitățile executanților*" (A.Jaquard).



Potențialul genetic realizat diferit în funcție de mediu explică "*variațiile în expresia unor gene*", de tipul penetranță, expresivitate etc. (vezi cap. 5).

### 3.2. RELAȚIA MEDIU → FENOTIP.

Relația mediu → fenotip este o *relație cauzală*, dar caracterele fenotipice produse de mediu (numite și "modificații") sunt *neereditare*. Ele sunt cel mai adesea caractere anormale sau boli produse de agenți fizici, chimici sau biologici: arsuri, traumatisme, intoxicații, avitaminoze și mai ales infecții. Dar, așa cum am mai precizat, exceptând accidentele, efectele agresiunilor mediului asupra organismului sunt influențate de structura sa genetică specifică.

<sup>4</sup> Relația genotip → fenotip se poate aplica și în sens restrâns: "o gena → un caracter".

Uneori caracterele fenotipice produse de mediu *se manifestă identic* sau foarte asemănător cu caracterele fenotipice produse de genotip. De ex., *microcefalia*<sup>5</sup> poate fi produsă de o infecție fetală sau de o mutație genică. Diferențierea cauzală în aceste cazuri, cunoscute sub numele de **fenocopii**, este foarte importantă în evaluarea riscului de recurență la sarcinile următoare: în primul caz (microcefalia produsă de factorii de mediu) riscul de recurență este practic nul dacă se evita o nouă agresiune; în al doilea caz, riscul este mare și depinde de tipul mutației.

### 3.3. RELAȚIA MEDIU → GENOTIP

Mediul poate acționa direct asupra genotipului producând modificări ale materialului genetic sau **mutații**. Ele pot afecta structura genei sau a cromosomilor și pot avea consecințe variate: unele modificări generează fenotipuri mutante anormale, altele determină variantele polimorfice populaționale pe care le prezintă un caracter.

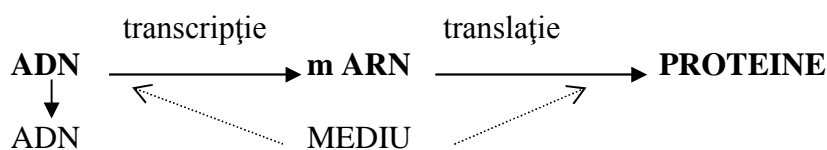
### 3.4. RELAȚIA GENOTIP → FENOTIP ← MEDIU LA NIVEL MOLECULAR.

Relația dintre genotip și fenotip își dezvăluie întreaga sa semnificație atunci când este analizată la nivel molecular. Termenul de genotip poate fi substituit prin însăși substratul material al genelor: molecula de ADN. Caracterele fenotipice sunt determinate de proteine structurale (colagen, oseină, elastină, hemoglobină, ș.a) sau enzime. În acest fel relația genotip → fenotip devine: ADN → PROTEINE și se traduce prin ideea fundamentală că ADN deține și exprimă informația necesară pentru sinteza proteinelor, ce constituie suportul biochimic al caracterelor ereditare ale organismului.

Relația ADN → PROTEINE se poate nuanța și completa dacă ținem cont de următoarele elemente:

- expresia informației ereditare *nu se face direct*; ea este copiată prin procesul de *transcripție* într-o moleculă de ARNm, care trece în citoplasmă, unde are loc sinteza proteinei (*translație*);
- informația genetică din molecula de ADN se poate transmite (conserva) în succesiunea generațiilor, prin *replicare semiconservativă*, formându-se molecule de ADN identice;
- fiecare element și etapă a relației poate fi *influențată de mediu*.

Pe baza acestor date, relația ADN → PROTEINE poate fi "reformulată". Obținem astfel o nouă relație, denumită frecvent **dogma centrală sau fundamentală a geneticii**.



## **4. OMUL - SUBIECT DE STUDIU AL GENETICII UMANE**

a). **Dezavantaje.** În comparație cu alte organisme, ființa umană pare, la prima vedere, un "material" de studiu genetic care prezintă suficiente *inconveniente*: diversitatea genetică a indivizilor, mare și necontrolată; dificultatea studiilor genealogice; numărul mic al subiecților observați; dispersia geografică etc; în plus, nu se pot face experiențe genetice pe om.

b). **Avantaje.** În realitate omul a devenit rapid un *subiect important* pentru cercetările genetice deoarece este *ființa cea mai bine studiată*. Sunt disponibile pentru cercetări populații mari, în care se pot analiza numeroase și variate tipuri de mutații, veritabile "experimente" ale naturii. Prin folosirea unor metode adecvate, inclusiv a unor tehnici noi de culturi celulare și analiză moleculară, pot fi depășite dificultățile inerente ale studiilor familiale. Se poate

<sup>5</sup>Reducerea perimetrului cranian sub -2 DS (deviații standard) însoțită de retard mintal

conchide fără rezerve ca omul reprezintă un subiect deosebit de interesant pentru studiile genetice.

## C. ISTORIA GENETICII UMANE

Relația dintre genetică și medicină trebuie analizată dintr-o *perspectivă istorică*, urmărind modul în care *evoluția geneticii a interferat și influențat în timp evoluția medicinei*, ajungând la stadiul actual de "medicină moleculară". Interacțiunea dintre medicină și genetică a fost permanentă, bidirecțională și foarte productivă, mai ales în ultimele decenii. Vom prezenta în mod succint și schematic principalele etape și evenimente din evoluția geneticii umane.

### 3. ETAPA PREȘTIINȚIFICĂ (→ 1865).

În această etapă s-au realizat numeroase observații corecte privind *agregarea familială și transmiterea ereditară a unor boli* (hemofilie, polidactilie, albinism); numeroase interpretări erau însă eronate. Se caracterizează prin lipsa cunoștințelor privind procesele de bază (concepție, reproducere etc), *eludarea analizei și absența unei teorii generale*, convingătoare, care să explice fenomenele ereditare.

### 2. ETAPA FUNDAMENTĂRII GENETICII CA ȘTIINȚĂ ȘI INTRODUCERII SALE ÎN MEDICINĂ (1865→1960).

Fundamentarea geneticii ca știință a fost făcută de către **Gregor Mendel** (1865), care introduce **conceptul genei** și formulează **legile eredității**. La începutul secolului XX, prin contribuția mai multor cercetători dar mai ales a lui **T.H.Morgan** (primul premiu Nobel pentru genetică) se formulează **teoria cromosomică a eredității**. Apar primele studii de *genetică în medicină*: **F. Galton** (1890) analizează unele caractere umane complexe, "cantitative" (talie, inteligența), introduce conceptul interacțiunii dintre ereditate și mediu, inițiază studiul gemenilor și dermatoglifelor; **A. Garrod** (1902) introduce mendelismul în medicină prin studiul primelor "*erori înăscute de metabolism*" (alcaptonuria, albinismul, cistinuria și pentozuria) precum și ideea "*individualității biochimice*", prin care explică răspunsurile diferite la droguri și infecții ale unor persoane diferite.

În deceniile cinci și șase începe *era geneticii moleculare*, prin demonstrarea rolului genetic al ADN (Avery et al. 1944) și descoperirea modelului structurii ADN (Watson și Crick, 1953).

Apariția **geneticii medicale** a fost determinată de două descoperiri remarcabile: L. Pauling (1949) demonstrează că o boală ereditară, anemia hemolitică cu hematii în seceră (sickleemia sau drepanocitoza) este produsă de o hemoglobină anormală (Hb S), care se deosebește de Hb A prin înlocuirea unui singur aminoacid; sickleemia devine *prima boală moleculară* identificată la om; J. Lejeune (1959) descoperă *prima anomalie cromosomică* la om, trisomia 21, în sindromul Down.

### 3. DEZVOLTAREA GENETICII MEDICALE (1960→1970).

În această scurtă perioadă ("*deceniul de aur*") se acumulează numeroase dovezi privind *rolul important al factorilor genetici în producerea bolilor umane*. Concomitent cu reducerea marcată a frecvenței bolilor infecțioase și nutriționale, a devenit evident că bolile genetice sau condiționate genetic reprezintă, cel puțin în țările dezvoltate, *o cauză majoră de morbiditate și mortalitate, o problemă de sănătate publică*.

S-au amplificat *aplicațiile practice ale geneticii medicale*, care capătă o pondere tot mai importantă în *practica medicală*; dintre acestea menționăm: perfecționarea diagnosticului



*bolilor metabolice și a depistării sistematice la nou născuți a unor boli frecvente și tratabile (fenilcetonuria, hipotiroidia congenitală); ameliorarea tehnicilor de analiză cromosomică, prin metode noi de marcaj în benzi, care permit identificarea precisă a unor anomalii structurale minime; dezvoltarea sfatului genetic (evaluarea riscului de apariție a unor boli genetice în familii); introducerea și amplificarea diagnosticului prenatal; optimizarea tratamentului simptomatic și patogenetic în diferite boli genetice, care încetează să mai fie "fără speranțe terapeutice".*

#### 4. NOUA GENETICĂ UMANĂ ȘI MEDICINĂ MOLECULARĂ (1980 → )

##### a). **Revoluția metodologică a geneticii moleculare**

Până în anul 1970 genele erau entități virtuale, inaccesibile analizei biochimice. La începutul deceniului opt se descoperă tehnici performante de *analiză directă a ADN, a genei*. Ele au permis: identificarea și localizarea unor gene; izolarea și clonarea lor; descifrarea "mesajului" genelor (prin secvențializarea ADN) și, eventual, expresia lor în diferite celule "gazdă", în care se obțin proteinele codificate de genă. Aceste tehnici de "manipulare genetică" sau "**ADN recombinant**" reprezintă o veritabilă "*inginerie genetică*".

Genetica iese din cadrul său abstract și începe o nouă eră a geneticii moleculare. Ea produce o veritabilă revoluție în biologie, deoarece deschide calea înțelegerii marilor enigme: originea vieții, evoluția, speciația, diferențierea celulară și morfogeneza, senescența, organizarea și funcționarea sistemului nervos și imun, cancerul etc. Inițial noile metodologii ale geneticii moleculare au fost receptate de către lumea științifică cu justificată teamă, atribuindu-li-se pericolul unor consecințe nefaste și necontrolabile. Rezervele s-au dovedit ulterior puțin justificate și, treptat, "ingineria genetică", simplificându-și procedurile inițiale și crescându-și gradul de accesibilitate, a "invadat" toate sectoarele biologiei și în special medicina.

Deși au trecut doar 15-20 ani de la introducerea noilor tehnologii de studiu direct al genei, aceste descoperiri, recompensate cu numeroase premii Nobel, au generat *consecințe majore pentru genetica umană dar mai ales pentru teoria și practica medicală* (tabelul 1.1)

##### b). **Noua genetică umană și medicina moleculară.**

Cu ajutorul tehnicilor de analiză moleculară a început descifrarea și cartografierea genomului uman. Până în prezent au fost identificate și localizate pe cromosomii umani peste 10000 de gene normale și mutante. S-au studiat efectele unor gene "importante" în fiziologia și patologia umană: genele pentru imunoglobuline, interferoni, factori de creștere, receptori hormonal, lipoproteine, collagen, oncogene, etc.

În anul 1980 s-a inițiat "**Proiectul genom uman**", unul din cele mai ample și ambițioase programe de cercetare medicală; în februarie 2001 s-a finalizat schita secvenței întregului genom uman și se estimează că până în anul 2005 toate cele circa 30.000-40.000 de gene fi identificate și analizate.

Anatomia și fiziologia, normală și patologică a genomului uman determină o abordare moleculară a tuturor problemelor de genetică medicală; deoarece ea este atât de diferită de abordările anterioare a fost numită "*noua genetică umană*".

Restructurându-și elementele sale fundamentale, prin introducerea *anatomiei și fiziologiei genomice*, medicina anilor '90 devine o *medicină moleculară*. Eforturile și realizările cele mai mari s-au făcut în domeniul *elucidării mecanismelor moleculare de producere a bolilor*. Afecțiunile genetice au fost, firește, primul beneficiar al aplicării noilor tehnici de analiză moleculară. În ultimii ani se constată însă o extensie a câmpului de acțiune al analizei patogeniei moleculare la *bolile comune*: cancerul, boala coronariană, diabetul zaharat, hipertensiunea arterială, etc încercându-se descoperirea genelor implicate în predispoziția la boală. Pe baza cunoașterii mecanismelor moleculare s-au introdus noi metode de diagnostic și tratament, care se adresează *moleculelor implicate în procesele patologice*. În acest context, rolul geneticii medicale devine din ce în ce mai important.

**Tabelul 1.1 Lista laureaților Premiilor Nobel pentru descoperiri în domeniul geneticii**

ANUL	LAUREAȚI	DESCOPERIRE
1933	Thomas Hunt Morgan	
1946	H J Muller	
1958	G W Beadle, E L Tatum, J Lederberg	
1959	S Ochoa, A Kornberg	
1962	Francis Crick, James Watson, Maurice Wilkins	Structura moleculară a ADN
1965	Francois Jacob, Jacques Monod, Andre Kwoff	Reglarea genetică
1968	Robert Holley, Gobind Khorana, Marshall Nirenberg	Descifrarea codului genetic
1975	Renato Dulbecco, Howard Temin, David Baltimore	Interacțiunea dintre virusurile tumorale și ADN nuclear
1978	William Arber, Daniel Nathans, Hamilton Smith	Endonucleazele de restricție
1980	Baruj Bernacerraf, George Snell, Jean Dausset	Controlul genetic al răspunsului imun
1980 (chimie)	F Sanger, Paul Berg, W Gilbert	
1983	Barbara McClintock	Genele mobile (transposonii)
1985	Michael Brown, Joseph Goldstein	Receptorii celulari în hipercolesterolemia familială
1987	Tonegawa Susumu	Aspectele genetice ale anticorpilor
1989	Michael Bishop, Harold Varmus	Studiul oncogenelor
1993	Richard Roberts, Philip Sharp	Structura discontinuă a genelor
1993 Chimie	K B Mullis, M Smith	
1995	Edward Lewis, Christiane Nusslein-Volhard, Eric Wieschaus	Genele homeotice și alte gene implicate în dezvoltare

## D. IMPORTANȚA GENETICII ÎN MEDICINA MODERNĂ

### 1. BOLILE GENETICE

Bolile genetice erau considerate rarități cu care practicianul se întâlnea întâmplător în cursul activității sale. Pe măsură ce tehnologiile de studiu și cunoștințele de genetică au progresat iar frecvența bolilor negenetice (cauzate de malnutriție, infecții, ș.a.) a diminuat spectaculos, a devenit evident impactul masiv al patologiei genetice în practica medicinei moderne.

**Bolile genetice sunt numeroase;** se cunosc peste 10.000 de boli determinate sau condiționate genetic; ele au o mare diversitate, se manifestă la orice vârstă, orice sistem de organe și de aceea se regăsesc în aproape toate specialitățile medicale. **Bolile genetice sunt frecvente;** ele afectează cel puțin 5-8% din nou-născuți (1 din 20) și probabil 30– 40 % de indivizi în tot cursul vieții (tabelul 1.2)

**Tabelul 1.2 Incidența<sup>6</sup> bolilor genetice**  
(modificat după Connor & Ferguson-Smith, 1997 și Jorde et al. 2000)

Tipuri majore de boli genetice	Număr de subtipuri	Incidența la 1000 nou-născuți vii
<b>Boli cromosomice</b> (ex.: sindrom Down)	> 600	6 - 9
<b>Boli monogenice (mendeliene)</b>		24
– Autosomal dominante (ex.: boala polichistică renală a adultului = ADPKD;	} 8544*	20
– Autosomal recesive (ex., fibroza chistică)		2
– Legate de X (ex.: hemofilia; daltonismul)	527*	2
<b>Boli mitocondriale</b>	60	Rare
<b>Boli multifactoriale</b> (debut înainte de 25 ani)		20 - 50
– Malformații congenitale majore (ex., spina bifida, DSV, despicăturile labio-maxilo-palatine)	>50	
– Boli comune ale adultului (ex.: hipertensiunea arterială, diabetul zaharat, boala ulceroasă, schizofrenia)	>50	
<b>Total (înainte de 25 ani)</b>		<b>50 - 83</b>
<b>Boli genetice ale celulelor somatice<sup>#</sup></b>	>100	250
<b>Total</b>		<b>300 - 383</b>

\* După OMIM (1998).

# Acest tip de boli apar după naștere, la circa 25% adulți.

**Bolile genetice au o contribuție majoră la mortalitatea infantilă și morbiditate.** Acum mai puțin de un secol bolile produse de cauze negenetice (malnutriție, infecții, condiții insalubre etc) produceau majoritatea deceselor la copil; în sec. XX sănătatea publică s-a îmbunătățit și ca rezultat mortalitatea infantilă s-a redus iar *bolile genetice au devenit o cauză majoră a deceselor la copil.* De exemplu în Marea Britanie decesele prin boli genetice erau 16,5% în 1914 și 50% în 1976. 30-50 % din internările în spitalele de copii sunt determinate de afecțiuni genetice sau anomalii congenitale; circa 10 % din internările în spitalele de adulți sunt produse de boli genetice sau condiționate genetic. Circa 50% din avorturile spontane din trim.I sunt produse de anomalii cromosomice. Aproximativ 2-3% din nou-născuți au o anomalie congenitală majoră, deseori produsă de factori genetici; alți 2% nou-născuți au o anomalie cromosomică sau o boală monogenică.

**Bolile genetice sunt boli cronice** care realizează frecvent un **handicap** fizic, senzorial, motor sau mintal. Bolile genetice produc peste 50% din cazurile severe de retard mintal, de surditate sau cecitate la copil. Îngrijirea pacienților cu boli genetice implică **cheltuieli importante.**

Se poate conchide, fără rezerve, că **bolile genetice reprezintă o problemă majoră de sănătate publică**, ce impune acțiuni concrete și eficiente de diagnostic și un **Program național de profilaxie a bolilor genetice**, bazat pe sfat genetic, screening și diagnostic prenatal, screening neonatal (pentru boli frecvente și tratabile), registre regionale sau naționale și diagnosticul presimptomatic în familiile cu risc genetic crescut.

## 2. GENETICA MEDICALĂ

*Genetica medicală* - ca parte a geneticii umane – a devenit o *specialitate clinică distinctă* care se ocupă de diagnosticul și îngrijirea *pacienților* cu boli genetice precum și de

<sup>6</sup> *Incidența* se referă la *rata* cu care se produc cazuri noi. *Prevalența* se referă la proporția unui grup afectat la un anumit moment (în cazul bolilor genetice prevalența este mai mică decât incidența fie din cauza speranței de viață mai reduse, fie din cauza debutului bolii la vârste mai tardive. *Frecvența* este un termen nespecific, folosit uneori sinonim pentru incidență

famiile lor prin: *sfat genetic, diagnostic prenatal, screening neonatal sau diagnostic presimptomatic*. Ponderea acestor servicii de genetică în asistența medicală a populației este importantă și nu poate fi ignorată. În fiecare an se nasc în România circa 7200 copii cu anomalii congenitale iar 12.000 vor fi afectați de diferite boli genetice înainte de 25 de ani. Deci circa 20.000 de copii și familiile lor (în care și alte persoane au un risc genetic) au nevoie anual de diagnostic, explorări și sfat genetic; aceasta impune cu necesitate crearea unei rețele naționale de Centre de Genetică Medicală regionale și Cabinete județene.

Numeroasele descoperiri din ultimul deceniu au avut efecte importante asupra *teoriei și practicii medicale*. Vom enumera cele mai importante consecințe.

- *Diagnosticul genotipic*. În plan diagnostic, perfecționarea metodelor de analiză moleculară, la nivel genic, a permis ameliorarea capacității de identificare a unor boli, indiferent de vârsta pacientului (făt, nou născut, copil, adult) și deseori înainte de manifestarea clinică a bolii (presimptomatic). Diagnosticul genotipic devine astfel o nouă și eficace acțiune în medicina practică. Deasemeni, cu ajutorul unor sonde specifice, se pot detecta genomurile unor virusuri, bacterii și paraziți care infectează organismul uman.
- *Farmacologia genomică și terapia genică*. Pe plan terapeutic tehnicile de ADN recombinant au dus la obținerea unor noi mijloace și soluții terapeutice. A început *fabricarea industrială a unor proteine umane cu valoare terapeutică* (insulină, interferon, hormon de creștere, eritropoietină, factor VIII, streptokinază, ș.a.) prin inserția unor gene umane în bacterii și cultivarea lor în bioreactoare. A apărut *farmacologia "genomică"* în care prin sinteza unor inhibitori ai transcripției genelor mutante sau a unor oligonucleotide anti-sens (complementare ADN sau mRNA) se încearcă blocarea funcționării genelor mutante sau a genomurilor exogene a unor virusuri (de ex., HIV). A devenit operațională (din 1991) și *terapia genică*, în care prin fabricarea și introducerea unor gene normale în celulele somatice ale unor bolnavi cu afecțiuni genetice grave se poate ameliora / corija efectul genelor mutante.
- *Profilaxia personalizată și medicina predictivă*. Profilaxia bolilor capătă, grație geneticii, o nouă dimensiune. Adresându-se familiilor sau persoanelor cu risc genetic, profilaxia devine *individualizată, personalizată*. Identificarea unor gene ce determină susceptibilitatea unor persoane sănătoase la anumite boli (de ex., la anumite forme de cancer) precum și studiul unor markeri genetici individuali asociați cu vulnerabilitatea la boală (de ex., la hipertensiune arterială, boală coronariană, ș.a.) deschid calea unei *medicinii predictive*, bazată pe "previziunile" prenatale sau premorbide. Medicina predictivă, cu toate dilemele etice pe care le suscită, oferă mari speranțe pentru prevenirea bolilor.

### 3. MEDICINA ÎN ERA POST-GENOMICĂ

Descifrarea completă a secvenței genomului uman va avea implicații certe asupra practicii medicale, determinând progrese majore în diagnosticul, tratamentul și prevenirea multor boli. Desigur, nu trebuie să exagerăm rolul geneticii medicale și nici nu trebuie să uităm riscul potențial al discriminării genetice sau numeroasele implicații etice, legale și sociale pe care le vor avea noile descoperiri ale geneticii.

Secvențierea genomului uman este doar sfârșitul unei etape și începutul *erei postgenomice* în care se vor multiplica eforturile de a identifica genele asociate cu variate caractere biologice, inclusiv boli, și se vor identifica variantele alelice ale genelor și profilurilor de expresie în diferite țesuturi normale sau anormale. O atenție specială se va acorda interacțiunilor complexe dintre gene precum și între gene și mediu. Mulți geneticieni, și nu numai ei, cred că toate acestea vor fundamenta noua eră a *medicinii moleculare*.

Optimiștii cred că studiul bolilor bazat pe mecanismele lor moleculare și biochimice va schimba orientarea practicii medicale de la diagnostic și tratament la predicție și profilaxie, bazate pe gene de susceptibilitate. Dar și elementele tradiționale se vor modifica deoarece

nimeni nu se îndoiește că diagnosticul genotipic (deseori presimptomatic sau prenatal) va fi tot mai mult aplicat iar farmacogenomica va permite un tratament bazat pe genotipul individual, va descoperi noi „ținte” pentru medicamente și va „rafina” specificitatea lor de acțiune.

Pesimiștii consideră că secvențierea genomului nu este decât unul dintre pașii numeroși pe care medicina îi are de făcut pentru a înțelege mai bine procesele patologice. Genele acționează într-o rețea de interacțiuni complexe, cu alte gene și cu mediul, astfel că orice corelație dintre genotip și fenotipul clinic (mai ales în bolile comune) va fi dificilă. Testele genetice predictive vor avea o eficiență mică asupra morbidității și mortalității, deoarece o proporție redusă din populație este afectată de boli monogenice iar rata mutațiilor noi este destul de importantă. Testele de susceptibilitate identifică numai o predispoziție la boală nu și riscul efectiv de boală (determinat de parametri mai complexi). În plus, persoanele cu risc (de exemplu pentru cancer) au încă opțiuni terapeutice reduse. Terapia genică rămâne o posibilitate a unui viitor nu prea apropiat. Implicațiile etice, sociale și legale pot fi importante în absența unei politici clare de protecție a confidențialității informației genetice.

Echilibrul necesar dintre punctele mai extreme de abordare a efectelor secvențierii genomului uman asupra practicii medicale pleacă de la recunoașterea faptului că am intrat în era postgenomică, decisivă pentru diseccția mecanismelor moleculare ale bolilor. Aplicațiile clinice vor depinde de abordarea etică și socială a problemelor dar cu certitudine vor oferi soluții de reducere a consecințelor atât a bolilor genetice cât și acelor comune, multifactoriale. Nimeni nu poate ignora că medicina a devenit moleculară și că genetica va contribui decisiv la dezvoltarea și eficiența ei.

#### CASETA 1.2

#### Va revoluționa genetica MEDICINA?

*Acesta este titlul unui articol publicat de către Holtzman și Marteau în anul 2002 în prestigioasa revistă New England Journal of Medicine, care a generat numeroase dezbateri și opinii divergente. În analiza lor, autorii pornesc de la un punct de vedere amplu exprimat și sintetizat de Francis Collins, directorul Institutului național de cercetare a genomului uman, din SUA: „... (noua genetică) va permite o înțelegere nouă a contribuției geneticii la bolile umane și dezvoltarea unor strategii raționale de reducere sau prevenire a tuturor bolilor”, cu referire specială la bolile comune ale adultului.*

*Autorii recunosc că secvențializarea genomului uman va schimba profund diagnosticul și tratamentul bolilor monogenice, mendeleene, dar acestea numai o mică parte din populație, comparativ cu bolile comune ale adultului care au o certă predispoziție genetică: diabetul zahart, boala coronariană, hipertensiunea arterială, astmul bronșic, psihozele, cancerele de sân și colon etc. În ciuda unor cercetări intense, s-au descoperit puține gene de susceptibilitate (cu penetranță mare) și acestea explică doar 3-5% din toate cazurile de boală iar efectul lor asupra riscului de îmbolnăvire este relativ redus, cresc riscul doar de 2-3 ori. Dificultățile sunt explicabile prin faptul că riscul de boală depinde de interacțiunea mai multor gene și a unor factori de mediu. În aceste condiții, prevenția prin testare în masă pentru identificarea persoanelor cu risc are o eficiență redusă și o finalitate limitată în absența unor tratamente eficiente (de ex. în cancer). În opinia autorilor, complexitatea etiologiei bolilor comune lasă dubii dacă predicția precisă pentru un număr mare de persoane din populație (deci nu din familiile cu risc crescut) va fi vreodată posibilă. În aceste condiții contribuția geneticii va fi mai mică și nu este bine să pierdem din vedere alte posibilități de îmbunătățire a sănătății publice.*

*Fără îndoială observațiile autorilor sunt pertinente, în momentul actual, dar în condițiile în care medicina a devenit moleculară și progresele cunoașterii sunt rapide, cu consecințe greu de prevăzut în prezent, nu credem ca putem anula optimismul benefic pe care noua genetică îl aduce abordării bolilor comune; fără genetica moleculară patogenia lor va fi la fel de misterioasă iar intervențiile profilactice și terapeutice puțin eficiente.*

## 4. ABORDAREA GENETICĂ ÎN RELAȚIA MEDIC - PACIENT

Genetica devine nu numai o parte integrantă a medicinei moderne ci și o componentă de rutină a îngrijirii bolnavilor și familiilor lor. Se produce astfel o modificare importantă în relația "medic-pacient".

Este important să reamintim că practica medicinei se bazează pe abordarea unui individ cu o problemă de sănătate. Confruntat cu pacientul bolnav medicul trebuie să adune datele necesare pentru a răspunde la două întrebări specifice: 1. Care este problema? (ce are bolnavul?) 2. Ce se poate face pentru rezolvarea acestei probleme? În esență, răspunsul la cele două întrebări înseamnă diagnostic și tratament, elemente tradiționale și esențiale pentru practica medicală. Totuși, alte două întrebări adiționale au devenit importante odată cu dezvoltarea geneticii: 3. De ce această persoană are această problemă (afecțiune) acum? 4. Există căi / mijloace pentru a preveni sau reduce o problemă viitoare (pentru această persoană sau familia sa)? Aceste două întrebări necesită cunoștințe sporite de fiziopatologie și genetică.

Așa cum am arătat, abordarea/ gândirea genetică se bazează pe trei principii fundamentale: 1) individualitatea (unicitatea) genetică a fiecărei persoane (vezi B.1.3); 2) rolul important al factorilor genetici în producerea bolilor sau a predispoziției la diferite îmbolnăviri; 3) transmiterea genelor mutante la alți membri ai familiei, ceea ce face ca familia să fie o unitate de interes și acțiune. Cele trei componente majore ale abordării (gândirii) genetice se pot rezuma în sintagme cunoscute:

- "nu există boli ci numai bolnavi";
- "aproape orice boală are o componentă genetică";
- "nu există boli ci ...familii de bolnavi".

Abordarea genetică presupune informarea pacientului asupra: a) modului său particular de a face boala și răspunde la tratament; b) componentei genetice a bolii; c) caracterului ei familial. La această acțiune se adaugă implicarea medicului în familia bolnavului, pentru diagnosticul unor cazuri noi de boală sau identificarea unor persoane cu risc, care trebuie sfătuite și ajutate corespunzător. Nu este vorba de fapt "de a ști genetică medicală" (specialitate clinică distinctă) ci de a practica o bună medicină pe baze genetice.

În esență, abordarea genetică în medicină, înțelegerea și aplicarea în practică a celorlalte descoperiri ale geneticii și medicinei moleculare presupune o cultură și ... o concepție (gândire) genetică, care trebuie însușite. Pentru medicul practician această acțiune pare dificilă dar toate lucrurile noi sunt dificile; abordarea lor merită făcută atunci când beneficiile sunt reale și importante.

Volumul și complexitatea informațiilor genetice au crescut substanțial și nu pot fi utilizate fără a recurge la sistemele informatice de stocare, regăsire și utilizare datelor (programe informatice, CD-ROM "actualizate", Internet). (vezi Caseta 1.2.). Valoarea și utilitatea practică a datelor genetice (în special în individualizarea tratamentului sau profilaxiei) nu mai pot fi ignorate și obligă pe clinicieni să folosească aceste informații pentru a-și asista pacienții. Aceasta presupune nu numai cunoașterea principiilor de bază ale geneticii medicale ci și disponibilitate pentru un sistem de educație medicală continuă, care nu poate fi ignorat de nimeni.

Pentru studentul în medicină care nu are încă o perspectivă clară a medicinei și practicii medicale, dar trebuie să memoreze numeroase lucruri, genetica prin caracterul ei rațional, logic și aplicativ ar putea fi un moment bine venit. În plus există și o puternică motivație: genetica înarmează viitorul medic cu principiile necesare înțelegerii viitorului medicinei.

### CASETA 1.3.

#### Genetica umană pe Internet

INTERNETUL este un sistem internațional amplu care leagă între ele computerele individuale și rețele locale din universități, laboratoare de cercetări, organizații guvernamentale sau comerciale. World Wide Web (www) este o modalitate de folosire a internetului cu ajutorul unui program web browser. Web folosește documente hypertext sau http (de la hypertext transmission protocol), care arată ca un text obișnuit (ce poate fi citit, editat, stocat, etc.) dar unele cuvinte sau cadre (boxes) sunt subliniate printr-o culoare (albastră); acestea sunt legăturile (links) de acces la alte documente. Facând click pe o astfel de legătură se poate accesa un alt computer, la mii de kilometri distanță.

Fiecare document web are un cod propriu numit uniform resource locator (URL) sub forma <http://www> numele serverului. De ex. URL pentru serverul www de la The National Center for Biotchnology Information este <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> iar URL pentru European Bioinformatics Institute este <http://www.ebi.ac.uk/> După ce se scrie adresa, web browserul computerului deschide Home Page din care prin cadrele de legătură se pot accesa alte pagini web.

Adresele diferitor baze de date se pot schimba. Dacă una din adresele cunoscute nu funcționează trebuie să o căutăm, plecând de la un punct start, folosind "o mașină de căutare" de tipul Yahoo: <http://www.yahoo.com>; folosind acest sistem se pot căuta documente cu un subiect specific. De la acest punct de start se pot găsi legăturile către diferite baze de date.

Adresele cele mai folosite în genetica umană sunt:

- OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) este catalogul caracterelor monogenice umane normale și patologice, creat de Victor McKusick, care este continuu actualizat. OMIM este legat de alte baze de date. Poate fi accesat: in USA: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim> ; in UK: <http://www.hqmp.mrc.ac.uk/omim/>
- Genome Database: <http://www.gdb.org/>
- Gene cards: <http://bioinformatics.weizmann.ac.il/cards/index/html> Prezintă, într-o formă concisă, date integrate din multiple baze de date.
- Cytogenetic resources: <http://www.kumc.edu/gec/geneinfo.html> prezintă o legătură foarte utilă cu multiple site-uri, inclusiv: Cytogenetic Images Index, Gene Map of human chromosomes, Human Cytogenetics Database, Chromosome Databases, Karyotypes of normal and abnormal chromosomes.
- Medline: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/> Dă informații (rezumate) asupra articolelor publicate în revistele biomedicale; ele pot fi accesate pe autori, titluri, cuvinte cheie etc.
- The National Center for Biotchnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- The National Center for Genomic Resources: <http://www.ncgr.org>
- The National Human Genome Research Institute Home Page: <http://www.nhgri.nih.gov>
- European Bioinformatics Institute este <http://www.ebi.ac.uk/>

Descrierea acestor site-uri și altora, utile în documentarea și activitatea celor interesați de domeniul geneticii medicale este prezentată la sfârșitul cărții într-o anexă specială. La fiecare capitol se vor prezenta adresele site-urilor relevante pentru capitolul respectiv.

### Bibliografie specifică selectivă<sup>7</sup>

1. Baird P.A., Anderson T.V., Newcombe H.B., Lowry R.R. *Genetic disorders in children and young adults: a population study*- Am.J.Hum.Genet 1988; 42:677-693

<sup>7</sup> Bibliografia specifică selectivă cuprinde o selecție de articole recente privitoare la capitol și recomandate cititorilor pentru completarea informațiilor. La sfârșitul cărții există o bibliografie generală ce include tratate, monografii, cărți de genetica umană și medicală. Deasemeni, într-o anexă specială sunt date adresele unor site-uri de internet accesibile pentru completarea informațiilor în aceste domenii.

2. Guttmacher A.E., Collins F.S. *Genomic medicine – a primer*. New E.J.Med 2002;347:1512-1520
3. Lawrence S., Giles CL - *Accessibilitly of information in the web* - Nature, 1999, 400, 107-110  
Holtzman N.A., Marteau T.M. Will genetics revolutionize medicine? New E.J.Med 2000; 343:141-144
4. Maximilian C. - *Geneza individualității* – Ed. Sport-Turism, București, 1980
5. McKusick V.A. *History of medical genetics*. in Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE (3<sup>rd</sup> eds) - Emery and Rimoin's Principles and practice of medical genetics. Vol.1, Churchill Livingstone, Edinburgh, pp 1-30
6. McKusick V.A. *Medical genetics: a 40-year perspective on the evolution of a medical specialty from a basic science*. JAMA, 1993; 270:2351-2356
7. Peltonen I., McKusick V.A. *Genomics and medicine: Dissecting human disease in the postgenomics era*. Science 2001;291:1224-1229
8. Williams S.J, Hayward N.K. *The impact of the Human Genome Projct on medical genetics*. Trends Mol.Med. 2001;7:229-231
9. Wilson G.N. *The genomics of human dysmorphology*. Am.J.Med.Genet. 1992; 43:187-196
10. \* \* \* BMJ nr. 7293, 2001 (număr dedicat geneticii): *Genetics-delivering the dreams?*



## CAPITOLUL 2

# STRUCTURA ȘI ORGANIZAREA CELULARĂ A ADN

ADN este molecula fundamentală a vieții. Toate mecanismele prin care se realizează structura și funcțiile celulelor, asamblate în țesuturi și organe, precum și răspunsurile lor la acțiunea mediului intern sau extern - sunt codificate și reglate de structura uimitor de simplă și elegantă a genomului uman. De aceea, *înțelegerea structurii ADN și a organizării sale în celule este fundamentală pentru studiul geneticii medicale și medicinei în general.*

## A. ADN ESTE SUBSTRATUL MOLECULAR AL EREDITĂȚII

### 1. EVOLUȚIA CONCEPȚIILOR DESPRE NATURA GENEI.

În anul 1865, MENDEL a formulat *ipoteza genei* potrivit căreia fiecare caracter este detreminat de “*o pereche de factori ereditari*” (numiți mai târziu gene) și a stabilit legile eredității. Astfel, el a pus bazele geneticii ca știință.

Inițial, în ipoteza lui Mendel, gena era o entitate *abstractă*, ipotetică, și natura sa chimică era necunoscută. Ulterior, la începutul secolului XX, demonstrându-se rolul cromosomilor în ereditate (Sutton, Boveri și mai ales T.H.MORGAN), gena a devenit un element concret, material, *un segment dintr-un cromosom care determină un caracter specific*, dar natura ei chimică a rămas în continuare necunoscută.

La începutul deceniului patru s-a stabilit că în structura cromosomilor există proteine și acizi nucleici: ADN și ARN; *una din aceste componente trebuia să fie substratul chimic al genei*. Mulți cercetători credeau atunci că genele sunt formate din proteine, cele mai complexe substanțe chimice din celule; ADN era considerat o moleculă prea simplă pentru înmagazinarea informației ereditare și transmiterea ei în succesiunea generațiilor. Existau totuși unele *argumente "indirecte"* care pledau pentru **rolul genetic al ADN**: localizarea aproape exclusivă a ADN în *nucleu și cromosomi*, structuri cu rol important în ereditate; cantitatea sa *constantă și caracteristică* speciei, proporțională cu numărul cromosomilor (celulele sexuale au jumătate din ADN-ul celulelor somatice); stabilitatea *metabolică* a moleculei de ADN. În 1944, Avery et al. au demonstrat experimental că ADN-ul este substratul molecular al eredității.

### 2. DEMONSTRAREA ROLULUI GENETIC AL ADN.

În 1928, microbiologul englez F. Griffith a făcut o observație remarcabilă. El a studiat morfologia și patogenitatea diferitelor tulpini de *pneumococcus*. Unele tulpini aveau o capsulă polizaharidică și cultivate pe agar formau colonii "netede", fiind numite S (de la "*smooth*") iar altele erau necapsulate și formau colonii "rugoase", fiind numite R (de la "*rough*"). Griffith a observat că șoarecii injectați cu pneumococi S au murit iar cei injectați cu tulpina R au supraviețuit; deci pneumococii S erau *patogeni*, producând septicemie și moarte. Patogenitatea,

deteminată de prezența capsulei, se transmite ereditar. În mod surprinzător, un amestec de pneumococi R (nepatogeni) vii și pneumococi S (patogeni) inactivați prin căldură a avut un efect letal. De la animalele moarte s-au izolat pneumococi S vii. Explicația posibilă a acestui fenomen era *transformarea* tulpinilor de pneumococi R vii în tulpini S vii, sub influența unor componente din structura pneumococilor S omorâți; natura chimică a substanței care a produs transformarea nu a putut fi însă stabilită.

În 1944, Avery, MacLeod, McCarty (de la Rockefeller Institut) au reluat experiențele lui Griffith și au demonstrat experimental că *ADN-ul este factorul transformant*. Autorii au arătat că **transferul ADN** extras de la o tulpină de pneumococi S capsulați, patogeni, la pneumococi R necapsulați, nepatogeni, determină **transformarea** lor în pneumococi patogeni (R → S); mai exact, un segment de ADN-S ce conține gena pentru capsulă a fost încorporat în ADN-ul pneumococilor R. Această modificare *nu era realizată de proteine* sau de alte componente din structura pneumococilor S și era *inhibată de ADN-ază* (figura 2.1); odată produsă, modificarea *se transmite* la generațiile următoare, fiind deci *ereditară*. Pe această bază s-a presupus că *ADN este materialul genetic*.

Așa cum se întâmplă adesea cu marile adevăruri, rolul genetic al ADN, clar și elegant demonstrat de Avery et al. a fost însă un timp negat. În 1952, Hershey și Chase (Premiul Nobel, 1969) au demonstrat că *transferul exclusiv al ADN* de la bacteriofagi la *Escherichia coli* transformă această bacterie în celule producătoare de particule fagice, cu o structură completă, inclusiv capsula proteică (figura 2.2). Autorii au marcat proteinele capsulare ale bacteriofagilor cu sulf radioactiv ( $^{32}\text{S}$ ) iar ADN cu fosfor radioactiv ( $^{35}\text{P}$ ); când bacteria *E. coli* a fost infectată cu bacteriofagi "marcați", se observă că numai  $^{35}\text{P}$  (deci ADN) pătrunde în celulă ( $^{32}\text{S}$  - proteinele capsulare rămân la exterior). Formarea ulterioară a unor particule fagice noi, complete, demonstrează clar că ADN era unicul purtător al informației ereditare.

Demonstrarea faptului că *transferul ADN de la un microorganism la altul produce transformări permanente și ereditare ale primitorului* a constituit dovada decisivă că genele sunt alcătuite din ADN.

Experiențele de transformare ereditară produse de ADN și numeroase alte dovezi au stat la baza unei noi paradigme fundamentale în biologie și au inaugurat *revoluția moleculară în genetică*. Introducerea unor segmente de ADN în celule cultivate "in vitro" (transfecție) sau în zigoți / embrioni ("animale transgenice") stă la baza ingineriei genetice. Mai mult, ea reprezintă principiul de bază al terapiei genice, cea mai extraordinară realizare a medicinei ultimilor ani.

## B. STRUCTURA ADN

Descoperirea rolului genetic al ADN<sup>1</sup> a concentrat atenția cercetătorilor asupra structurii sale, întrucât descifrarea ei reprezenta singura cale *pentru înțelegerea naturii și funcției genei*. În anul 1953, James Watson și Francis Crick au propus un model al moleculei de ADN alcătuit din două catene polinucleotidice, legate complementar prin bazele azotate, înfășurate într-o elice dublă, răsucită spre dreapta.

Modelul WATSON-CRICK al structurii ADN reprezintă, probabil, *cea mai mare descoperire a biologiei moderne* (Premiul NOBEL, 1962). Acest model, *universal* valabil în lumea vie, corespunde funcțiilor materialului genetic, deoarece explică modul în care se *stochează, se transmite și se exprimă informația ereditară*. Gena încetează să mai fie o entitate "misterioasă", are o structură chimică complexă și bine definită, iar ADN devine nu numai esența genetică ci și un veritabil *simbol al vieții*. Consecințele pentru practica medicală ale revoluției

---

<sup>1</sup> La unele virusuri materialul genetic este ARN; ele sunt numite "retrovirusuri" deoarece în timpul infecției se integrează în genomul celular după ce ARN-ul lor a fost convertit în ADN, de către enzima "revers transcriptază" (sau transcriptază inversă). Unele din aceste virusuri produc cancer și alte îmbolnăviri (SIDA).

determinate de către descoperirea structurii și funcției ADN sunt și vor fi atât de spectaculoase încât nu vor avea egal în istoria medicinei.

## 1. STRUCTURA PRIMARĂ ȘI SECUNDARĂ A ADN.

### 1.1. STRUCTURA PRIMARĂ A ADN.

ADN este un *macropolimer de "deoxiribonucleotide"*. Lungimea și greutatea sa moleculară sunt foarte mari, permițând stocarea unei cantități uriașe de informație. Cantitatea de ADN variază de la specie la specie (la om  $g.m.=3,5 \times 10^{12}$  daltoni) dar este *constantă* la indivizii aceleiași specii, precum și în toate celulele somatice (diploide) de la același individ.

Unitatea structurală a ADN este **deoxiribonucleotidul**, alcătuit din trei elemente distincte: un *glucid* cu cinci atomi de carbon (o pentoză), o *bază azotată* și un *grup fosfat* - unite prin legături *covalente* (puternice) (figura 2.3). Pentoză este reprezentată de D-2-**deoxiriboza**, în forma sa furanozică. **Baza azotată** poate fi purinică - *adenina* (A), *guanina* (G) - sau pirimidinică - *timina* (T), *citozina* (C); se leagă la C1' al deoxiribozei, alcătuind împreună un **nucleozid**. Grupul fosfat (provenit din acidul ortofosforic) se leagă la C5' al deoxiribozei, formând cu aceasta și baza azotată un **nucleotid**, unitatea fundamentală a structurii catenei de ADN. Grupul fosfat conferă moleculei de ADN caracterul de "acid" și numeroase sarcini negative, neutralizate *in vivo* prin fixarea histonelor, proteine baze. În ADN, există *patru tipuri de deoxiribonucleotide* - acid deoxiadenilic, deoxiguanilic, deoxicitidilic, deoxitimidilic - care se vor deosebi numai prin baza azotată; gruparea fosfat și deoxiriboza sunt elemente constante.

*Polimerizarea nucleotidelor*, în molecula de ADN, se realizează prin **legături covalente 3'-5' fosfodiester**, formate între gruparea OH a C<sub>3</sub> al deoxiribozei unui nucleotid și restul fosfat fixat la C<sub>5</sub> al nucleotidului următor. Se formează astfel o catenă (lanț) *continuă, lineară* (neramificată!), care reprezintă **structura primară a ADN**. Această catenă prezintă o parte "constantă", fosfoglucidică (în care gruparea fosfat alternează regulat cu deoxiriboza), ce formează axul catenei, și o parte "variabilă", reprezentată de bazele azotate, care se fixează perpendicular și lateral pe "coloana vertebrală" fosfoglucidică (bazele azotate de pe aceeași catenă nu se leagă între ele) (figura 2.4).

În catena de ADN poziția unui nucleotid *nu impune cu necesitate* în vecinătatea sa prezența unui anumit alt nucleotid: pozițiile adiacente pot fi ocupate de *oricare* din cele patru tipuri de nucleotide. Deci, nu există *nici o restricție* în dispunerea / succesiunea nucleotidelor în lungul catenei de ADN sau, altfel spus, există *o libertate totală de așezare a nucleotidelor*. Acest lucru este esențial deoarece secvența (ordinea) nucleotidelor în lungul catenei de ADN reprezintă **informația genetică codificată**, pe baza căreia se stabilește *ordinea aminoacizilor în proteine*. Sensul de "citire" al informației genetice este determinat de **polaritatea 5' → 3'** a catenei de ADN. Ea este dată de faptul că pozițiile 5'-fosfat a primului nucleotid și 3'-hidroxil a ultimului nucleotid al catenei sunt *libere*, neangajate într-o legătură chimică. Orice secvență de nucleotide se "citește" în direcția 5' → 3' și se scrie cu capătul 5' la stânga, de ex. 5'-ATGCCTAGATCA-3'. Fiecare catenă a ADN este deci o *secvență orientată*, definită prin înlanțuirea nucleotidelor.

### 1.2. STRUCTURA SECUNDARĂ A ADN.

În elaborarea modelului structurii ADN-ului, WATSON și CRICK s-au bazat pe studiile difracției cu raze X a moleculelor de ADN (M. Wilkins, R. Franklin) precum și pe analizele chimice ale ADN (Chargraaf).

Imaginile obținute prin difracție cu raze X a unor molecule de ADN de origini diferite erau totdeauna asemănătoare, relevând, deci, un "model unic" și sugerând că moleculele de ADN au o organizare bine definită, ordonată, în care părțile componente se repetă ele însele. Modelul sugerează existența mai multor catene polinucleotidice și o structură helicală ordonată. Analizele chimice ale ADN au evidențiat că suma bazelor purinice (A+G) este însă întotdeauna egală cu suma bazelor pirimidinice (T+C) iar raportul A/T și G/C este unitar, indiferent de specie; în schimb raportul A+T/G+C este diferit de 1 și caracteristic speciei fiecărei specii; la om este 1,7.

Prelucrând creator aceste date, Watson și Crick au propus un model al moleculei de ADN

alcătuit din **două catene polinucleotidice**, legate între ele prin bazele azotate, în mod *complementar* (figura 2.5 A) și înfășurate *plectonemic* pentru a forma o *dublă spirală elicoidală* (o elice dublă) orientată spre dreapta, cu diametrul de 20 Å și pasul elicei de 34 Å (figura 2.5.B). Pornind de la faptul că raportul  $A/T = G/C = 1$ , Watson și Crick consideră că în molecula de ADN se produce o împerechere "*preferențială*" a bazelor care unesc cele două catene; bazele azotate (situat spre interiorul moleculei) se leagă **complementar**: o bază purinică se unește cu o bază pirimidinică sau, mai exact **A – T și G – C** (formând un cuplu sau o pereche de baze, prescurtat **pb**). Legăturile se realizează prin *punți de hidrogen*, legături electrostatice slabe (figura 2.5 A). În felul acesta secvența nucleotidelor unei catene *determină cu necesitate* secvența nucleotidelor celeilalte catene. Deci, cele două catene ale ADN nu sunt identice, ci *complementare și strict codeterminate*. Cunoașterea secvenței nucleotidice a unei catene va permite automat determinarea secvenței nucleotidice a celeilalte catene. De exemplu:



În acest context vom sublinia o idee asupra căreia vom reveni: **legea complementarității** bazelor stă la baza mecanismelor prin care se realizează funcțiile genetice ale ADN: transcripția, replicarea, repararea leziunilor, recombinarea.

Libertatea totală de așezare a nucleotidelor în lungul catenelor de ADN ( pe verticală) se asociază cu necesitatea dispoziției lor complementare (în planul orizontal al moleculei). "Libertatea și necesitatea" dau substratul eredității înalta sa diferențiere și capacitate de a stoca, exprima și transmite perfect mesajul pe care îl deține" (Parot, 1985). În molecula simbol a vieții este astfel "înscris" unul din principiile filosofice fundamentale ale existenței omului: *libertate și necesitate*.

Legăturile stereochemice / spațiale necesare pentru împerecherea corectă dintre A–T și G–C fac ca *orientarea (polaritatea) celor două catene să se dirijeze în sensuri opuse*, deci, să fie **antiparalele**. Acest lucru are consecințe importante în "*citirea*" informației în procesul sintezei proteice, precum și în mecanismul replicării (biosintezei unor noi molecule de ADN).

Cele două catene ale ADN se înfășoară (se împletesc) *plectonemic* (una în jurul alteia, ca "o frânghie", și amândouă în jurul unui ax central (imaginar) al moleculei, formând o *dublă spirală elicoidală coaxială* (o elice dublă), orientată spre dreapta (dextrogir) (figura 2.5 B). Ea poate fi comparată cu o "scară în spirală" în care axele fosfoglucidice formează marginile scării iar perechile de baze, treptele ei. Această structură, asociată funcțiilor majore pe care le îndeplinește ADN, a fost plastic numită "*elicea vieții*", fiind un veritabil simbol al lumii vii.

Structura ADN este, în ansamblul ei, *perfect regulată*, ordonată: diametrul moleculei 2 nm; o tură completă are  $360^{\circ}$ ; pasul elicei 3,4 nm permite dispunerea a 10 perechi de baze (figura 2.5. b). În configurația ei spațială, molecula de ADN prezintă *două șanțuri laterale*: unul mai mic și altul mai mare. Ele sunt importante în *recunoașterea* stereochemică și fixarea pe ADN a *histonelor* (la nivelul șanțului mici) sau a unor *molecule proteice reglatoare* (la nivelul șanțului mare), singurul loc în care bazele sunt *accesibile* acestor proteine care vor influența (regla) realizarea funcțiilor ADN.

În condiții fiziologice, molecula de ADN are o mare *stabilitate metabolică*, datorită legăturilor fizico-chimice dintre elementele unei catene precum și dintre cele două catene <sup>2</sup>. Ele sunt strâns legate una de alta și de obicei nu se pot separa. Această stabilitate este o condiție obligatorie pe care trebuie să o îndeplinească substratul material al eredității. Totuși, sub acțiunea unor enzime cele două catene ale ADN *se pot desface parțial*, pe segmente limitate, și funcționează ca "matriță" pentru sinteza unor molecule noi, complementare (ARNm în procesul de transcripție, sau o altă catenă ADN, în cursul replicării).

<sup>2</sup> Deși legăturile de hidrogen sunt legături electrostatice slabe, multitudinea lor asigură "coeziunea" catenelor.

## CASETA 2.1.

**Denaturarea și hibridizarea ADN.**

În condiții experimentale se poate produce ruperea (desfacerea) legăturilor de hidrogen dintre cele două catene, prin denaturare termică (încălzire la 63-100°C) sau chimică (tratament cu alcali etc.) (figura 2.6). Acest proces de conversie a ADN de la forma bicatenară la starea monocatenară se numește **denaturare**. Prin răcirea lentă a soluției, monocatenele de ADN se pot reasocia pe baza complementarității și refac structura originală; procesul se numește **renaturare** sau **hibridare**. Viteza de reasociere este funcție de concentrația ADN și timp (se numește cot de la concentrație x timp; valoarea cot la care se produce o asociere de 50% se numește cot 1/2). Prin răcire bruscă monocatenele ADN rămân separate și pot fi folosite pentru realizarea unor **hibrizi moleculari** (pe baza complementarității dintre catene) de tip ADN-ADN, fie între două molecule de ADN de la specii diferite fie între fragmente de ADN obținute artificial ("sonde", ce corespund unei gene) și regiunea corespunzătoare, complementară din ADN nativ. Se pot obține de asemenea hibrizi între o catenă ADN și o moleculă de ARN complementară (de tip ARNm) rezultând un heteroduplex. Fenomenele de denaturare și hibridare sunt amplu utilizate în biologia moleculară, în tehnicile ADN recombinant, pentru identificarea sau localizarea unor gene și, mai recent, în terapia cu **oligonucleotide antisens** (în cancer, SIDA) care se fixează pe secvențe de ADN sau pe ARNm și blochează expresia genelor.

1.3. RELAȚIILE DINTRE STRUCTURA ȘI FUNCȚIILE ADN

Modelul structurii ADN întrunește toate condițiile pe care trebuie să le îndeplinească *materialul genetic*:

- să stocheze o cantitate mare de informație, într-o formă stabilă, dar ușor de exprimat;
- să reproducă informația, deci să o transmită cu mare fidelitate de la o generație la alta, eventual să o "repare" corect, dacă se produce o leziune;
- să exprime informația genetică prin sinteza unor proteine specifice;
- să fie capabil de variație.

Aceste proprietăți fundamentale și caracteristice ale ADN îi conferă calitatea de a fi *molecula esențială a vieții*.

**a. Informația genetică**

ADN deține, prin genele pe care le posedă, informațiile necesare pentru ca celulele să trăiască, să se multiplice și să se diferențieze (căpătând anumite specializări). În ansamblul organismului, ADN determină și controlează embriogeneza, dezvoltarea, creșterea, metabolismul și reproducerea - deci toate procesele majore ale funcționării organismului uman.

Informația genetică necesară acestor procese este reprezentată de *secvența lineară (succesiunea sau ordinea de înlănțuire) nucleotidelor în molecula de ADN*; ea determină structura proteinelor care alcătuiesc celulele și țesuturile și participă la funcționarea lor complexă. Proteinele sunt formate din lanțuri de aminoacizi; secvența aminoacizilor în proteină determină proprietățile caracteristice ale fiecărei proteine; această *ordine specifică a aminoacizilor este determinată de secvența nucleotidelor în ADN*.

Informația ereditară este *codificată*, fiind scrisă într-un limbaj foarte simplu, cu ajutorul unui "alfabet nucleic" ce are numai patru "litere": **A, T, G și C** (corespunzătoare celor patru tipuri de nucleotide). Folosind aceste elemente de cod se pot scrie "cuvinte" de trei litere, asamblate într-o "frază" ce alcătuiește o genă. La fiecare triplet de nucleotide, numit **codon** corespunde pe baza **codului genetic** (vezi capitolul 4), un anumit aminoacid din structura proteinei sau un "semnal" necesar pentru a începe sau termina lectura mesajului (figura 2.7).

*Gena este unitatea de informație ereditară*; ea este alcătuită dintr-o *succesiune specifică de codoni*, ce determină *ordinea aminoacizilor într-un polipeptid* și, prin aceasta,

funcția lui. Modificarea secvenței nucleotidelor prin **mutația** genei va duce la modificarea unui / unor codon(i) și, de cele mai multe ori, la modificarea structurii și funcției proteinei sintetizate .

### b. Expresia informației ereditare

Expresia informației ereditare reprezintă, în esență, sinteza de proteine.

Informația genetică codificată din ADN nu este folosită direct în sinteza proteinelor (figura 1.1 și 2.7). Ea este mai întâi copiată - **transcripție** - într-o moleculă de ARNm, folosind același cod și mecanismul complementarității. Urmează apoi **translația** sau decodificarea informației genetice din ARNm într-o *secvență specifică de aminoacizi* a proteinei, pe baza corespondenței dintre fiecare codon și un anumit aminoacid.

Copiarea informației în ARNm se face numai de *pe una din catenele ADN*, catena 3'→5', numită *catenă copiată sau matriță*<sup>3</sup>. Ea este totdeauna aceeași pentru o anumită genă dar la gene diferite poate fi una sau alta din catenele ADN. Catena ADN complementară catenei transcrise este similară cu ARNm ca secvență (exceptând înlocuirea timinei cu uracilul) și direcție (5' → 3') și se numește *catenă de referință ("sens")*. După desfacerea enzimatică, temporară, a legăturilor de hidrogen dintre cele două catene ale ADN, copierea se face în direcția 3' → 5', sintetizându-se o *moleculă complementară și antiparalelă* (5' → 3') de **ARNm**; ea va avea aceeași secvență și orientare ca și catena de referință. De aceea, *notarea și descrierea unei gene se fac, convențional, referindu-se la catena 5' → 3' de referință a ADN*.

Mult timp s-a considerat că transferul de informație se face într-o singură direcție: ADN→ARNm→Proteină. Această "dogmă fundamentală a geneticii" a fost reevaluată prin identificarea "**transcripției inverse**", de la ARNm → ADN. Prin acest mecanism **retrovirusurile**, care au ca material genetic ARN, se pot *incorpora* în genomul celulei-gazdă, confecționându-și o copie complementară de "tip ADN". Fenomenul este larg folosit astăzi și în "ingineria genetică" (vezi capitolul 3.C.3) pentru obținerea unor molecule de **ADN complementar** față de ARNm extras din celule; în fond acest **ADNc** reprezintă gena (mai exact partea codantă) pe baza căreia se va sintetiza ARNm și apoi proteina corespunzătoare.

### c. Replicarea și repararea ADN

O proprietate *esențială* a ADN este capacitatea de a servi ca model (matriță) pentru autoreplicarea sa și sinteza unor noi molecule, *identice informațional* între ele și cu molecula inițială. Pentru aceasta, cele două catene ale ADN *se desfac* și fiecare servește ca *matriță* pentru aranjarea *secvențială și complementară* a deoxiribonucleotidelor. Prin polimerizare lor se formează o catenă "*nouă*" care reface împreună cu catena "*veche*" o moleculă de ADN (vezi figura 1.1). Replicarea semiconservativă a ADN este *cheia eredității*: un organism parental transmite prin gameți o replică a ADN-ului său primei celule a descendenților. Astfel, prin replicare, *informația ereditară se perpetuează* în mod stabil în cursul generațiilor.

Uneori în cursul replicării se pot produce *erori*, prin împerecheri "nelegitime" (greșite) ale nucleotidelor (de tipul C-C, A-G sau A-C). Ele ar putea produce o modificare a informației genetice dacă nu ar interveni un *mecanism enzimatic de "reparare"*; pe baza catenei matriță, aceasta corijează erorile de replicare (vezi capitolul 5.A.1)

## 2. POLIMORFISMUL STRUCTURAL ȘI FLEXIBILITATEA MOLECULEI DE ADN

Forma clasică a structurii ADN, descrisă de Watson și Crick, corespunde **conformației de tip B**, care se realizează frecvent "in vivo" (în condiții de umiditate crescută și concentrație ionică joasă). S-au descris însă și alte conformații sau **isoforme**: *A și C*, mai frecvente, *D și E*, mai rare. Ele au *același plan general de structură*: elice dublă orientată spre dreapta dar se deosebesc de tipul B printr-o serie de particularități fizice (înclinarea bazelor față de ax, modificarea pasului elicei și numărul de baze per tură elice): *forma A este mai scurtă și mai groasă, iar celelalte mai lungi și mai subțiri*.

<sup>3</sup> Catena 3'→5' se mai numește și *catenă antisens* deoarece prin convenție ARNm este considerat *catena sens*

În organism, în anumite regiuni ale moleculei de ADN (cu o anumită secvență nucleotidică) se produc frecvent modificări (tranziții) conformaționale  $A \leftrightarrow B \leftrightarrow C$ . Aceste modificări permit *recunoașterea* segmentelor respective de către anumite molecule exogene, care *reglează expresia genelor*.

În 1979, Rich și Dickerson descoperă un tip particular de **ADN-Z** sau **ADN-senestra**. El are o moleculă dublu elicală, *orientată spre stânga*, care își pierde simetria caracteristică formei B, deoarece axul fosfo-glucidic ia o formă neregulată în *zig-zag*, producând deformarea și alungirea moleculei de ADN (figura 2.8). Conformația ADN-Z este o conformație *normală*, există "in vivo" și apare, în anumite condiții fizico-chimice, în regiunile bogate în perechi de baze G-C, prin tranziția / conversia formei B (sub acțiunea unei topoisomerase, prin rotarea bazelor cu  $180^\circ$ ); *tranziția  $B \leftrightarrow Z$  este reversibilă*.

ADN-Z intervine foarte probabil în *inactivarea unor gene* și, deci, în controlul expresiei informației genetice. Conversia locală  $B \rightarrow Z$  (mai ales în situsurile de reglare a transcripției) poate fi realizată prin *fixarea* mai intensă a *histonelor* sau a altor molecule ce produc represia genelor sau prin *metilarea citozinei* din situsurile GC. Astfel, un "viraj la stânga" la începutul unei gene determină stoparea activității ei.

Tranziția  $B \leftrightarrow Z$  ar determina însă și evidențierea unor situsuri din ADN în care se fixează mai facil agenți mutageni sau cancerigeni. Pentru aceasta pledează faptul că mutațiile apar mai frecvent la nivelul secvențelor G-C care iau conformația Z.

În finalul acestei prezentări este important de subliniat faptul că tranziția ADN  $B \leftrightarrow Z$  ca și modificările conformaționale  $A \leftrightarrow B \leftrightarrow C$  care apar în anumite regiuni ale ADN (cu o secvență specială a nucleotidelor), demonstrează elocvent faptul că molecula *de ADN nu are o structură fixă, rigidă, încrămențită*. În funcție de condițiile de mediu, moleculele ADN sînt *flexibile*, într-o permanentă stare dinamică, deformându-se neîncetat; pe drept cuvânt se poate spune că molecula de ADN (simbolul vieții) "*pulsează sau respiră*".

## C. STRUCTURA GENOMULUI UMAN

Termenul de **genom** a fost creat (Winkler, 1920) pentru a denumi *setul haploid* de cromosomi din gameții eucariotelor. Ulterior el a fost folosit pentru a desemna *ansamblul genelor* unui organism dar descoperirea ADN necodant, diferitelor clase de ADN repetitiv și altor elemente de „anatomie”, au dus la semnificația actuală a genomului, conceput ca *ansamblul complex al secvențelor de ADN a unui individ sau specii*.

Cunoștințele despre genomul uman au fost dependente în timp de metodele folosite. Descoperirea tehnologiei ADN recombinant a marcat începutul unei perioade revoluționare pentru biologie în general și medicină în special. În 1980 a apărut ideea *Proiectului Genom Uman*, care treptat a început să prindă contur, devenind în 1990 un important proiect internațional destinat să stabilească harta fizică și genetică a genomului uman și, în final, să determine întreaga secvență a ADN uman dar și altor organisme (vezi capitolul 3.D.4). Coordonarea cercetărilor a fost realizată de *Human Genome Organization (HUGO)*, care după descoperirea hărții genetice a omului (1995) a propus *descifrarea întregii secvențe a genomului uman*. Proiectul demarează însă abia în 1999 și doi ani mai târziu, la 15 februarie 2001, *International Human Genome Sequencing Consortium (IHGSC)* precum și compania privată *Celera Genomics* au publicat **prima schiță (ciornă) a secvenței genomului uman**, ce acoperă 96% din partea eucromatică (activă) a genomului uman; heterocromatina este greu de clonat datorită structurii sale repetitive și se consideră că nu are sau are doar câteva gene. Deși mai sunt multe de făcut până la finalizarea completă (în 2003) a proiectului (stabilirea unei secvențe continue, unice, pentru cei 24 de cromosomi umani și a poziției precise a tuturor genelor) iar unele detalii se vor schimba, există multe puncte clare. De aceea, în prezentarea organizării genomului uman, vom ține cont în special de aceste elemente certe.

## 1. DATE GENERALE.

*Cantitatea totală de ADN* din celulele umane diploide a fost apreciată la 7 picograme sau 3,5 picograme per genom haploid, ceea ce corespunde teoretic la circa 3,3 miliarde de perechi de baze (pb). Mărimea genomului haploid este *constantă* la fiecare specie și se mai numește *valoare C*; ea prezintă evident variații în cursul ciclului celular: 2C la sfârșitul diviziunii și faza G1, 4C după replicarea ADN în faza S și în G2.

Mărimea totală estimată a genomului uman, apreciată de IHGSC în 2001, este de **3,2 Gb** (gigabaze = miliarde de baze); din acestea 2,95 Gb reprezintă eucromatina, segmentul „funcțional” al genomului, iar restul heterocromatina inactivă. Surprinzător este că *secvențele codante reprezintă mai puțin de 5% din genom* (numai 1,1% -1,4% sunt secvențe ce codifică proteine) iar *numărul prognozat de gene este cuprins între 30.000 și 35.000*, jumătate față de estimările anterioare (din acestea numai 26.000 au fost identificate, deși la multe încă nu se cunoaște cu precizie rolul, efectul lor). Deci genele, ce conțin ADN "codant", sunt pur și simplu niște "insule" într-un "ocean" de ADN necodant; această dispoziție este nu numai surprinzătoare (prin logica "economiei" sau "rentabilității") dar și misterioasă. Cert este că *genomul nu poate fi considerat o succesiune de gene pe cromosomi ci o structură cu arhitectură complexă* în care genele (fragmentate) sunt dispersate pe cromosomi și separate prin largi regiuni intergenice, necodante. Acest ADN necodant (numit uneori și "egoist", deoarece nu participă la formarea de proteine) nu este probabil în totalitate "inutil": evidențierea unor secvențe perfect organizate, din care unele sunt chiar transcrise, sugerează că cel puțin o parte din acest ADN ar putea juca un rol, pentru moment necunoscut.

Genomul uman este alcătuit dintr-un **genom nuclear** complex, ce conține marea majoritate a ADN-ului celular (3,2 Gb) și un **genom mitocondrial** simplu și mic (16,6 Kb).

## 2. GENOMUL NUCLEAR

### 2.1. FRAGMENTAREA GENOMULUI UMAN.

Nucleul celulelor umane conține peste 99 % din ADN celular. Această cantitate enormă de ADN este *fragmentată în 24 de tipuri distincte de molecule lineare de ADN* care, prin *asociere cu proteine* histonice și nehistonice, formează *cromosomii*: 22 de tipuri distincte de *autosomi* și doi cromosomi sexuali, X și Y. *Mărimea lor variază de la 244 Mb pentru cromosomul 1 la 44 Mb pentru cromosomul 21* iar structura lor este *neuniformă*, prin compoziție nucleotodică și densitate de gene, producând un model caracteristic de benzi, colorate și necolorate, pentru fiecare cromosom.

### 2.2. HETEROGENITATEA SECVENTELOR NUCLEOTIDICE A ADN.

În genomul uman există mai multe "clase" de ADN, diferite prin repetiția secvențelor nucleotidice: ADN nerepetitiv, ADN moderat repetitiv și ADN înalt repetitiv.

#### a. **ADN nerepetitiv**

ADN nerepetitiv (60%) este alcătuit din *secvențe unice per genom* sau în număr foarte mic de exemplare (formând familii multigenice); se găsește mai frecvent în regiunile cromosomice active transcripțional, mai puțin condensate, cunoscute sub numele de *eucromatină*. Doar o mică parte (2%) din ADN nerepetitiv alcătuiește *regiunile codante ale genelor ce codifică proteine* (exonii). Ele sunt transcrise de ARN polimeraza II și, de aceea, se numesc "*gene de clasă II*". Restul ADN-ului nerepetitiv este *necodant* și are funcții încă necunoscute; se găsește în interiorul genei (introni) și în regiunile ce separă genele.

#### b. **ADN moderat repetitiv**

ADN moderat repetitiv (30 %) este alcătuit din *secvențe scurte*, de 300-1000 pb (rar mai mari), *repetate de zeci și sute de mii de ori* și *dispersate* în genom; majoritatea secvențelor moderat repetitive sunt transcrise în ARN și formează frecvent "*familii*" de secvențe înrudite, unele cu funcție cunoscută (codante pentru ARNr și ARNt), altele cu funcție necunoscută



(secvențele SINEs sau LINEs).

- *Genele ribosomale*, pentru ARNr<sup>4</sup>, sunt transcrise de ARN polimeraza I (și numite "gene de clasă I"). Ele se găsesc în unități repetate în tandem ce formează 150-200 copii, localizate pe brațele scurte ale cromosomilor acrocentrici, în regiunile "organizatorilor nucleolari", care formează nucleolii în nucleul interfazic; excepție fac genele pentru ARNr 5S situate pe cromosomul 1q42, aproape de telomer.
- *Genele pentru ARNt* (și alte molecule mici de ARN), transcrise de ARN polimeraza III ("gene de clasă III") sunt organizate în grupe de gene repetate în tandem și localizate în diferiți cromosomi (mai ales 1 și 6).
- *Secvențele SINEs* ("short interspersed repeated sequences") sunt secvențe scurte de 100-400 p.b., existente în circa 500.000 de copii (3-5% din genom), dispersate în cromosomi; ele sunt reprezentate în special de familia Alu<sup>5</sup>. Funcția lor nu este cunoscută; s-a presupus că ar avea un rol în inițierea replicării în diferite puncte ale ADN. Secvențele Alu pot acționa ca *elemente transpozabile*.
- *Secvențele LINEs* ("long interspersed repeated sequences") au lungimea de 6-7 kb, se află în circa 100.000 copii, dispersate în genom; se cunosc familia L1 (sau Kpn 1) și The 1. Ca și secvențele Alu par să se multiplice prin retrotranspoziție. Secvențele LINEs au foarte probabil rol în *împerecherea corectă* a cromosomilor omologi în meioză, condiție esențială pentru *schimbul egal* de segmente cromosomice. Se consideră că prin împerechere incorectă între secvențe identice dar din poziții și uneori cromosomi diferiți se pot produce (prin CO inegal) *recombinări aberante* care generează mutații și deci boli genetice.

### c. ADN înalt repetitiv

ADN înalt repetitiv (10 % din genom) este alcătuit din *secvențe foarte scurte* (2-200 p.b.), *repetate în tandem* ( $\rightarrow\rightarrow\rightarrow\rightarrow$ ), de milioane de ori; ele *nu sunt transcrise*. Unele secvențe de ADN înalt repetitiv, numite și *ADN satelit* ( $\alpha$ ,  $\beta$ , 1, 2, 3) alcătuiesc *blocuri mari de heterocromatină constitutivă* în anumite regiuni cromosomice: centromer, telomere, constricții secundare, benzile G, etc; ele au evident un *rol structural*<sup>6</sup>. Alte secvențe *foarte scurte* (14-65 p.b.) și *repetate în tandem* sunt *dispersate* în toți cromosomii (excepție X și Y), ocupând anumite *situsuri precise*; aceste secvențe formează **minisateliți** hipervariabili (sau VNTR de la "variable number of tandem repeats"). Mai există secvențe de 1-13 p.b., formate de regulă din repetiția unui dinucleotid (în special AC și AT), cu o structură foarte polimorfă și cu o distribuție uniformă în genom; ele se numesc **microsateliți** (STR sau VNDR).

Minisateliții sunt alcătuiți dintr-o regiune centrală, cu o secvență identică (ce poate fi pusă în evidență cu o sondă specifică) și regiuni periferice variabilă. Ei sunt niște veritabili *markeri genetici individuali*: numărul de repetiții al secvenței unui minisatelit variază de la o persoană la alta. Numărul mare de minisateliți și de variante pentru fiecare din ei fac ca probabilitatea întâlnirii a doi indivizi identici (dar neînruđiți) cu același profil să fie mai mică de  $10^{-20}$ . Minisateliții reprezintă "**amprenta genetică**" a fiecărui individ (figura 2.11) folosită astăzi în: medicina legală, cartografierea genomului uman, diagnosticul molecular al bolilor genetice, analiza cromosomică.

Mai recent, IHGSC (2001) stabilește că **secvențele repetitive** alcătuiesc mai mult de 55% din schița genomului uman și le împarte în cinci clase: (1) repetiții dispersate, produse de *transposoni*; (2) copii inactive a genelor sau *pseudogene*; (3) *repetiții de secvențe simple* (SSRs); (4) *duplicații segmentare* a unor blocuri de 10-300kb; (5) *blocuri repetate în tandem*, localizate la centromer, telomere, brațe scurte cromosomi acrocentrici.

- Cele mai multe secvențe repetitive (circa 45%) sunt derivate prin transpoziție. La mamifere și om, elementele transpozabile sunt de patru feluri: LINEs, SINEs, retrotransposoni LTR (elemente asemănătoare retrovirusurilor) și transposoni ADN „fosili” (asemănători cu Tn bacterieni). Primele trei categorii *transpozează* prin intermediul unei copii de ARN, care sub acțiunea unei *transcriptaze inverse* va forma o copie de tip ADN ce se va introduce într-un alt loc din ADN.
- Repetițiile de secvențe simple (SSRs, de la *Simple Sequence Repets*) sunt reprezentate în special de *microsateliți*, repetiții scurte (n=1-13 pb) și *minisateliți*, *repetiții mai lungi* (n=14-500 pb). SSRs sunt produse foarte probabil prin devieri frecvente de împerechere (*slippage*=alunecare, patinare) în cursul replicării ADN. Formează circa 3% din genom, cele mai frecvente fiind repetițiile dinucleotidice (0.5%) în special AC și AT; se găsesc câte una la fiecare 2kb.

<sup>4</sup> Subunitatea mare a ribosomului conține ARNr 28S, 5,8 S și 5S iar subunitatea mică ARNr 18 S.

<sup>5</sup> Denumirile Alu, Kpn, The - provin de la enzimele cu care aceste secvențe sunt "decupate" din genom.

<sup>6</sup> ADN satelit  $\alpha$  (sau *alphoid*) este specific fiecărui cromosom și poate fi evidențiat, chiar în nucleul interfazic, cu sonde centromerice specifice

- caracteristică remarcabilă a genomului uman este *duplicația segmentală* a unor porțiuni/blocuri (1-200kb, majoritatea >10kb) din secvența genomică în una sau mai multe locații, pe același cromosom (duplicații intracromosomice<sup>7</sup>, mai ales pericentromerice) sau pe cromosomi diferiți (duplicații intercromosomice<sup>8</sup>). Ele alcătuiesc circa 5% din genomul uman. Interesant este faptul că multe duplicații s-au produs foarte recent în evoluția spre om, lipsind la specii apropiate.

Secvențele repetitive au fost considerate „deșeu” neinteresante. Și totuși ele s-au dovedit a fi markeri paleontologici valorosi pentru a înțelege evoluția populațiilor umane, selecția și mutațiile. Au permis înțelegerea structurii și dinamicii cromosomilor. Mai mult, ca agenți activi, repetițiile au remodelat genomul uman, producând rearanjamente care au modificat genele existente (producând mutații) sau au creat gene noi. Dacă menționăm, în final, și valoarea lor ca instrumente de testare / diagnostic în genetica medicală<sup>9</sup> atunci cu siguranță nu le vom considera „un gunoi” și va trebui să le acordăm atenția necesară.

### 2.3 ADN GENIC

Genomul nuclear este alcătuit din: *ADN genic* (25 %) și *ADN extragenic* (75 %). (Figura 2.9). ADN genic conține secvențele codante și necodante din structura genelor active, fragmentelor de genă sau genelor inactivate (pseudogene).

Gena este unitatea de informație genetică sau ce codifică *un produs primar specific* (proteine sau ARN necodant). Structura genelor este foarte complexă (vezi capitolul 3) dar toate genele prezintă o regiune centrală, transcrisă, flancată de două regiuni laterale, netranscrise, cu rol reglator. Regiunea centrală („*cadru de lectură*” sau *ORF* de la „open reading frame”) este *fragmentată* în secvențe codante (*exoni*) separate de secvențe necodante, intercalare (introni). ADN genic se împarte deci în *ADN codant* (10 %) (reprezentat de exonii celor circa **35.000 de gene** ce codifică proteine sau alte molecule de ARN) și *ADN necodant* (90%) alcătuit din introni, gene sau fragmente de gene nefuncționale (pseudogene).

Genele sau cel puțin regiunile lor codante alcătuiesc numai *o mică fracțiune din genomul uman* (mai puțin de 5 %) dar ele reprezintă funcția biologică majoră a genomului și scopul final al proiectului. Identificarea lor este însă o sarcină dificilă mai ales datorită dimensiunilor mici ale exonilor. Genele genomului nuclear se pot împărți în două categorii: gene ce codifică proteine și gene ce codifică diferite clase de ARN necodant.

**Gene ce codifică proteine** reprezintă circa 1,5 % din genom. Studiile *IHGSC* au arătat că: există o variație considerabilă în *mărimea* genelor (în special pe seama intronilor) precum și în *distribuția* lor: regiunile bogate în GC (din benzile G negative) au o mare densitate genică iar genele sunt mai compacte comparativ cu regiunile bogate în AT (benzile G pozitive), mai sărace în gene; *densitatea* genelor este mai mare în regiunile subtelomerice iar unii cromosomi (de ex., 19 și 22) sunt mai bogați în gene decât alții (de ex., 4 și 18). Un element remarcabil este faptul că aproximativ 35% din genele umane suferă matisare alternativă, generând, prin selecția exonilor, mai mulți produși diferiți structurali și funcționali (deci cele circa 35000 de gene produc aproape un număr triplu de proteine). Un procent din genele umane exprimate sunt membri ai unor **familii de gene** care prezintă o mare similitudine a secvenței, structurii și funcției lor (vezi capitolul 3).

**Genele pentru ARN necodant (ncARNs)** sunt împărțite (după *IHGSC*, 2001) în mai multe clase majore: (1) gene pentru *ARN de transfer* (tARN); (2) gene pentru *ARN ribosomal* (rARN); (3) gene pentru *ARN nucleolar mic* (snoARN) necesar procesării rARN; (4) gene pentru *ARN nuclear mic* (snARN) ce intervin în procesarea intronilor. Mai există și alte tipuri: ARN telomeraza, Xist transcript etc.

<sup>7</sup> Pe cromosomul 17 există trei copii a unei secvențe de circa 200kb, separate prin 5 Mb; copiile sunt atât de similare (99%identitate) încât generează prin recombinare paralogă sindroamele cu microdeleții Smith-Magenis și Charcot-Marie-Tooth 1A;

<sup>8</sup> un segment de 9,5kb din Xq28 ce conține și locusul pentru adrenoleukodistrofie, se găsește duplicat, lângă centromer, pe cromosomii 2,10,16 și 22

<sup>9</sup> Din cauza gradului înalt al polimorfismului de lungime dintr-o populație microsateleții sunt markeri genetici valoroși în testările genetice.

#### 2.4. ADN EXTRAGENIC

ADN extragenic (75%) este alcătuit din secvențe *inactive transcripțional*, unice sau repetitive. Secvențele repetitive au fost clasificate (Strachan și Read, 1999) în două categorii:

- *ADN repetat în tandem și grupat în "blocuri"* cu diferite localizări cromosomice; această categorie de ADN înalt repetitiv se numește generic ADN satelit și se subîmparte în patru clase: megastelit, satelit, minisatelit și microsateelit;
- *ADN repetat și dispersat* în numeroase situsuri în spațiul dintre gene; este reprezentat de secvențele SINEs și LINEs.

### 3. GENOMUL MITOCONDRIAL.

Genomul mitocondrial este definit printr-un singur tip de *ADN circular*, bicatenar (figura 2.10), format din 16.569 pb. Secvența sa nucleotidică a fost complet descifrată (Anderson et al, 1981) și se caracterizează printr-o mare *densitate* de secvențe codante. Cele două catene ale ADN mitocondrial au o compoziție bazică diferită: o catenă "greă" (**H**) este mai bogată în guanină iar cealaltă catenă "ușoară" (**L**) în citozină. Într-o mică regiune, *bucla D*, ADN este alcătuit din trei catene, prin sinteza unei piese scurte adiționale la catena H, cunoscută ca ADN 7S.

Fiecare celulă umană conține câteva mii de copii ale ADN mitocondrial (ADNmt) și de aceea cantitatea lui totală, raportată la ADN unei celule somatice, poate reprezenta *până la 0.5%*. În cursul diviziunilor celulare mitotice, moleculele de ADN mitocondrial ale celulei inițiale segregă *la întâmplare* în celulele fiice.

Trebuie subliniat că genomul mitocondrial al zigotului provine *exclusiv de la ovul, deci de la mamă*, fapt ce determină un tip particular de *transmitere maternală* a genelor mitocondriale: de la mamă la toți copiii săi.

Genomul mitocondrial mai prezintă câteva elemente particulare, diferite de genomul nuclear: *NU este asociat cu proteine histonice sau nehistonice și nu conține ADN repetitiv* (tabelul 2.1). Genomul mitocondrial este extrem de *compact*: circa 93% din ADN este format din secvențe codante (absente doar în bucla D), ce formează **37 de gene** (28 pe catena H și 9 pe catena L): 13 gene codifică polipeptide (constituenți ai sistemului de fosforilare oxidativă), 22 gene codifică ARNt și 2 gene ARNr (figura 2.13). Restul proteinelor mitocondriale sunt codificate de gene nucleare, sintetizate în citoplasmă și importate în mitocondrii. Genele mitocondriale sunt aproape totdeauna *contigue* iar unele chiar *suprapuse*; ele *nu conțin introni*.

Transcripția începe în promotorii (PH și PL) aflați în bucla D, este *continuă* (deci multigenică) și se desfășoară în direcții diferite pe cele două catene, generând *un transcript multigenic mare* (ce va fi ulterior secționat în mai multe molecule de ARN). Codul genetic mitocondrial *diferă puțin* de cel nuclear. El are patru codoni stop (nonsens) din care doi sunt codoni sens în ADN nuclear; codonul stop UGA din ADN nuclear este codon sens în ADN mitocondrial. *Replicarea este unidirecțională* și începe în puncte diferite de origine (O) p entru cele două catene<sup>10</sup>.

Diferențele dintre structura și funcția lor sunt prezentate sintetic în tabelul 2.1

**Tabelul 2.1 Diferențele dintre genomurile umane nuclear și mitocondrial**  
(modificat după Strachan și Read, 1999)

Caracteristici	Genom nuclear	Genom mitocondrial
Mărime	3200 Mb	16,6 Kb
Număr de molecule de ADN diferite	23 (la celulele XX) sau 24 (la celulele XY)	O moleculă circulară de ADN

<sup>10</sup> ADN mitocondrial, prin particularitățile sale structurale, net diferite de ADN nuclear, se aseamănă foarte mult cu ADN procariotelor ancestrale; de aceea și consideră că mitocondriile își au originea din includerea unei particule asemănătoare bacteriilor de către primele celule eucariote apărute în evoluție.

Număr total de molecule de ADN per celulă	23 în celulele haploide și 46 în celulele diploide	Câteva mii de
Asocierea cu proteine	Mai multe clase de histone și proteine nehistonice	Neasociat cu proteine
Procentul de ADN codant	~ 5 %	~ 97 %
Număr de gene	~ 35.000 gene	37
Densitatea genelor	Mică (~ 1 la 40 kb)	Mare (~ 1 la 0.45 Kb)
Introni	Prezenți în cele mai multe gene	Absenți
ADN repetitiv	30 – 40 %	Foarte puțin
Transcripție	De obicei individuală	Transcripție continuă a genelor multiple
Repararea leziunilor ADN	Mecanisme multiple, eficientă	Unele mecanisme de reparare absente; mutațiile se acumulează rapid.
Recombinare	Cel puțin una pentru fiecare pereche de cromosomi meiotici	Absentă
Ereditate	Mendeliană pentru genele de pe autosomi și cromosomul X; paternală pentru secvențele de pe Y	Exclusiv maternă

ADN mitocondrial poate suferi mutații<sup>11</sup> producând o serie de boli degenerative (vezi capitolul 8), care sunt *transmise într-un mod specific, de la mamă la toți descendenții; bărbații bolnavi nu transmit boala*. Atunci când se produce o mutație în ADN mitocondrial rezultă în mitocondrie un amestec de molecule mutante și normale, numit *heteroplasmie*. Când o celulă se divide ADN mitocondrial mutant va fi împărțit *la întâmplare* între celulele fiice și astfel, în timp, procentajul de ADN mit mutant între diferite linii celulare și țesuturi va fi diferit, fenomen numit *segregare replicativă*. Studiul familiilor în care există heteroplasmie cu ADN mitocondrial mutant, relevă că procentajul ADNmt mutant crește și producția de energie scade treptat, până sub un prag minimum necesar funcționării normale a țesutului, moment în care manifestările clinice devin evidente. De aceea bolile mitocondriale au un debut tardiv și o evoluție progresivă.

S-a demonstrat că ADN mitocondrial poate suferi *mutații somatice*, în celulele corpului după naștere, care se acumulează rapid datorită absenței unor mecanisme de reparare. Astfel, aceste *mutații somatice* au probabil un rol important atât în debutul și progresia bolilor mitocondriale, a unor boli degenerative precum și în procesul de senescență.

#### 4. SCHIȚA SECVENȚEI GENOMULUI UMAN

La 15 februarie 2001 a fost publicată „*Schița genomului uman*”. Acest lucru a fost realizat concomitent de International Human Genome Sequencing Consortium (un proiect public început în 1990, ce implică 20 de laboratoare și sute de cercetători din întreaga lume) și de Celera Genomics, o companie privată. Ambele schițe prezintă secvența a circa 96% din regiunile eucromatice ale cromosomilor umani.

Mărimea totală estimată a genomului uman este de 3,2 Gb (*gigabase*), din care 2,95Gb reprezintă *eucromatina*. Secvențele codante cuprind mai puțin de 5% din genom iar numărul prognozat de gene este cuprins între 30.000 și 35.000. Acest număr este relativ mic dacă îl comparăm cu 6.000 la o celulă de drojdie, 13.000 la drosofilă, 18.000 la un vierme și 26.000 pentru o plantă. Se pune firesc întrebarea: *cine face diferența dintre om și mamiferele superioare* (de ex. Cimpanzeul), ca să nu vorbim de celelalte organisme multicelulare. Este posibil un răspuns dacă comparăm...proteinele. Se estimează că genomul uman codifică 1.278 de familii de proteine dar numai 89 sunt specifice vertebratelor! (realizând complexitatea neuronală, coagularea sângelui, imunitatea, semnalizarea intra- și intercelulară, dezvoltarea,

<sup>11</sup> Rata mutațiilor ADNmt este de 10-15 ori mai mare decât a ADN nuclear, fapt ce duce la acumularea unui spectru larg de secvențe polimorfice de ADN mt în populațiile umane; analizând distribuția acelor polimorfisme în populațiile umane se pot obține indicații privind evoluția lor în timp.

apoptoza etc). Cele mai multe dintre funcțiile celulare – metabolismul bazal, transcripția și translația, replicarea, diviziunea – se realizează *la fel ca la bacterii* sau organismele unicelulare. Diferența majoră între om și nevertebrate o reprezintă *complexitatea proteinelor*, structura lor *modulară* (pe domenii și motive), care permite combinații noi. “*Istoria omului este de fapt o arhitectura nouă realizată cu piese vechi*” (Baltimore D., 2001). La aceasta se adaugă interacțiunile complexe dintre proteine, mecanismele subtile de reglare a sintezei lor și nu în cele din urmă posibilitățile de a produce proteine diferite pe baza informației dintr-o singură genă (matisare alternativă). Cert este că a înțelege cine determină enorma complexitate a ființelor umane rămâne o enigmă de rezolvat în viitor.

Ar mai fi o întrebare la fel de tulburătoare: *ce deosebește un organism uman de altul, evident la nivelul genomului, făcându-ne pe fiecare unici?* Analiza schiței genomului uman arată că oamenii diferă între ei prin circa o pereche de baze la fiecare mie de pb. Acest polimorfism al unui singur nucleotid (SNPs de la *single nucleotid polymorphisms*) reprezintă markerii noștri de individualitate cei mai valorosi, care determină probabil (dar nu stim cum) și răspunsul la agresiuni (boala) și efectele medicamentelor iar la scara mai mare abilitatea, memoria, coordonarea fizică, creativitatea etc. Cunoașterea aprofundată a genomului uman ne va permite să învățăm multe din această carte a vieții.

Din multitudinea datelor ce însoțesc „*Schița secvenței genomului uman*” vom sublinia câteva idei mai importante.

- Peisajul genomic prezintă o *mare variabilitate* în distribuția unor caractere: gene, elemente transpozabile, conținut de GC, distribuția insulelor CpG, rata recombinărilor în meioză;
- Cele circa 35.000 de gene<sup>12</sup> au o *structură mai complexă* ca la alte vertebrate și au posibilități de a genera (prin matisare alternativă) un număr mare de proteine;
- Întregul set de proteine (*proteom*) codificat de genomul uman este mai *complex* decât la nevertebrate; ele au domenii și motive care pot fi aranjate în diferite structuri;
- Există *regiuni bogate și sărace în GC*, care se corelează pozitiv cu densitatea genelor, benzile cromosomice, compoziția secvențelor repetitive, rata recombinărilor.
- Genele sunt distribuite inegal în genom. Unii cromosomi (de ex., 17, 19, 22) au o densitate mare de gene comparativ cu alții (de ex., 4, 8, 13, 18 și Y).
- *Insulele CpG* (în care nu se produce metilarea) se află frecvent la capătul 5’ al genelor;
- *Rata de recombinare meiotică* între cromosomii omologi este mai mare pe brețele scurte, mare la capătul cromosomilor și absentă la centromer;
- *Rata mutațiilor* este de două ori mai mare în meioza masculină decât la femeie, deci cele mai multe mutații se produc la bărbat;
- Au fost identificate mai mult de *1,4 milioane de SNPs* ce prezintă un polimorfism foarte mare între indivizii unei populații (rata de heterozigotitate este de 1 la 1300 pb);
- Mai mult de jumătate din ADN reprezintă *secvențe repetitive* de diferite tipuri. Este totuși puțin probabil că tot acest “junk ADN” (deșeu/gunoi) reprezintă elemente “egoiste” ce parazitează genomul uman (el aproape lipsește la vertebratele inferioare). Cu siguranță el a avut și mai are efecte negative dar și pozitive. Foarte probabil însă aproape toate aceste repetiții parazitice de ADN par vechi și epuizate deoarece există puține probe că ele își continuă reinsertia în prezent.

Rezultatele publicate de Consorțiul Internațional vizează și alte domenii: analiza *proteomului*, istoria și evoluția genomului uman, aplicațiile în medicină și biologie. Ne vom referi succint la ultimul aspect. O aplicație esențială a cercetării genomului uman o reprezintă abilitatea de a găsi gene cu funcții biochimice necunoscute. Deasemeni, analiza secvenței genomului uman a permis identificarea mecanismelor ce duc la sindroamele cu microdeleții cromosomice (de ex. sdr. Velo-Cardio-Facial sau sdr Williams-Beuren) precum și la

<sup>12</sup> L 5 ianuarie 2003 erau identificate și localizate pe cromosomi 26148 de gene iar alte a48 nu erau încă localizate.

identificarea rapidă a genelor paraloge de boală, adică a unor gene înrudite care produc boli asemănătoare (de ex. genele pentru presenilina-1 și presenilina-2 în care mutațiile produc o formă de boală Alzheimer cu debut precoce. Aceasta va genera noi opțiuni terapeutice.

În concluzie, publicarea primei schite a secvenței genomului uman (februarie 2001) reprezintă un progres considerabil dar mai sunt încă multe de făcut până la finalizarea proiectului și extragerea tuturor informațiilor din cunoașterea acestei secvențe pentru a înțelege cum funcționează genomul uman.

Vom menționa în încheiere că se cunoaște secvența completă a ADN din cromosomii 20, 21 și 22.

## D. ORGANIZAREA ADN ÎN CELULĂ

### 1. APARATUL GENETIC

Structurile celulare care conțin ADN (nucleul și mitocondriile), precum și cele care intervin în realizarea funcțiilor sale (ribosomii și centriolii) alcătuiesc **aparaturile genetice**. Nucleul este elementul principal al aparatului genetic, centrul de comandă și control al tuturor activităților celulare. El conține circa 99.5 % din toată cantitatea de ADN a celulei.

Structura nucleului diferă în interfază și diviziune, cele două etape importante ale ciclului de viață al celulei. Fără a intra acum în detalii (vezi capitolul 5.B.1) vom preciza că interfaza este alcătuită (figura 2.11) din: *faza G<sub>1</sub>* – presintetică, în care cromosomii despiralizați sunt *monocromatidieni* și au o singură moleculă de ADN iar conținutul total al ADN este 2C; *faza S* – în care se produce sinteza ADN, prin replicare semiconservativă, și cantitatea de ADN a celulei se dublează la 4C; *faza G<sub>2</sub>* – postsintetică, în care cromosomii sunt *bicromatidieni*, fiecare cromatid fiind alcătuită dintr-o singură moleculă de ADN. Prin diviziunea (*mitoza*) se produce, prin disjuncție (separare) cromatidiană, distribuția (segregarea) egală și totală a materialului genetic dublat în faza S.

**Nucleul interfazic** este delimitat la exterior de o *membrană dublă*, cu pori (prin care se realizează schimburile nucleo-citoplasmice); în interiorul nucleului se află: un *nucleoschelet* sau matrice nucleară (formată din ARN și proteine, în special actină), *cromatină*, *nucleoplasmă* și *nucleol(i)* (cu rol esențial în formarea ribosomilor).

În nucleu, fiecare moleculă de ADN se *asociază* cu proteine histonice, nehistonice și mici cantități de ARN, formând un complex nucleo-proteic numit **cromatină**. Interacțiunile dintre ADN și proteine au un *rol structural* fundamental în organizarea supramoleculară a ADN, precum și un *rol funcțional* în mecanismele complexe care reglează expresia și replicarea genelor. Relațiile complexe dintre ADN și proteine nu sunt încă complet elucidate.

#### CASETA 2.2

##### Proteinele histonice și nehistonice

**Histonele** sunt proteine bazice prezente la toate eucariotele, cu mare afinitate pentru ADN, fixându-se pe mica incizură și neutralizând sarcinile acide. Raportul ADN - histone este egal cu 1. Genele care codifică histone au o structură particulară (fără introni), se află în mai multe exemplare (peste 20), localizate pe cromosomii 1, 6, 12. Se exprimă în faza S a ciclului celular, sincron cu replicarea ADN. După numărul și tipul de aminoacizi se deosebesc cinci tipuri de histone prezente la toate eucariotele: **H1, H2A, H2B, H3 și H4**. Cu excepția histonei H1, celelalte tipuri (și mai ales H3 și H4) au o structură stabilă, bine conservată în evoluție. Acest lucru relevă rolul structural important pe care îl au aceste proteine în organizarea supramoleculară a ADN și compactarea lui în nucleu. Ele intră în alcătuirea **nucleosomilor**, particule fundamentale din structura fibrelor de cromatină. Histonele au însă și roluri funcționale, fiind implicate în reglarea expresiei

*genelor (transcripție): acetilarea histonelor determină activarea unor gene, iar metilarea lor produce represia genică. Fosforilarea histonei H1 provoacă condensarea fibrelor de cromatină interfazică în cromosomi și declanșează mitoză. O dovadă recentă a rolului funcțional al histonelor este descoperirea histonei H1<sup>0</sup> (numită și H5) care lipsește în celulele care se divid și apare în celulele diferențiate sau celule în faza G<sub>0</sub>. Au fost identificate și alte variante funcționale. Astfel histona H2AZ, cu rol important în reglarea transcripției, este o variantă larg răspândită la nivelul cromosomilor, dar neuniform. CENP-A este o proteină înrudită cu H3 care are rol major în activitate centromerilor.*

***Proteinele nehistonice** sunt proteine acide și neutre, numeroase, heterogene și puțin abundente; o excepție face grupul proteinelor HMG ("high mobility group"). Unele proteine nehistonice au un rol structural formând "matricea" cromosomilor dar majoritatea au roluri funcționale, intervenind specific în reglarea sau modularea activității genelor. Ele se fixează la ADN în marea incizură laterală. Proteinele HMG participă probabil la reglarea replicării ADN.*

Moleculele de ADN și histone suferă *spiralizări succesive*, alcătuind un sistem ierarhizat de **fibre de cromatină**, de dimensiuni diferite. Ele realizează "*compactarea*" moleculelor lungi de ADN în spațiul nuclear, care nu depășește câțiva micrometri în diametru.

La începutul diviziunii, membrana nucleară și nucleolii dispar, iar fibrele de cromatină se spiralizează, se condensează și formează **cromosomii**; la sfârșitul diviziunii aceștia se despiralizează și persistă în interfază sub forma filamentelor de cromatină. Cromatina și cromosomii sunt *două modalități diferite de organizare morfofuncțională* a materialului genetic, în interfază și diviziune.

O dovadă elegantă a acestei afirmații o reprezintă "*fenomenul de condensare prematură a cromosomilor*". El se realizează prin *fuzionarea experimentală* a unei celule în diviziune (metafază) cu o celulă interfazică (în faza G<sub>1</sub>, S sau G<sub>2</sub>). Se produce o "sincronizare" a celulei interfazice și o condensare precoce a filamentelor fine de cromatină, care vor prezenta toate detaliile morfologiei cromosomilor, fiind monocromatidieni, dacă celula se află în G<sub>1</sub> sau bicromatidieni dacă inducerea condensării s-a făcut în faza G<sub>2</sub> (pentru celulele în faza S condensarea precoce determină un aspect "pulverizat" al cromatinei). De menționat că prin tehnica condensării precoce a cromosomilor pot fi vizualizați și analizați cromosomii gameților, celule interfazice.

## 2. CROMATINA

Asocierea obligatorie dintre ADN nuclear și proteine se numește cromatină. În diferite stadii ale ciclului celular cromatina prezintă diferite grade de condensare și se prezintă sub două tipuri morfo-funcționale distincte: eucromatina și heterocromatina (tabel 2.2)

**Tabelul 2.2. Caracteristicile eucromatinei și heterocromatinei.**

Caracteristici	EUCROMATINA	HETEROCROMATINA
Condensare	Fin dispersată	Puternic condensată (cromocentri)
Colorare	Slabă	Intensă
Replicare în faza S	Precoce	Tardivă
Activitate genetică	Activă	Inactivă
Compoziție chimică	Predomină p.b. C - G; ADN nerepetitiv; proteine nehistonice	Predomină p.b. A - T; ADN repetitiv; proteine histonice

### 2.1. EUCROMATINA ȘI HETEROCROMATINA

**Eucromatina** are mai mult ADN nerepetitiv, în care predomină perechile de baze G-C, și proteine nehistonice; este puțin condensată și reprezintă partea activă genetic (transcripțională)

a cromatinei; se replică precoce la începutul fazei S. Alcătuieste benzile R pozitive din cromosomii cu marcaj în benzi.

**Heterocromatina**, are mai mult ADN repetitiv (în care predomină p.b. A-T) și histone, este foarte compactată (condensată sub formă de *cromocentri*), inactivă genetic, cu replicare tardivă. Deși inactivă genetic (transcripțional), heterocromatina îndeplinește cu siguranță *anumite funcții celulare*. Se presupune că heterocromatina stabilizează centromerul și telomerele cromosomului, intervine în desfășurarea meiozei (în sinapsa cromosomilor omologi) și, probabil, în diferențierea celulară. Heterocromatina este de două feluri: constitutivă și facultativă

- **Heterocromatină constitutivă** care se găsește constant sub formă condensată. Ea nu conține gene funcționale, și este formată din ADN înalt repetitive (ADN satelit). În structura cromosomului, heterocromatina constitutivă se află în regiunea centromerului, pe brațul lung al cromosomului Y, pe brațele scurte ale acrocentricilor și în constricțiile secundare. Ea poate fi evidențiată în cromosomii metafazici, printr-un tratament specific, sub forma unor benzi numite benzi C.
- **Heterocromatină facultativă** care diferă la celule diferite și chiar la organisme diferite: în unele celule anumite gene sau părți din cromosomi pot fi active; în alte celule, aceleași structuri pot să nu funcționeze, fiind sub formă de heterocromatină. Astfel, **heterocromatinizarea** ar interveni în reglajul genic. Exemplul cel mai tipic îl constituie *cromatina sexuală*; unul din cei doi cromosomi X la organismele de sex feminin este inactivat formând **cromatina X**. Procesul se produce la întâmplare și independent în fiecare celulă

## 2.2. CROMATINA SEXUALĂ

**Cromatina sexuală** reprezintă un cromocentru cu particularități morfologice bine definite, care permite stabilirea numărului de cromosomi sexuali și, prin aceasta, *determinarea sexului genetic (XX sau XY) și anomaliilor numerice ale cromosomilor sexuali*.

Cromatina sexuală se prezintă diferit la femeie și la bărbat, deoarece rezultă prin mecanisme diferite.

- La femeie (XX), cromatina sexuală se formează prin *inactivarea unuia din cei doi cromosomi X*, care formează un corpuscul de heterocromatină numit **corpuscul Barr** sau cromatină X.
- La bărbat (XY) cromatina sexuală reprezintă *heterocromatina brațului lung* al cromosomului Y, care se vizualizează la microscopul în fluorescență prin afinitatea particulară pentru diferite substanțe fluorescente (în special quinacrină); de aceea se mai numește **corpusculul F** sau cromatina Y.

### **a). Cromatina X** (Barr și Bertram, 1949)

Așa cum am precizat și vom discuta ulterior în detaliu (vezi capitolul 4.B.4), cromatina X rezultă la femeile XX prin **inactivarea** unuia din cei doi cromosomi X, care prin condensare (heterocromatinizare) va forma corpusculul Barr. În felul acesta, atât la femeie cât și la bărbat, va rămâne *numai un singur X rămâne funcțional*; la ambele sexe, toți cromosomii X în plus vor fi heterocromatinizați. Potrivit **ipotezei Lyon** (1961), inactivarea cromosomului X este *totală*, se produce *precoce* în perioada embrionară și este *definitivă*, pentru toată viața. Procesul de inactivare a unuia din cei doi cromosomi X (de origine maternă și paternă) se produce la *întâmplare și independent* în fiecare celulă.

Cromatina X, se poate evidenția pe frotiuri realizate cu celulele diferitelor mucoase (de obicei mucoasa bucală), pe frotiuri de sânge (în polimorfonuclearele neutrofile), în bulbul pilos, în celule amniotice și în celule obținute prin biopsia diferitelor organe.

În *celulele epiteliale ale mucoasei bucale*, cromatina X se prezintă sub forma unui *corpuscul* (cromocentru) intens colorat bazofil, situat de obicei pe fața internă a membranei nucleare, ovalar sau plan convex, cu mărime medie de un micron ( $\pm 0.3$ ), numit **corpusculul Barr** (figura 2.12.a). Prin caracteristicile sale el poate fi *deosebit* de nucleol sau alți



cromocentri nespecifici. Teoretic, toți nucleii celulelor provenite de la persoane normale de sex feminin ar trebui să aibă un corpuscul Barr. În practică, procentul celulelor "cromatin X pozitive" este cuprins între 15-35 % datorită: calității improprie pentru analiză a unor nucleii, și probabil, acțiunii unor factori celulari care produc decondensarea cromosomului X fără a afecta însă inactivarea lui. *Numărul de corpusculi Barr este egal cu suma cromosomilor X - 1.* În felul acesta, pe baza numărului de corpusculi Barr se poate preciza numărul cromosomilor X și diagnostică<sup>13</sup>, simplu și repede, sexul genetic și diferite anomalii numerice: X0, XXX, XXY, etc. (figura 2.13).

În *polimorfonuclearele neutrofile* (PMN) cromatina X se poate prezenta sub forma unor **apendici nucleari**, fie "în băț de tobă" (apendice tip A), fie ca un "nodul sesil" (apendice de tip B) (figura 2.12.b). Pentru un diagnostic corect ei trebuie deosebiți de alți appendici nesexuali. Numărul apendicilor sexuali este, ca și în cazul corpusculului Barr, egal cu suma cromosomilor X minus 1.

#### **b). Cromatina Y**

În celule prelevate de la o persoană de sex masculin (XY) se poate evidenția prin colorația cu diferiți fluorocromi (quinacrină) și examinare microscopică în lumină ultravioletă, un corpuscul intens fluorescent, numit **corpuscul F** (figura 2.12.c). El reprezintă aspectul interfazic al celor 2/3 distale a brațului lung al cromosomului Y, alcătuite din heterocromatină intens fluorescentă. Mărimea medie a corpuscului F este 0.25 microni, iar *numărul de corpusculi F este, firesc, egal cu numărul cromosomilor Y.*

### 2.3. STRUCTURA SUPRAMOLECULARĂ A CROMATINEI

Analiza cromatinei la microscopul electronic evidențiază un *sistem ierarhizat de fibre de cromatină*, de dimensiuni diferite (figura 2.14), alcătuite din ADN, histone și proteine nehistonice.

*Primul nivel* de organizare supramoleculară a ADN este **filamentul cu nucleosomi**, cu diametrul de 10 nanometri (nm). **Nucleosomul** este alcătuit dintr-un complex de ADN și histone (figura 2.15.a): o secvență de ADN (de 146 p.b.) se înfășoară (1 tur și 3/4) în jurul unui "miez" histic, cilindric, formată din 8 molecule de histone (câte 2 molecule din H2A, H2B, H3 și H4). Nucleosomii sunt legați între ei printr-un *segment de ADN liber* (60 p.b.), formând filamentul cu nucleosomi, asemănător unui "*șirag de mărgel*". Această structură (menținută strâns prin histona H1, ce leagă doi nucleosomi vecini) realizează o rată de "împachetare" a ADN nativ (dublu helix de 2nm) de circa 10:1.

Mecanismul prin care se formează nucleosomii este încă puțin cunoscut. Cert este faptul că nucleosomii nu sunt structuri statice, rigide, deoarece funcțiile ADN (transcripția, replicarea, recombinația) necesită separarea celor două catene ale ADN și implicit modificarea structurii nucleosomului. Ei sunt fixați la o singură catenă a ADN ("în fază") aceiași de la o celulă la alta.

*Al doilea nivel* de organizare supramoleculară a cromatinei este **fibra de cromatină de 30 nm**. Ea rezultă din spiralizarea în solenoid a filamentului cu nucleosomi (figurile 2.14 și 2.15.b). Această structură (cu pasul de 6 nucleosomi) este stabilizată de histona H1 și realizează o compactare de 5:1. Fibra de cromatină de 30 nm este unitatea fundamentală de organizarea cromatinei în nucleul interfazic.

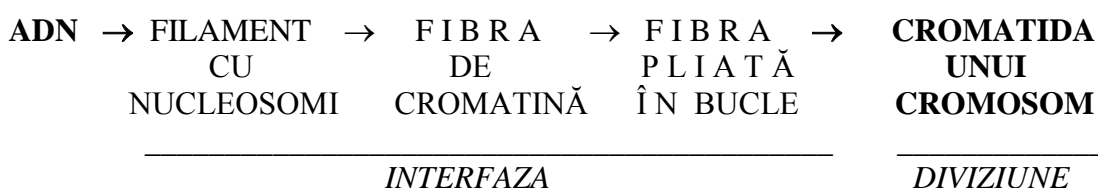
Fibra de cromatină are însă și un rol important pentru *funcționarea genomului*, deoarece prin spiralizare apropie mult diferite regiuni ale ADN care, liniar, se află la distanțe mari unele de altele. În felul acesta, favorizează *interacțiunile genice* necesare pentru expresia adecvată a informației ereditare. Mai mult, solenoidul *nu are o structură omogenă*: zonele spiralizate *alternează neregulat* cu zone nesprializate, unde se pot fixa o serie de proteine specifice, care produc o configurație cromatiniană ce permite accesul ARN polimerazei și deci transcripția.

<sup>13</sup> În laboratoarele cu dotari pentru FISH se folosesc sonde marcate fluorescent pentru X și Y care permit evaluarea mai precisă a prezentei și numărului cromosomilor sexuali în nucleii interfazici.

Al treilea nivel de organizare rezultă prin *plierea* fibrei de cromatină de 30 nm în *bucle laterale*, numite și domenii, de lungimi diferite (20-100 kb); se formează **fibra pliată în bucle laterale** cu un diametru de 300 nm (grad de compactare 10:1). Buclele sunt *atașate*, prin anumite *situsuri de ancorare*<sup>14</sup> din structura fibrei de ADN, la un "*schelet*" sau *matrice proteică* (nonhistică<sup>15</sup>) (figura 2.14), care are o formă identică cu cea a cromosomului metafazic. Se consideră că fiecare buclă sau domeniu (ce conține câteva gene) ar putea fi o *unitate funcțională de transcripție și replicație*; buclele au deci atât o semnificație structurală cât și un rol funcțional important.

Fibra pliată în bucle laterală formează *la începutul profazei*, printr-o puternică spiralizare și condensare (grad compactare 20), **cromatida** unui cromosom (figura 2.14). Ea atinge în metafază o grosime de 700 nm, fiind cel mai înalt grad de compactare a fibrei de bază a cromatinei (30 nm). Fiecare cromatidă a unui cromosom conține deci o *singură moleculă de ADN*, organizată în mai multe structuri succesive și ierarhizate de "*împachetare*". La sfârșitul diviziunii, *în telofază*, se produce despiralizarea/decondensarea cromosomilor.

Relația dintre ADN, fibrele de cromatină și cromosomi se poate reda sintetic astfel:



Molecula de ADN suferă astfel o *compactare de 10.000 de ori* și poate încapa facil în spațiul mic, de câțiva microni, al nucleului. Acest fenomen *favorizează distribuția corectă a materialului genetic* în diviziune și asigură funcționarea ADN.

Înainte de a încheia prezentarea acestor fenomene vom sublinia un alt fapt important. Buclele fibrei de 300 nm *se fixează neregulat* de scheletul proteic. Din loc în loc (în regiuni de ADN în care predomină secvențe cu p.b. A-T) ele formează *mici aglomerări de bucle*, numite **cromomere**, separate prin zone mai laxe (figura 2.16). Pe măsură ce cromosomul profazic se condesează cromomerele mici, vecine, se unesc într-o structură mai mare. Aceste cromomere mari se adună în grămezi și formează benzi intens condensate și colorate (benzi G); ele vor fi separate prin benzi mai puțin condensate și mai clare (benzi R).

ADN care formează benzile G (sau Q) conține mai multe puncte de atașare, strâns apropiate, iar buclele sunt mai dense, mai compactate; coloranții (Giemsa, Quinacrină) care au afinitate pentru regiunile SAR bogate în A-T vor da benzi G. În benzile R densitatea punctelor de atașare este mai mică, buclele sunt mai laxe.

Benzile cromosomice reflectă *structura internă heterogenă* a cromosomului și definesc *regiuni din genom care au proprietăți și funcții diferite*.

### 3. CROMOSOMII UMANI

La începutul diviziunii cromatina se organizează în **cromosomi**, organite nucleare care fixează intens coloranții bazici ("chroma" - culoare; "soma" - corp) și îndeplinesc două funcții importante: *transportă materialul genetic* de la părinți (prin gameți) la descendenți, precum și de la o celulă "mamă" la celulele "fiice" în cursul multiplicării celulare, asigurând *stabilitatea* proceselor ereditare; realizează *amestecul materialului ereditar* între generații succesive, prin procesele de recombinare ce au loc în meioză, sursa principală de variabilitate

<sup>14</sup> "Regiunile de atașare la matrice" (prescurtarea în engleză, SAR) sunt bogate în AT

<sup>15</sup> Printre proteinele matricei se află și *topoisomeraza II* care are un rol esențial pentru condensarea cromosomilor.

*Anomaliile* de număr și structură ale cromosomilor sunt implicate în numeroase stări patologice (vezi capitolul 10) și deaceia explorările citogenetice reprezintă o *metodă importantă de diagnostic* în medicina clinică (sindroame plurimalformative, debilități mintale și tulburări de comportament, tulburări de sexualizare și reproducere, cancer). Orice medic practician trebuie să aibă cunoștințe precise despre metodele de studiu, indicațiile și limitele analizei cromosomice precum și priceperea de a interpreta corect rezultatele explorărilor citogenetice.

### 3.1. MORFOLOGIA CROMOSOMILOR UMANI

*Numărul și morfologia cromosomilor sunt elemente caracteristice pentru fiecare specie.*

La om, în celulele somatice diploide, există în mod normal 46 de cromosomi, iar în gameți (celule haploide) doar 23 de cromosomi. După fecundare, la zigot, se reface numărul diploid și se realizează 23 perechi de **cromosomi omologi**, identici ca mărime, formă și conținut genic<sup>16</sup> - dar diferiți ca origine. 22 perechi de cromosomi sunt identice la cele două sexe și se numesc **autosomi**; o pereche diferă însă la cele două sexe, numindu-se cromosomi sexuali sau **gonosomi**: XX la femeie și XY la bărbat. Cromosomii X și Y sunt omologi doar ca origine și funcție, ambii având un rol important în determinismul sexelor; ei se deosebesc morfologic (cromosomul Y fiind mult mai mic decât cromosomul X) și genetic (cromosomul X are și gene "nesexuale" ce determină diferite caractere ale corpului).

Cromosomii sunt cel mai ușor de analizat în stadiul de *metafază sau prometafază* al mitozei (figura 2.17) deoarece se află în același plan (în "placa ecuatorială") și sunt bine individualizați. În aceste stadii ei sunt alcătuiți din *două cromatide unite la centromer și delimitate la capete prin telomere* (figura 2.18 a). Cromosomii sunt bicromatidieni deoarece în faza S a ciclului celular a avut loc dublarea (replicarea) materialului genetic.

**a). Elementele morfologice și funcționale comune tuturor cromosomilor** sunt: cromatidele, centromerul și telomerele. Ele sunt *esențiale* pentru replicarea și distribuția cromosomilor în diviziune; de aceea ele nu pot lipsi din structura unui cromosom funcțional sau din arhitectura cromosomilor "artificiali" (YAC) care au început să fie "fabricați" în scopuri experimentale.

**(1). Cromatidele** unui cromosom sunt subunități longitudinale identice ("*cromatide surori*") care posedă fiecare o *singură moleculă de ADN* asociată cu proteine sau, mai exact, o fibră de cromatină puternic condensată (figura 2.14). În lungul cromatidelor există, foarte probabil, *secvențe de replicare autonomă* (elemente ARS), bogate în AT, în care se *inițiază* replicarea. Localizarea lor nu a fost încă precis definită la om.

**(2). Centromerul** este locul în care cromatidele surori sunt atașate prin intermediul unor proteine, formând *constricția primară*. Cromosomii au în mod normal *un singur centromer*. Poziția centromerului la fiecare cromosom este *fixă, fiind determinată* de o secvență particulară de *ADN centromeric* înalt repetitiv (ADN satelit), *aceiași* la toți cromosomii; ea formează un bloc de heterocromatină constitutivă, evidențiat prin marcajul C. La aceasta secvență de ADN comună tuturor cromosomilor se poate adăuga o *secvență specifică fiecărui cromosom* (ADN alfoid). La secvențele centromerice se leagă niște proteine specifice CENP (A, B, C, D) care sunt probabil implicate în funcțiile centromerului.

Centromerul împarte cromatidele în două *brațe*, notate convențional cu p (de la "*petit*") pentru brațul scurt și q (de la "*queue*"), pentru brațul lung. După poziția centromerului, cromosomii pot fi:

- *metacentrici* (cu centromerul în la mijlocul cromosomului și brațele aproximativ egale),
- *submetacentrici* (cu centromerul în afara zonei centrale și brațele de lungimi diferite),
- *acrocentrici* (cu centromerul spre un capăt al cromosomului). (figura 2.18 b)

Centromerul are un rol cheie în *diviziunea celulară*, în procesul de segregare. Funcția centromerului este de a asigura distribuția *egală* a fiecărui cromosom, prin mitoză de la celula

<sup>16</sup> Cromosomii omologi au aceleași tipuri de gene (loci omologi), în aceeași ordine dar în același locus ei pot avea forme identice sau diferite ale genelor alele.

“mamă” la “celulele fiice”. În acest proces, ADN centromeric determină fixarea specifică a unor proteine<sup>17</sup> care vor forma *kinetocorii*, locul de fixare a microtubulilor filamentelor fusului de diviziune (în metafază), care vor asigura tracțiunea și deplasarea cromatidelor la polii fusului de diviziune (vezi capitolul 5.B.2). Fragmentele cromosomice fără centromer (“*acentrice*”)<sup>18</sup> nu se atașează la fusul mitotic și nu vor fi incluse în nucleii celulelor fiice iar *cromosomi dicentrici* anormali nu se pot “distribui” corect în diviziune.

Recent s-a stabilit că *alipirea* celor două cromatide la nivelul centromerului este controlată de proteina ISS (de la *Inhibitor of Sister chromatid Separation*). Atunci când cromosomii s-au *alinat corect* în placa metafazică o enzimă (*ubiquitina*) produce degradarea bruscă a proteinei ISS și începe anafaza, cu migrarea cromatidelor surori spre fiecare pol. În absența centromerului se pierde controlul distribuției cromosomilor în celulele fiice; una din ele poate primi două copii ale cromosomilor acentrici se formează de obicei în celule tumorale o structură numită “*double minute chromosomes*”

(3). **Telomerele** - sunt structuri specializate formate din ADN și proteine care acoperă capetele cromosomului. Ele prezintă *un bloc* (3-20 kb) de ADN repetitiv format din secvențe scurte de (5'-TTAGGG-3'), repetate în tandem, de câteva mii de ori; ele sunt identice la toți cromosomii și perfect conservate în evoluție. Sub acest bloc se găsește regiunea subtelomerică (TAR de la *telomere associated repeats*, divizată în două domenii) formată din ADN repetitiv, cu funcții încă necunoscute, dar cu o structură 95% identică la alți cromosomi. Urmează secvențe de ADN specifice fiecărui cromosom

Telomerele au următoarele funcții probabile:

- *Menținerea stabilității și integrității structurale a cromosomului*, apără capetele cromosomilor de degradare și împiedică fuziunea “*cap la cap*” cu alți cromosomi; pierderea telomerelor produce capete cromosomice instabile care au tendința de a fuziona cu capetele altor cromosomi ruți, formând diferite tipuri de aberații structurale.

Recent s-a stabilit că prezența telomerelor la capetele cromosomilor servește ca *semnal* de normalitate; dacă în celulă se produce o ruptură cromosomică și apare un fragment cromosomic această structură anormală este recunoscută de mecanismele de control ale integrității ADN și se produce oprirea temporară a ciclului celular, pentru a permite repararea leziunilor; dacă acest lucru nu este posibil atunci se declanșează apoptoza

- *Asigurarea replicării complete a capetelor cromosomului*. Procesul se realizează cu ajutorul unei *telomeraze*; reducerea activității sale produce o pierdere treptată a secvențelor telomerice, la fiecare replicare; acest fenomen (ce va fi descris în detaliu în capitolul 5) va duce la *scurtarea progresivă a telomerelor*, până la un moment critic ce va bloca diviziunea celulei. Aceasta ar putea fi o explicație a duratei limitate de viață a celulelor somatice. Așa cum vom vedea, fenomenul de scurtare a telomerelor este implicat în *senescență și cancer* (Holt, 1996).
- Participare la stabilirea *arhitecturii tridimensionale a nucleului* (cromosomii se fixează cu telomerele pe fața internă a membranei) și/sau la inițierea *sinapsei corecte a cromosomilor omologi* la începutul profazei meiozei I.

#### **b). Elemente morfologice comune unor cromosomi.**

(1). **Satețiții**. Cromosomii acrocentrici (exceptând Y) au atașate la brațele scurte, mici mase de cromatină numite *satețiți*. Atașarea satețiților se face prin intermediul unor filamente ce conțin genele pentru ARN ribosomal (bogat reprezentat în nucleol); de aceea ele se numesc și *organizatori nucleolari*.

(2). **Constricțiile secundare** (notate convențional cu "h") se găsesc pe cromosomii 1, 9 și 16, pe brațul lung lângă centromer. Sunt alcătuite din ADN repetitiv.

<sup>17</sup> Mutații ale genelor pentru proteinele centromerice perturbă formarea kinetocorilor și pot determina *nedisjunție sau întârziere anafazică*

<sup>18</sup> Fragmentele acentrice sunt rezultatul unor rupturi cromosomice spontane sau induse de factori mutageni

(3). **Situsurile fragile.** Uneori pe cromatidele cromosomilor se observă niște "lacune" necolorate în care cromosomii *se pot rupe* mai ușor, *in vivo* sau în anumite condiții de cultură (folosirea unor antifolați sau aphidicolin, un inhibitor specific al ADN polimerazei). Aceste zone de rezistență scăzută, situate într-un punct specific în lungul cromosomului, se numesc *situsuri fragile*. Majoritatea situsurilor fragile sunt considerate markeri normali. Excepție face un situs fragil *FRAXA* situat pe brațul lung al cromosomului X (*Xq27*), asociat frecvent cu debilitate mintală (*sindromul X fragil*). Studii recente sugerează că unele situsuri ar putea avea un rol în progresia tumorală: rupturile în aceste situsuri produc inactivarea unor gene supresoare de tumori.

### c). Benzile cromosomice, elemente specifice fiecărui cromosom

Prin diferite tratamente (digestie enzimatică, denaturare termică etc) și/sau încorporarea unor coloranți specifici pentru ADN (Giemsa, Quinacrină etc), cromosomii metafazici apar alcătuiți dintr-o *serie continuă de benzi longitudinale*, în care zone intens colorate (benzi G) *alternează regulat* cu altele mai slab colorate (benzi R). Fiecare cromosom are un *model caracteristic al poziției, succesiunii, mărimii și intensității benzilor*, ce permite identificarea sa precisă (figura 2.19). Acest model este *identic* în toate celulele corpului și la toți indivizii speciei<sup>19</sup>. Mărimea benzilor este cuprinsă între 1-10 Mb.

Benzile sunt markeri citologici ai *structurii interne heterogene* a cromosomilor; ele reflectă în primul rând gradul de compactare (condensare) a fibrei de cromatină în lungul cromosomilor; Benzile se corelează în mare măsură și cu organizarea funcțională a cromosomilor, deoarece definesc o *distribuție alternativă a eucromatinei (benzi R) și heterocromatinei (benzi G)*, care posedă proprietăți diferite (tabelul 2.3)

- **Benzile G și Q** sunt zone din cromosomi bogate în *heterocromatină*, mai compactate, ce conțin puține gene active și se replică tardiv spre sfârșitul fazei S; ele posedă ADN bogat în A-T (55-60%) și numeroase secvențe repetitive LINES.
- **Benzile R** sunt arii cromosomice ce conțin *eucromatină*, puțin condensată, cu o mare densitate de gene structurale, active; ADN lor se replică precoce, la începutul fazei S și este bogat în perechi de baze G-C (60%), cu numeroase secvențe repetitive SINES (în special din familia ALU). De aceea anomaliile cromosomice care implică benzile R au consecințe clinice importante.
- **Benzile C**, situate în regiunea centromerică, sunt alcătuite din *heterocromatină constitutivă*. Aceasta se mai găsește pe brațul lung al cromosomului Y, constricțiile secundare și sateliții cromosomilor acrocentrici. Deoarece heterocromatina este lipsită de gene sau genele sunt inactive, modificări structurale în aceste zone nu produc efecte fenotipice.

**Tabelul 2.3 Caracteristicile benzilor cromosomice**  
(modificat după Miller O.J., 1996)

Caracteristici	Benzi - R	Benzi - Q sau G	Benzi - C
Localizare	Brațe cromosomice	Brațe cromosomice	Centromere, Yq
Tip de cromatină	Eucromatină	Heterocromatină	Heterocromatină
Tip secvențe ADN	Unice, unele repetitive	Repetitive, unele unice	Înalt repetitive - ADN satelit
Compoziția bazelor	Bogate în GC	Bogate în AT	Bogate în AT, unele în GC
Secvențe repetitive	SINEs	LINES	ADN satelit
Replicare	Precoce	La mijloc sau sfârșit S	Tardivă
Transcripție	Intensă	Redusă	Absentă
Densitate gene	Numeroase	Puține	Absente
Insule bogate în CpG			
Tip de gene	Gene comune	Gene specific-tisulare	Absente

## 3.2.TEHNICI DE ANALIZĂ A CROMOSOMILOR

### a). Metode de obținere a cromosomilor.

<sup>19</sup> Există doar câteva benzi care nu au o morfologie constantă la toți indivizii..

Analizele citogenetice se pot realiza pe *cromosomii metafazici sau prometafazici*, obținuți din celule care se divid rapid în culturi celulare (limfocite, fibroblaste, celule fetale etc) sau, în unele cazuri, direct din țesuturi cu activitate mitotică intensă (măduvă osoasă, trofoblast, tumori).

(1). **Metodele citogenetice de rutină** folosesc *culturi de limfocite din sângele periferic* (produsul cel mai accesibil pentru studiu).

O probă de 0.5 ml sânge heparinat (recoltată steril) este incubată 48-72 ore (la 37°) într-un *mediu* nutritiv, la care se adaugă ser uman sau de vițel (pentru a îmbogăți conținutul în proteine și factori de creștere) și *fitohemaglutinină* (pentru a stimula multiplicarea limfocitelor T). Cu puțin timp înainte de terminarea culturii, mitozele sunt *blocate în metafază cu colchicină*, substanță ce inhibă formarea fusului de diviziune și trecerea în anafază. Apoi, mediul este înlocuit cu o *soluție salină hipotonă*, care "umflă" celulele și dispersează cromosomii; Urmează *fixarea* celulelor, *etalarea* lor pe o lama microscopică și *colorarea* (cu *Giemsa*). Preparatele sunt examinate la microscop, se numără cromosomii (obișnuit 16 metafaze; 32 în cazul suspiciunii unui mozaic cromosomic) și se analizează morfologia lor; metafazele selecționate sunt fotografiate. Cromosomii, din fotografiile obținute după mărire, sunt *decupați, identificați* și apoi aranjați în **cariotip**, pe baza criteriilor morfologice, în perechi de omologi și grupe. Se analizează atent morfologia și modelul în benzi a fiecărui cromosom. Tehnica de analiză cromosomică este o *metodă laborioasă, complexă și costisitoare*, necesitând o pregătire și o dotare specială. În condiții obișnuite, un rezultat complet nu poate fi obținut decât în 1-2 săptămâni. Există însă și sisteme de analiză computerizată a metafazelor care furnizează rapid și corect cariotipul celulelor analizate; sunt însă scumpe și necesită un dialog permanent "om -mașină".

(2). **Metodele speciale** folosesc *culturi* din alte tipuri celulare: *măduvă osoasă; fibroblaste* obținute prin biopsie de piele; *celule fetale* recoltate prin amniocenteză sau biopsie de trofoblast (placentocenteză); ele au dezavantajul prelevării mai dificile și a unui timp mai lung de cultură. Există deasemeni *variante tehnice* ce permit studiul cromosomilor în prometafază, evidențierea situsurilor fragile<sup>20</sup> sau a sindroamelor cu rupturi cromosomice

(3) **Metodele directe** (fără cultură) se aplică, în anumite situații, țesuturilor ce se divid activ: *măduvă osoasă* în leucemii; *tumori solide; vilozități coriale*, în diagnosticul prenatal. Aceste metode dau rezultate rapide (3-12 ore) dar numărul metafazelor analizabile este variabil și calitatea cromosomilor mediocră. Metodele directe se pot folosi și pentru studiul *cromosomilor meiotici*, mai ales din spermatoците, la bărbat.

#### b). Tehnici de analiză cromosomică.

Din 1956 și până în prezent tehnicile de analiză cromosomică au evoluat permanent, putându-se deosebi schematic patru generații de tehnici.

(1) **Tehnicile de generația I-a** (1956). Cromosomii obținuți prin metodele prezentate mai sus și *fără alt tratament* sunt *uniform colorați* ("*solid staining*") și au puține repere pentru identificarea lor precisă (figura 2.20 a). Folosirea actuală a metodelor ce colorează uniform cromosomii este *limitată* la diagnosticul aneuploidiilor și mozaicurilor cromosomice, investigarea situsurilor fragile, a rupturilor cromosomice și polimorfismului cromosomic.

(2) **Tehnicile de generația II-a** (1970) sunt *tehnici de marcaj cromosomic în benzi a cromosomilor metafazici*. Folosind o serie de tratamente și/sau colorații speciale a ADN se vizualizează pe cromosomii metafazici o structură specifică de benzi alternative intens colorate și puțin colorate. Se evidențiază astfel **300-400 benzi** pentru un set haploid de cromosomi metafazici. Aceste tehnici permit *identificarea precisă a fiecărui cromosom* (figura 2.20 b) și caracterizarea majorității anomaliilor cromosomice (exceptând microdelețiile).

**Marcajul G** se obține prin *digestie controlată cu tripsină*, urmată de colorarea cu *Giemsa*. Tehnica este relativ simplă și larg folosită; are dezavantajul că nu colorează telomerele cromosomilor (figura 2.21)

**Marcajul Q** se obține prin colorarea cromosomilor cu un fluorocrom ce se fixează preferențial pe regiunile ADN bogate în AT (ex. *Quinacrina, DAPI, Hoechst 33258*); benzile Q fluorescente (observabile în UV) au aceeași distribuție ca și benzile G. Metoda are dezavantajul că preparatele nu sunt permanente și necesită un echipament special de microscopie. Este utilă în special pentru analiza cromosomului Y.

**Marcajul R** (de la "*Reverse*") are o dispoziție *inversă* benzilor G și poate fi obținut prin denaturarea

<sup>20</sup> **Situsurile fragile** se evidențiază în culturi realizate într-un mediu fără ser uman sau tratate special cu inhibitori ai timidinsintetazei (substanțe antifolice).

termică controlată (85°) a preparatelor într-o soluție salină, înaintea colorării cu Giemsa sau prin folosirea unor coloranți specifici pentru regiunile bogate în GC (ex., *chromomicina A3*); benzile colorate se numesc benzi R (ele corespund benzilor G sau Q negative). Un subset de benzi R este reprezentat de **marcajul T** în care capetele cromosomilor apar intens colorate. Realizează o foarte bună diferențiere a benzilor și telomerelor, dar este laborioasă și influențată de o serie de factori ce trebuie bine cunoscuți și standardizați. (figura 2.22)

**Marcajul C** evidențiază heterocromatina constitutivă, în special la nivel centromeric; se obține după denaturarea cu o soluție saturată de hidroxid de bariu, înainte de colorarea cu Giemsa.

**Alte metode (NOR)**, pentru evidențierea regiunilor organizatoare de nucleoli; studiul replicării, în special a cromosomilor X, cu ajutorul bromodeoxiuridinei) etc. - sunt tehnici foarte speciale, utilizate doar pentru caracterizarea unor remanieri cromosomice complexe.

Unele tehnici de marcaj (R și G) sunt folosite curent pentru analiza morfologiei cromosomilor, producând setul complet de benzi; alte tehnici (benzi Q, C, T, metodele de marcaj al replicării cu BrdU, colorația NOR, ș.a.) se folosesc în analiză numai în anumite situații, pentru a defini mai bine anumite subseturi de benzi precum și tipul de aberații structurale ale cromosomilor.

**(3) Tehnicile de generația III-a (1977)** sunt *tehnici de marcaj de înaltă rezoluție* care studiază cromosomii în primele faze ale diviziunii, când ei sunt mai puțin condensați. Fiecare bandă din cromosomii metafazici poate fi astfel subdivizată în mai multe sub benzi (figura 2.23). Se pot identifica **550 sau 850 de benzi**, corespunzător prometafazei sau profazei. Fiecare bandă corespunde probabil la 20-30 de gene, aceasta fiind limita maximă de rezoluție în analiza citogenetică convențională. Aceste tehnici permit evidențierea unor modificări mici (de ex. microdeleții) din structura cromosomilor.

Marcajul de înaltă rezoluție se obține prin folosirea tehnicilor de marcaj G sau R pentru procesarea cromosomilor aflați în *primele faze ale diviziunii* (prometafază, profază). Aceasta necesită *blocarea sintezei de ADN*, pentru *sincronizarea* tuturor celulelor și, apoi, reluarea sintezei și oprirea culturii într-un moment în care numeroase celule se află la sfârșitul profazei. Datorită complexității lor tehnicile de înaltă rezoluție nu sunt proceduri de rutină. Se folosesc atunci când se suspectează o anomalie structurală fină (de ex. microdeleția unei părți dintr-o bandă cromosomică).

**(4) Tehnicile de generația IV-a (1991)** sunt **tehnici de citogenetica moleculară**. Ele folosesc "sonde" de *ADN monocatenar*, specifice unei anumit cromosom, regiuni cromosomice (centromer sau telomere) sau unor gene cu localizare cunoscută în anumite zone. Sondele *se fixează (hibridizează) prin complementaritate* în aceste situsuri "țintă". Pentru a fi evidențiate după hibridizare, sondele sunt 'marcate' cu un fluorocrom (vizibil la microscopul cu lumină UV). De aceea metoda se numește *hibridizare fluorescentă in situ* sau, prescurtat, **FISH** (de la Fluorescence In Situ Hybridization). (caseta 2.3)

FISH este o metodă performantă (rezoluția pe cromosomi metafazici este de *câteva megabaze*) dar dificilă și scumpă. Ea are indicații precise și nu se substituie celorlalte tehnici citogenetice. Se folosește pentru: suspiciunea clinică / citogenetică a unei microdeleții (figura 2.24.a și b) sau microduplicații, a unor translocații criptice sau deleții telomerice; detecția sexului genetic sau a unor aneuploidii în *nucleii interfazici* (FISH "interfazic"; figura 2.24.c), mai ales din celulele fetale (diagnostic prenatal); caracterizarea unor remanieri complexe sau a unor cromosomi markeri, mai ales în celulele tumorale; detectarea unor secvențe de Y la bărbații XX; evaluarea unui mozaicism.

### 3.3. CLASIFICAREA ȘI NOMENCLATURA CROMOSOMILOR UMANI

Identificarea cromosomilor umani se face pe baza morfologiei lor, utilizând criterii precis codificate la diferite conferințe internaționale de standardizare. Clasificarea actuală utilizează "*International System of Human Cytogenetic Nomenclature*" (ISCN)(1995)

Pe baza lungimii și poziției centromerului cromosomii umani au fost clasificați în 7 grupe, notate (convențional) de la A la G (**tabel 2.4**). Autosomii sunt desemnați fiecare printr-un număr de la 1 la 22. Se obține astfel, o *aranjare sistematizată a cromosomilor unei celule numită cariotip* (figura 2.21 și 2.22).

**Tabel 2.4 Clasificarea pe grupe a cromosomilor umni**

CROMOSOMI	Metacentrici	Submetacentrici	Acrocentrici
mari	<b>A</b> (1-3)*	<b>B</b> (4-5)	-
mijlocii	<b>E</b> (16)	<b>C</b> (6-12,X)	<b>D</b> (13-15)
mici	<b>F</b> (19-20)	<b>E</b> (17-18)	<b>G</b> (21-22,Y)

\* Cromosomul 2 este mai submetacentric.

### CASETA 2.3.

#### Hibridizarea fluorescentă in situ (FISH)

**Principiul** acestei metode de *citogenetică moleculară* este hibridizarea prin complementaritate, a unei sonde de ADN monocatenar (de circa 40 kb) cu o anumită regiune a unui cromosom. Sonda ADN este marcată fie *direct* prin încorporarea unui nucleotid-fluorescent, fie *indirect* prin încorporarea unui nucleotid modificat ce conține o moleculă "reporter" (cum ar fi biotina sau digoxigenina) care este recunoscută de un ligand specific (streptavidina pentru biotină și anticorpi specifici pentru digoxigenină) conjugat cu un fluorocrom.

**Sondele** pot fi clasificate în 4 tipuri, în funcție de aplicația practică:

- *Sonde specifice unui locus dat*, pentru detectarea delețiilor sau duplicațiilor submicroscopice; dacă sonda NU se fixează pe zona cromosomică căreia îi corespunde (absența semnalului colorat), atunci se poate concluziona deleția (pierderea) acestei zone; apariția a două semnale indică o microduplicație. Astfel, se pot decela anomalii segmentare foarte mici, la limita de rezoluție a microscopului optic. Acest tip de sonde se folosesc și pentru stabilirea precisă a punctelor de ruptură în cazul translocațiilor.
- *Sonde centromerice* (alfoide) pentru identificarea centromerului unui anumit cromosom; pot fi utilizate în nucleii interfazici sau pe cromosomii metafazici
- *Sonde telomerice*.
- *Sonde specifice unui cromosom* permit "colorarea" particulară a unui /unor cromosomi (*chromosome painting*); "pictura cromosomică" poate evidenția remanieri cromosomice mici; în acest grup se includ și sondele corespunzătoare ADN genomic, folosite în *hibridizarea genomică comparativă*.

**Țintele** sunt multiple:

- ADN din *cromosomii metafazici*; nivelul de rezoluție este de ordinul a 1-3 Mb
- ADN din *nucleii interfazici ai celulelor fetale*; hibridizarea unor sonde de ADN specifice anumitor cromosomi (de ex. 21, 18, 13, X și Y) cu *nuclei interfazici* permite diagnosticul prenatal rapid (fără cultură) al unor anomalii de număr ale cromosomilor respectivi, fără să fie nevoie de efectuarea cariotipului (ex. trei spoturi fluorescente obținute cu sonda pentru cromosomul 21 pune diagnosticul de trisomie 21); nivelul de rezoluție este de ordinul 100 Kb.
- *Molecule de ADN prealabil "alungite"* prin procedee fizice sau chimice; această metodă permite individualizarea a două sonde distanțate la 1 Kb.
- *Întregul cromosom*. Prin folosirea unui amestec de secvențe ce corespund diferitelor părți dintr-un anumit cromosom se poate obține colorarea sa integrală cu un anumit fluorocrom ("chromosome painting"). Metoda a fost ulterior dezvoltată: folosind sonde cu secvențe din fiecare cromosom, o combinație de mai mulți fluorocromi (Multiplex FISH) și analiza digitală automată a imaginilor (cu o cameră CCD) este posibilă colorarea diferită a fiecărui cromosom din cariotip. O variantă a acestei metode este *cariotiparea spectrală (SKY)* ce utilizează combinații variate a cinci probe fluorescente, o cameră specială de luat imagini și un soft de procesare a imaginilor ce permite ca fiecare cromosom să aibe o colorație particulară, unică, ce face posibilă detectarea oricărui rearanjament cromosomic.
- *Întregul genom*. O metodă larg folosită în studiile citogenetice în cancer este *Hibridizarea Genomică Comparativă (CGH)*: ADN test (de ex., tumoral) este marcat cu un fluorocrom verde iar ADN normal (control) cu unul roșu; cele două probe, amestecate, sunt hibridizate cu cromosomi metafazici normali. Raportul semnalului verde sau roșu pe cromosomii metafazici hibridizați indică localizarea unei duplicații (exces de verde) sau deleții (exces de roșu) din ADN test



Identificarea precisă a cromosomilor în cadrul fiecărei grupe nu este posibilă fără ajutorul marcajului în benzi. Un exemplu edificator este prezentat în figura 2.20 în care se observă că fără marcajul benzii este imposibil de făcut deosebirea între cromosomii grupei D (13-14-15); acest lucru devine facil prin tehnicile de marcaj, fiecare cromosom având o distribuție specifică a benzilor. Modelul de marcaj în benzi a tuturor cromosomilor umani și nomenclatura lor este prezentat în figurile 2.25 și 2.26.

La cromosomii cu marcaj, în lungul cromatidelor există diferite "repere specifice" (centromerul, unele benzi mai importante, telomerele) care împart fiecare braț în *regiuni cromosomice*, numerotate pentru fiecare braț, de la centromer spre telomere (p1, p2, p3...și q1, q2, q3...); ele sunt divizate în mai multe *benzi*: p11 (unu-unu, nu unsprezece), p12, p13.. (fig. 2.21). Dacă prin tehnici mai fine (prometafază) banda este divizată în *sub-benzi*, ele sunt numerotate ca sub-seturi ale benzii originale (de ex. banda 18 q22 poate fi divizată în 18 q22.1, 18 q22.2 și 18 q 22.3). La cromosomii profazici pot apare și sub-sub-benzi (ex., 18 q22.11. Conform unor standarde internaționale, fiecare bandă este definită numeric prin numărul cromosomului, brațul, regiunea, banda, sub-banda; de ex. Xp21.2 înseamnă banda 1, subbanda 2 a regiunii 2 de pe brațul scurt al cromosomului X.

Pentru a descrie sintetic un cariotip normal sau anormal, International System for human Cytogenetics Nomenclature (ISCN, 1995) a stabilit un **sistem de nomenclatură** și o serie de abrevieri. Formula de bază cuprinde 3 itemuri, separate prin virgulă: primul precizează *numărul de cromosomi*, al doilea constituția (normală / anormală) a *cromosomilor sexuali*, iar al treilea (prezent în funcție de situație) *anomaliile* de număr sau structură ale autosomilor (reprezentate prin abrevierile din **tabelul 2.5**). Prezența unui *mozaic cromosomic* este indicată printr-o diagonală (/) care separă cariotipurile liniilor celulare componente.

<b>46,XX sau 46,XY</b>	- cariotip normal feminin sau masculin;
<b>Monosomie X 45,X</b>	- 45 cromosomi, un singur cromosom X;
<b>Trisomie 47,XXY</b>	- 47 cromosomi cu doi X și cu un Y;
<b>Trisomie 47,XX,+21</b>	- 47 cromosomi, la o persoană cu sex genetic feminin și un cromosom 21 suplimentar (trisomie 21);
<b>Mozaic 45,X/46,XX</b>	- mozaic cromosomic cu două linii celulare una cu cromosomi și un singur X, alta normală;

**Tabel 2.5 Simboluri folosite în descrierea cariotipului**  
(după ISCN, 1995)

A-G	Grupele cromosomice	dup	duplicație
1-22	Numerele autosomilor	dic	dicentric
X, Y	Cromosomii sexuali	fra	situs fragil
/	mozaicism	i	isocromosom
p	braț scurt	ins	inserție
q	braț lung	inv	inversie
pter	capăt braț scurt	mat	origine maternă
qter	capăt braț lung	pat	origine paternă
cen	centromer	r	cromosom inelar
h	heteromorfism	t	translocație
del	deleție	upd	disomie uniparentală
der	rearanjament cromosomic sau cromosom derivat	::	rupere cu reunire
+/-	înaintea numărului unui cromosom indică adăugarea / pierderea cromosomului întreg; după un număr cromosomic indică adăugarea / pierderea unei părți din cromosom		

Pentru a defini mai amplu o anomalie de structură cromosomică (un rearanjament) se poate folosi sistemul de numerotare al benzilor și *precizarea punctelor de ruptură*. Există

două forme de nomenclatură: una scurtă - în care se precizează cromosomii implicați și punctele de ruptură; alta detaliată - care identifică punctele de ruptură și segmentele cromosomice de la un telomer la altul<sup>21</sup>. În practica medicală se folosește mai ales *sistemul scurt*; cele mai frecvente anomalii de structură (prezentate în capitolul 8) sunt notate astfel:

#### Anomalii de structură

Deleție	46,XY,5p
Deleție terminală	46,XY, del (5)p14
Deleție interstițială	46,XX,del(5)(p14p15.2)
Duplicație	46,XX,dup(1)(q11→q32)
Inversie	46,XX,inv(4)(p15q13)
Insertie	46,XX,ins (6;12)(p21;q13q23)
Isocromosom X de braț lung	46,Xi(Xq)
Marker	47,XX,+mar
Cromosom inelar	46,XX,r(18)(p11q22)
Situs fragil	46,XY, fraX(q28)
Translocație reciprocă echilibrată	46,XY,t(2;8)(p13;q12)
Translocație robertsoniană	45,XX,t(13;14)(q11;p11)

Pentru a exemplifica sistemul detaliat (utilizat de specialiști) redăm nomenclatura a două anomalii de structură prezentate mai sus:

**46,XX,inv(4)(p ter→q15::q13→p15:q13→qter)**

**46,XY,t(2;8)(2pter→2p13::8q12→8pter; 2qter →2p13::8q12 →8qter)**

### 3.4. HETEROMORFISMUL CROMOSOMILOR

Prin diferite tehnici de studiu s-au evidențiat variații în morfologia cromosomilor omologi la un individ sau la persoane diferite (din familie sau populația generală). Aceste variații au fost numite (la Conferința Paris, 1971) *heteromorfism cromosomic*<sup>22</sup> iar cromosomul care se deosebește morfologic de omologul său este considerat a fi un *cromosom marker*. Deoarece regiunile cromosomice heteomorfice sunt arii de heterocromatină, bogate în ADN repetitiv și inactiv genetic, *mărimea lor variabilă este fără consecințe fenotipice* ("variante normale"). Unele studii relevă totuși o frecvență mai mare a acestor variante heterocromatinice la clupurile cu avorturi spontane repetate sau în grupul persoanelor cu retard mintal; semnificația acestui fenomen este necunoscută.

S-au descris patru tipuri majore de heteromorfism cromosomic:

- mărimea cromosomului Yp (10% din bărbații normali au un Y mai lung sau mai scurt decât deobicei),
- mărimea heterocromatinei centromerice (benzi C) sau juxtacentromerice (mai ales la cromosomii 1,9,16),
- polimorfismul sateliților (în mărime),
- situsurile fragile induse de antifolați (peste 5% din populație are 60 tipuri diferite de situsuri).

Fiecare persoană posedă un heteomorfism particular (are cel puțin un cromosom marker) cu aceeași valoare ca și amprentele sale; deobicei markerul se transmite nemodificat de la părinte la copil (ca un caracter dominant), putând fi folosit uneori în determinarea paternității)

<sup>21</sup> În acest caz se folosesc câteva semne: → indică "de la...până la"; :: descrie reunire și rupere. ; separă cromosomii implicați. **der** - cromosom derivat. **ter** - capătul terminal al cromosomului.

<sup>22</sup> Se folosește uneori și termenul polimorfism dar acesta a fost rezervat pentru variantele alelice ale unei gene.

## INTERNET

1. Dicționar de biologie celulară: <http://www.mlab.gla.ac.uk/~julian/Dict.html>
2. European Bioinformatics Institute (EBI): <http://www.ebi.ac.uk>
3. Indiana University Biotechnology: <http://www.biotech.chem.indiana.edu>
4. Genome Data Base: <http://gdbwww.gdh.org/>
5. Genethon (France): <http://www.genethon.fr>
6. National Center for Genomic Resources: <http://www.ncgr.org>
7. National Center for Biotechnology information (NCBI): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
8. National Human Genome Research Institut: <http://www.nhgri.nih.gov>
9. Nature –Genome gateway: <http://www.nature.com/genomics/huamn>
10. Institute for genomic research: <http://www.ftp.tigr.org>
11. Citogenetica: <http://www.kumc.edu/gec/geneinfo.html>
12. Citogenetică moleculară: <http://www.mpimg-berlin-dahlem.mpg.de/~cytogen/>

### Bibliografie specifică selectivă

1. Bernardi G. *Human genome organization* . Curr.Opin,Genet.Develo. 1995; 5:315-322
2. Deloukas P. et al *The DNA sequence of human chromosome 20*. Nature 2001; 414:865-871
3. Dunham I. et al. *The DNA sequence of human chromosome 22*. Nature 1999; 402:489-495
4. Ekong R, Wolfe J - *Advances in fluorescence in situ hybridization* - Curr. Opin. Biotechnol. 1998, 9, 19-24.
5. Ferguson-Smith M.A., Andrews T. - *Cytogenetics analysis* - in "Emery and Rimoin Principles and practice of Medical Genetics" 3<sup>rd</sup> Edn, ed. D.L Rimoin, J.M. Connor, R. E. Pyeritz. 1996, Churchill Livingstone, New York. London. 1996, p. 253- 276.
6. Gardiner K. *Human genome organization*. Curr.Opin.Genet.Develop. 1995; 5:445-476
7. Hattori M. et al. *The DNA sequence of human chromosome 21*. Nature 2000; 405:311-319
8. Heard E, Clerc P, Avner P - *X-chromosome inactivation in mammals* - Annu.Rev.Genet., 1997, 31, 571-610.
9. Heng HHQ, Spyropoulos B, Moens PB - *FISH technology in chromosome and genom research* -BioEssays 1997, 19,75-84
10. Horn P.J., Peterson L.C. Chromatin higher order folding wrapping up transcription. Science 2002; 297:1824-1827.
11. International Human Genom Sequencing Consortium. *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature 2001; 411:860-920
12. Knight S.J.L., Flint J. *Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis*. J.Med.Genet. 2000; 37:401-409.
13. Lyon MF - *X-chromosome inactivation* - Curr. Biol., 1999, 9, R235-R237
14. Manuelidis L - *A view of interphase chromosomes* - Science, 1990, 250, 1533-1540.
15. Migeon BR - *X-chromosome inactivation: molecular mechanism and genetic consequences* - Trends Genet., 1994, 10, 230-235.
16. Miller O.J. - *Chromosomal Basis of Inheritance* - in "Emery and Rimoin Principles and practice of Medical Genetics" 3<sup>rd</sup> Edn, ed. D.L Rimoin, J.M. Connor, R. E. Pyeritz., Churchill Livingstone, New York. London. 1996, p.235-252.
17. Mittelman F (ed) - *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN)*- Karger, Basel, 1995.
18. Peltonen L., McKusick V.A. *Dissecting human disease in the postgenomic era*. Science 2001; 291:1224-1229
19. Rosenthal N.- *DNA and the genetic code* - N.Engl.J.Med., 1995; 331:39-41

20. Saitoh Y, Laemmli UK - *Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold*- Cell, 1994, 76, 609-622.
21. Speicher M.R., Ward D.C. *The coloring of cytogenetics*. Nature med. 1996; 2:1046-1049
22. Sutherland G.R., Baker E., Richards R.I. *Fragil sites still breaking*. TIG, 1998; 14:501-505
23. Tyler-Smith C., Willard HF.- *Mammalian chromosome structure* - *Curr. Opin. Gene Dev.*, 1993, 3, 390-397.
24. Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W. et al. *The sequence of the human genome*. Science 2001; 291: 1304-1351
25. Wallace D.C., Brown M.D., Lott M.T. - *Mitochondrial Genetics* - in "Emery and Rimoin Principles and practice of Medical Genetics" 3<sup>rd</sup> Edn, ed. D.L Rimoin, J.M. Connor, R. E. Pyeritz., Churchill
26. Wolffe A. *Mitochondrial disease in man and mouse*. Science; 283:1482-1488

# CAPITOLUL 3

## STRUCTURA, ANALIZA ȘI LOCALIZAREA GENELOR

Noțiunea de genă, cu denumirea de "factor ereditar", a fost introdusă în biologie de către Gregor Mendel (1865). El a formulat ipoteza potrivit căreia "*o pereche de factori ereditari determină un caracter și se transmite la urmași independent de alți factori*". Gena era considerată o unitate a eredității, transmisă de la părinți la descendenți, în cursul reproducerii. La începutul secolului 20, prin contribuția a numeroși geneticieni (Sutton, Boveri, ș.a.) și în special a lui Thomas Hunt Morgan, se fundamentează **teoria cromosomică a eredității**. În acest cadru *gena reprezintă un segment de cromosom care determină realizarea unui anumit caracter*. S-au pus astfel bazele **concepției clasice** despre genă; *gena era considerată o unitate de structură, recombinare, funcție și mutație*.

Descoperirea rolului genetic al ADN-ului inaugurează era modernă a geneticii. *Gena devine un segment de ADN care deține informația codificată* pentru realizarea unei proteine (mai exact, pentru așezarea secvențială specifică a aminoacizilor în proteină), substratul biochimic al unui caracter. Ulterior relația "*o genă - o proteină*" devine "*o genă - un produs primar specific*" (proteină sau ARN). După 1970, prin folosirea unor metode de analiză directă a ADN, s-a constatat că structura și funcția genelor sunt mult mai complexe și este dificil să se dea genei o definiție spațială, structurală și funcțională foarte precisă. În **concepția actuală** se consideră că gena este un ansamblu de secvențe ale ADN necesar pentru producerea unei molecule funcționale (proteină sau ARN); mai concis, *gena este o unitate de transcripție*.

### A. CONCEPȚIA CLASICĂ DESPRE STRUCTURA GENEI

#### 1. GENA - UNITATE DE STRUCTURĂ A MATERIALULUI GENETIC

În concepția clasică, *gena reprezintă un segment de cromosom, precis delimitat, continuu (indivizibil), care determină un anumit caracter fenotipic* (figura 3.1).

##### a). Locus

Gena ocupă în cromosom o poziție fizică fixă, totdeauna aceeași, numită **locus**<sup>1</sup> (plural = loci). Acesta poate fi situat pe autosomi ("*loci autosomali*") sau pe cromosomii sexuali. Cromosomii X și Y au gene implicate în procesul de sexualizare; cromosomul X are însă și numeroase gene care determină caractere "nesexuale", ca și locii situați pe autosomi, (de ex: *grupa sanguină Xg, vederea colorată, sinteza factorilor VIII și IX ai coagulării etc.*). Cromosomul Y are însă foarte puține gene "autosomale".

##### b). Gene alele. Polialelie.

Fiecare genă se găsește în natură, la indivizii unei specii, într-o formă "*standard*", normală sau de tip "*sălbatic*". Ea poate suferi o mutație, care produce o formă alternativă a genei; această

<sup>1</sup> Termenul de locus este frecvent folosit cu referință la o anumită genă (de ex., locusul hemofiliei este situat pe cromosomul X)

variantă alternativă a genei ce ocupă același locus și influențează același caracter se numește **genă alelă** (figura 3.1). O genă (de ex: A) poate suferi însă mai multe mutații diferite (ex:  $A^1$ ,  $A^2$ ,  $A^3$  ...  $A^n$ ), cu efecte fenotipice variate dar limitate la același caracter<sup>2</sup>; rezultă variante alelice diferite sau **alele multiple** iar fenomenul se numește **polialelie**. Un exemplu clasic îl reprezintă seria de gene alele A1, A2, B și 0 pentru locusul care determină grupul sanguin AB0. Conceptul de gene alele multiple sau polialelie trebuie înțeles la nivel populațional deoarece o anumită persoană din grup posedă în locusul respectiv numai una din genele alele care există în populație.

Deoarece în celulele somatice (diploide) cromosomii sunt în perechi de omologi, un caracter (monogenic) va fi determinat de o pereche de gene alele<sup>3</sup> ce ocupă loci omologi (de ex., Dd pentru caracterul D; figura 3.1.). Genele alele, situate în loci omologi, **segregă** în anafaza meiozei I, deoarece cromosomii omologi se separă (segregă) și gameții devin haploizi (având un singur cromosom din perechea de omologi). Gameții vor fi astfel "puri genetic", întrucât au o singură genă din perechea de alele. Genele alele situate pe o pereche de cromosomi omologi (de ex., Dd) **segregă independent** de genele alele situate pe altă pereche (de ex., Mm), formându-se gameți cu combinații genice diferite (figura 3.2.).

### c). Homozigot, heterozigot, hemizigot.

Genele alele (normale-N sau anormale-A) ce ocupă loci omologi pot fi identice sau diferite. În primul caz (gene alele identice) genotipul<sup>4</sup> ca și organismul care le posedă este **homozigot** (NN sau AA) iar în al doilea caz (gene alele diferite) va fi **heterozigot** (NA). Frecvent, heterozigoții au o alelă normală și una anormală, mutantă (NA); ei pot fi însă și **heterozigoți compuși**, cu două alele mutante diferite ( $A^1 A^2$ ). La bărbații XY, o genă "autosomală" de pe X nu are de obicei echivalent pe cromosomul Y; pentru această situație, diferită atât de homozigot cât și heterozigot, se folosește termenul de **hemizigot**.

În cursul meiozei homozigoții vor produce un singur tip de gameți, deci sunt *homogametic*, iar heterozigoții vor fi *heterogametic*, producând prin segregarea genelor alele două tipuri diferite de gameți (N și A sau D și d), fiecare în proporție de 50% (figura 3.1.).

### d). Dominant, codominant și recesiv.

La heterozigoți, genele alele diferite se pot manifesta fenotipic diferit, în funcție de "forța" lor de expresie. Acest fenomen va fi analizat în detaliu ulterior dar, pentru moment, este util să precizăm câteva elemente importante.

Uneori, una din cele două alele diferite este mai "puternică" și se manifestă fenotipic la heterozigoți. Gena și caracterul care se manifestă la heterozigoți sunt numite **dominante** și se notează de obicei cu majuscule. Gena care nu se manifestă fenotipic la heterozigoți și se exprimă numai în stare homozigotă se numește **recesivă** și se notează de obicei cu literă mică;. De exemplu, la persoanele cu genotip Na gena N este dominantă și fenotipul va fi normal; indivizii respectivi vor fi însă purtători ai unei gene recesive a. În același context, persoanele An vor fi fenotipic anormale / bolnave, deoarece gena A este dominantă iar genă n, recesivă. Genele recesive se exprimă însă la homozigoții aa sau nn.

Alteori, ambele gene alele se manifestă fenotipic la heterozigoți și vor fi **codominante**. De ex. genele A și B din sistemul multialelic ce determină grupul sanguin ABO sunt dominante față de gena O și codominante una față de alta; genotipurile Ao, Bo și AB determină fenotipurile sau grupele sanguine A, B și respectiv AB.

## 2. FENOMENELE DE ÎNLĂNȚUIRE GENICĂ (LINKAGE) ȘI ÎNCRUCIȘARE CROMOSOMICĂ (CROSSING-OVER)

<sup>2</sup> Uneori, mutații diferite ale unei gene normale formează mai multe variante alelice care au același efect asupra fenotipului; ele se numesc **isoalele**.

<sup>3</sup> Excepție fac genele de pe X la bărbații XY.

<sup>4</sup> Noțiunile de genotip și fenotip se pot folosi și în sens restrâns, pentru o pereche de gene ("genotip") ce determină un anumit caracter ("fenotip")

Un cromosom este alcătuit din mai multe gene nealele, ce ocupă, fiecare, un locus distinct. Ele sunt dispuse liniar în cromosomi, una după alta sau "în monom" (figura 3.1.). Prezența a două sau mai multe gene distincte *pe același cromosom* se numește **sintenție**.

## 2.1. ÎNLĂNȚUIREA GENICĂ

Genele situate pe același cromosom au *tendința* de a se transmite *împreună*, "în bloc" (o dată cu cromosomul respectiv), prin gameți, de la părinți la descendenți. Acest fenomen în care genele nealele *situate aproape una de alta* pe același cromosom *nu segregă* (nu se separă) în meioză și au *tendința* de a se transmite mai frecvent *împreună* în succesiunea generațiilor se numește **înlănțuire genică** ("linkage" în limba engleză) (figura 3.3.a.). Genele dintr-o regiune cromosomică care se transmit împreună formează un *grup de înlănțuire* sau un **haplotip**.

Un exemplu clasic îl reprezintă genele din regiunea HLA (~4Mb) situată pe brațul scurt al cromosomului 6, ce cuprinde (figura 3.3.c) genele HLA de clasă I (A, B, C), genele HLA de clasă II (DR, DP, DQ), separate de genele HLA de clasă III (vezi capitolul 16). În afara genelor implicate în răspunsul imun în această regiune se găsesc și alte gene "non-imune" care, prin mutații, produc diferite boli: deficiența în 21-hidroxilază sau *sindromul adreno-genital*, prin mutația genei CYP21 și *hemocromatoza*, prin mutația genei HFE; genele respective se transmit strâns înlănțuit cu genele HLA din vecinătate: HLA B în primul caz și HLA A în al doilea caz.

Trebuie să precizăm că fenomenul de înlănțuire se referă *la loci* și nu la alele. De ex. să presupunem că locusul *D* pentru o boală genetică dominantă este înlănțuit cu alt locus *M* (care ar putea fi un marker<sup>5</sup> al locusului-boală/morbid); acesta prezintă două forme alelice *M* și *m*. În unele familii alela mutantă *D* va fi pe același cromosom cu alela marker *M* (genotip *DM*) iar în alte familii cu alela marker *m* (genotip *Dm*); în fiecare caz gena *D* a locusului morbid și alela respectivă a locusului marker se vor transmite împreună prin gameți de la părinți la descendenți (figura 3.3.b).

Fenomenul de înlănțuire genică *nu este un fenomen absolut* deoarece numai genele situate *foarte aproape* una de alta se transmit totdeauna împreună, *înlănțuite* (figurile 3.3.a și 3.4.a). În acest caz fenomenul de înlănțuire este *complet*. De ex: genele C, D, E ce determină grupul sanguin Rh, localizate pe cromosomul 1, se transmit totdeauna împreună. Pentru genele situate *mai la distanță* una de alta, pe același cromosom, înlănțuirea genică poate fi *incompletă*, ele putând fi separate prin crossing-over (figurile 3.3.b și 3.4b).

## 2.2. ÎNCRUCIȘAREA CROMOSOMICĂ (CROSSING-OVER) ȘI RECOMBINAREA GENICĂ OMOLOGĂ

### a). Mecanismul CO

În profaza meiozei primare se produce o *împerechere (sinapsă) riguroasă*, "genă la genă", a cromosomilor omologi urmată de o "încrucășare" a cromatidelor acestor cromosomi numită și **crossing-over** (CO): la locul de contact (*chiasmă*) cromosomii se pot "rupe" și efectua un *schimb egal de gene* (figura 3.4.b.); astfel o genă poate trece de pe un cromosom pe omologul său și se produce o nouă dispoziție /așezare a genelor parentale. Acest fenomen a fost numit **recombinare genică omologă**. Între două gene nealele situate la distanță pe același cromosom (figura 3.3.b și 3.4.b.) după schimbul reciproc de gene se produc, prin meioză, patru tipuri diferite de gameți, din care două au genotipuri noi, *recombinante*. Recombinarea genelor are loc numai dacă cromatida suferă un *număr nepereche de CO* între cei doi loci.

### b). Punere în evidență a CO.

Evidențierea fenomenului de crossing-over între două gene se poate face prin "încrucășarea" unui *dublu heterozigot pentru acele gene și recesivul homozigot* (figura 3.5). Teoretic ar trebui să rezulte proporții egale de descendenți cu aceleași genotipuri și fenotipuri ca și părinții. În realitate,

<sup>5</sup> Un locus (genă sau secvență de ADN) marker are rolul de a "semnaliza" prezența unui locus boală (morbid) cu care este strâns înlănțuit, fie atunci când acesta nu se exprimă fenotipic fie în cazul în care este mai greu de identificat direct.

alături de combinațiile parentale apar și combinații noi (*recombinanți*), datorită CO produs la dublul heterozigot.

La om fenomenul de CO și recombinare intracromosomică a fost evidențiat inițial prin studiul transmiterii unor caractere determinate de mutații recesive ale unor gene de pe cromosomul X. În figura 3.6., din căsătoria unui bărbat (I-1) care prezintă hemofilia (**h**) cu o femeie sănătoasă rezultă patru copii sănătoși și un băiat (II-6) cu protanopie (**p**) (absența vederii colorate pentru roșu, sau daltonism). Acesta este hemizigot și unicul său cromosom X cu alela mutantă (exprimată fenotipic), provine cert de la mamă, care va fi astfel heterozigotă (**Pp**). O soră sănătoasă (II-3) a bolnavului II-6 se căsătorește cu un bărbat sănătos și are trei băieți afectați: hemofilia (III-1), protanopie (III-3), hemofilia și protanopie (III-4) precum și unul sănătos (III-2). Se poate conchide, fără dificultate, că mama (II-3) celor patru băieți este dublu heterozigotă ( $hP \setminus Hp$ ) și datorită acestui lucru este ușor de înțeles nașterea celor doi băieți afectați de hemofilia (III-1) sau protanopie (III-3). În cazul celorlalți doi copii (III-2 și III-4) s-a produs un CO în meioza maternă.

### c). Caracteristicile CO.

Recombinările genice intracromosomice, produse în meioză prin crossing-over (CO), sunt fenomene *aleatorii și imprevizibile*. Ele ascultă de o singură lege: *probabilitatea; ca atare frecvența de producere a CO între două gene/loci este direct proporțională cu distanța fizică dintre ele*: șansele de recombinare sunt mai mici dacă genele sunt mai apropiate și invers. Gradul de apropiere între două gene (loci) de pe același cromosom se exprimă printr-un *procent de recombinare sau centiMorgan* (abreviere cM): locii care sunt separați prin CO la 1% din gameți se află la distanță de 1 cM.

Recombinările genice între doi loci situați pe același cromosom se pot observa numai prin *studii familiale*. Explicația este simplă: pentru a evidenția/demonstra o înlănțuire sau o recombinare între două gene de pe același cromosom trebuie analizată comportarea lor în meioză și *modul în care se transmit* prin gameți la urmași, deci la membrii unei familii. *Comparând* structura genică a cromosomilor urmașilor cu cea a părinților se poate aprecia *frecvența de producere a recombinărilor* între două gene (loci), distanța dintre ele și poziția lor în cromosomi. Aceste lucruri sunt posibile numai când ambii loci ai celor doi cromosomi omologi parentali au *alele diferite* iar numărul de meioze (în care s-a produs recombinarea) este suficient de mare, adică familiile sunt *mari* și pot fi analizate pe cel puțin *trei generații*. Mai recent, evidențierea fenomenului de recombinare genică poate fi realizată și prin genotiparea unor spermatozoizi individuali proveniți de la același individ.

Datorită fenomenului de încrucișare cromosomică între două perechi de gene alele (de ex:  $D/d$  pentru un *locus-boală* și  $M/m$  pentru un *locus-marker* al genei patologice), situate pe același cromosom în loci diferiți, pot exista două posibilități de dispunere denumite **faze de înlănțuire** (figura 3.7):

- alelă a unui locus, de ex:  $D$ , se poate afla pe *același cromosom* cu o alelă anumită a celui alt locus, de ex:  $M$ , situație numită *fază de cuplare sau cis*;
- cele două alele  $D$  și  $M$  ale locilor respectivi se pot găsi fiecare pe cei doi cromosomi omologi, în *fază de repulsie sau trans*.

În exemplul dat, genele  $D$  și  $M$  pot fi în poziție **cis** iar  $D$  și  $m$  în poziție **trans** (genotipul se notează  $DM/dm$ ) sau invers  $D$  și  $M$  în poziție **trans** iar  $D$  și  $m$  în **cis** (genotip  $Dm/dM$ ). În analizele de înlănțuire pe care se bazează deseori diagnosticul genotipic al bolilor este important a se stabili *faza de înlănțuire* între un locus-boală  $D$  și alelele  $M$  sau  $m$  ale unui locus-marker  $M$  sau mai precis dacă alela  $D$  a locusului boală se găsește pe același cromosom fie cu alela  $M$  fie cu alela  $m$  a locusului marker. Aceasta se poate realiza numai prin studii familiale urmărind cosegregarea (transmiterea împreună) a două gene nealele în generații succesive, fără schimbarea fazei.

## 2.3. DEZECHILIBRUL DE ÎNLĂNȚUIRE ȘI ASOCIERILE.

### a). Definiție.

Diferitele gene alele ale unor loci diferiți, situate *pe același cromosom* în faza de cuplare (cis), pot forma combinații sau *haplotipurii variate*. De ex., în figura 3.7 genele alele  $D$  și  $d$  ale unui locus-boală și  $M$  și  $m$  ale unui locus-marker pot realiza haplotipurile:  $DM$ ,  $dm$ ,  $Dm$  și  $dM$ . Deci locusul-boală  $D$  poate fi asociat, în familii diferite, fie cu alela-marker  $M$ , fie cu alela-marker  $m$ . *Frecvența teoretică* cu care se găsesc anumite haplotipurii ( $DM$  sau  $Dm$ ) într-o populație se calculează prin produsul frecvențelor individuale ale genelor alele ce-l alcătuiesc. Dacă se compară



frecvența teoretică cu *frecvența reală* (determinată în populația respectivă) se pot constata două situații:

- frecvențele reale ale haplotipurilor *DM* și *Dm* nu diferă semnificativ față de frecvența teoretică; se spune atunci că genele ce alcătuiesc un haplotip se află în **echilibru de înlănțuire**. Aceasta înseamnă că o genă alelă a unui anumit locus (*D*) se poate asocia cu orice alelă a unui alt locus (*M* sau *m*), de pe același cromosom.
- frecvența reală în populație a unui anumit haplotip (de ex., *Dm*) este mai mare decât frecvența teoretică; în acest caz se produce o **asociere alelică preferențială** sau **dezechilibrul de înlănțuire** (linkage): o anumită alelă a unui anumit locus (*D*) se va asocia pe același cromosom cu o anumită alelă (*m*) a altui locus mai frecvent decât ar fi de așteptat pe bază de întâmplare.

#### b). Mecanism

Dezechilibrul de înlănțuire este o caracteristică populațională și nu familială, ce depinde de *distanța genetică* dintre loci și *vechimea mutației* ("distanța" cronologică). Explicația acestui fenomen este în esență *înlănțuirea strânsă* dintre alela boală *D* și alela *m*, care face dificilă realizarea unui CO între ele; această înlănțuire poate fi explicată și prin faptul că bolnavii au un strămoș comun.

Un exemplu sugestiv este reprezentat de **hemocromatoza idiopatică**, cea mai frecventă boală recesivă la om (vezi **caseta 3.1**) în care se produce o acumulare excesivă de fier la bolnavii adulți; depozitele de fier din cord, ficat, pancreas, piele și sistemul endocrin produc o varietate de manifestări inclusiv insuficiență cardiacă, ciroză, deficiență de hormoni hipofizari, diabet "bronzat" (insuficiență pancreatică endocrină și pigmentarea pielii). Mai multe studii multicentrice au arătat că 78% din pacienții cu hemocromatoză au și alela A3 a locusului HLA, în timp ce frecvența ei la persoanele sănătoase este de numai 27%. Pe baza acestei înlănțuiri genetice s-a localizat gena hemocromatozei (HFE) într-o regiune de câțiva cM pe cromosomul 6p (figura 3.3.c); ulterior analiza dezechilibrului de înlănțuire a "îngustat" regiunea cercetată la 250 Kb și a permis apoi identificarea genei HFE, în care o singură mutație (ce interesează codonul 282, numită C282Y) se găsește la 85% din bolnavi. Aceasta s-a produs pe un cromosom ce avea alela HLA A3.

Dezechilibrul de înlănțuire reflectă un anumit *fond comun de gene* (genofond) al populației respective. Interpretarea obișnuită a dezechilibrului de înlănțuire este că cei mai mulți indivizi ce poartă gena mutantă (morbida) provin dintr-un *strămoș comun* ("fondator") care a avut haplotipul cel mai des asociat cu alela mutantă (vezi și capitolul 7).

Dezechilibrul de înlănțuire ce include un locus boală bialelic (*D* și *d*) și un marker permite stabilirea *vechimei mutației* ce produce boala ("datarea" ei) precum și a faptului că mutația a survenit la un singur individ ("efect de fondator") sau independent, la mai mulți indivizi, în arii geografice diferite ("*origine multicentrică*"). Această "paleo-antropo-genetică" poate fi demonstrată prin două exemple:

- *drepanocitoza* sau sicklemlia are o vechime de 3000 de ani și origine multicentrică (trei focare distincte în Africa și unul în Asia);
- *deficitul în alfa-1-antitripsină* datează de aproximativ 6000 de ani și are un singur "fondator", în Europa de Nord; același lucru pare a fi valabil și pentru *fibroză chistică* (*mucoviscidoză*)

### CASETA 3.1

OMIM 234200; 602390

#### Hemocromatoza

**Definiție:** hemocromatoza ereditară (HE) este o anomalie autosomal recesivă a metabolismului fierului, caracterizată prin absorbția crescută a fierului prin mucoasa gastrointestinală ce determină acumularea excesivă de fier în diferite organe ale adulților

**Incidență:** Frecvența homozigoților în populația europeană este 1/200- 1/400, iar cea a heterozigoților este 1/8. Prevalența este mult mai scăzută la asiatici și africani.

**Manifestări clinice:** boala debutează la circa 40 de ani la bărbați și 60 de ani la femeie (deoarece acumulările de fier sunt mai reduse datorită pierderilor menstruale) cu oboseală, dureri

abdominale și articulare, letargie, pierdere ponderală, scăderea libidoului. Depozitarea excesivă a fierului în ficat, inimă, pancreas, piele și sistem endocrin determină o serie de simptome incluzând ciroză, insuficiență cardiacă congestivă sau aritmii, pigmentare cutanată, diabet zaharat, artrită și hipogonadism.

**Patogenie:** neelucidată complet.

**Genetică:** transmitere autosomal recesivă. Gena pentru hemocromatoza ereditară (gena HFE) este localizată lângă locusul HLA, pe cromosomul 6p21.3, distal de gena A. Majoritatea genelor mutante se asociază cu alela HLA A3 („dezechilibrul de înlănțuire”), sugerând descendența purtătorilor mutației dintr-un strămoș comun. Gena HFE a fost clonată în 1996. La 85% din cazuri s-a identificat o mutație unică (o substituție cisteină/ tirozină în codonul 282. Analiza acestei mutații poate fi folosită ca test direct pentru detectarea bolii sau examinarea altor membri cu risc din familie. Hetrozigoții (11% din populație) au un avantaj selectiv deoarece 1/3 din populație are anemie feriprivă.

**Diagnostic:** se bazează pe datele clinice, biochimice, histologice și moleculare. Pacienții nu au întotdeauna tablou complet. Diagnosticul se bazează pe saturația cu fier a transferinei serice și concentrația serică crescută de feritină; este confirmat prin măsurarea depozitelor hepatice de fier prin biopsia hepatică și/ sau testarea moleculară a mutațiilor în gena HFE.

**Diagnostic diferențial:** trebuie avute în vedere alte încărcări excesive cu fier: anemia sideroblastică, porfiriea cutanea tarda, atranferinemia congenitală, hemocromatoza neonatală și hemocromatoza juvenilă;

**Diagnostic prenatal:** teoretic posibi dacă se cunoaște tipul mutației la părinți (heterozigoți). Ridică probleme etice pentru o boală cu manifestare tardivă și tratabilă

**Prognostic:** bun sub tratament.

**Tratament:** tratament simplu, ieftin, sigur și eficient ce constă în flebotomie (îndepărtarea unei unități de sânge ce conține 160-200 mg fier) periodică.

### c). Asocierile genetice

Fenomenul de înlănțuire (care se referă la locii dintr-un cromosom) nu trebuie confundat cu **asocierea** care este o relație statistică (pusă în evidență în populație) între un caracter (boală) și un marker genetic.

- De ex., **spondilita anchilozantă** - o boală inflamatorie cronică ce afectează ligamentele, discurile coloanei vertebrale și articulația sacro-iliacă – se asociază la 90% din bolnavi cu alela HLA B27. În populația generală frecvența bolii este circa 1% iar frecvența alelei B27 de 5-10 %; deci multe persoane HLA B27 nu fac boala dar au un risc de 90 ori mai mare de a o dezvolta, comparativ cu cei care nu au această alelă. Este important să precizăm că factorii genetici și de mediu care produc această afecțiune nu sunt clari și că *asocierea populațională observată nu implică necesar o înlănțuire genetică*. Deoarece spondilita anchilozantă este considerată o boală autoimună, asocierea poate reflecta totuși, faptul că sistemul HLA este un factor important în patogenia bolii.
- O altă asociere populațională a fost observată între **diabetul zaharat insulino-dependent** (tipul 1) și alelele HLA DR3 și HLA DR4. Deoarece în diabetul tip 1 autoimunitatea este un factor etiologic, se poate presupune că alelele DR3/DR4 cresc susceptibilitatea la această boală.

Se poate conchide că asocierile populaționale reflectă participarea semnificativă a unor factori genetici sau negenetici în etiologia unor boli. Ele trebuie deosebite de înlănțuirile genetice, care se referă la poziția unor loci în cromosomi. Dezechilibrul de înlănțuire este un caz special de asociere în care există o asociere neîntâmplătoare a unei alele specifice (de boală) cu un locus din vecinătate (marker).

### c). Valoare practică.

Asocierea alelică preferențială se folosește în *diagnosticul genotipic prenatal sau diagnosticul presimptomatic* al unei boli în familiile cu risc crescut. Acest lucru este posibil atunci

când se realizează asocierea preferențială a genei pentru o boală cu o alelă specifică a unui locus marker, strâns înălțuit cu locusul boală.

De ex., pe cromosomul 7 în apropierea genei CF pentru fibroză chistică sau mucoviscidoză (boală genetică frecventă în populația europeană, 1: 3500 nm) se găsesc doi markeri genetici, XV-2c și KM-19, fiecare cu două alele (figura 3.8.). S-a stabilit că marea majoritate (90%) a indivizilor ce poartă gena CF mutantă posedă deasemeni alelele 1 (XV-2c) și 2 (KM-19) ale celor doi markeri; acest haplotip (alela 1 - alela 2 - CF) se găsește în populație doar în 20% din cromosomii ce poartă alela CF normală (restul cromosomilor "normali" având alte haplotipuri).

#### 2.4. IMPORTANȚA TEORETICĂ ȘI PRACTICĂ A FENOMENELOR DE ÎNLĂNȚUIRE GENICĂ ȘI ÎNCRUCIȘARE CROMOSOMICĂ.

##### **a). Importanța teoretică.**

- *Cartografierea genomului uman.* Înălțuirea și recombinarea genică sunt utilizate, alături de alte metode, pentru localizarea genelor în cromosomi. Fără a intra în detalii (vezi capitolul 3.D) vom preciza următoarele elemente utile în cartografierea genică: două gene care se transmit strâns înălțuite la descendenți sunt localizate pe același cromosom; frecvența de producere a crossing-overului între două gene este direct proporțională cu distanța dintre ele; prin studii familiale, calculând frecvența de recombinare a genelor la descendenți, se poate stabili poziția lor pe cromosomi.
- *Înțelegerea mecanismelor de producere a unor mutații.* Uneori se poate produce în meioză o încrucișare cromosomică aberantă sau **crossing-over inegal** care poate genera mutații genice sau anomalii de structură ale cromosomilor. El rezultă printr-o *împerechere imperfectă* a unor secvențe asemănătoare de pe cromosomii omologi; *schimbul de segmente prin CO nu se face egal* și pot rezulta *deleții și duplicații* genice sau cromosomice (figura 3.9.); acestea au deseori consecințe fenotipice negative. Cel mai sugestiv exemplu pentru acest mecanism îl reprezintă tulburările de vedere colorată (protanopia și protanomalia - pentru *roșu* și deuteranopia și deuteranomalia - pentru *verde*) (vezi **caseta 3.2**).
- *CO inegal* a avut însă, foarte probabil, și un rol pozitiv în evoluție, generând *duplicația sau hiperduplicația unor gene ancestrale*. Au rezultat mai multe "exemplare" ale genei inițiale care, ulterior, au evoluat diferit; ele păstrează însă o serie de caracteristici comune formând *familii sau superfamilii de gene înrudite* (vezi cap.3.B.3.2). Un exemplu sugestiv îl reprezintă genele ce determină diferite catene polipeptice (alfa, beta, gama, delta) din structura hemoglobinelor umane. Ele au rezultat prin duplicația succesivă a unei gene ancestrale (figura 3.10.).

#### CASETA 3.2.

OMIM # 303800 / 303900

#### **Defecte de vedere a culorilor roșu și verde**

**Definiții:** incapacitatea ereditară a percepției culorii roșu se numește **protanopie (P)** iar a culorii verde - **deuteranopie (D)**; perceperea alterată a culorii roșu este numită **protanomalie (PA)** iar a culorii verde - **deuteranomalie (DA)**.

**Incidență:** 8% din bărbații caucazieni au un tip sau altul de defecte ale percepției a culorilor roșu sau verde; frecvența lor la femei este mult mai mică, 1:150.

**Diagnostic:** defectele vederii colorate și intensitatea lor se pot evidenția folosind o serie de planșe colorate sau anomaloscopie.

**Patogenie:** vederea colorată normală este tricromatică fiind determinată de trei clase de celule cu conuri care au un pigment (opsina) ce reacționează la culorile primare: roșu, verde și albastru. Absența sau alterarea pigmentului vizual, produsă prin mutația genelor corespunzătoare va determina diferite defecte ale vederii colorate: dicromatopsia - când nu se percepe una din culorile primare - sau, foarte rar, monocromatopsia - nu se percep două din aceste culori.

**Genetică:** Defectele de vedere a culorilor roșu (P și PA) sau verde (D și DA) sunt transmise ereditar recesiv legat de X; acest fapt explică frecvența crescută a acestor defecte la sexul masculin. Genele pentru opsinele sensibile la culorile fundamentale au fost identificate și

localizate: gena pentru albastru (BCP) - pe cromosomul 7 iar genele pentru roșu (RCP) și verde (GCP) pe Xq28, foarte aproape de gena pentru factorul VIII.

Genele pentru roșu și verde sunt situate pe cromosomul X una lângă alta, în tandem; în mod normal există o genă pentru roșu și 1-3 copii identice pentru gena pentru verde. Cele două tipuri de gene au o secvență aproape identică (96% omologie). Pentru vederea colorată normală este necesară expresia unei singure gene pentru pigmentul roșu și a unei gene pentru cel verde.

Disponerea în tandem și secvența lor foarte asemănătoare generează frecvent împerecheri eronate în meioză și producerea unui CO inegal, între gene, modificând numărul lor (în plus sau minus) sau chiar în gene, producând modificări în structura lor sau gene hibride. Absența genei pentru roșu sau verde va genera protanopie și respectiv deuteranopie iar hibridii dintre cele două tipuri de gene - tulburările de percepție de tipul PA și DA.

**Prognostic:** Indivizii afectați au dificultăți dar se pot "adapta" ușor la aceste situații.

### b). Importanța practică

În practica medicală fenomenul de înlănțuire genică este folosit pentru studiul transmiterii unei gene mutante într-o familie și, implicit, pentru diagnosticul de boală genetică, mai ales prenatal sau presimptomatic. Diagnosticul se face *indirect*, prin analiza distribuției unei gene marker normală, ușor de identificat, cu care gena mutantă este înlănțuită. De ex: gena pentru enzima 21 hidroxilază (care intervine în steroidogeneza) este localizată pe cromosomul 6p și se transmite strâns înlănțuită cu gena B a complexului HLA (figura 3.3.c).

- Mutația genei 21-hidroxilază determină, în stare homozigotă (*aa*), un deficit enzimatic care perturbă steroidogeneza suprarenaliană (figura 3.11.a.); se produce un exces de androgeni ce determină la embrionul feminin un *grad de masculinizare* a organelor genitale externe sau sindromul adreno-genital (boală autosomal recesivă) (vezi **caseta 3.3**). Transmiterea genei mutante pentru 21-hidroxilază într-o familie și diagnosticul bolii se pot stabili prin analiza prezenței genei marker *HLA-B*, cu care gena mutantă este strâns înlănțuită.
- În familia A... (figura 3.11 b) s-a născut un copil (II-3) cu sindrom adrenogenital; la o nouă sarcină (II-4) părinții solicită un sfat genetic pentru evaluarea riscului de recurență a bolii și, eventual, un diagnostic prenatal. Soluție: copilul bolnav (*aa*) moștenește câte o genă mutantă (*a*) de la fiecare din părinți (sănătoși dar heterozigoți, *Na*); aceste gene sunt înlănțuite cu alela HLA B14 la tată și HLA B5 la mamă. Determinarea grupelor HLA la copii, relevă că: primul copil sănătos B1/B5 este heterozigot (*Na*); la al doilea B14/B5 se decelează, surprinzător (poate și pentru că era băiat), o formă asimptomatică a bolii; în schimb fătul (III-4) are genotipul HLA B1/B7 și deci va fi sănătos (NN).

Valoarea diagnostică a înlănțuirilor genice dintre un locus boală și unul marker a început să fie larg utilizată după 1980 prin folosirea markerilor ADN polimorfici .

CASETA 3.3

OMIM 201910

### Deficiența în 21-hidroxilază

**Definiție:** deficiența în 21-hidroxilază produce la fătul feminin grade diferite de virilizare a organelor genitale externe; este cea mai frecventă formă de pseudohermafroditism feminin; se mai numește sindrom adreno-genital sau hiperplazie congenitală de suprarenală.

**Incidență:** 1:8000- 1:25.000 nou născuți.

**Manifestări clinice.** Afecțiunea este evidentă la nou născuții de sex feminin, care prezintă o ambiguitate a organelor genitale externe (hipertrofie clitoris); circa 1/3 din astfel de cazuri nu vor avea alte manifestări (aceasta este forma cu virilizare simplă) Ceilalți vor prezenta, în a doua săptămână de viață, vărsături, deshidratare/ hipovolemie și stare de șoc, fatală fără tratament patogenetic (forma cu pierdere de sare). A treia formă clinică de prezentare este virilizarea cu debut tardiv care apare în copilărie sau adolescență. Boala se poate manifesta și la băieți; ei vor avea OGE normale dar ar putea prezenta o precocitate sexuală.

**Patogenie.** 21-hidroxilaza intervine în steroidogeneza suprarenaliană, în sinteza de aldosteron și cortizol (figura 3.11 a). Deficiența enzimei blochează formarea celor doi hormoni și determină o hiperproducție de androgeni; aceasta începe după luna III-a de gestație și produce masculinizarea variabilă a OGE la fătul de sex feminin (cu XX și ovare). De aceea boala mai este numită sindromul adrenogenital, fiind o formă de pseudohermafroditism feminin. Absența completă a aldosteronului produce "pierderea de sare". Absența cortizolului va determina o secreție crescută și continuă de ACTH care va duce la hiperplazia congenitală de cortico-suprarenală<sup>6</sup>.

**Genetică.** Boala se transmite autosomal recesiv. Rezultă prin mutațiile<sup>7</sup> genei CYP21B pentru citocromul P450 implicat în steroid-21-hidroxilare. Gena este situată pe 6p în regiunea HLA III, în vecinătatea genei HLA B, cu care se transmite strâns înlănțuită. Mutațiile prezintă o asociere alelică preferențială cu haplotipul HLA A11, B55, DR4. Heterozigoții, purtători sănătoși de genă anormală, pot fi identificați prin analiza ADN; interesant de semnalat este faptul că ei au un avantaj selectiv, fiind rezistenți la infecțiile cu *Haemophilus influenzae* tip B. Cele trei forme clinice sunt produse de mutații diferite, cu un nivel rezidual de activitate enzimatică diferit.

**Diagnostic.** OGE au grade diferite de virilizare, gonadele nu se palpează în labioacrot, OGI feminine, sex genetic feminin, niveluri crescute ale 17-cetosteroidilor urinari, 17-alfa-hidroxi progesteronului și ACTH (care se normalizează sub tratament).

**Diagnostic prenatal.** Este posibil fie prin analiza ADN în celulele vilozităților coriale, fie prin determinarea 17-alfa-hidroxi progesteronului în lichidul amniotic. Un diagnostic pozitiv va duce la administrarea maternă a unui preparat cortizolic care va preveni/reduce virilizarea OGE a fătului.

**Screening neonatal** este posibil prin dozarea 17-alfa-hidroxi progesteronului.

**Prognosticul** vital este bun; pacienții vor fi sănătoși și fertili dacă se face un diagnostic precoce și un tratament adecvat.

**Tratament.** Pacienții primesc toată viața terapie substitutivă cu cortizol și mineralocorticoizi; chirurgie plastică pentru corecția ambiguității sexuale.

## B. CONCEPȚIA ACTUALĂ DESPRE STRUCTURA GENEI

Concepția actuală despre structura și funcția genei se bazează în esență pe rolul genetic al ADN-lui. Gena a fost definită ca un *ansamblu liniar de secvențe nucleotidice necesar pentru a produce un polipeptid sau o moleculă de ARN funcțional*; acest complex include secvențe transcrise (codante și necodante) precum și secvențe de reglare ale transcripției. În cea mai succintă definiție gena este o unitate de transcripție.

Numai o mică parte din ADN nuclear este transcrisă, formând cele aproximativ 35.000 de gene ale genomului uman. În funcție de produsul funcțional pe care îl codifică și de ARN polimeraza care realizează transcripția, genele se clasifică în:

- gene *ribosomale* (gene de clasă I), transcrise de ARN polimeraza I, ce codifică precursorul de 45 S al moleculelor de ARNr de 28 S, 18 S și 5,8 S;
- gene ce codifică *proteine* (gene de clasă II), transcrise de ARN polimeraza II;
- gene ce codifică *ARN de transfer* (ARN t) și alte molecule mici de ARN, transcrise de ARN polimeraza III.

Majoritatea genelor umane au o *structură discontinuă* (alcătuită din secvențe codante și secvențe necodante) pentru descoperirea căreia Richard ROBERTS și Philip SHARP au primit premiul Nobel (în 1993).

### 1. ANATOMIA UNEI GENE CARE CODIFICĂ O PROTEINĂ

<sup>6</sup> 90% din formele de HCS sunt produse prin deficiența 21-hidroxilazei; există și alte deficiențe în biosinteza hormonilor steroizi, mai rare, care produc HCS și ambiguități genitale asociate însă și cu alte anomalii clinice și biochimice.

<sup>7</sup> Marea majoritate a cazurilor sunt produse prin *conversie genică* (70%) sau *CO inegal* (30%).

Genele care codifică proteine prezintă o *parte centrală*, transcrisă (copiată) în ARN mesager precursor, numită și "cadru de lectură"<sup>8</sup> al informației genetice deoarece conține mesajul codificat pentru sinteza proteinei, flancată de două *părți laterale*, netranscrise, cu rolul de a regla expresia genei (figura 3.12.). În descrierea acestor regiuni ne vom referi la catena 5'-3' a ADN sau *catena sens*.

### 1.1. REGIUNEA CENTRALĂ (cadru de lectură) A GENEI

Regiunea centrală a genei este transcrisă *integral în ARN mesager precursor* prin acțiunea ARN polimerazei II. Această regiune este alcătuită din alternanța regulată a două tipuri distincte de secvențe: *exoni și introni*, prezente sau nu în versiunea finală a *ARNm matur*, ce va părăsi nucleul.

Regiunea centrală a genei începe cu **situsul de inițiere** (start) al transcripției. Care este numit, prescurtat, SIT sau INR (de la *initiator sequence*). După S.I.T. urmează o *regiune necodantă* (transcrisă dar netranslată) de câteva sute de nucleotide și numită **5'UTR** (de la *untranslated region*); ea conține o secvență *consensus* (prezentă la toate genele) 5'-CCAGCC**ATG**-3', care pare să joace un rol important dar încă nedefinit în reglarea translației. Cert este că această secvență conține și *codonul inițiator ATG*, care semnalează locul de debut al translației (va corespunde primului aminoacid în polipeptid). Urmează exonul 1.

**Exonii** sunt secvențe transcrise în *ARN mesager precursor* și păstrate în *ARNm matur* (denumirea lor se bazează pe faptul că sunt secvențe ce se exprimă și părăsesc – *exit* - nucleul. Ei sunt regiunile funcționale din structura genei, care de obicei *codifică* anumite părți structurale și/sau funcționale distincte ale proteinei, numite *domenii*. Numărul exonilor variază de la o genă la alta (între 2 și mai mult de 50) precum și la diferite organisme.

Este util de precizat că nu este obligatoriu ca exonii să fie întotdeauna părți codante/translate ale genei; în unele gene unii exoni nu sunt translați deși sunt prezenți în *ARNm matur* (de ex., exonul 1 în gena pentru insulină). Recent s-a constatat un alt lucru surprinzător: gene diferite pot avea unul sau mai mulți exoni identici, în consecință diferite proteine complexe, neînrudite, pot avea unele domenii identice. Spre exemplu, gena pentru receptorul LDL (lipoproteine cu densitate joasă) are exoni ce produc în structura receptorului domenii proteice regăsite în multe alte proteine. Explicația acestui fenomen nu este clară dar unii autori susțin că în evoluție s-ar fi putut asambla gene noi din exonii unor gene preexistente.

**Intronii** - numiți și "Intervening Sequences" sau IVS (*intercalante* pentru că se interpun între exoni) - sunt secvențe necodante, *transcrise inițial în ARNm precursor (transcript primar) dar decupate precis și îndepărtate ulterior din ARNm matur*<sup>9</sup>, ce va fi alcătuit prin asamblarea exonilor. Numărul intronilor este cu unul mai mic decât cel al exonilor iar lungimea lor este variabilă, neconcordantă cu a exonilor, de obicei mult mai mare. Important de precizat este faptul că aproape toți intronii încep întotdeauna cu dinucleotidele **5' GT** și sfârșesc cu **AG 3'**; o minoritate a intronilor sunt delimitați de secvențele dinucleotidice **AT** la capătul 5', respectiv **AC** la capătul 3'. Aceste perechi de nucleotide au rolul unor semnale (balize) pentru decuparea precisă și corectă a intronilor. *Rolul intronilor nu este încă bine cunoscut*. Cert este că numărul și mărimea lor variază la diferite gene, fiind cel mai adesea mult mai mari în dimensiuni decât exonii pe care îi separă. Rolul lor cel mai important este acela de a asigura posibilitatea matisării alternative, care este o sursă majoră de sporire a diversității proteinelor (o gena poate astfel conduce la sinteza mai multor proteine, vezi în capitolul 4.B.2). Uneori, surprinzător și...inexplicabil, ei pot lipsi în unele gene (precum genele pentru histone, angiotensină, receptori beta adrenergici, ADN mitocondrial) iar altele unii introni (din genele pentru NF1, factor VIII, ș.a.) pot conține gene transcrise (în direcție opusă) fără nici-o legătură cu gena în care se găsesc. De asemeni, la nivelul intronilor se pot găsi secvențe cu rol regulator în funcția genei, precum insulele CpG la nivelul genelor amprentate (vezi capitolul 4.B.2).

După ultimul exon din zona centrală transcrisă a genei există o **secvență 3'UTR** necodantă

<sup>8</sup> Termenul se referă la citirea și copierea informației genetice a genei, pe baza căreia se sintetizează un polipeptid; se mai denuște și *ORF* (de la *Oen Reading Frame*)

<sup>9</sup> Procesul de asamblare a exonilor, ce va fi descris în capitolul 4, se numește "splicing" - în l. engleză, - "epissage" - în l. franceză; traducerea acestor termeni în limba română ar fi: înnădire, îmbinare cap la cap sau *matisare*).

(transcrisă dar netranslată). Ea începe cu unul din **codonii stop** (TAA, TAG, TGA) ce reprezintă semnalul de oprire a translației sau sintezei proteinei. Secvența 3'UTR are spre capătul 3' un hexanucleotid (**AATAAA**) ce reprezintă **situsul de terminare al transcripției**; la 15-30 nucleotide în aval de acest situs se produce clivarea (desprinderea) moleculei de ARN sintetizate de pe catena matriță a ADN. Acest punct se mai numește **situsul de poliadenilare**, pentru că în acest loc, la produsul de transcripție (ARNm) se adaugă un segment de circa 200 nucleotide cu adenozină (poliadenilare), ce au rol în stabilitatea moleculei de ARNm și transportul ei din nucleu în citoplasmă.

## 1.2. REGIUNILE LATERALE SAU SECVENȚELE DE REGLARE A GENEI.

Cadrul de lectură al oricărei gene este flancat de două regiuni laterale, *netranscrise*, care au rolul de a *semnaliza inițierea transcripției* de către ARN polimerază și de a *regla intensitatea ei*; mutații în aceste regiuni nu modifică structura de aminoacizi a proteinei codificate de genă ci numai *nivelul ei de expresie* (rata sintezei). De exemplu, mutații în regiunea reglatoare 5' a genei pentru beta-globină reduc sinteza catenelor beta la adult, producând boala denumită *beta-talasemie* și/sau creșterea expresiei catenelor gama în afecțiunea denumită *persistența ereditară a hemoglobinei fetale*.

### a). Regiunea laterală 5'.

Această regiune, situată în amonte de cadrul de lectură al genei, reprezintă locul unde se fixează ARN polimeraza și servește la inițierea transcripției; ea este numită generic **promotor** și conține mai multe *elemente sau module (cis-activatoare)* cu o secvență nucleotidică scurtă și precis definită. Pe aceste secvențe se fixează niște proteine reglatoare (*trans-activatoare*) numite *factori de transcripție* (TF II<sup>10</sup>) care au rolul să *fixeze și poziționeze* ARN polimeraza II - astfel ca transcripția să înceapă exact la SIT, cu primul nucleotid (+1) – precum și de a *activa* enzima. Trebuie precizat că ARN polimeraza nu poate recunoaște direct promototul și nu poate iniția singură transcripția. Este nevoie de o interacțiune complexă între enzimă, elementele cis-activatoare ale promotorului genei și proteinele trans-reglatoare (TF II), care se vor fixa la promotor (vezi capitolul 4.B.2).

Promotorul eucariotelor superioare este divizat în trei regiuni, cu structură (“module”)și funcții diferite (figura 3.13)

(1). **Miezul promotorului** conține *elemente* care inițiază transcripția, formând *complexul transcripțional bazal*, împreună cu ARN polimeraza și factorii de transcripție generali (În special TF II D și B). Aceste elemente, relativ identice la majoritatea genele care codifică proteine, sunt:

- **TATA box** (secvența TATAAA situată la circa 25 pb în amonte de SIT.) este locul la care ARN polimeraza II se fixează la ADN (prin intermediul TF II D). Această secvență este importantă în demararea *precisă* (în punctul de start) a transcripției, asigurând expresia genei la un *nivel bazal*; mutația secvenței TATA nu împiedică inițierea transcripției dar produce o deplasare a punctului de start, față de normal. TATA box este prezentă la majoritatea *genelor specifice de țesut* (ex., beta-globina); la *genele comune* (“*housekeeping genes*”) – funcționale în toate țesuturile - secvența TATA este înlocuită de **secvența GC** (sau *insule CpG*) datorită concentrației mari de dinucleotide 5'-CG- 3'.
- **Elementul BRE** (de la *TFIIB Recognition Element*), situată imediat în amonte de TATA, reprezintă locul de fixare a factorului de transcripție TF IIB.
- **Elementul DPE** (de la *Downstream Promotor Element*) situat după SIT (la +30).

(2). **Regiunea promotor proximală** (de la -200 la -50) conține elemente care modulează transcripția bazală.

<sup>10</sup> Prefixul TF semnifică *transcription factor* iar II arată tipul de ARN polimerază cu care se asociază; urmează o literă: A,B,C,D ...care specifică un anumit TF. Factorii de transcripție sunt elemente *trans-acting*, deoarece sunt sintetizați de gene situate la distanță de situsurile de acțiune și ei migrează la acest loc. Elementele promotorului pe care se fixează TF sunt *cis-acting elements* deoarece funcția lor este limitată la regiunea de ADN în care ei se găsesc.

- **CAAT box** (secvența GGCCAAT) este situată în amonte de caseta TATA (la circa 75 pb de SIT) și fixează alți TF (CTF și CBF) care *modulează* transcripția bazală, inițiată de secvența TATA.
- **GC box** (secevnța GGGCGG) sunt situate adesea la circa 90 p.b. în amonte față de SIT și leagă factorul de transcripție SP1, care modulează de asemeni transcripția bazală.

**(3). Regiunea promotor distală** conține o serie de secvențe ADN care, după fixarea anumitor factori de transcripție, produc activarea masivă a transcripției sau blocarea ei; ele determină astfel specificitatea tisulară și specificitatea stadiului de dezvoltare în care are loc expresia unor gene, în anumite țesuturi.

- **Elemente care determină expresia specifică a anumitor gene** (de ex., elemente octamerice – OCT), limitată fie la un anumit tip celular fie la un anumit stadiu de dezvoltare ontogenetică. Această acțiune este realizată de *factori de transcripție specific tisulari*, care se fixează pe anumite secvențe situate în regiunea 5' a genei. De ex., expresia specifică a anumitor gene în celulele eritroide este semnalată de secvența TGA<sup>CT</sup>CAG sau AGATAA care sunt recunoscute de TF specific-eritroid NF-E2 sau GATA, inițiind transcripția unui set de gene în eritroblast.
- **Elemente de răspuns (RE)** modulează transcripția unor gene în funcție de anumite semnale extracelulare ("*expresie genică indusă*"). Aceste semnale pot fi *stimuli externi* (molecule nutritive, concentrația unor ioni, temperatură, șoc) sau *semnale de comunicare* de la alte celule (hormoni, morfogeni) - care activează anumiți FT ce se fixează pe elementele de răspuns la anumitor gene și determină transcripția lor temporară. Ex., elementele de răspuns la receptorii hormonal nucleari sau CRE - elementul de răspuns la cAMP (*mesagerul secund* prin care acționează diferiți hormoni și alte molecule semnalizatoare).
- **Activatorii** ("*enhancers*") sunt elemente de reglare pozitivă care *cresc* nivelul bazal al transcripției, inițiată de promotor<sup>11</sup>. Funcția lor nu depinde de localizare (pot fi plasați și în regiunea 3') sau orientare, fiind determinată de mai ales de fixarea unor factori de transcripție specifici anumitor țesuturi (stimulează activitatea unor gene specifice, de ex. cele pentru *imunoglobuline*).
- **Inhibitorii** ("*silencers*") reduc nivelul transcripției și uneori represează funcția unor gene.
- Acțiunea activatorilor și inhibitorilor lor este *limitată* la o anumită genă de către niște secvențe "**izolatoare**" ("*insulators*") care blochează răspândirea efectului unor "agenți" ce intensifică sau atenuază transcripția.

#### **b). Regiunea laterală 3'**

Orice genă se termină în regiunea 3' cu o secvență netranscrisă, care flanchează "cadru de lectură a genei" sau zona ei centrală. Această secvență este *imprecis delimitată și cunoscută* dar existența ei certă îi conferă teoretic un rol structural sau funcțional. În această regiune se găsesc *secvențe semnal* care afectează procesarea, stabilitatea și durata de viață a ARNm. Se mai știe că la unele gene (ex. gena beta-globinei) în această regiune 3' a genei se pot găsi secvențe reglatoare de tip activator (enhancer).

\* \* \*

Înainte de a încheia prezentarea "anatomiei" unei gene ce codifică o proteină vom preciza că structura descrisă reprezintă o *structură "tip" sau "cadru", cu variații individuale la diferite gene*. Astfel, tipurile de module (elemente) ce au fost identificate la promotorii a numeroase și diferite gene sunt în număr limitat; acest fapt este în contradicție cu numărul mare de gene și reglarea lor foarte fină, în raport cu programul dezvoltării sau condițiile externe. Dar promotorii se organizează după principiul "amestecării și armonizării" (*mix and match*), fiecare poate avea mai multe copii ale unui modul în cadrul unui domeniu reglator și mai ales o combinație proprie de module, fapt ce îi conferă o *identitate structurală și funcțională*.

<sup>11</sup> După fixarea proteinelor reglatoare (TF) ADN dintre secvența activatoare și promotor face o buclă care permite TF fixat la activator să interacționeze cu TF fixați la promotor sau cu ARN polimeraza.



Semalăm existența unor gene umane cu secvențe codante *fără introni* (de ex.: genele pentru histone, genele pentru receptori hormonal sau diferiți neuro-transmițători și altele) și de asemeni existența (rară în genomul uman) a unor *gene parțial suprapuse* (ce folosesc cadre de citire diferite, fiecare pe o catenă distinctă a ADN; ex unele din genele HLA de clasă III) și chiar de gene incluse sau "*gene în gene*" (ex. gena pentru neurofibromatoza tip I sau gena pentru factorul VIII al coagulării conțin în anumiți introni alte gene mai mici, transcrise de pe catena opusă celei folosită de gena de bază).

## 2. GENE COMUNE ȘI GENE SPECIFICE.

Genele ce codifică proteine se clasifică în *gene comune*, ce se exprimă în toate celulele și *gene specifice* a căror expresie se face în anumite tipuri celulare și/sau în anumite momente specifice.

### 2.1. GENE COMUNE.

Un grup restrâns de gene codifică proteine comune, ubicuitare, indispensabile funcțiilor celulare. De ex.: sinteza proteică, producerea de energie, metabolismele intermediare. Firesc, ele se exprimă în toate celulele și se numesc **gene comune** / ubicuitare sau "*gene domestice (menajere)*" (de la *housekeeping genes*, în terminologia engleză). Caracteristici:

- reprezintă circa 1/5 din numărul total de gene la om și peste 90% din genele exprimate în orice tip celular;
- se află în majoritatea lor în regiunile de ADN relativ bogate în GC, deci în benzile cromosomice alcătuite din *eucromatină* (benzile R);
- promotorul este alcătuit din una sau mai multe secvențe de tip GC box, situsuri la care se fixează un *factor special de inițiere a transcripției* (Sp 1);
- transcripția lor este de obicei *continuuă* (permanentă), dar la un *nivel scăzut*;
- conțin în regiunea 5' (dar și în alte zone) numeroase repetiții ale dubletului 5'-CG-3' (hipometilat sau nonmetilat, contrar regulii generale); ele alcătuiesc "*insule HTF*" sau insule CG (*insule* - în sensul de grupări; *HTF* de la "Hpa Tiny Fragments", deoarece situsurile CGCG pot fi recunoscute și clivate de enzima de restricție Hpa II).

### 2.2. GENE SPECIFICE.

Circa 4/5 din genele umane au o expresie limitată spațial sau temporal. *Limitarea spațială* înseamnă exprimarea specifică în anumite țesuturi (ex., neuronal, muscular etc), în anumite linii celulare (ex., celulele derivate din creasta neurală), în anumite tipuri celulare (ex., celule eritroide) și chiar celule individuale (ex., limfocitele B, neuronii olfactivi). Acest proces implică intervenția unor mecanisme particulare de reglare a expresiei genice și stă la baza diferențierii sau specializării celulare. *Limitarea temporală* se referă la expresia unor gene în anumite stadii (momente specifice) ale dezvoltării, diferențierii sau ciclului celular.

## 3. GENE UNICE ȘI FAMILII DE GENE.

### 3.1. GENE UNICE SAU CVASIUNICE. PSEUDOGENE

Marea majoritate a genelor sunt reprezentate de **gene unice** (mai exact două copii alelice prezente în genomul diploid) al căror plan structural coincide cu cel descris anterior (secvența CAAT poate însă lipsi).

Unele gene au fost însă *duplicate* în cursul evoluției: uneori cele două copii sunt cvasiidentice și pot fi folosite aleatoriu în transcripție, când una când alta (ex. genele  $\alpha 1$  și  $\alpha 2$  pentru alfa-globină); alteori, cele două copii au suferit mici modificări care nu le alterează funcția,

iar expresia lor individuală se face fie în diferite perioade de ontogeneză (ex., genele pentru catenele de globină  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  și  $\beta$ ), fie în țesuturi /organe diferite (ex. genele pentru amilaza salivară sau pancreatică) sau compartimente celulare diferite (genele pentru izozimele citoplasmice și mitocondriale diferite enzime).

Unele copii produse prin duplicația genelor<sup>12</sup> sunt *defective* și, de obicei, nefuncționale; dacă ele cuprind întreaga structură a genei se numesc **pseudogene** (se notează cu litera grecească psi-  $\psi$ ) iar dacă sunt alcătuite numai dintr-o parte a genei se numesc **gene trunchiate** sau **fragmente de genă**. De ex., gena NF1 (neurofibromatoza tip I), situată pe 17q11.2 are cel puțin 11 pseudogene sau fragmente de genă localizate în regiunile pericentromerice a șapte cromosomi diferiți; gena PKD1 (ce produce ADPKD sau boala polichistică renală a adultului) situată pe 16p13.3 are în imediata ei vecinătate trei copii trunchiate a circa 70% din gena normală. Probabil singura pseudogenă funcțională este *gena  $\theta$  pentru globină* (din familia  $\beta$  globinei; figura 3.14.a): ea codifică un polipeptid care însă nu este încorporat într-o moleculă funcțională de hemoglobină.

### 3.2 FAMILII ȘI SUPERFAMILII DE GENE.

În genomul uman există numeroase gene funcționale care prezintă un grad mai mare sau mai mic de secvențe similare. Genele cu *structuri asemănătoare* alcătuiesc **familii de gene**. În funcție de gradul de înrudire al secvențelor pe care le au membrii familiei se pot deosebi mai multe tipuri.

#### **a). Familii "clasice" de gene.**

Genele ce alcătuiesc o astfel familie au o *structură cvasiidentică* (de ex., familia genelor pentru histone și cea a genelor ARNr) sau foarte asemănătoare (ex., familia alfa sau beta globinei)(vezi figura 3.14 și *caseta 3.3*) și de aceea se consideră că foarte probabil au o *origine comună*, ele rezultând prin duplicația succesivă a unei *gene ancestrale* (figura 3.10). Deși copiile au evoluat apoi independent și divergent, fiecare continuă să *producă proteine relativ asemănătoare, structural și funcțional*. Unele gene din familie pot să nu funcționeze, formând pseudogene

Elementele ce compun o familie de gene pot fi uneori *dispersate* în genom (de ex. familia genelor pentru colagen, actină, miozină ș.a.); alteori, ele sunt *grupate* ("clusters"), foarte aproape una de alta, într-o anumită regiune a unui cromosom (de ex. familiile genelor globinei, a hormonului de creștere, ș.a.) sau în mai mulți cromosomi (de ex., familiile genelor pentru histone, genelor pentru receptorii olfactivi).

#### CASETA 3.4

#### **Familiile alfa și beta globinei**

*Genele hemoglobinei, sunt repartizate în două familii, situate pe cromosomi diferiți: familia alfa-globinei și familia beta globinei (figura 3.14.a.). Toate genele au aceeași structură fiind alcătuite din 3 exoni și 2 introni și derivă probabil prin duplicații succesive dintr-o genă ancestrală (figura 3.10)*

**Familia genelor alfa-globinei** - este situată la capătul distal al brațului scurt al cromosomului 16 (locus HBA din 16p13); este alcătuită din patru gene funcționale: zeta ( $\zeta$ ), alfa 2 ( $\alpha 2$ ), alfa 1 ( $\alpha 1$ ) și teta ( $\theta$ ) - care produc fiecare un polipeptid de 141 aminoacizi. Familia alfa globinei conține de asemenea 3 pseudogene ( $\psi$ ), nefuncționale. Ordinea genelor în familia  $\alpha$ -globinei (descrise în direcția 5' → 3') este următoarea:  $\zeta$ -  $\psi\zeta$ -  $\psi\alpha^2$  -  $\psi\alpha^1$  -  $\alpha^2$  -  $\alpha^1$  -  $\theta$ . Gena zeta ( $\zeta$ ) se exprimă numai în perioada embrionară (figura 3.14); genele alfa 2 și alfa 1 încep să se exprime în perioada fetală și rămân active toată viața (produc proteine identice și contribuie în mod egal la sinteza catenei alfa-globinei); gena teta este o pseudogenă funcțională dar produsul său proteic nu a fost încă identificat în condiții fiziologice.

**Familia genelor beta-globinei** - se află la extremitatea distală a brațului scurt al cromosomului 11 (locus HBB din 11p15); conține cinci gene funcționale: epsilon ( $\epsilon$ ), gama ( $\gamma$ )-G,

<sup>12</sup> Pseudogenele pot să apară și prin retrotranspoziție: ARNm produs de o genă activă formează sub acțiunea transcriptazei inverse o copie de ADNc care se inseră în ADN; neavând promotor această copie este nefuncțională

gama ( $\gamma$ )-A, delta ( $\delta$ ) și beta ( $\beta$ ), care codifică fiecare un peptid de 147 aminoacizi. Există o singură pseudogenă. Ordinea genelor ce alcătuiesc familia beta-globinei este următoarea:  $\epsilon - \gamma - \beta - \delta - \beta$ . Gena epsilon este activă în perioada embrionară (formând hemoglobinele embrionare: Hb Gower 1 -  $\zeta^2\epsilon^2$  și Hb Gower 2 -  $\alpha^2\epsilon^2$ ); genele gama se exprimă în perioada fetală (formând Hb fetală Hb- $\alpha^2\gamma^2$ ) dar imediat după naștere transcripția lor diminuează brutal fiind înlocuită de sinteza lanțurilor beta și producerea de Hb A ( $\alpha^2\beta^2$ ); în aceeași perioadă începe să funcționeze și gena delta care va participa la sinteza Hb A2 ( $\alpha^2\delta^2$ ) dar expresia sa este slabă (Hb A2 = 2%). Se remarcă faptul că genele globinei se exprimă în diferite perioade ontogenetice în ordinea 5'→3' în care se găsesc pe cromosom (figura 3.14.b).

**b). Familii de gene ce codifică produse cu domenii mari identice ("conservate")**

În acest grup sunt incluse familiile care codifică *factori de transcripție* (ex., familiile genelor HOX, PAX, SOX, POU etc, ce intervin în embriogeneză); ele au în comun o secvență ce codifică un domeniu/motiv identic al proteinei, cu care aceasta se fixează pe ADN genei țintă (de ex domeniul *homeobox* pentru genele HOX).

**c). Familii de gene ce codifică produse cu un motiv scurt de aminoacizi identici**

În acest caz membrii familiei au o structură diferită exceptând o secvență scurtă, identică, de aminoacizi care va determina o funcție asemănătoare (ex., familia ankirinei implicată în interacțiuni proteină-proteină).

**d). Superfamilii de gene.**

O genă ancestrală poate forma printr-un fenomen de hiperduplicație, produs precoce în evoluție, un număr mare de copii genice care, evoluând divergent, vor prezenta structuri și funcții diferite. Totuși, ele vor mai păstra un "*motiv*" structural identic și vor interveni în procese corelate. Cel mai cunoscut și mai frumos exemplu îl reprezintă **superfamilia genelor imunității** care include genele pentru imunoglobuline, genele pentru receptorii limfocitelor T, genele complexului major de histocompatibilitate (HLA), dar și alte gene implicate în recunoașterea celulară în sistemul nervos (genele pentru molecule de adeziune celulară sau pentru glicoproteinele asociate cu mielina). Toate aceste gene conservă structura terțiară a unității de bază (figura 3.15). Un alt exemplu de superfamilie îl reprezintă genele ce codifică **receptorii nucleari pentru hormoni**.

## 4. ELEMENTELE GENETICE MOBILE

Genele nu au întotdeauna o poziție fixă în genom. Unele secvențe de ADN sunt capabile să își schimbe localizarea în genom, fără să apară însă niciodată în formă liberă și individualizată în celulă. Deplasarea unor secvențe de ADN dintr-o poziție în alta a fost numită **transpoziție** iar secvențele respective *elemente genetice mobile*, *elemente transpozabile* sau **transposoni**.

Transposonii au fost identificați inițial la porumb (Barbara Mc. Clintock, Premiul Nobel, 1983) și ulterior la numeroase specii de procariote și eucariote, plante și animale; deși mai puțin frecvenți la mamifere, existența lor a fost recunoscută inclusiv la om, putând fi uneori o sursă de mutații.

În prezent, elementele transpozabile prezente la om se împart în două categorii, în funcție de mecanismul transpoziției: **transposoni și retrotransposoni**.

(1) **Transposonii** sunt secvențe de ADN copiate prin transpoziție mediată de ADN; transposonii sunt rari la om (mai cunoscut este transposonul *Mariner*). Structura transposonului include și genele ce codifică enzimele (*transpoază*, *rezolvază*) necesare inserției sale în genom; Mecanismul transpoziției implică secționarea catenelor ADN la locul țintei (prin acțiunea *transpoazei*), poziționarea în această breșă a unei copii ADN (de obicei incomplete) a transposonului (realizată prin replicare) și sudarea capetelor (cu ajutorul *rezolvazei*).

(2) **Retrotransposonii** și alte secvențe înrudite, la care transpoziția este realizată prin intermediul ARN; alcătuiesc marea majoritate a elementelor transpozabile cunoscute la om. Mecanismul retrotranspoziției: transcriptul primar ARN al unor secvențe de ADN este convertit - sub acțiunea *transcriptazei inverse* - într-o formă de ADN complementar care este reinserat înapoi într-un alt situs din ADN cromosomic. Structura

elementelor retrotranspozabile, care suferă transpoziția mediată de ARN, este variată: unii au origine *virală*, posedă gena pentru *transcriptază inversă* și sunt capabili de transpoziție independentă; în această categorie se includ **retrotransponii** (de ex., familia LINE-1) și **retrovirusurile endogene**, care seamănă cu retrovirusurile dar au o structură modificată ce îi face incapabili să infecteze noi celule (ex., familia HERV/RTLTV); alții au origine *nonvirală*, nu produc transcriptază inversă și suferă retrotranspoziția folosind revers transcriptaza codificată de alte elemente; în această grupă se includ **retropseudogenele** de tipul familiei *Alu*

IHGSC a stabilit recent (2001) că în **schita secvenței genomului uman** circa 45% din secvențele repetitive sunt derivate din elemente genetice mobile, în special retrotransponii. La mamifere și om, elementele transpozabile sunt de patru feluri: LINEs (*long interspersed elements*, de circa 6kb; reprezentați în special de familia L1), SINEs (*short interspersed elements*, circa 100-400 pb; reprezentați în special prin familia *Alu*), retrotransponii LTR (elemente asemănătoare retrovirusurilor) și transponii ADN „fosili” (asemănători cu transponii bacterieni). Primele trei categorii *transpozează* prin intermediul unei copii de ARN, deci sunt *retrotransponii*.

Transponii au fost implicați în diferite procese:

- *modificarea structurii și funcției unei gene* în care se inseră un transpon; acesta aduce fie o "informație" anormală, fie o secvență-control nepotrivită; au fost descrise cazuri de hemofilie A produse prin inserția unei secvențe LINE 1 într-un exon al genei și cazuri de neurofibromatoză produse prin inserția unei secvențe *Alu* în genă.
- *transferul unor exoni sau chiar a unor copii de gene* ce pot fi eventual procesate dacă sunt inserate lângă un promotor; de ex., s-au descris copii autosomale ale unor gene situate pe cromosomul X ;
- realizarea unor "*puncte fragile*" în cromosomi, la locul de inserție; ruperea cromosomilor în aceste puncte și rearanjările ulterioare ale materialului genetic pot juca un rol în evoluție.

Existența elementelor genetice mobile, care încă nu și-au dezvăluit toate secretele, dovedește că genomul are o anumită *plasticitate*. Fenomenul nu se limitează numai la aceste elemente deoarece rearanjamentele ADN se întâlnesc și în funcționarea genelor imunoglobulinelor.

## **C. METODE DE CLONARE ȘI ANALIZĂ A GENELOR. (TEHNOLOGIA ADN RECOMBINANT)**

Până în 1970 genele erau entități materiale inaccesibile analizei directe din cauza dimensiunilor foarte mici și imposibilității obținerii unei cantități suficiente de material pentru studiu. În acel an s-au descoperit *enzimele de restricție*, veritabile "bisturie" genetice, cu ajutorul cărora a devenit posibilă secționarea ADN și izolarea genelor. Aproape concomitent s-au introdus alte noi tehnologii de studiu ale ADN, care au făcut posibilă combinarea moleculelor de ADN de la diferite specii (ADN recombinant) precum și clonarea genelor.

Termenul de **ADN recombinant** se referă la *combinațiile noi de ADN obținute între anumite secvențe de ADN uman (sau de la alte organisme) și molecule de ADN bacterian (sau de la alte specii), capabile să se replice indefinit (formând clone moleculare) sau să exprime, într-o celulă gazdă, informația genetică pe care o conțin.*

Tehnicile de ADN recombinant au inaugurat "era ingineriei moleculare" care schimbă statutul geneticienilor, transformându-i din observatori în "manipulatori" de gene. În numai două decenii, s-au obținut rezultate extraordinare în descifrarea structurii și funcției genelor și aplicarea noilor cunoștințe în medicină (pentru depistarea, diagnosticul și tratamentul bolilor), industria farmaceutică (obținerea de proteine terapeutice și noi vaccinuri), agricultură și zootehnie (utilizarea unor biotehnologii în ameliorarea plantelor și animalelor). Se poate afirma fără nici o rezervă că tehnologia ADN recombinant a produs o nouă și importantă revoluție în biologie și medicină, comparabilă cu descoperirea microscopului, care a deschis *era medicinei moleculare*.

Tehnicile ADN recombinant se pot grupa în două mari categorii:

- *clonarea ADN sau amplificarea selectivă* a unei gene / secvențe de ADN, bazată în esență pe multiple runde de replicare a ADN, care vor produce un număr mare de copii ale fragmentului respectiv; clonarea poate fi *celulară, in vivo*, când se folosește mecanismul natural al replicării ADN sau *acelulară, in vitro*, bazată pe reacția de polimerizare în lanț (PCR).
- *analiza ADN sau detecția specifică* a unei secvențe de ADN sau ARN, bazată pe hibridizarea moleculară (prin complementaritate) a unei *sonde* marcate de acid nucleic, cu secvența respectivă.

## 1. CLONAREA ADN ÎN CELULE.

Clonarea ADN *in vivo* utilizează mecanismul natural de replicare al ADN în celule și implică patru etape majore (figura 3.16):

- *formarea ADN recombinant*, prin atașarea *in vitro* a fragmentelor de ADN uman la "un vector sau replicon" capabil de replicare independentă;
- *transformarea*: moleculele de ADN recombinant sunt transferate în *celule gazdă* în care vectorul recombinant se replică independent de cromosomul celulei gazdă;
- *amplificarea* sau producerea de clone celulare multiple.
- *izolarea clonelor de ADN recombinant* prin oprirea culturilor și izolarea selectivă a ADN recombinant.

### 1.1. OBȚINEREA UNOR GENE/FRAGMENTE DE ADN.

Pentru obținerea unor fragmente de ADN în vederea amplificării și analizei ulterioare, se pot folosi trei metode: secționarea ADN genomic, cu ajutorul *enzimelor de restricție*; formarea unei copii de ADN complementară unei molecule de ARN mesager extras din citoplasmă, utilizându-se *transcriptaza inversă*; sinteza artificială (chimică) prin polimerizarea nucleotidelor după o secvență prestabilită, cu ajutorul *ADN polimerazei*.

#### a). Secționarea ADN cu enzime de restricție

**Enzimele de restricție**<sup>13</sup> sunt mijloace naturale de apărare ale unor bacterii contra infecțiilor cu virusuri; bacteriile reușesc să *limiteze* (în engleză, "to restrict") creșterea virusului infectant, printr-un proces în care ADN fagic este *selectiv recunoscut și degradat enzimatic*, în timp ce ADN bacterian rămâne *protejat* de această acțiune distructivă<sup>14</sup>.

Enzimele de restricție nu secționează ADN la întâmplare ci *au un grad înalt de specificitate*: ele "scanează" ADN și se opresc atunci când recunosc o secvență nucleotidică specifică, numită *situs de recunoaștere și clivare* sau **situs de restricție**.

Situsul de restricție este alcătuit de obicei din 4-6 perechi de baze (rar mai mult de 8 sau mai multe), dispuse în *palindrom* deci *inversate* (o catenă are secvența inversă a celeilalte catene; ambele catene "citite" în sensul 5'→ 3' au însă aceeași secvență) (tabel 3.1.). Situsurile de restricție sunt localizate de regulă în *regiunile intergenice necodante*; rareori pot fi și intragenice, găsindu-se de obicei în introni.

**Tabel 3.1. Exemple de enzime de restricție și situsuri de recunoaștere și clivare**  
(adaptat după Gelherter și Collins, 1998)

ENZIMA DE RESTRICȚIE	SURSA	SITUS DE RESTRICȚIE
Alu I	<i>Arthrobacter luteus</i>	5'AG↓CT3'

<sup>13</sup> Enzimele de restricție au fost descoperite în 1970 de către Arber, Nathans, și Smith (Pr. Nobel, 1978)

<sup>14</sup> Enzimele de restricție posedă deasemeni capacitatea de *a metila ADN propriu*, la nivelul aceluiași situsuri de clivaj și astfel de a-l proteja contra propriei degradări.

		3' TC↓ GA5'
Bam H I	<u>B</u> acillus <u>a</u> myloli <u>q</u> uefaciens <u>H</u>	G↓ GATCC CCTAG↑ G
<b>Eco R I</b>	<u>E</u> scherichia <u>C</u> oli <u>R</u> Y 13	G↓ AATTC CTTAA↑ G
<b>Hae III</b>	<u>H</u> aemophilus <u>a</u> egipticus	GG↓ CC CC↑ GG
Not I	<u>N</u> ocardia <u>o</u> titis	GC↓ CGGCCGC CGGCCG↑ CG
Taq I	<u>T</u> hermus <u>a</u> quaticus	T↓ CGA AGC↑ T
* Nomenclatura: prima literă=genul bacteriei; a doua literă și eventual a treia=specia; a treia literă=sușă; o cifră = numărul de ordine.		

Enzimele de restricție secționează *ambele catene* ale moleculei de ADN la sau lângă situsul de restricție; ele sunt *endonucleaze* deoarece hidrolizează legăturile fosfodiester dintre nucleotide, totdeauna spre interiorul moleculei. Se cunosc câteva sute de enzime de restricție, deosebite prin sursa bacteriană din care provin și secvențele nucleotidice pe care le recunosc și clivează în ADN.

După modul în care secționează ADN în situsul de recunoaștere enzimele de restricție sunt de două feluri (tabelul 3.1): unele enzime (de ex. Eco RI) realizează *secțiuni asimetrice* (decalate) ale catenelor și produc fragmente care au *capetele "proeminente"*, cu o prelungire de 4 baze pe una din catene; aceste capete se mai numesc "*adezive* (coezive)" deoarece au tendința să se asocieze unul cu altul sau la o altă extremitate ce posedă o secvență complementară (figura 3.16); alte enzime (de ex. Hae III) taie simetric (la același nivel) ambele catene și produc capete "drepte"; ele nu se pot asocia spontan, ca în primul caz, ci numai sub acțiunea unor ADN ligaze. Există de asemenea enzime a căror activitate este inhibată de prezența metilării ADN (precum HpaII sau NotI), sau dimpotrivă, care sunt capabile să secționeze la nivelul situsului de restricție numai atunci când ADN-ul este metilat.

Clivarea moleculei de ADN cu o anumită enzimă de restricție "fragmentează" ADN într-un *număr definit, caracteristic și reproductibil de fragmente*, care reflectă localizarea și frecvența situsurilor specifice de clivare sau **harta de restricție**. Situsurile de restricție sunt dispuse la distanțe variate iar fragmentele produse prin secționare sunt inegale; pe această bază, ele pot fi ușor separate prin electroforeză.

În acest context este util de subliniat un ultim aspect privind situsurile de restricție. Diferite mutații pot modifica situsul de restricție (care nu va mai fi cunoscut de enzimă) sau pot crea situsuri noi. De aceea clivarea ADN cu aceeași enzimă de restricție va produce la persoane diferite din populație fragmente de ADN cu lungimi diferite. Se realizează un amplu fenomen de "*polimorfism al lungimii fragmentelor de restricție*" (RFLP), care poate fi folosit ca un marker genetic prețios în diagnosticul unor boli genetice (vezi capitolul 9.B.2).

În afara acestor particularități trebuie să precizăm un lucru important: o anumită enzimă de restricție produce *capete adezive indentice* atunci când secționează molecule de ADN diferite (figura 3.16). Datorită acestei caracteristici *două fragmente de ADN cu origini diferite dar produse de aceeași enzimă de restricție se pot uni pe bază de complementaritate producând o moleculă hibridă de ADN recombinant*<sup>15</sup>.

Enzimele de restricție au devenit instrumentul de bază al ingineriei genetice, "bisturiul" cu care se fac toate "operațiile moleculare" asupra ADN: corecții, amputații și mai ales "transplante" de gene.

#### **b). Obținerea de ADN complementar**

<sup>15</sup> Această moleculă hibridă, ce reunește segmente de ADN de la specii diferite, se mai numește și moleculă de ADN "himerică"

O altă metodă de a obține gene folosește ca material de lucru *ARN mesager*, produsul (transcriptul) primar al genei, extras din citoplasma unei celule care îl sintetizează din abundență (de ex., ARNm pentru beta-globină izolat din hematii tinere). Molecula monocatenară de *ARN mesager servește ca matriță* pentru sinteza unei catene de **ADN complementar** (ADNc) realizată de enzima *transcriptază inversă*. Pe baza primei catene de ADN se sintetizează și cea de a doua catenă; astfel se obține o moleculă ADNc bicatenar care va corespunde genei (mai exact exonilor din genă) care în celulă a produs (prin transcripție) ARNm ce a servit ca matriță pentru ADNc. În acest mod s-a sintetizat pentru prima dată gena pentru beta globină.

### c). Sinteza "artificială" (chimică) a unor fragmente de ADN.

Metoda se bazează pe *polimerizarea deoxiribonucleotidelor* ce alcătuiesc o catenă de ADN, într-o *ordine prestabilită/determinată anterior*. Ea se deduce pe *baza secvenței de aminoacizi a proteinei* codificată de genă, cu ajutorul codului genetic, care stabilește pentru fiecare aminoacid codonul (trinucleotidul) corespunzător. Alteori, secvența de nucleotide a genei ce va fi sintetizată se stabilește prin alte metode. Această tehnică se folosește mai des pentru obținerea unor *oligonucleotide corespunzătoare unei părți din genă*, utilizate fie ca sonde fie ca amorse, în alte tehnici de analiză moleculară.

## 1.2. CONSTRUCȚIA MOLECULELOR DE ADN RECOMBINANT

După obținerea unor fragmente de ADN uman analiza sau utilizarea genelor necesită *multiplicarea fragmentului* într-o cantitate suficientă. Pentru aceasta, *genele se inseră* într-un **replicon** sau **vector** și cu ajutorul lui sunt introduse într-o **celulă gazdă** (bacterii, levuri etc), unde vor fi multiplicat. Deoarece vectorii pot forma prin replicare un număr mare de copii per celulă și întrucât gazdele pot fi crescute indefinit în laborator se pot obține mari cantități din secvența de ADN inserată (genă).

Unirea a două fragmente de ADN de origini diferite produce o moleculă de **ADN recombinant**. Pentru aceasta, moleculele de ADN din cele două surse sunt secționare cu *aceiași enzimă de restricție*; se produc capete complementare identice care fiind coezive se pot uni pe bază de complementaritate și produce o moleculă hibridă de ADN recombinant (figura 3.16). Legăturile sunt stabilizate cu ajutorul unei *ADN ligaze*. Talia fragmentului exogen inserat depinde de tipul de vector.

### a). Vectorii.

Un vector este o moleculă naturală de ADN utilizată pentru *transportul* secvențelor de ADN exogen într-o celulă gazdă. El trebuie să fie capabil să *se replice activ și independent* de genomul gazdei (de aceea se mai numește și *replicon*), din care apoi va fi izolat în formă pură. Vectorul care include un fragment de ADN exogen se numește *vector recombinant* iar procesul de încorporare a plasmidelor recombinante în celulele gazdă este numit **transformare**

În tehnicile de clonare se utilizează frecvent patru tipuri principale de vectori, deosebiți prin *mărimea fragmentelor de ADN exogen pe care-l pot insera*: plasmide, bacteriofagi, cosmide, cromosomi artificiali (tabelul 3.2.)

**Tabel 3.2. Exemple de vectori folosiți frecvent în clonarea moleculară**

(după Thompson și Thompson, 2001)

Vectori	Gazde	Tip ADN clonat	Mărimea fragmentului inserat
Plasmide	bacterii, levuri	genomic, ADNc	până la 10 kb
Bacteriofagi Lambda	bacterii	genomic, ADNc	până la 20 kb
Cosmide	bacterii	genomic	până la 50 kb
Cromosomi "artificiali" BACs și YACs	levuri	genomic	între 100-1000 kb

- (1) **Plasmidele** - se găsesc natural în bacterii, cărora le conferă rezistența la diferite antibiotice și metale grele. Ele sunt alcătuite dintr-o moleculă mică (de circa 2-5 Kb) de ADN bicatenar circular extracromosomal, care se replică complet independent de cromosomul bacterian. Prezintă un situs de inițiere a replicării (origine) și unul sau mai mulți markeri de selecție (de obicei gene care conferă rezistență la antibiotice). Au un situs unic de restricție (situat într-o genă de "selecție") unde poate fi inserat un fragment de ADN exogen (de la circa 1 Kb, până la maximum 10kb) rezultând un *plasmid recombinant*.
- (2) **Bacteriofagii** (sau pe scurt fagii) sunt virusuri care infectează și distrug bacteriile. Ei posedă un sistem de penetrare a bacteriei în care își introduc ADN; se se replică autonom, rapid și intens (circa un milion de copii). Multiplicarea fagului în bacterie<sup>16</sup> se traduce după un timp, prin liza ei. În tehnicile de ADN recombinant se folosesc în special fagii lambda ( $\lambda$ ) ce atacă E. coli. ADN fagic bicatenar și linear (figura 3.17), de aproximativ 45 Kb, este "împachetat" în capsula virusului. El posedă două extremități coezive /adezive, numite *cos* (care permit circularizarea ADN fagic pătruns în bacterie) și un "fragment intern", neesențial pentru replicare, care poate fi decupat și înlocuit cu o moleculă de ADN exogen (10-20 Kb), formând fagi recombinanți (figura 3.17). Pe culturi de geloză fagii recombinanți se recunosc prin plaje de liză, pe un "covor" bacterian.
- (3) **Cosmidele** sunt vectori artificiali constituiți dintr-un plasmid clasic la care s-au adăugat secvențele *cos* ale fagului lambda, secvențe care permit împachetarea unor segmente de ADN exogen mai lungi decât în fagi (figura 3.26). Cosmidele funcționează inițial ca niște fagi și după infecția bacteriei acești pseudofagi se recircularizează și se replică ca un plasmid, dar mult mai lent, fiind și mult mai mari. Avantajul cosmidelor este că permit inserția și clonarea unor fragmente foarte lungi de ADN (până la 50 Kb).
- (4) **"Cromosomii artificiali bacterieni (BACs)"** derivă din plasmidul de fertilitate din E.Coli și este capabil să încorporeze fragmente de ADN până la 300 kb.
- (5) **"Cromosomii artificiali de levuri (YACs de la yeast artificial chromosomes)** sunt plasmide care posedă centromerul și telomerele originale, elementele necesare replicării și segregării mitotice a cromosomilor în cele două celule fiice de *Saccharomyces cerevisiae* (drojdia folosită în brutării). În rest cromatidele YAC vor fi alcătuite din ADN exogen (figura 3.18). După "fabricare" cromosomii artificiali sunt introduși în levuri și se comportă ca și cromosomii normali. YAC poate încorpora fragmente foarte mari de ADN (până la 1000 Kb) și permite replicarea ADN de eucariote cu secvențe repetitive de ADN. Totuși multe gene umane au mărimi de 2-3 Mb și în aceste cazuri analiza lor cu vectorii convenționali necesită clonarea unor fragmente suprapuse de genă, din care să se reconstituie ulterior secvența originală și integrală a genei<sup>17</sup>.
- (6) **Alți vectori.** În afara celor patru tipuri principale de *vectori de clonare*, în cazuri speciale, se folosesc și alte tipuri de vectori. *Vectorii "navetă"*, destinați a fi utilizați și la procariote și la eucariote. Ei pot introduce o secvență de ADN în celulele eucariote (transfecție), care ulterior va fi recuperată prin clonaj într-o bacterie, în scopul studierii modificărilor pe care le-a suferit în celula eucariotă. *"Vectori de expresie"*. Unii vectori sunt prelucrați într-un mod particular adăugându-li-se, în vecinătatea situsului de inserție a ADN exogen, semnalele necesare transcripției. Acești vectori pot funcționa în bacterii sau drojzii determinând sinteza proteinei corespunzătoare genei pe care o conțin. *"Vectorii virali"* pentru celulele eucariote sunt retrovirusurile, adenovirusurile, virusul SV 40 și virusurile de tip Herpes. Sunt folosiți în experiențe de introducere (încorporare) a ADN în celule eucariote numite generic *transfecție*.

### 1.3. TRANSFORMAREA

Moleculele de ADN recombinant sunt *transferate* (încorporate) în *celule gazdă* (de obicei bacterii nepatogene modificate<sup>18</sup>), în care vectorii recombinanți se vor multiplica *independent* (autonom) de cromosomul bacterian, formând mai multe exemplare identice. Introducerea unui vector într-o celulă bacteriană se numește **transformare**.

Procedura de inserție este specifică fiecărui tip de vector (de ex. în cazul plasmidelor membrana bacteriilor va fi tratată special<sup>19</sup> iar în cazul fagilor, ADN recombinant va fi mai întâi "împachetat" în capsula virală).

<sup>16</sup> Uneori fagii se pot insera în cromosomul bacterian, unde rămân "tăcuți" (sub formă de profagi) și se pot replica odată cu acesta (ciclul lizogenic)

<sup>17</sup> Recent a început fabricarea cromosomilor artificiali de mamifere (MAC) sau de om (HAC) ce vor fi utilizați pentru transferul de ADN în culturi de celule umane (de ex. în genoterapie).

<sup>18</sup> Bacteriile - sunt cel mai frecvent folosite în clonarea ADN datorită multiplicării rapide (timp de generație 20-30 minute), facilității de manevrare și costului redus. Deși nepatogene, bacteriile sunt modificate pentru a diminua riscurile diseminării accidentale. Cel mai des se utilizează E. Coli, mai rar *Pseudomonas* și *Bacillus subtilis*.

<sup>19</sup> Membrana celulei bacteriene nu este în mod normal permeabilă la moleculele mari de ADN dar poate deveni permeabilă după tratamentul cu ioni bivalenți, șocuri electrice scurte (electroporație) care formează pori în peretele celular, prin care pătrund plasmidele. Totuși numai un mic procent de celule vor fi *competente* deci capabile să



Trebuie subliniat că o celulă gazdă *competentă* fixează numai o singură moleculă de ADN recombinant; fiecare celulă transformată va forma o clonă specifică (figura 3.16)

#### 1.4. AMPLIFICAREA

Bacteriile transformate sunt supuse multiplicării. În cazul clonării cu vectori plasmidici celulele bacteriene sunt însămânțate pe suprafața unei plăci cu agar, unde cresc și formează colonii sau clone (populații de celule identice, descendente dintr-o singură celulă) distincte. Apoi, coloniile sunt prelevate și cultivate individual într-un flacon cu mediu lichid, unde se produce o nouă expansiune a numărului de celule (figura 3.16). Dacă celula inițială conținea un vector recombinant atunci - prin multiplicarea lui precum și a celulelor ce-l conțin - se realizează o amplificare enormă a fragmentului de ADN atașat vectorului.

#### 1.5. IZOLAREA CLONELOR DE ADN RECOMBINANT.

Celulele care au încorporat vectorul recombinant se vor *selecta* datorită unor caractere fenotipice particulare. Astfel, creșterea bacteriilor pe un mediu cu ampicilină selectează acele celule care conțin copii ale plasmidului (cu gena de rezistență la ampicilină inserată) ce conferă bacteriei rezistență la acest antibiotic (figura 3.16). Se formează o colonie de bacterii cu ADN recombinant. La fel, proliferarea fagilor într-o bacterie se traduce prin liza sa: pe culturi în geloză, recombinanții nu se evidențiază prin clone ci prin plaje de liză, pe un "fond" de bacterii normale. Prezența ADN recombinant în structura vectorului este adeseori identificată pe baza inactivării inserționale a unei gene. Un astfel de sistem este acela al beta-galactozidazei. Situsul de inserție este situat în interiorul acestei gene din structura vectorului. Prezența ADN recombinant va determina inactivarea acestei gene și, ca urmare, va aboli capacitatea celulelor bacteriene transformate de a transforma Xgal într-o substanță albastră. Există și alte metode de screening și selecție a clonelor de ADN. După selecție, celulele sunt procesate pentru *a se extrage și purifica clona de ADN recombinant*. Această procedură se va face pentru fiecare colonie bacteriană ce conține un anumit fragment de ADN genomic. Rezultă o *colecție* sau o *bancă (bibliotecă) de clone de ADN* ("DNA libraries") din populația inițială de fragmente de ADN.

#### 1.6. CONSTRUCȚIA BĂNCILOR SAU BIBLIOTECILOR DE GENE

După punerea la punct a metodelor de clonare moleculară a devenit necesară crearea unei *colecții de clone de ADN recombinant*, care să conțină toate secvențele provenite dintr-o anumită sursă: ADN genomic (nuclear) (figurile 3.16, 3.17 și 3.18) sau ADN complementar (ADNc)(figura 3.19). O astfel de colecție se numește **biblioteca (bancă) de gene**, deoarece o anumită genă sau fragment de ADN poate fi obținută pentru a fi studiată sau folosită asemenea unei cărți într-o bibliotecă.

*Identificarea clonei* cu gena dorită, din ansamblul clonelor din biblioteca sau banca de gene, se face cu ajutorul unor tehnici sensibile de identificare (screening sau criblaj).

##### a). Biblioteci (bănci) genomice

După extragerea ADN dintr-o celulă somatică (care conține de fapt informația genetică cuprinsă în genomul individului) se realizează fragmentarea prin digestia sa incompletă cu ajutorul unei anumite enzime de restricție, care produce fragmente de o anumită mărime. Aceste fragmente sunt inserate separat într-un vector tip bacteriofag lambda (figura 3.17) sau în plasmide (mai rar în cosmide sau YAC). (figura 3.18) Se obține o bancă cu sute de mii de vectori recombinanți ce conțin fragmente diferite de ADN uman. O astfel de colecție va cuprinde tot ADN din genomul uman. Una din primele bănci genomice, folosită și astăzi de sute de laboratoare, a fost creată în 1978 de Maniatis. Pentru a ușura procesul de identificare a unei anumite gene s-au construit recent colecții

---

încorporeze ADN din mediul extracelular. Atunci când o fac ele fixează numai o singură moleculă vector, deci numai un fragment de ADN

de clone ce corespund numai unui anumit cromosom uman (izolat printr-o tehnică specială de triere) sau chiar a unei regiuni sau benzi cromosomice.

### b). Biblioteci (bănci) de ADN complementar (ADNc)

Banca de ADNc cuprinde copiile de ADNc ce corespund tuturor moleculelor de ARN mesager dintr-o anumită celulă. Construcția unei bănci de ADNc se face în mai multe etape (figura 3.19). Mai întâi se obține ARN total din celulă și apoi se separă ARNm de celelalte tipuri de ARN. Cu ajutorul transcriptazei inverse se produc copii de ADNc corespunzătoare fiecărui tip de ARNm. Acestea se inseră în vectori de tip bacteriofag lambda și astfel se obține o bancă de ADNc.

Băncile de ADNc sunt folosite mai frecvent decât cele de ADN genomic deoarece clonele obținute corespund numai secvențelor codante ale genei (fără introni), deci sunt mult mai scurte. În plus se pot identifica mai ușor genele care se exprimă preferențial sau exclusiv în celule specializate (ficat, mușchi, reticulocite) sau în diferite perioade ale dezvoltării ontogenetice (embrion, făt, adult).

### c). Identificarea unei clone.

Pentru identificarea unei anumite clone ce conține ADN recombinant dorit dintr-o bancă de ADN s-au utilizat diferite metode; în prezent, sunt folosite doar două tehnici: trierea cu oligonucleotidele de sinteză și trierea cu anticorpi.

- *Trierea cu oligonucleotide* de sinteză utilizează o secvență nucleotidică scurtă, sintetizată pe baza secvenței de aminoacizi a unei părți (15-20 aminoacizi) dintr-o anumită proteină, folosind corespondențele aminoacizi → codoni stabilite de codul genetic. Secvența oligonucleotidică sintetizată va corespunde unei părți din gena cercetată. Ea va fi marcată radioactiv cu <sup>32</sup>P și apoi hibridizată cu clonele ce alcătuiesc banca de ADN. Sonda se va fixa și identifica o anumita clonă, ce conține gena care codifică proteina respectivă.
- *Trierea cu anticorpi* evidențiază proteina codificată de gena cercetată, care se exprimă in vitro (într-un sistem adecvat). Complexul antigen-anticorp se va forma numai în celulele ce conțin clona cu gena respectivă; el va fi identificat prin evidențierea anticorpului (prin tehnici speciale).

## 2. CLONAREA ACELULARĂ A ADN (METODA PCR)

În anul 1985, în analiza genotipică s-a produs o nouă mini-revoluție metodologică prin introducerea tehnicii "*polymerase chain reaction*" (PCR) (Mullis și Smith; Pr. Nobel, 1993). Cu această metodă se poate *amplifica selectiv o secvență scurtă de ADN sau ARN*, a cărei structură nucleotidică este parțial cunoscută. Amplificarea este considerabilă (de miliarde de ori) și rapidă (în câteva ore), permițând obținerea unei cantități suficiente de material genetic necesar pentru analiză.

Amplificarea selectivă in vitro a unui fragment de ADN cu secvență cunoscută se realizează pe baza *principiului extensiei unei amorse* ("primer sau amplimer"). Tehnica folosește două oligonucleotide de sinteză care reproduc o secvență de 15-25 nucleotide situate la capătul 3' a celor două catene ale segmentului de ADN (figura 3.20); ele sunt numite **amorse** deoarece *declanșează* sinteza ADN, după "matrița" fragmentului ADN inițial (de amplificat); reacția necesită, evident, prezența ADN-polimerazei.

Într-un prim timp, segmentul de ADN ce trebuie amplificat este *denaturat termic* (la 95°C), obținându-se un amestec de fragmente monocatenare. Apoi, în al doilea timp, se produce (la 50-60°C) *poziționarea și hibridarea amorse* la secvențele complementare (situate în poziția 3') de pe fiecare catenă. După aceea, în a treia etapă are loc *polimerizarea* nucleotidelor sub acțiunea unei ADN-polimeraze termostabilă<sup>20</sup> (la 72°C) și fiecare amoră este *alungită* (extinsă) în sensul 5' → 3', formându-se o secvență complementară catenei copiate (matriță) (figura 3.20). La fiecare circa 3-10 minute rezultă o nouă dublare a secvenței inițiale de ADN.

PCR este o *reacție în lanț* deoarece catenele de ADN nou sintetizate vor acționa ca *matrițe* pentru sinteza ADN în ciclurile următoare de denaturare termică, hibridizare amorse și polimerizare (extensia amorse sau sinteza enzimatică ADN); se produce astfel o amplificare

<sup>20</sup> Este vorba de Taq-polimeraza izolată din bacteria *Thermophilus aquaticus*, care crește natural în izvoarele termale și este stabilă la temperaturi ridicate

exponențială a cantității de ADN: după  $N$  cicluri se obțin teoretic  $2^N$  exemplare din segmentul inițial de ADN. După 30 de cicluri, fără să fie necesară adăugarea de amorse sau enzimă proaspătă, acest segment este amplificat de circa un miliard de ori. Prin această "clonare acelulară" plecând de la o cantitate infimă de ADN (chiar de la o singură celulă) se poate obține, prin PCR, o cantitate suficientă de ADN-țintă, care poate fi vizualizată prin fluorescență în UV (după colorare cu bromură de etidium) și /sau analizată direct.

Avantajele clonării acelulare a ADN prin PCR sunt determinate în primul rând de *simplitatea* sa (nu necesită nici o altă manipulare, în afara variațiilor termice necesare diferitelor etape ale reacției, și deaceia se pretează la automatizare, folosind un *termociclor*); în al doilea rând, PCR este o metodă *rapidă, sensibilă, eficientă și ieftină*.

Dezavantajele majore ale PCR sunt necesitatea unor informații prelabile despre secvența capetelor terminale ale ADN țintă (pentru a fabrica oligonucleotide specifice), mărimea mică (0.1-5 kb în tehnicile uzuale de PCR) și cantitatea limitată de produs, precum și infidelitatea replicării ADN (frecvența relativ crescută a erorilor de împerechere, care depinde de precizia ADN-polimerazei și de existența sau nu a capacității de corecție a erorilor)

Metoda PCR a fost aplicată cu succes la studiul diverselor tipuri de secvențe de ADN: genomic, mitocondrial, exogen (în special viral), precum și la molecule de ARNm, după ce în prealabil s-a obținut cu ajutorul transcriptazei inverse o moleculă de ADN complementar unui mesager (RT-PCR sau *reverse transcriptase PCR*). Tehnica PCR a revoluționat atât analiza genetică, cât și diagnosticul molecular al bolilor genetice, prin detecția directă a mutațiilor sau diagnosticul indirect prin polimorfismul RFLP sau al markerilor minisatelitici. În acest scop s-au elaborat numeroase variante ale PCR.

### 3. METODE DE ANALIZĂ A ACIZILOR NUCLEICI.

Analiza relației fundamentale dintre genotip și fenotip s-a bazat multă vreme pe analiza fenotipică, deci pe studiul manifestărilor genei sau explorarea produselor sale de expresie. Recent a devenit posibilă **analiza genotipică** prin *explorarea directă a ADN*. Deși prezintă numeroase dificultăți, analiza genotipică are o valoare teoretică și practică deosebită.

În planul *cercetărilor fundamentale* analiza genotipică permite:

- studiul structurii genei;
- stabilirea hărții complete a genomului uman; elucidarea mecanismelor de expresie genică și în special a modalităților de reglaj, cheia unor procese biologice fundamentale: diferențierea celulară, morfogeneza, senescența, funcția sistemului nervos sau a sistemului imun.

În *medicina practică* analiza genotipică este folosită pentru:

- studiul patologiei moleculare produsă de mutațiile ADN, indiferent dacă este vorba de o patologie ereditară (boli genetice) sau somatică (cancere);
- diagnosticul genotipic prenatal sau presimptomatic al unor boli chiar și atunci când gena și efectele ei nu sunt cunoscute sau nu sunt evidente;
- recunoașterea unei infecții virale latente.

Pentru a identifica și studia o genă dintr-o colecție (bibliotecă/bancă) de fragmente de ADN clonate sau pentru a pune diagnosticul molecular al unei boli la o anumită persoană este necesară o *sondă genotipică* adecvată care să permită fie recunoașterea directă a genei fie a unor markeri genotipici (secvențe necodante) situați în vecinătatea genei. Această recunoaștere se bazează pe principiul **hibridizării moleculare** a acizilor nucleici.

#### 3.1. HIBRIDIZAREA MOLECULARĂ A ACIZILOR NUCLEICI.

Hibridizarea moleculară se bazează pe capacitatea unor *molecule monocatenare* de acid nucleic de a forma, pe bază de complementaritate, molecule *bicatenare*. *Tehnicile standard* folosesc o **sondă** monocatenară de acid nucleic (cu o structură cunoscută), pentru a identifica o secvență

similară într-un amestec complex și heterogen de molecule de acid nucleic “țintă” (de obicei *imobilizat* pe un suport solid). Dacă ținta este o moleculă de ADN dublu-catenară atunci catenele trebuie mai întâi *separate* (prin încălzire sau tratament alcalin). În condiții adecvate, sonda genotipică (vezi *caseta 3.5*) se fixează specific și stabil pe secvența sa complementară din țintă. Pentru a *identifica* și izola hibridul molecular *sonda este marcată* cu un traser radioactiv sau cu un compus fluorescent. Aceasta va permite *detectarea* secvenței / genei ce posedă o secvență ADN omologă sondei folosite.



Fenomenul este de o specificitate extraordinară pentru că o sondă este capabilă să recunoască o secvență unică printre milioane de alte secvențe. Mai recent s-a introdus și se folosește mai frecvent **hibridizarea inversă** care se deosebește de *hibridizarea standard* a acizilor nucleici prin faptul că sonda *nemarcată* este *fixată* pe un suport solid iar acidul nucleic "țintă" este *marcat* și se află într-o soluție apoasă.

### CASETA 3.5

#### Sondele genotipice

Prin sondă genotipică se înțelege orice secvență de ADN sau ARN, de cel puțin 20 nucleotide, omologă unei secvențe celulare (de ADN sau ARN) care se hibridează în mod specific și stabil cu aceasta, prin asociere între bazele complementare: A-T și G-C.

Obținerea unei sonde specifice necesită izolarea și clonarea prealabilă a genei sau a markerului genei. De aceea există două tipuri de sonde: directe și indirecte.

(1) **Sondele directe** corespund genei analizate<sup>21</sup>. Ele sunt de mai multe tipuri: sonde pentru ADN genomic sau ADNc din băncile corespunzătoare; ribosonde (alcătuite din ARN); oligosonde de sinteză; sonde pentru ADN-ul a genomului unor microorganisme (de ex. virusul hepatitei B) atunci când se urmărește integrarea lor în genomul celulelor umane.

(2) **Sondele indirecte** sunt fragmente de ADN intergenic ce provin dintr-o bancă de ADN genomic, care pun în evidență polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție (RFLP), folosit ca marker genetic. Pentru că nu conțin o secvență codantă se mai numesc și sonde anonime. Atunci când un locus este definit printr-o sondă anonimă se folosește o nomenclatură specială. De ex. D22S1 - unde prima literă este D (de la DNA) urmată de numărul cromosomului și unul din următoarele simboluri: S - pentru secvența unică; Z - pentru secvență repetată situată într-un situs cromosomic definit; NF - pentru secvență repetitivă dar dispersată pe mai mulți cromosomi. Ultima cifră este un număr cronologic care corespunde punerii în evidență.

#### a). Analiza ADN genomic uman prin metoda de transfer Southern

Obiectivul principal al metodei descrisă de Ed Southern (1975) – cunoscută sub numele de **Southern blot** - este de a evidenția, cu ajutorul unei sonde specifice prezența sau absența *unui fragment de ADN omolog* (“țintă”), obținut *din ADN genomic*, cu o anumită enzimă de restricție. Pentru aceasta ADN extras din nuclii celulari este digerat cu una sau mai multe enzime de restricție, fragmentele sunt separate după mărime prin electroforeză în gel de agaroză, denaturate și apoi transferate (prin “sugere”/blotting) și imobilizate pe o membrană solidă de nitroceluloză, pentru a fi hibridizate cu o sondă monocatenară specifică, marcată radioactiv. Sonda se va fixa numai pe secvența omologă de ADN (dacă este prezentă) iar poziția ei pe membrană va permite evaluarea mărimii sale (figura 3.21).

Metoda Southern comportă următoarele etape (figura 3.21):

<sup>21</sup> Denumirea sondelor directe se face cu un nume privat, dat de laboratorul inventator, precum și prin abrevierea locusului genei (conform nomenclurii "Human Gene Mapping"). De exemplu sonda ce corespunde genei alfa - globină se numește pJW 101 (denumire privată) și HBA (în nomenclatura oficială).

- *extragerea ADN genomic* dintr-o sursă accesibilă: limfocite din sângele periferic, celule din culturi de fibroblaste, celule amniotice sau din vilozități coriale (pentru diagnosticul prenatal), celule obținute prin biopsii de organe;
- *fragmentarea ADN genomic*, prin clivare cu o enzimă de restricție adecvată (sau un amestec de două enzime), pentru a obține circa un milion de fragmente mai mici de 20kb; aceasta presupune cunoașterea prealabilă a *hărții situsurilor de restricție* pentru domeniul genomic explorat și alegerea celui mai adecvat cuplu enzimă de restricție - sondă.
- *separarea fragmentelor*, pe baza mărimii lor prin electroforeză în gel de agaroză, în care fragmentele mai mici migrează mai repede decât cele mai mari; pentru separarea fragmentelor mai mari de ADN (40 kb → 2-3 Mb) se folosește electroforeza în câmp pulsatil;
- *denaturarea* (în mediu alcalin) fragmentelor bicatenare, pentru separarea celor două monocatene complementare;
- *transferarea* moleculelor de ADN monocatenar de pe gelul de agaroză fragil pe un suport *solid* (filtru din nitroceluloză sau nailon), prin capilaritate sau sugere ("blotting"); de aici derivă numele metodei "Southern blot" sau "Southern transfer"; fragmentele monocatenare de ADN vor fi *imobilizate* pe membrană în poziția în care s-au găsit, după migrare, în gel;
- *hibridizarea* fragmentelor ADN de pe filtru cu o sondă monocatenară specifică unei gene sau a unui marker genotipic, *marcată* radioactiv; sonda se va împerechea / asocia numai cu secvența complementară dintr-unul sau două fragmente de ADN genomic;
- *spălarea*: heteroduplexul format de fragmentul de ADN și sondă este puternic fixat pe filtru și deci rezistent la o spălare intensă (care îndepărtează fragmentele nehibridate de pe filtru);
- *punerea în evidență* a duplexului, printr-un semnal persistent, după contactul filtrului cu un film foto (autoradiografie), care relevă poziția și mărimea fragmentului.

Rezultatele obținute prin metoda Southern *se compară* cu profilul normal al domeniului genomic explorat de sondă și astfel se pot evidenția două tipuri de mutații: *deleții sau inserții genice de mai mult de 50-100 pb*, detectate prin modificarea lungimii fragmentelor realizate de enzima de restricție; dacă deleția este totală atunci gena dispăre și sonda nu dă nici un semnal; *mutații punctiforme*, ce afectează o singură bază și creează sau distrug un situs de restricție intragenic pentru o anumită enzimă, antrenând *o modificare a lungimii fragmentelor de restricție*.

Cu toate că rezultatele obținute prin metoda Southern par reduse ca informație (semnal prezent sau absent; situs prezent sau absent) analiza genotipică realizată cu această tehnică are o valoare practică, deoarece permite *diagnosticul prenatal sau presimptomatic* al unor mutații genice morbide, precum și *identificarea heterozigoților*. Metoda Southern nu permite evidențierea unor modificări mici din structura ADN (microdeleții, mutații punctiforme ale unei pb). În aceste cazuri, sonda de ADN nu va putea face distincție între gena normală și gena cu alterări minime ale secvenței nucleotidice. Trebuie să subliniem că metoda Southern are și alte inconveniente: este laborioasă, complexă, costisitoare și prezintă numeroase dificultăți de interpretare.

#### **b). Analiza cu sonde oligonucleotidice specifice unei alele (ASO).**

În această metodă, o soluție apoasă de ADN genomic *nefracționat* este depusă sub forma unor *pete* direct pe o membrană de nitroceluloză (**dot-blot**) sau indirect printr-o *fantă* (**slot-dot**); picătura este uscată și ADN imobilizat pe membrană este denaturat (prin tratarea filtrului cu o soluție de alcali) și expus la o soluție ce conține *sonda monocatenară marcată*; aceasta se va hibridiza, formându-se un heteroduplex țintă-sondă ce va fi pus în evidență autoradiografic.

Această metodă, mai simplă și mai rapidă decât Southern blot (nu necesită fracționarea ADN), folosește de obicei sonde ce corespund unei secvențe mici (20 pb) din structura genei, numite și **sonde oligonucleotidice specifice** (ASO de la "Alelele Specific Oligonucleotides") sau pe scurt, oligonucleotide. Aceste sonde scurte sunt mult mai "sensibile" la alterările minime ale secvenței genice, putând *depista modificări ale unei singure perechi de baze*. De aceea, ele sunt folosite pentru depistarea unor *mutații specifice*, cunoscute deja într-o anumită boală genetică<sup>22</sup>. Cu alte cuvinte, se poate stabili dacă *acea mutație este prezentă sau absentă într-o probă de ADN* obținut de

<sup>22</sup> Există și alte metode pentru detectarea mutațiilor *necunoscute* : **denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)**, **mismatch cleavage**, **single-strand conformational polymorphism (SSCP)** care vor fi descrise în capitolul 8

la un pacient oarecare. Sensibilitatea sondelor ASO este evident superioară metodei Southern, care nu poate depista leziunile minime ale ADN.

Pentru depistarea unei mutații specifice se fabrică oligonucleotide specifice unei alele normale sau mutante. Mai exact, ele corespund regiunii genice unde au fost localizate diferențe de secvență (mutații). Sonda corespunzătoare acestei regiuni este sintetizată în două versiuni: normală și mutantă. *Versiunea normală a sondei* nu se poate hibridiza decât cu alela normală și invers, *versiunea mutantă* se împerechează numai cu alela mutantă. Hibridizările încrucișate nu sunt stabile datorită împerecherii greșite ("mismatch") între baze necomplementare (figura 3.22). Astfel se poate stabili dacă o mutație deja cunoscută, specifică unei boli, este prezentă sau absentă la o anumită persoană. Mai mult, se poate face deosebirea între un homozigot pentru alela normală (ADN-ul său hibridizează numai cu ASO normal), heterozigot (ADN-ul său hibridizează cu ambele versiuni ASO) sau homozigot pentru secvența mutantă (ADN-ul său hibridizează numai cu ASO mutant).

Trebuie totuși să subliniem că lipsa de hibridizare între versiunea ASO mutantă și ADN pacientului nu înseamnă automat că aceasta este normal: el poate avea o altă mutație în genă, în altă regiune decât cea explorată printr-o anumită sondă ASO. Analiza ASO este utilă numai în cazurile în care există o mare probabilitate (bazată pe alte date) ca o familie sau un individ să posede o mutație cunoscută. Deci, tehnica se aplică în special pentru boli genetice caracterizate printr-un număr mic de mutații, precis definite (de ex. hemocromatoza, drepanocitoza).

#### c). Analiza ARN m prin Northern blot.

Northern blot<sup>23</sup> este o variantă a metodei Southern blot în care acidul nucleic țintă este ARNm. Obiectivul principal al metodei este obținerea de informații privind profilurile de expresie (tipul celular, abundența transcriptului) unei anumite gene (deja clonată).

Punerea în evidență a unui anumit ARN mesager se bazează pe hibridarea moleculară a ARN cu o sondă complementară monocatenară (ADN c denaturat; oligonucleotide ADN antisens).

Moleculele de ARNm, de diferite lungimi (în funcție de gena transcrisă), extrase din diferite țesuturi, sunt separate prin electroforeză în gel de agaroză denaturant (care suprimă structura secundară ce ar jena migrarea și hibridizarea). Apoi ele sunt transferate pe un filtru de nitroceluloză și hibridate cu o sondă de ADN marcată. Pe autoradiogramă se observă una sau mai multe benzi a căror talie, număr și intensitate sunt indicații prețioase. Absența unei benzi ce ar fi trebuit evidențiată de sondă ne indică faptul că gena nu este exprimată / transcrisă datorită unei mutații. Existența unei mutații (de ex., deleție) poate fi revelată printr-un fragment de ARN m cu talie anormală.

Analiza ARN mesager este mult mai delicată și mai dificilă decât cea a ADN deoarece: ARN este foarte vulnerabil la ARN-azele citoplasmice; numeroase tipuri au o expresie celulară variabilă în funcție de diferențierea celulară<sup>24</sup> (de ex. ARN m pentru fenilalanin-hidroxilază nu este prezent decât în hepatocite, iar cel pentru tiroglobulină numai în celulele tiroidiene); ARNm se găsește în cantități foarte mici.

#### c). Hibridizarea *in situ* a ADN.

Analiza ADN se poate face și prin hibridizarea *in situ* pe preparate cromosomice în prometafază folosind sonde marcate (radioactiv sau cu molecule fluorescente - FISH) judicios alese, în funcție de obiectivul urmărit (vezi capitolul 2.D.3.a). Dacă se bănuiește o microdeleție pentru o anumită regiune cromosomică, la limita vizibilității microscopice se utilizează o sondă marcată corespunzătoare genelor din regiunea respectivă; absența semnalului corespunzător sondei traduce deleția regiunii. Dacă se urmărește localizarea unei gene se folosește o sondă tip ADNc pentru o genă analogă identificată deja la un animal de laborator. Hibridizarea *in situ* se folosește și pentru evidențierea ARN în secțiuni histologice folosind de obicei o sondă de ARN, marcată ("ribosondă"), complementară unui ARNm.

#### d). Identificarea ADN al organismelor exogene

Orice infecție sau infestare printr-un microorganism bacterian, viral, fungic sau parazitar poate fi detectată într-un eșantion biologic prin hibridizare moleculară, dacă există sonde corespunzătoare genomului acestui organism. Hibridizarea moleculară oferă multiple avantaje față

<sup>23</sup> Metoda este denumită "Northern" (Nordică) prin opoziție umoristică față de metoda descrisă de Southern ("Sudică").

<sup>24</sup> ADN se poate analiza în orice tip de celule nucleate și toate genele sunt egal accesibile analizei.

de metodele clasice: simplitate, rapiditate și specificitate (perspective de automatizare); posibilitatea de a detecta agenți infecțioși dificil sau imposibil de cultivat in vitro; posibilitatea de depistare directă a unui agent patogen într-un amestec polimicrobian (în mijlocul unei flore comensale) și pe orice tip de eșantion patologic.

În practică metodele de hibridizare moleculară au găsit deja importante aplicații pentru caracterizarea rapidă a germenilor cu creștere lentă (mycobacterii, treponeme, Brucella etc.), pentru identificarea virusului hepatitei B, virusului papiloma (HPV) și în special în cazurile de SIDA (HIV).

### 3.2. ANA LIZA SECVENȚEI NUCLEOTIDELOR DIN ADN (secvențializarea ADN)

După izolarea și amplificarea unui fragment de ADN (genă), etapa principală de analiză genotipică este *determinarea secvenței nucleotidice*, deci a informației genetice a fragmentului respectiv. Această acțiune este decisivă pentru a stabili *structura* genei precum și secvența de aminoacizi a *proteinei* codificată de genă (în cazul în care ea nu a fost identificată). De asemenea se poate determina *tipul de mutație* care a produs o boală genetică. Stabilirea secvenței nucleotidice este utilă și pentru sinteza *oligosondelor* specifice pentru o alelă (ASO) și a *amorselor* folosite în PCR, ambele fiind larg utilizate în diagnosticul molecular.

Metodele pentru determinarea secvenței nucleotidice a unor fragmente de ADN au fost descoperite independent de Walter Gilbert (tehnica de degradare chimică) și Fred Sanger (tehnica de sinteză enzimatică), care în 1980 au primit premiul NOBEL. Metoda cea mai folosită în prezent este metoda enzimatică a lui Sanger

#### **Metoda enzimatică (Sanger)**

##### (1). Principiu.

Se sintetizează o catenă de ADN complementară *fragmentului cu secvență necunoscută*, utilizând ADN-polimerază și o *amorsă* radiomarcată (fixată la extremitatea 3' a fragmentului). Reacția poate fi inhibată (stopată) în dreptul unui anumit nucleotid, prin folosirea unor *analogi nucleotidici* de tipul dideoxinucleotidelor (care au pierdut gruparea 3'-OH). ADN *polimeraza* poate adăuga un astfel de nucleotid, dar după ce acesta a fost încorporat, reacția se oprește datorită absenței grupării 3'-OH din dideoxinucleotid, necesară polimerizării. Se realizează astfel fragmente cu o lungime egală distanței dintre amorsă și locul unde s-a încorporat un anumit dideoxinucleotid.

##### (2). Descrierea metodei:

Molecula de ADN ce trebuie secvențializată este *separată* în cele două catene. Fiecare catenă este *clonată* într-un vector monocatenar (fagul M 13), fiind *inserată* (cu capătul 3') într-un anumit situs, după o secvență (primer) cunoscută și marcată radioactiv sau fluorescent, ce are rolul de *amorsă* (figura 3.23). Aceste monocatene de ADN servesc ca *matriță* pentru sinteza unei catene noi, complementare, folosind ADN polimeraza și nucleotidele necesare sintezei. Reacția se desfășoară concomitent în *patru eprubete*, în fiecare se va stabili localizarea unui anumit nucleotid folosind ca analog inhibitor, un anumit dideoxiribonucleotid. De ex. în eprubeta ce va stabili localizarea G se va adăuga ddGTP; atunci când dideoxiribonucleotidul respectiv este încorporat în catena în curs de formare, sinteza se oprește. Când polimeraza întâlnește următorul nucleotid C fenomenul se repetă și rezultă un fragment cu 4 nucleotide și respectiv 9 nucleotide<sup>25</sup> (figura 3.23). Apoi proba este analizată prin electroforeză în gel; se observă o serie de benzi la poziții ce corespund localizării fiecărui nucleotid cu G. Reacții similare pentru nucleotidele cu A, T și C vor furniza serii corespunzătoare de fragmente (fiecare probă într-un anumit "canal" al gelului de poliacrilamidă). Ansamblul celor patru reacții poate fi atunci citit pe o "scară" pozițională direcționată de la fragmentele cele mai mici la cele mai mari; astfel se poate determina *secvența* de nucleotide a fragmentului analizat.

<sup>25</sup> Cantitățile de nucleotide G normale și analog G din această reacție sunt astfel ajustate ca polimeraza să încorporeze analogul G în unele catene noi sintetizate pentru prima oară când se încorporează G, în timp ce în alte catene analogul este încorporat a doua oară când se va încorpora G, în altele a treia oară s.a.m.d

Metoda de sinteză enzimatică descrisă de Sanger este din ce în ce mai mult folosită fiind perfecționată continuu. Folosind ca vectori, pentru secvența de determinat, plasmide de generația III-a se pot secvenția molecule de ADN bicatenar. Marcajul radioactiv a fost înlocuit cu marcajul prin fluorocromi specifici fiecărui nucleotid. Informatizarea a deschis drumul automatizării și sunt deja folosite primele secvențiatore automate. Determinarea secvenței unui acid nucleic nu mai pune probleme și este extrem de rapidă. În aceste condiții a fost posibilă determinarea secvenței cvasi- integrale a genomului uman (alcătuit din circa 3 miliarde pb).

#### 4. METODE DE ANALIZĂ A PROTEINELOR

Analiza structurii genelor normale sau anormale trebuie completată deseori cu *studiul funcției sau expresiei acestor gene* la nivel de proteină. În cazul mutațiilor genice este important de stabilit defectul molecular al proteinelor codificate și modul în care ele produc un fenotip anormal.

##### a). Metoda de transfer Western.

Pentru identificarea specifică a proteinelor a fost imaginat un procedeu asemănător metodelor Southern și Northern, botezat "Western blotting". El permite evaluarea cantitativă și calitativă a unei proteine mutante, extrasă din celulele unor pacienți cu boli genetice.

Proteinele *izolate* dintr-un extract celular sunt *separate*, pe baza lungimii (mărimii) lor, prin electroforeză în gel de poliacrilamidă. Apoi sunt *transferate* pe un filtru de nitroceluloză și incubate cu un *antiser specific* pentru proteina respectivă. Complexul antigen (proteină) - anticorp (antiser) este identificat cu ajutorul unui *anti-anticorp* (anticorp ce recunoaște primul anticorp folosit în reacție) marcat radioactiv sau fluorescent.

Metoda Western permite diferențierea între bolnavii cu forme grave de boală (prin absența totală a proteinei) și forme medii (cantități mici de proteină); de ex. forma gravă Duchenne și medie Becker a distrofiei musculare legată de X (figura 3.24). Deasemeni, se pot evidenția heterozigoții, purtători sănătoși de gena mutantă (Na) care vor avea o cantitate mai redusă (la jumătate) de proteină normală comparativ cu homozigoții sănătoși (NN).

##### b). Determinarea secvenței de aminoacizi a proteinelor

Stabilirea secvenței de aminoacizi a proteinei este utilă atât pentru analiza și sinteza proteinei, cât și pentru izolarea genei corespunzătoare. Astfel, pe baza secvenței de aminoacizi a unei părți de proteină, se poate sintetiza (pe baza relației aminoacid-codon stabilită de codul genetic) un oligonucleotid cu o secvență de nucleotide corespunzătoare celei de aminoacizi. Acest oligonucleotid poate fi utilizat ca sondă pentru a căuta gena corespunzătoare într-o bandă bibliotecă de ADN genomic sau ADN complementar.

Tehnicile de secvențializare a proteinelor, introduse de Sanger în 1950 (primul premiu NOBEL luat de acest mare cercetător, de două ori laureat), constau în clivarea chimică sau enzimatică a proteinei în polipeptide mai mici (15-30 aminoacizi) care vor fi secvențiate de analizoare automate, începând cu capătul amino al fiecărui peptid.

##### c). Producția de proteine prin "inginerie genetică".

Cu ajutorul genelor clonate în E.coli sau levuri (drojdii) se pot produce ușor, ieftin și în cantități "industriale" diferite proteine de origine umană, cu valoare terapeutică.

Multe boli sunt determinate de absența sau pierderea funcției unor proteine. Cel mai adesea, tratamentul nu poate fi decât *substitutiv* și este preferabilă administrarea unor proteine de origine umană deoarece proteinele animale sunt potențial imunogene. Totuși, prin metodele clasice, nu se pot obține întotdeauna proteine umane (de ex. insulina) sau fabricarea unor cantități mari ridică probleme de disponibilitate și de contaminare virală (de ex. fabricarea factorului VIII necesită sute de prelevări sanguine ce cresc riscul contaminării cu virus HBV sau HIV). În aceste condiții, producția de proteine de substituție prin "inginerie genetică" este o soluție ideală. Au fost deja fabricate și utilizate în producția medicală: *insulină* (pentru tratamentul diabetului), *hormon de creștere* (pentru terapia tulburărilor de creștere), *streptokinază* (substanță trombolitică folosită în



infarctul miocardic acut), *factorul VIII* al coagulării (pentru tratamentul hemofiliei), *eritropoietină* (hormonul care stimulează proliferarea celulelor eritroide), *interferoni* (cu acțiune citostatică și antivirală) etc. Concomitent s-a proiectat producția unor *vaccinuri* (prin folosirea fracției virale proteice necesară inducerii reacției imune) sau bio-reactivi (proteine, enzime).

Biotehnologiile utilizate pentru producția de proteine umane ridică totuși diferite probleme. În cazul producției de către bacterii este necesară fabricarea unor *vectori de expresie bacteriană* de mare randament, găsirea unor soluții tehnice care să evite inactivarea proteinei fabricate după inserția vectorului ce conține gena umană sau să permită recuperarea ei facilă din "reactoarele de cultură". Producția bacteriană de proteine umane este valabilă numai pentru proteinele care *nu trebuie activate* prin modificări secundare (glicozilare, carboxilare etc.) după sinteză. În acest caz trebuie să se recurgă la producția proteinei de către *celulele eucariote în cultură*, mult mai complexă și costisitoare. Se preconizează însă soluții mai eficiente: plantele și animalele transgenice.

## 5. TEHNICILE DE MODIFICARE A MATERIALULUI GENETIC.

Expresia genelor normale și mutante precum și fenotipul pe care-l determină se află sub controlul unor mecanisme complexe, care implică intervenția anumitor *secvențe de ADN*, cu rol de reglare, precum și acțiunea unor *molecule efectoare exogene* care se fixează la ADN. Descifrarea acestor mecanisme este importantă nu numai pentru fiziologia normală ci și pentru elucidarea patogeniei bolilor moleculare, optimizarea diagnosticului și, mai ales, a tratamentului lor. Un pas enorm pentru înțelegerea mecanismelor de reglare a expresiei genelor și patogeniei bolilor genetice l-a reprezentat introducerea *tehnicilor de modificare dirijată a materialului genetic*. Aceste tehnici pot crea mutante noi sau pot modula acțiunea unor componente ale sistemelor de reglare.

Practic sunt posibile două tipuri de acțiuni: modificarea unor structuri existente (mutagenză dirijată) sau crearea unor structuri noi (animale transgenice). Strategia globală implică mai multe etape:

- secvența nucleotidică studiată (genă sau parte de genă) va fi mai întâi *modificată* (deleție, inserție, substituție de nucleotide) și apoi *cuplată* cu altă secvență ADN ("*reporter*") care va servi la identificarea ei;
- *ADN recombinant* este introdus fie în culturi de celule (transfecție), fie în ovocite fecundate (animale transgenice);
- După obținerea gazdelor se analizează efectele (expresia) secvenței analizate (creșterea / diminuarea sintezei unor proteine; modificarea proprietăților proteinei produse) într-un context *in vivo*, care integrează efectele tuturor parametrilor naturali; analiza rezultatelor trebuie făcută însă cu mare *prudență* deoarece trebuie să se țină cont de o serie de elemente ce nu sunt încă controlabile: localizarea și stabilirea inserției, posibilitatea de a fi modificată de celule.

### a). Modificarea unei secvențe nucleotidice

Pentru a evalua *rolul unei anumite secvențe nucleotidice* (genă sau parte de genă) se produce mai întâi *suprimarea* (excizia) ei globală, folosind enzime de restricție; capetele moleculei ADN ce rezultă după excizie vor fi *resudate*, cu ajutorul unei ligaze. În felul acesta se pot evalua *consecințele fiziopatologice ale absenței secvenței studiate*. Ulterior, pe un alt sistem experimental, se realizează în secvența studiată succesiv *deleții* din ce în ce mai mici, pentru a identifica și localiza precis *siturile* cele mai strategice. Apoi, în aceste regiuni se induc *mutații* diferite pentru a preciza rolul fiecărui nucleotid din aceste regiuni asupra mecanismelor reglatoare.

### b). Mutagenza inserțională aleatorie.

Această tehnică permite *evidențierea și clonarea unor gene necunoscute*.

O secvență de ADN cunoscută și reperabilă (transposon în cazul *Drosophillei* și retrovirusi la șoarece) este introdusă într-o celulă embrionară (ovocite fecundate, blastocite). Ea se încorporează *la întâmplare/aleatoriu* în genomul celular; dacă inserția se face într-o genă se produc mutația ei, pierderea funcției proteinei codificate și modificarea fenotipului. După selecționarea

mutațiilor se realizează un clonaj genomic folosind ca sondă o secvență identică cu cea introdusă; astfel se poate repera gena în care s-a produs inserția.

#### c). **Mutageneza dirijată prin oligonucleotide de sinteză**

Cu ajutorul unor oligonucleotide de sinteză se pot induce *mutații punctiforme* într-un anumit situs din structura genei. În felul acesta se poate studia efectul precis al unui nucleotid în mecanismul regulator sau rolul unui aminoacid (codificat de un codon mutant) în secvența proteică. Astfel, codonul AUG (pentru metionină) din structura genei alfa-1-antitripsinei a fost modificat în două variante GUG (semnifică valina) și AGG (pentru arginină); gena cu prima variantă produce o enzimă cu mare eficacitate (care se preconizează a fi utilizată în prevenirea bronșitei cronice la fumători) iar gena cu a doua variantă are concomitent o activitate antitrombină III.

#### d). **Micro-injecția de ADN în ovocite fecundate.**

Această metodă de manipulare genetică a unui întreg organism reprezintă cel mai puternic instrument de analiză a mecanismelor de expresie a genelor eucariote, într-un veritabil context in vivo. Principiul metodei este simplu dar realizarea practică este delicată iar randamentul este redus (10-20%). Ea constă fie din microinjecția unei gene în ovocite fecundate (de obicei de șoarece), care apoi sunt injectate în uterul unei femele pregătite pentru gestație, fie introducerea ei în celule stem embrionare, nediferențiate, care sunt ulterior implantate într-un blastocist. În felul acesta se obțin **animale transgenice**. Dacă gena specifică a fost modificată înainte de a se introduce în celulele stem embrionare atunci animalele obținute se numesc "**knockout**".

Analiza șoarecilor născuți relevă, în cazurile reușite, integrarea aleatorie a genei analizate în cromosomi. Copiile integrate sunt prezente în toate celulele și transmise la descendenți. Ele se exprimă de obicei în țesutul specific (atunci când gena prezintă și secvențele de reglare). Experiențele realizate cu gene pentru elastază, globină, transferină, hormon de creștere etc au furnizat date prețioase pentru înțelegerea mecanismelor de expresie. Mai recent introducerea unor gene mutante cunoscute a permis crearea unor veritabile modele experimentale pentru studiul unor boli genetice umane.

## D. LOCALIZAREA GENELOR PE CROMOSOMI (HARTA GENICĂ LA OM)

*Localizarea unei gene pe un anumit cromosom a fost inițial un "exercițiu intelectual", fără consecințe practice, determinat de curiozitatea și dorința de cunoaștere a spiritului uman. Progresele remarcabile ale cartografierii genomului uman în ultimii 20 ani au generat însă *multiple aplicații în teoria și practica medicală*, pentru înțelegerea mecanismelor bolilor genetice, optimizarea diagnosticului bolilor genetice (mai ales prenatal sau presimptomatic), creșterea eficienței sfatului genetic (ce stabilește riscul de apariție sau reapariție a bolii) și eventual pentru tratamentul bolilor genetice, prin terapie genică (prin inserția unei gene normale la indivizii afectați de o boală genetică). În aceste condiții, realizarea unei **hărți complete a genomului uman**, un fel de "*enciclopedie a tuturor genelor noastre și bolilor genetice asociate lor*" este obiectivul central al geneticii medicale.*

Cartografierea genelor pe cromosomii umani se poate realiza în două variante: cartografierea genetică și cartografierea fizică.

- **Cartografierea genetică** reprezintă evaluarea tendinței ca două gene (una dintre ele fiind o genă marker) să segreghe împreună în meioză și să se transmită *înlănțuite* de la părinți, prin gameți, la descendenți. **Harta genetică** este o reprezentare a poziției relative a genelor pe un cromosom, bazată pe *frecvența de recombinare meiotică* între două segmente de ADN. Se realizează astfel "*o hartă de înlănțuire*". În acest caz este vorba mai mult de o descriere a comportării meiotice a genelor decât de o localizare fizică.
- **Cartografierea fizică** constă în *localizarea fizică reală a genelor* într-o anumită regiune a unui cromosom, folosind anumiți markeri. Cu ajutorul unor metode de analiză cromosomică și

moleculară, *poziția* unor gene este descrisă în unități determinate prin măsurători fizice ale distanțelor dintre markeri. Se realizează astfel *hărți cromosomice* pe baza cărora se obțin hărțile ADN (pentru o regiune din cromosom). **Harta fizică** este reprezentarea poziției reale a genelor în ADN al fiecărui cromosom, într-o anumită ordine și la distanțe cunoscute (măsurate în perechi de baze). Obiectivul final al cartografierii fizice este stabilirea integrală a secvențelor nucleotidice liniare din fiecare cromosom.

Înainte de anul 1950 localizarea genică era limitată exclusiv la cromosomul X, deoarece analiza genealogică evidențiază o transmitere ereditară caracteristică, ce permitea localizarea genei repective<sup>26</sup>. Genele autosomale erau mult mai dificil de cartografiat. Prima genă autosomală localizată a fost a grupei sanguine Duffy (Donahue, 1968) care, într-o anumită familie, era transmisă împreună cu alungirea constricției secundare subcentromerice de pe brațul lung al cromosomului 1. După 1970 studiile genealogice, lungi și dificile, au fost înlocuite cu analiza segregării cromosomilor în celulele somatice în cultură. S-a născut astfel **genetica celulelor somatice** ce reprezintă o posibilitate originală de a studia bolile monogenice și cromosomice în culturi celulare (fibroblaste) pe termen lung. Foarte curând s-au realizat *hibridzi celulari interspecifici* și localizarea genică a devenit mai accesibilă. Totuși cartografierea genelor în genomul uman a progresat lent deoarece se foloseau *markeri fenotipici* (de ex., diferite proteine) iar numărul lor era mic. Introducerea *hibridizării moleculare* cu sonde ADN a relansat cartografierea genomului uman întrucât *markerii genotipici* au o foarte mare specificitate (prin multitudinea și polimorfismul lor) și permit identificarea genelor, indiferent dacă ele se exprimă sau nu. Se dezvoltă concomitent tehnicile de clonare moleculară și secvențiere.

În 1990 a fost lansat "**Proiectul Genom uman**" al cărui obiectiv final este ca până în 2005 să descifreze complet harta genică la om sau mai precis secvența celor 3 miliarde de pb ce alcătuiesc genomul uman. Primele realizări, bazate pe clonare pozițională, au fost localizarea genelor pentru distrofia musculară Duchenne (1986), fibroza chistică (1990); realizarea primei hărți genetice (bazată pe microsateliți) în 1996, a schitei primei hărți fizice de înaltă rezoluție (2000) și secvențierea completă a cromosomilor 22 (în anul 1999), 21 (în anul 2000) și 20 (în anul 2001) iar în februarie 2001 a fost publicată **prima schiță (ciornă) a secvenței genomului uman** (vezi capitolul 2.C.2), care va fi finalizată în 2003.

## 1. CARTOGRAFIEREA GENETICĂ

Cartografierea genetică constă în măsurarea distanței dintre locii genetici prin studiul *fenomenelor de înlănțuire și recombinare genică* (prin încrucișare cromosomică sau crossing over) care au loc în meioză.

### 1.1 ANALIZA DE ÎNLĂNȚUIRE

Două gene (loci) pot fi situate pe cromosomi diferiți sau pe aceeași pereche de cromosomi omologi. În primul caz, când cei doi loci [de ex. D și M] sunt situați pe *cromosomi diferiți* (vezi figura 3.2), genele alele Dd și Mm *segregă independent* în meioză formând patru tipuri de gameți: DM, Dm, dM și dm, în proporții egale (25%). În al doilea caz, când locii D și M sunt situați pe *aceiași pereche de omologi*<sup>27</sup> comportarea lor în meioză depinde de *distanța dintre loc*. Deși am discutat această problemă în capitolul 3.A.2, reamintim două noțiuni esențiale.

<sup>26</sup> Prima localizare genică pe un cromosom a fost făcută la om în 1911 când s-a demonstrat că o boală "cecitatea pentru culori" (daltonismul) se transmite ca un caracter legat de X.

<sup>27</sup> Combinația de alele de pe fiecare cromosom se numește **haplotip** (de la "*haploid genotyp*")

- (1) Dacă cei doi loci D și M sunt situați foarte aproape unul de altul (figura 3.3. a), ei au *tendința* de a se transmite *împreună*, formând două tipuri de gameți DM și dm. Acest fenomen a fost numit **înlănțuire genică** (linkage)
- (2) Dacă locii D și M se află la distanță mai mare unul de altul (figura 3.3.b), între ei se poate produce aleatoriu o încrucișare cromosomică sau **crossing over** (CO). La locul de contact, cromatidele se rup și schimbă segmente egale de material genetic; genele alele Dd și Mm pot forma combinații noi, rezultând patru tipuri de gameți: doi *nerecombinați* (DM și dm) și doi *recombinați* (Dm și dM)<sup>28</sup>. Acest fenomen a fost numit **recombinare genică omologă**;

**Distanța genetică** care separă doi loci situați pe același cromosom este *constantă și independentă* de natura alelei și familia studiată. Ea influențează însă *frecvența recombinărilor*: cu cât distanța este mai mare cu atât probabilitatea unui eveniment recombinational crește și invers.

În figura 3.25, mama (I-1) suferă de *neurofibromatoză* (NF1), boală autosomal dominantă (vezi capitolul 11.E.1), și este heterozigotă atât pentru locusul-boală (Dd) cât și pentru doi loci marker 1 și 2 (Aa și Bb); tatăl neafectat este homozigot pentru toți cei trei loci (dd, AA și BB). Pacienta are șase copii din care II-1, II-2 sunt bolnavi; ei au moștenit alela A a markerului 1 (care nu apare la descendenții sănătoși, toți cu alela a) și se poate presupune că alela A este înlănțuită cu alela D (boală).

Se observă că toți cei șase copii sunt nerecombinați pentru NF1 și locusul marker 1 (situați foarte aproape unul de altul). Totuși II-1, II-3 și II-5 sunt *recombinați pentru NF1 și locusul marker 2*, situați la distanță unul de altul. Copilul II-6 a moștenit alela A și deci foarte probabil și alela mutantă D dar boala nu este încă manifestă (diagnostic presimptomatic).

Distanța genetică între doi loci se poate măsura evaluând **frecvența (fracția) de recombinare**; ea este definită prin *proporția descendenților recombinanți în raport cu numărul total de descendenți* și este notată cu litera grecească teta ( $\theta$ ). Unitatea de măsură a distanței genetice dintre doi loci a fost denumită **Morgan (M)** în onoarea lui T.H.Morgan, care a descoperit (1910) fenomenul de crossing over. Un centiMorgan (cM) este o distanță genetică în care se produc recombinări cu o frecvență de 1%. Când locii sunt *complet înlănțuiți* ei sunt situați foarte aproape unul de altul, nu pot fi separați niciodată prin CO, *nu există nici o recombinare* ( $\theta = 0.0$ ) iar distanța genetică este nulă, zero cM. Când doi loci sunt *neînlănțuiți* ei *segregă independent* în meioză (fiind localizați pe cromosomi diferiți sau pe același cromosom dar la distanță unul de altul, în grupe de înlănțuire diferite) frecvența de recombinare este maximă 50 %; atunci teta  $\theta = 0.5$ , iar distanța genetică este  $\geq 50$  cM.

Distanța genetică dintre loci este o evaluare funcțională care nu se suprapune exact cu distanța fizică ce-i separă. Totuși se poate face *conversia* distanței genetice (definită prin frecvența de recombinare) în distanța fizică reală (lungimea ADN exprimată în pb)<sup>29</sup> S-a stabilit astfel că **1 cM este egal cu 10<sup>6</sup> pb** sau 1000 k.b Un cromosom cu 1-3 recombinări per meioză prezintă deci 100-300 cM. Astfel se poate construi o **hartă de înlănțuire** pentru fiecare cromosom.

Echivalența 1 cM = 10<sup>6</sup> p.b. nu este totdeauna valabilă deoarece *frecvența de recombinare nu este constată în lungul unui cromosom, la cromosomi deferiți și la sexe diferite*. Astfel,

- telomerele au recombinări mai frecvente decât alte regiuni cromosomice (de ex. centromerele);
- frecvența CO și numărul recombinărilor este mai mare la femeie decât la bărbat;
- unii cromosomi (de ex. 12 și 13) sunt genetic "mai lungi" la femeie deși lungimea fizică este aceeași ca și la bărbat (figura 3.26).

<sup>28</sup> CO nu produce obligator o recombinare deoarece dacă între doi loci are loc un *crossing over dublu* nu rezultă recombinanți,

<sup>29</sup> Deoarece analiza cromosomilor umani în profaza meiozei I (celule diploide) relevă existența a circa 60 de chiasme (presupuse a fi locul unde se produce CO) se consideră că "lungimea genetică" a genomului uman haploid este de 30 M sau 3000 cM. Întrucât el are 3x10<sup>6</sup> pb rezultă că 1 M reprezintă 10<sup>8</sup> p.b. iar 1 cM un milion pb (10<sup>6</sup>) sau 1000 de Kb<sup>29</sup>. În realizarea conversiei se pleacă de la ipoteza că: (1) recombinările survin cu o probabilitate egală în orice punct din cromosom sau genom; (2) se produc cu o frecvență egală la cele două sexe; (3) nu se interferează între ele.

Centi-Morganul este un etalon "elastic" ce poate varia între  $5 \times 10^5$  și  $1 \times 10^7$  p.b.; acest lucru este important de știut pentru fiabilitatea diagnosticului genotipic indirect prin RFLPs.

Măsurarea frecvenței de recombinare este cunoscută sub numele de **analiză de înlănțuire genetică** (linkage analysis). Ea se poate face numai prin **studii familiale**, comparând genotipurile urmașilor cu cele ale părinților. Analiza de înlănțuire reprezintă o metodă valoroasă de cartografiere a unor gene, deoarece permite stabilirea poziției unor gene (loci) pe același cromosom (fenomen numit **sintenie**), a ordinii și distanței dintre ele. Se va obține astfel o **harta genetică ce cuprinde poziția relativă pe cromosom a unor gene, bazată pe frecvența de recombinare dintre loci** (figura 3.26).

Analiză de înlănțuire genetică se bazează pe *studiul segregării* (distribuției) în familie a unei *gene mutante* (cauzatoare de boală) și a unui **marker genotipic**, un locus care "marchează cromosomul", ce va fi transmis prin gameți la descendent, și pe care se găsește alela-boală (markerul nu are nici o legătură cu cauza reală a bolii genetice). Locii markeri folosiți pentru cartografiere trebuie să fie: *codominanți* (pentru a permite diferențierea dintre homozigoți și heterozigoți); *numeroși și distribuiți* în toate regiunile fiecărui cromosom (pentru a fi cât mai aproape de locusul boală); *foarte polimorfici*, pentru ca părinții să fie heterozigoți pentru un marker.

Pentru analiza de înlănțuire a doi loci – boală și marker - sunt necesare două condiții:

- *familia studiată să fie informativă pentru locii cercetați*, deci părinții trebuie să fie heterozigoți atât pentru locusul-boală (morbid) cât și pentru locusul-marker. Locii cei mai "informativi" sunt cei care au un *polimorfism* ridicat (prezintă numeroase variante alelice) și deci se găsesc în stare heterozigotă la un număr mare de persoane din populație; această condiție este îndeplinită "cu brio" de markerii ADN (RFLPs, minisateliți, microsateți).
- a doua condiție este *cunoașterea fazei de înlănțuire*, deci a modului de dispunere a alelelor celor doi loci pe un cromosom, la fiecare părinte; alele unor loci situate pe același cromosom sunt în faza *cis* sau *de cuplare* iar alele situate pe cromosomi omologi sunt în faza *trans* sau de *repulsie* (figura 3.7).

De aceea pentru studiile de înlănțuire sunt foarte utile *familii mari*, cu trei sau mai multe generații (deci un număr mare de "meioze" pentru a stabili mai precis numărul de recombinanți) și *informative* prin markerii utilizați, care trebuie să permită *stabilirea fazei de înlănțuire* (figura 3.27). Dacă cunoaștem faza de înlănțuire analiza este mai eficientă deoarece este mai ușor să se determine *care descendenți sunt recombinanți* (pentru aceasta cel puțin un părinte trebuie să fie heterozigot). Dacă studiile pe familii mari nu sunt posibile atunci se vor folosi în cercetare *mai multe familii mici*, afectate de aceeași boală, produsă de aceeași genă mutantă (deci fără heterogenitate genetică; vezi capitolul 4.A.), iar datele vor fi *analizate statistic* (vezi scorul LOD).

**Analiza de înlănțuire** este utilă în genetica medicală pentru identificarea și localizarea genelor responsabile de producere bolilor ereditare, mai ales în situațiile în care nu se cunoaște efectul lor biochimic. Această analiză permite *detectarea prezenței unei gene mutante* prin urmărirea transmiterii în familie a unei *gene (locus) marker*. Așa cum am mai spus acesta "markează" cromosomul cu alela-boală care va fi transmis, prin gameți de la părinți la descendenți; deci markerul nu are nici o legătură cu cauza reală a bolii genetice. Prin analiza de înlănțuire se poate face un **diagnostic presimptomatic** deci se poate pune în evidență existența genei mutante în familiile în care gena nu se exprimă fenotipic ca urmare a lipsei de penetranță, a manifestării tardive (vezi figura 3.25, copilul II-6) etc. sau analiza se face prenatal (figura 3.11).

## 1.2 DEZECHILIBRUL DE ÎNLĂNȚUIRE ȘI CARTOGRAFOEREA GENICĂ.

Așa cum am precizat la începutul acestui capitol (vezi A.2.3), **dezechilibrul de înlănțuire** este o asociere preferențială a unei alele a unui locus cu o anumită alelă a unui locus vecin. De ex., la 78% din bolnavii cu hemocromatoză se întâlnește alela A3 a locusului HLA în timp ce frecvența ei la persoanele sănătoase este de numai 27%. Pe baza acestei înlănțuiri genetice s-a localizat gena hemocromatozei (HFE) într-o regiune de câțiva cM pe cromosomul 6p;

ulterior analiza dezechilibrului de înlănțuire a "îngustat" regiunea cercetată la 250 k.b. și a permis apoi identificarea genei HFE, în care o singură mutație (ce interesează codonul 282, numită C282Y) se găsește la 85% din bolnavi. Aceasta s-a produs pe un cromosom ca avea alela HLA A3.

Fenomenul de dezechilibru de înlănțuire se explică prin înlănțuirea strânsă dintre cei doi loci și prin faptul că posesorii lor au un strămoș comun. Deoarece dezechilibrul de înlănțuire este rezultatul distanței dintre loci el a fost folosit pentru stabilirea ordinii genelor în cromosomi. În plus, dezechilibrul de înlănțuire reflectă recombinările care au avut loc în zeci de generații antreioare<sup>30</sup> (zeci de meioze fără CO, fapt ce permite localizarea genei într-o regiune mai mică de 0,1 cM.

### 1.3. DETERMINAREA SEMNIFICAȚIEI REZULTATELOR ANALIZELOR DE ÎNLĂNȚUIRE: SCORUL LOD.

Pentru a evalua rezultatele obținute prin analiza de înlănțuire a unei /unor familii se determină *probabilitatea relativă de obținere a datelor observate*, folosind un procedeu de calcul statistic, elaborat în 1955 de către Morton. El determină **raportul de probabilitate** a frecvenței de recombinare ( $\theta$ ) în două ipoteze opuse:

- *există înlănțuire* iar  $\theta < 0.5$ , având o anumită valoare (de ex., 0.1); probabilitatea acestei ipoteze este simbolizată prin **L( $\theta$ )**;
- *nu există înlănțuire* și  $\theta = 0.5$ ; probabilitatea acestei ipoteze se notează cu **L( $\theta_{0.5}$ )**.

Probabilitatea relativă la o anumită valoare a lui  $\theta$  (de ex., 0.1) este egală:

$$\frac{\text{probabilitatea datelor dacă locii sunt înlănțuiți la valoarea 0.1 a lui teta}}{\text{probabilitatea datelor dacă locii sunt neînlănțuiți}} = \frac{L(\theta)}{L(\theta_{0.5})}$$

Pentru a facilita calculul se folosește *logaritmul zecimal al probabilităților* relative (deci al raportului de probabilitate) sau **scorul LOD**<sup>31</sup> simbolizat prin **Z( $\theta$ )**:

$$Z(\theta) = \log_{10} [L(\theta)/L(\theta_{0.5})]$$

unde  $L(\theta)$  este probabilitatea unei familii de a prezenta înlănțuire la o anumită valoare  $\theta$  (de ex., 0.1) iar  $L(\theta_{0.5})$  este probabilitatea absenței înlănțuirii. Folosirea logaritmilor permite ca datele obținute de la diferite familii să fie combinate prin simplă adăuție.

Pentru analiza de înlănțuire în familiile mici, probabilitățile se calculează pe baza distribuției binomiale a probabilității:

$$Z(\theta) = \log_{10} [\theta^R(1-\theta)^{NR}] / 0.5^{NR+R},$$

unde R este numărul de recombinanți și NR este numărul de nerecombinanți. Probabilitatea unei înlănțuirii [ $L(\theta)$ ] este egală cu  $\theta^R(1-\theta)^{NR}$  iar probabilitatea absenței înlănțuirii [ $L(\theta_{0.5})$ ] este egală cu  $0.5^{NR+R}$ . Dacă de ex., din patru descendenți unul singur este recombinant scorul LOD se calculează, pe baza formulei de mai sus, în felul următor:

$$Z(\theta) = \log_{10} [\theta^R(1-\theta)^{NR}] / 0.5^{NR+R} = \log_{10} [\theta^1(1-\theta)^3] / 0.5^{3+1}$$

Pentru o frecvență de recombinare  $\theta=0.1$ , calculul scorului este:

$$Z(0.10) = \log_{10} [0.10^1(0.90)^3] / 0.5^4 = 0.067$$

Scorurile LOD sunt calculate de obicei pentru *mai multe valori arbitrare ale lui  $\theta$* . Scorul LOD la  $\theta=0.5$  va fi totdeauna egal cu zero; un scor LOD mai mare decât 0 este o dovadă în favoarea înlănțuirii, în timp ce un scor LOD mai mic de 0 (deci negativ) pledează contra înlănțuirii. Cel mai bun scor este dat de valoarea maximă a lui Z. Valoarea lui  $\theta$  la care Z este cel mai mare (Z max) este o estimare bună a fracției de recombinare și se numește *estimarea probabilității maxime* ("maximum likelihood estimate"). Valorile pozitive ale lui Z sugerează ca doi loci sunt înlănțuiți iar cele negative fac puțin probabilă o înlănțuire (la acea valoare a lui  $\theta$ ). Prin convenție, *un scor LOD*

<sup>30</sup> Dezechilibrul de înlănțuire poate fi totuși influențat de o serie de forțe evolutive: selecția naturală, deriva genetică (vezi capitolul 7)

<sup>31</sup> LOD este un acronim de la "logarithm of odds", deci logaritm al raportului de probabilitate.

combinat care este egal sau mai mare de +3 (echivalent cu o probabilitate mai mare de 1000:1 în favoarea înlănțuirii) este considerat că o probă definitivă ca doi loci sunt înlănțuiți (distanța de recombinare este mai mică 50 cM). Rezultatele între 1 și 3 sunt ambigue și pentru o concluzie finală este necesară creșterea numărului de familii analizate. Un scor LOD mai mic de -2 este considerat o probă că nu există înlănțuire (probabilitate mai mare de 1000 :1 contra înlănțuirii.)

Uneori analiza de înlănțuire efectuată în mai multe familii produce un scor LOD total zero; dar în unele familii scorul LOD este pozitiv (indicând înlănțuire) iar în altele este negativ (pledând contra înlănțuirii). În aceste situații se suspectează o **heterogenitate de locus** (vezi capitolul 4.A) deci mutații în loci diferiți produc aceeași boală (de ex., *Osteogenesis imperfecta* poate fi produsă fie de mutații pe cromosomul 7, fie de mutații pe cromosomul 17).

Calculul "scorului LOD" este complex și în prezent se realizează pe microordinate cu ajutorul unor programe informatizate speciale (de ex. LIPED sau LINK-MAP).

#### 1.4. HĂRȚILE DE ÎNLĂNȚUIRE GENETICĂ

*Localizarea unei gene* ce produce o anumită boală începe cu studiul unor familii în care se manifestă boala. Apoi se va analiza la membrii acestor familii distribuția bolii și a unor loci markeri multipli pentru fiecare cromosom, urmărind stabilirea unei înlănțuiri genice dintre gena boală și un anumit marker (un scor LOD pozitiv). Din cauza mărimii genomului uman trebuie testați sute de markeri, bine aleși, pentru a găsi o înlănțuire. Pentru a fi utili în cartografiere locii markeri de înlănțuire trebuie să fie, așa cum am precizat, *codominanți, numeroși și distribuiți* în toate regiunile fiecărui cromosom și *foarte polimorfici*; gradul înalt de polimorfism crește probabilitatea ca familiile să fie informative (cu părinți heterozigoți pentru un marker) și face posibilă stabilirea fără dificultăți a fazei de înlănțuire, precum și identificarea persoanelor recombinante din familie. Izolarea și cartografierea a peste 10.000 de markeri polimorfici ai ADN (majoritatea microsatețiți) a condus la stabilirea unor hărți genetice din ce în ce mai detaliate, cu o densitate sub 1cM (figura 3.29).

## 2. CARTOGRAFIEREA FIZICĂ

Cartografierea fizică se realizează în principiu în două mari etape: *localizarea fizică* globală a unei gene sau secvențe de ADN pe un anumit cromosom și apoi *localizarea regională*, din ce în ce mai precisă pe acel cromosom. Metodele de realizare a cartografierii fizice sunt variate iar nivelul lor de rezoluție în localizarea genică este cuprins între un cromosom întreg și o singură pereche de baze (tabelul 3.3.). Pentru ca o localizare să fie validată ea trebuie confirmată prin cel puțin două metode și de către două echipe diferite.

**Tabel 3.3. Metode folosite pentru cartografierea fizică**

(după Thompson et al., 1991)

Metoda	Obiectiv	Rezoluție de cartografiere (p.b.)
Hibridi celulari om/rozătoare	Localizare cromosomică	50-250 x 10 <sup>6</sup>
Translocații, deleții	Localizare regională	5-20 x 10 <sup>6</sup>
Dozaj genic	Localizare regională	5-20 x 10 <sup>6</sup>
Hibridare în situ	Localizare într-o bandă cromosomică	1-2 x 10 <sup>6</sup>

Hărți de restricție	Localizare genică	$10^5 - 10^6$
Clonare în cromosomi artificiali de levuri(YACs)	Clonare genică (la scară mare)	$10^5 - 10^6$
Clonare în E. Coli (BACs) sau PACs	Clonare genică (la scară mică)	$10^3-5 \times 10^6$
Secvențializare ADN	Secvență nucleotidică	1

### 1.1 HIBRIZI CELULARI SOMATICI INTERSPECIFICI

**Hibridii celulari somatici interspecifici** sunt produși prin fuziunea celulelor provenite de la specii diferite: om - șoarece sau om - hamster, realizată în culturi celulare, într-un mediu selectiv (figura 3.30).

Fuziunea celulelor somatice este facilitată de polietilen glicol sau de virusul Sendai inactivat. Se formează **heterocarioni** dacă fuzionează două celule de la specii diferite sau **homocarioni** dacă se produce fuziunea a două tipuri celulare ale aceleiași specii. În ambele situații nucleii sunt inițial menținuți separați în aceeași citoplasmă. După prima diviziune celulară mitotică cei doi nuclei *fuzionează* formând un nucleu hibrid. Izolarea clonelor celulare hibride este posibilă prin folosirea unui mediu selectiv,<sup>32</sup> care elimină celulele parentale nefuzionate sau homocarionii.

Pentru motive neclare, hibridii obținuți au tendința să piardă preferențial (în cursul primelor diviziuni) majoritatea cromosomilor umani dar să rețină cromosomii rozătoarelor. După câteva generații se formează *clone celulare stabile*, ce păstrează fiecare anumiți cromosomi umani (identificați precis prin marcajul lor individual). Rezultă un set (“*panel*” în engleză) de clone de hibridi care se deosebesc prin numărul și combinația de cromosomi umani reținută. Acest set / “panel” de clone hibride poate fi utilizat pentru cartografierea genică (tabelul 3.4).

Principiul de bază este următorul: o genă sau o secvență genică particulară este prezentă<sup>33</sup> totdeauna într-un hibrid atunci când cromosomul pe care este localizată gena este prezent și este absentă atunci când acest cromosom este absent din hibrid; deci *o genă care este totdeauna asociată cu prezența unui anumit cromosom uman într-un hibrid celular se află localizată pe acest cromosom*.

Practic, se stabilește prezența sau absența unei gene umane într-un *set (panel) de clone de hibridi celulari interspecifici*. Apoi se corelează prezența sau absența genei cu tipul cromosomilor umani din fiecare clonă hibridă. Analiza de concordanță permite localizarea genei pe un anumit cromosom.

Un exemplu convingător este prezentat în tabelul 3.4. Un set de opt clone hibride om/șoarece, fiecare având 2-13 cromosomi umani, a fost folosit pentru a testa prezența sau absența genei pentru hexosaminidaza A (HEXA). Deficiența / absența enzimei lizozomale HEXA produce prin acumularea gangliosidului GM2 în special în neuroni boala Tay-Sachs, caracterizată printr-o deteriorare severă mintală și fizică, letală la 2-3 ani. Există o corelație perfectă între prezența sau absența genei HEXA și prezența sau absența cromosomului 15; aceste rezultate permit localizarea genei HEXA pe cromosomul 15.

**Tabelul 3.4. Localizarea genei umane HEXA folosind hibridi celulari somatici**

HIBRID	GENA HEXA	Cromosomi Umani																								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y	

<sup>32</sup> Se folosește frecvent mediul HAT (ce conține hipoxantină, aminopterină, timidină) + oubaină; HAT distruge celulele de rozătoare nehibridizate iar oubaină distruge celulele umane nehibridizate.

<sup>33</sup> Prezența unei gene poate fi evidențiată cu ajutorul unor markeri fenotipici (proteina/ enzima codificată de genă și identificată prin electroforeză sau cu metode imunologice) sau genotipici (secvențe de ADN identificate prin metoda Southern). Folosirea sondelor ADN și markerilor genotipici permite identificarea unor gene care nu se exprimă de obicei în fibroblaste dar sunt prezente în cromosomii hibridului.





**retinoblastomului** în banda 13q14. Analiza cromosomică a unor bolnavi cu retinoblastom unilateral asociat cu retard mintal și diverse malformații congenitale (asociere destul de rară pentru retinoblastom) a evidențiat deleții ale brațului lung al cromosomului 13. Regiunea care este pierdută prin deleție variază de la un pacient la altul dar interesează totdeauna banda 13q14. În această regiune mică (numită generic "SRO" de la "*Smallest Region of Overlap*") a fost localizată și apoi identificată gena retinoblastomului.

#### 1.4. HIBRIDIZAREA ÎN SITU

**Hibridizarea în situ** (Gall și Pardue, 1969) este o *metodă directă* de localizare a unei gene *deja identificate și clonate*.

O secvență de ADN clonat (*sondă*) se hibridizează pe cromosomii prometafazici etalați pe o lamă microscopică și denaturați în prealabil (pentru ca ADN lor să devină monocatenar). *Sonda marcată* cu un traser radioactiv (tritiu) - numită sondă "caldă" se fixează pe regiunea complementară de ADN, situată într-o anumită regiune a unui cromosom. Hibridul poate fi localizat prin acoperirea preparatului cu o emulsie sensibilă la razele X. Poziția granulelor "radioactive" pe o anumită bandă cromosomică reflectă localizarea genei. Mai recent se folosesc sondele "reci" marcate cu biotină și identificate cu o moleculă fluorescentă (streptavidină) ce se leagă la biotină; metoda este mai sensibilă și mai rapidă decât cea care folosește sonde radioactive. Deoarece folosește un semnal fluorescent această metodă se numește **FISH** (Fluorescence in Situ Hybridization) (vezi capitolul 2.D.3.a).

Nivelul de rezoluție al localizării corespunde unei regiuni de 1-2 milioane p.b. din cromosomul metafazic. Rezoluția crește la 50-500 kb pentru fibrele de cromatină interfazică și la câteva kb pentru fibre de cromatină alungite /întinse artificial ("*fiber-FISH*")

#### 1.5. IZOLAREA UNOR CROMOSOMI INDIVIDUALI PRIN CITOMETRIE DE FLUX

Anumiți cromosomi umani pot fi izolați într-o formă pură, unici sau în grupe, funcție de mărime, prin citometrie de flux *f* (*low cytometry*). Ei vor fi folosiți pentru a realiza hibridi om-hamster (pentru studii de localizare genică) sau utilizați în diferite studii moleculare, pentru determinarea secvenței de nucleotide (au fost create *biblioteci de ADN pentru fiecare cromosom*).

În acest proces, cromosomii umani sunt izolați dintr-o celulă în diviziune și apoi marcați cu un colorant fluorescent ce se fixează pe ADN; fiecare cromosom absoarbe o cantitate de colorant proporțională cu mărimea sa. După marcarea cu fluorocrom, cromosomii sunt trecuți prin dreptul unei raze laser și se măsoară intensitatea fluorescenței. Cromosomii sunt apoi sortați automat, în funcție de acest parametru, și apoi izolați după mărime

#### 1.6 . METODE DE CARTOGRAFIERE DE ÎNALTĂ REZOLUȚIE

Toate metodele prezentate anterior, bazate pe analiza citogenetică, permit localizarea unor gene sau secvențe de ADN pe un cromosom, regiune cromosomică sau, cel mult, o bandă cromosomică ( $1-5 \times 10^6$  pb) (vezi tabel 3.3). Pentru *localizarea fină* a genelor au devenit accesibile - grație tehnicilor de ADN recombinant - o serie de metode de înaltă rezoluție. Ele acoperă "veritabila prăpastie" ce există între dimensiunile unei benzi cromosomice (1000-5000 Kb) și cele ale taliei maxime a unui segment de ADN clonat (de circa 50 Kb) în care se includ genele de talie mijlocie (figura 3.30).

Evident, pentru un segment de ADN cromosomic de 1000 Kb există în băncile genomice mai multe secvențe clonate de 20 - 50 Kb. Problema esențială este de a *ordona aceste secvențe*, de a le reuni fizic pentru a obține un segment continuu de mai multe sute de Kb. Pentru aceste "acțiuni" s-au pus la punct noi tehnici de cartografiere de înaltă rezoluție care au menirea să "acopere" intervalul metodologic între analiza (cito) genetică și analiza moleculară și să realizeze o cartografiere moleculară pe distanțe mari.

Fără a intra în detalii “procedura generală” este următoarea:

- (1) se secționează ADN dintr-o regiune cromosomică cu anumite enzime de restricție pentru a obține fragmente de o anumită dimensiune;
- (2) aceste fragmente se clonează în vectori adecvați pentru mărimea lor (YACs pentru fragmente de 100-1000 Kb; BACs pentru 150-350 Kb; cosmide pentru 40 Kb; plasmide pentru 1-5 Kb) realizându-se biblioteci sau bănci de fragmente ce alcătuiesc împreună un anumit segment cromosomic (denumite după vectorul de clonare: biblioteci de YACs, BACs, cosmide, plasmide);
- (3) fragmentele dintr-o colecție se analizează pentru a identifica repere (de ex., STSs<sup>34</sup>, SSRs<sup>35</sup>) și apoi se compară unul cu altul pentru a găsi secvențe suprapuse pe diferite fragmente;
- (4) fragmentele (definite prin anumite repere) și care au suprapuneri, deci sunt vecine (numite și “contigs”), se ordonează și se orientează pentru a forma o secvență continuă de ADN ce permite realizarea unei hărți fizice. Această procedură se repetă pentru a obține și ordona fragmente din ce în ce mai mici.

Operațiunea începe cu fragmentarea unui segment de ADN în piese de circa 1000 Kb, care se încorporează în YACs și se clonează; clonele YACs se analizează pentru a stabili poziția și ordinea STSs și altor repere caracteristice; pe această bază se realizează ordonarea fragmentelor ce au secvențe terminale identice (suprapuse) într-o secvență continuă (“scaffold”), realizând harta fizică a cromosomului /regiunii cromosomice respective. În felul acesta s-a realizat (Hudson et al, 1995) **harta fizică de joasă rezoluție pentru** fiecare cromosom. Pentru realizarea **hărții fizice de înaltă rezoluție**, fragmentele de ADN clonate în YACs și ordonate sunt tăiate fiecare cu alte enzime de restricție în fragmente mai mici de 100-350 Kb și clonate în BACs; cu aceste clone BACs se repetă operațiile (3) și (4); apoi se repetă fragmentarea (40 Kb), clonarea (în cosmide) și ordonarea secvențelor iar în final se face o nouă fragmentare (1-5 Kb), clonare (în plasmide) și ordonarea secvențelor

În final, fragmentele foarte mici (1-5 Kb) clonate în plasmide și apoi ordonate într-o secvență continuă sunt *secvențiate individual* iar pe baza ordinii lor se stabilește *secvența de nucleotide a cromosomului*. Toate operațiunile au putut fi realizate în ultimii cinci ani, în cadrul Programului Genom Uman, datorită perfecționării continue a tehnicilor, folosirii masive a automatizării și informaticii, dar mai ales datorită unui efort internațional remarcabil prin colaborarea oamenilor de știință și sprijinului politic și financiar acordat acestui proiect gigant dar esențial pentru omenire.

O problemă esențială o reprezintă *identificarea genelor* în secvența de ADN a unui cromosom. Ne vom referi concret la această problemă în subcapitolul următor dar aici vom menționa numai tehnicile folosite, care sunt detaliate în literatura de specialitate (de exemplu, Strachan și Read, 1999):

- **Zoo blotting (cross-species hybridization)** – o clonă de ADN uman este hibridizată, în tehnica Southern blot, cu o varietate de secvențe de ADN ale unor gene cu efecte deja cunoscute la animale;
- **Identificarea insulelor CpG** – multe gene au în regiunea promotor insule de CpG hipometilate, o structură caracteristică genei, ce pot fi identificate cu enzime de restricție și/sau PCR;
- **Exon trapping** – o secvență suspiciată a fi o parte din genă se introduce într-un plasmid și acesta este supus transcripției într-o celulă gazdă; are loc procesarea ARNm cu eliminarea secvențelor care nu sunt exoni;
- **Selecția ADNc** – o secvență de ADN genomic va fi supusă hibridizării cu o populație dată de ADNc (obținută pe baza ARNm din celulă, deci crespunzătoare secvențelor codante din ADN genomic);
- **Analiza computerizată a unei secvențe de ADN** – folosește computerul pentru compararea unei secvențe de ADN genomic și o bază de date ce cuprinde ESTs (de la *Expressed Sequence*

<sup>34</sup> STSs de la “*sequence-tagged sites*”, fragmente scurte (200-500 pb) de ADN care au o secvență unică cunoscută și pot fi amplificate prin PCR.

<sup>35</sup> SSRs de la “*simple sequence repeat*”, secvențe mici de 2-4 nucleotide repetate în tandem de sute de mii de ori

*Tags*) secvențe de câteva sute de pb de la ambele capete ale unei clone de ADNc (ce este complementar ARNm din exoni, secvențele codante ale genei);

- **Screeningul mutațiilor în secvența omologată ca fiind o genă**, efectuat la bolnavi;
- **Testarea expresiei genei prin Northern blot.**

### 3. APLICAȚIILE CARTOGRAFIERII GENOMULUI UMAN

Aplicarea strategiilor de cartografiere a genomului uman a reprezentat un progres remarcabil pentru cunoașterea organizării și funcționării aparatului genetic și un veritabil succes în practica medicală. *Harta genică reprezintă de fapt anatomia genomului uman*. Așa cum anatomia este necesară pentru înțelegerea funcției corpului uman, cunoașterea hărții genice este indispensabilă pentru înțelegerea funcției genomului uman și prin extensie, a noii fiziologii moleculare umane. Localizarea unor gene mutante cu efect patologic sau "gene morbide" - în anumite regiuni cromosomice a demarat realizarea "*anatomiei patologice a genomului uman*". Pe această bază se dezvoltă cu mult succes următoarele acțiuni:

- elucidarea unor mecanisme patogenice în anumite boli monogenice sau multifactoriale;
- clonarea genelor pe baza localizării lor pe cromosomi ("clonare pozițională");
- dezvoltarea unor noi metologii de sfat genetic și diagnostic genotipic cu ajutorul markerilor ADN;
- dezvoltarea strategiilor optime de terapie genică.

Importanța teoretică și practică a cartografierii genetice justifică eforturile actuale, ample și costisitoare, pe care comunitatea științifică internațională le face pentru "PROIECTUL GENOM UMAN". Fără a intra în detalii vom prezenta cu exemplificări, câteva din aplicațiile menționate, altele vor fi discutate în alte capitole.

#### 3.1. LOCALIZAREA GENELOR MORBIDE

Dacă o genă suferă o mutație cu efect patologic ("genă-morbidă") se realizează un sistem alcătuit cel puțin din două alele: una normală și alta morbidă (sau mai multe dacă se produc mutații diferite)<sup>36</sup>. Rezultă astfel un marker genetic fenotipic (gena este identificată prin efectele sale patologice).

Cartografierea genelor sau locilor morbizi se realizează prin analiza înlănțuirii lor cu markeri genotipici polimorfi în familiile în care se manifestă boala. Această analiză trebuie să țină evident cont de modul de transmitere (autosomal dominant sau recesiv, legat de X) și de penetranță (vezi capitolul 4.A).

Cartografierea prin analiza înlănțuirii genetice necesită un *număr suficient de familii informative*, lucru deseori dificil deoarece multe boli genetice sunt individual rare și bolnavii pot deceda la o vârstă tânără, ne mai fiind disponibili pentru analiză. Identificarea unor *familii mari*, cu mai multe persoane afectate, în trei patru generații, este benefică în primul rând prin "materialul" disponibil pentru analiză și în al doilea rând pentru că toți bolnavii din familie au "aceeași boala genetică", produsă de o anumită mutația a unui singur locus (prin această metodă a familiilor mari – celulare - s-a reușit localizarea genei pentru boala Huntington). În cazul în care această abordare familială nu este posibilă se vor "*colecta*" mai multe *familii mici* – nucleare - (lucru mai ușor pentru bolile mai frecvente de tipul mucoviscidozei) și se va practica metoda scorului LOD aditiv. Există însă riscul ca nu toate familiile să aibă o boală genetică identică deci să fim confrunțați cu fenomenul de heterogenitate genetică (mutații diferite, alelice sau nonalelice, produc același fenotip morbid). Pentru a obține un LOD score > 3, care atestă înlănțuirea, este necesar ca markerul polimorfic să fie la o distanță < 20 cM de locusul genei morbide cercetate. De aceea, pentru a găsi un rezultat pozitiv de înlănțuire cu un locus autosomal se cercetează succesiv în medie 100 de markeri polimorfici pe o colecție mai mare de familii afectate. Pentru bolile legate de X situația este mult mai ușoară, datorită densității genelor deja localizate și modului particular de transmitere.

<sup>36</sup> Dacă avem certitudinea că boala este produsă de o singură genă mutantă ea se asimilează cu locusul ce trebuie cartografiat.

După ce se confirmă înlănțuirea cu locusul morbid, se vor testa și alți markeri știuți că se plasează aproape de cel găsit înlățuit, pentru a ne apropia cât mai mult de gena morbidă. În situația în care unul sau mai mulți markeri sunt găsiți la circa 5 cM de gena bolii ei pot fi folosiți în scop diagnostic și pentru izolarea genei morbide (clonare pozițională).

În continuare vom prezenta două exemple de cartografiere genică devenite "modele" de lucru pentru toate acțiunile de localizare a genelor umane.

#### **a. Localizarea genei pentru boala Huntington**

Boala Huntington este o boală autosomală dominantă (1 la 20.000 indivizi) ce debutează după 37-40 de ani prin modificări de personalitate, pierderea treptată a memoriei și o serie de tulburări motorii, inclusiv *coree* (mișcări involuntare ale membrelor) și în final deces (vezi capitolul 11.D). Ele sunt produse de alterarea neuronilor din ganglionii bazali și din cortex. Boala Huntington a fost prima boală genetică cartografiată printr-un screening sistematic al înlănțuirii unor markeri genotipici polimorfici ("genome scan"). Analiza de înlănțuire s-a efectuat (Gusela et al., 1983) pe o familie foarte mare din Venezuela. După testarea a 12 markeri polimorfici a fost identificat (cu o sondă numită G8) un polimorfism al enzimei de restricție *Hind III* care produce pentru locusul D4S10, patru alele diferite asociate cu gena HD (de la *Huntington disease*), la un LOD score de 8.53 (la  $\theta=0.0$ ). Studiile ulterioare au stabilit că locusul detectat de markerul G8 este situat la 3-5 cM de gena Huntington și au permis localizarea celor doi loci (G8 și HD) pe cromosomul 4p16, foarte aproape de telomerul 4p într-o regiune de circa 1000 Kb. Atât G8 cât și alți markeri ADN pentru banda 4p16 pot fi folosiți pentru **depistarea presimptomatică** a bolii Huntington în familiile cu risc. Clonarea ulterioară a genei HD a permis identificarea mutațiilor cauzatoare de boală, stabilind că este vorba de *o expansiune* (amplificare >36 de copii) a unor repetiții trinucleotidice, CAG, (vezi capitolul 11.D) care modifică o proteină (*huntingtina*) cu funcție încă necunoscută. Acum expansiunea CAG din gena HD poate fi identificată direct prin PCR. Există o corelație strânsă între lungimea expansiunii CAG și vârsta de debut a simptomelor dar testarea genetică presimptomatică ridică numeroase probleme etice (vezi capitolul 20).

#### **b. Localizarea genelor pentru retinita pigmentară**

Acest exemplu este caracteristic pentru cartografierea bolilor ce manifestă heterogenitate genetică și utilizarea metodei "**genelor candidat**".

Retinita pigmentară (RP) (vezi caseta....) reprezintă un grup de retinopatii relativ frecvent (1:4000 nn) în care se produce degenerarea retinei și mai ales a fotoreceptorilor. Clinic se caracterizează prin reducerea progresivă a vederii periferice și nocturne și producerea orbirii. RP este un exemplu tipic de *heterogenitate genetică* (vezi capitolul 4.A.) deoarece manifestări fenotipice relativ identice sunt produse de gene distincte: 25% din cazurile familiale se transmit autosomal dominant, 45% autosomal recesiv și 30% legat de X.

Studiile de înlănțuire genetică cu markeri de pe cromosomul X au identificat două gene care dau RP legate de X: una (20-40% din cazuri) este localizată în regiunea Xp11 iar cealaltă (60-80%) în regiunea Xq21.

RP autosomal dominantă prezintă și ea două forme deosebite ca debut și mod de afectare a fotoreceptorilor. Datorită posibilității existenței unor loci autosomali multipli s-au studiat numai familiile mari<sup>37</sup>. Într-una din acestea s-a evidențiat o înlănțuire strânsă cu un locus marker situat pe brațul lung al cromosomului 3. Identificarea genei responsabile folosește o strategie diferită de cea utilizată în boala Huntington și mucoviscidoză: este vorba de cercetarea **genelor candidat**: se selectează *gene deja clonate* care sunt localizate în aceeași regiune cromosomică cu locusul marker din regiunea cromosomică respectivă sau gene despre care se știe că au rol în fiziologia organului afectat. Apoi se analizează pe rând genele candidat la un grup de pacienți căutând o eventuală mutație. Localizarea RP cu transmitere autosomal dominantă pe cromosomul 3q a dus imediat la

<sup>37</sup> Utilizarea unor studii combinate de înlănțuire realizate pe mai multe familii mici (ca și în cazul mucoviscidozei) este inoperantă din cauza heterogenității genetice.

ipoteza că gena pentru *rodopsină* ce fusese deja localizată pe 3q, ar putea fi responsabilă de apariția RP. Ipoteza s-a confirmat deoarece la 15% din pacienții neînrușiți s-a identificat o mutație punctiformă. În restul cazurilor este vorba fie de alte mutații neidentificate ale acestei gene, fie mai probabil mutații ale unor gene cu altă localizare.

### CASETA 3.6

OMIM 180100; 600132; 312600

#### Retinita pigmentară

**Definiție:** grup de afecțiuni ereditare în care anomaliile fotoreceptorilor (conuri și bastonașe) sau ale epiteliului pigmentar retinian duc la pierderea progresivă a vederii.

**Incidență:** 1/3.500-1/4.000 în Europa și SUA, fără specificitate etnică.

**Manifestări clinice.** Inițial adaptare defectuoasă la întuneric (cecitate nocturnă). Ulterior limitare progresivă a câmpului vizual periferic (vedere în tunel), cu păstrarea acuității vizuale centrale. Fund de ochi: arteriole îngustate, pigmentări intraretiniene (inițial fine, ulterior grosiere), pierderea pigmentului din epiteliul pigmentar. Uneori: cataractă subcapsulară (posterior), particule fine în vitros, puncte albe în retină, corpi hialini ai capului nervului optic.

Au fost identificate următoarele categorii de retinită pigmentară:

- *nonsindromică* (fără alte localizări); poate fi familială (multiplex), afectând mai mulți membri ai familiei, sau izolată (simplex), afectând un singur individ.
- *sindromică* (afectează și alte sisteme, cum ar fi auzul):
- *sistemică* (afectează multiple țesuturi).

**Patogenie:** încă neelucidată complet. Mutațiile afectează diferite proteine: rodopsina, proteine ale fototransducției în bastonașe (subunitatea  $\alpha$  a canalului proteic cationic cGMP și subunitățile  $\alpha$  și  $\beta$  a fosfodiesterazei cGMP), proteine pentru menținerea structurii discurilor segmentului extern al fotoreceptorilor, periferină și proteina 1 membranară a segmentului extern al bastonașelor.

**Genetică:** RP se transmite AD (15-25%), AR (5-20%), RX (5-15%), digenic sau mitocondrial; 40-50% din cazuri apar izolat.

RP se caracterizează prin *heterogenitate genetică* (mai multe gene diferite pot determina aceeași boală), *heterogenitate alelică* (mutații diferite în aceeași genă pot determina aceeași boală sau boli diferite) și *heterogenitate clinică* (indivizi diferiți cu aceeași mutație pot avea simptome diferite). S-au identificat mai mult de 20 de loci ce pot produce RP

**Diagnostic:** Diagnosticul de RP se stabilește pe următoarele elemente: Disfuncție a conurilor: adaptare dificilă la întuneric (prag final crescut al conurilor) sau electroretinogramă (răspunsul conurilor cu amplitudine redusă și timp implicit prelungit sau nedetectabil); Pierdere progresivă a funcției fotoreceptorilor; Pierderea vederii periferice; Afectare bilaterală. Sunt indicate: anamneză familială pe cel puțin 3 generații și examinare clinică și oftalmologică (pentru formele sindromice).

**Diagnostic diferențial:** sindromul Usher, atrofia girată a coroidei și retinei, coroidemia, distrofia conuri- bastonașe (RP centrală/ inversă), amauroza congenitală Leber, RP unilaterală.

**Diagnostic prenatal:** deocamdată indisponibil.

**Screening neonatal:** deocamdată indisponibil.

**Sfat genetic:** se identifică tipul de transmitere și se calculează riscul de recurență.

**Prognostic:** în forma nonsindromică prognosticul este bun; în formele sindromice sau sistemice prognosticul poate fi umbrat de afectarea altor organe.

**Tratament:** degenerarea retiniană se tratează cu vitamina A; cataracta se tratează chirurgical; ochelari speciali.

### 3.2 CLONAREA GENELOR MORBIDE PE BAZA CARTOGRAFIERII GENETICE: "CLONAREA POZIȚIONALĂ" SAU "GENETICA INVERSĂ"

Pentru izolarea și clonarea unei gene ce produce o boală există două posibilități (figura 3.31). Prima pleacă de la identificarea prealabilă a defectului funcțional și caracterizarea funcției (deci a produsului) genei – proteina anormală; pe baza secvenței de aminoacizi se construiesc oligosonde cu care se cercetează localizarea genei; această metodă "a geneticii clasice" numită **clonare funcțională** (deoarece pleacă *de la funcție la genă*) a permis identificarea mai multor gene, ce produc diferite boli: hemoglobinopatii, hemofilia, etc. A doua posibilitate se bazează pe analiza cartografiei genetice. Cu ajutorul unor markeri genetici (ADN) polimorfici se izolează și clonează secvența de ADN genomic implicată într-o boală ereditară sau într-o anumită funcție sau fenotip în general. Apoi se stabilește secvența nucleotidică codantă pe baza căreia se deduce proteina codificată. Această metodă, care pornește *de la genă și ajunge la funcție* și la proteină se numește "*genetică inversă*" sau "**clonare pozițională**". Ea a fost aplicată cu succes la bolile genetice "cu genă necunoscută" (de ex. miopia Duchenne, mucoviscidoza). Are avantajul că oferă posibilitatea unui *diagnostic genotipic precoce*, chiar și atunci când nu au fost complet rezolvate toate etapele.

Strategia *geneticii inverse* se realizează în mai multe etape (figurile 3.32):

- (1) Identificarea unei înălțări genetice între locusul morbid și un marker genotipic, prin analiza segregării lor în familiile afectate (valori  $\theta < 0.5$  și LOD score  $> 3$ ). Dacă nu există "un fir conducător", un element orientativ (de ex. o translocare / microdelecție asociată cu gena cercetată), se explorează metodic ("*genom scan*") fiecare cromosom cu ajutorul markerilor genotipici spațiați la intervale regulate. Această etapă este destul de lungă și dificilă.
- (2) Localizarea cromosomică regională și *restrângerea* locusului posibil al genei într-un teritoriu delimitat se face apropiindu-ne cât mai mult de genă, la 1-2 cM. Este utilă găsirea a doi markeri genotipici polimorfi care să încadreze gena, într-un număr mare de familii afectate.
- (3) Identificarea genei în domeniul delimitat de markeri face apel la numeroase indicii și metode; Cu ajutorul vectorilor YACs (500-1000 Kb) și BACs (50-200 Kb) se realizează clonarea unui număr mare de segmente de ADN din regiunea candidat. Uneori este rapid identificată o "*genă candidat*" din regiune, pe baza funcției și localizării ei în regiunea unde a fost localizată gena boală. Indicatorul ferm al "găsirii" genei este prezența unui exon transcris în ARN mesager matur provenind din țesuturile afectate de boală precum și a mutațiilor specifice acestei gene la bolnavi.
- (4) După descoperirea și clonarea genei se reconstituie (pe baza secvenței codante) secvența de aminoacizi a proteinei și apoi se fabrică un peptid sintetic; cu ajutorul acestui peptid sintetic se fabrică *anticorpi* care să permită identificarea proteinei echivalente în organism. După izolare, proteina este analizată structural și funcțional încercând obținerea pe această cale a unor informații fiziopatologice despre boală. Cu ajutorul anticorpilor se încearcă elaborarea unor teste de diagnostic fenotipic, mai simple și mai puțin laborioase decât diagnosticul genotipic.
- (5) Se cercetează concomitent gena izolată pentru a-i descifra "anatomia", mecanismele (secvențele de reglare) precum și pentru a determina leziunile prezente în genele mutante ale bolnavilor, corelația lor cu tabloul clinic etc.

Vom prezenta spre exemplificare două succese remarcabile ale "geneticii inverse": izolarea și clonarea genelor distrofiei musculare Duchenne și mucoviscidozei (sau fibrozei chistice). Ele au fost laborioase dar metoda folosită este utilă pentru a identifica genele implicate în numeroase alte boli genetice umane.

#### **a. Distrofia musculară Duchenne**

Distrofia musculară (miopia) Duchenne (DMD) este o boală recesivă legată de X, (vezi capitolul 11.D.2) care afectează băieții, la vârsta de 3-4 ani. Ea se caracterizează prin apariția precoce a unei slăbiciuni musculare; deficitul motor crește progresiv și băieții afectați sunt de obicei invalizi la 10 ani și decedeză prin insuficiență respiratorie către 20 de ani. O formă mai puțin

severă de miopatie, cu debut mai tardiv și durată de viață mai lungă este distrofia musculară Becker (DMB), considerată o formă alelică a DMD.

Clonarea pozițională a genei DMD s-a făcut prin două abordări diferite. Prima (Ray et al, 1985), a studiat cazurile rare de femei bolnave, cu tranlocția X/autosom. Autosomul implicat diferă în fiecare caz dar situsul translocației pe X este totdeauna același: Xp21. Într-unul din cazuri, cu t(X;21), segmentul de X este translocat pe brațul scurt 21, în regiunea unde sunt localizate genele ribosomale. Prin clonarea ADN din X atașat la genele ribosomale s-a obținut o secvență din X care face parte din gena DMD. A doua abordare (Kunkel et al, 1985) s-a bazat pe deleția ADN ce corespunde regiunii Xp21.2. Într-un caz particular, un băiat care prezenta DMD și alte trei caractere legate de X (boală granulomatoasă cronică, retinită pigmentară și un grup sanguin rar). Printr-o tehnică ingenioasă cercetătorii au obținut clone genomice care existau pe cromosomul X normal dar erau absente în ADN-ul acestui bolnav. Una din aceste clone (pERT87) conține segmentul de ADN ce lipsește în cazul deleției Xp21. Folosind această clonă ca sondă și hibridizând-o cu ADN de la alți bolnavi cu DMD (fără deleție cromosomică vizibilă) s-a observat că pERT87 era absentă, total sau parțial, la mulți bolnavi. Deci cel puțin un segment al genei DMD se găsește în pERT87; unele deleții care implicau regiunea pERT87 se extindeau dincolo de "marginile" ei, indicând că gena DMD este foarte mare.

Apoi cercetătorii folosind sondele sintetice de ADN (corepunzătoare unei părți din gena DMD) au depistat (prin Northern blot) în celulele musculare un ARNm de 14 Kb El a fost folosit pentru obținerea și clonarea ADNc care corespunde genei DMD, o genă gigantă de 2300 Kb (1,5% din cromosomul X), cu 79 de exoni.

Plecând de la ADNc pentru DMD s-a dedus, pe baza codului genetic, secvența de aminoacizi a proteinei codificate, numită **distrofină**; ea este absentă la bolnavii cu DMD. La persoanele sănătoase s-a stabilit că distrofina se localizează în membrana celulelor musculare și este implicată în contracția mușchilor striati și cordului.

În majoritatea cazurilor de DMD se produc deleții totale sau parțiale ale genei. În distrofia musculară Becker leziunile ADN sunt localizate tot în gena DMD (de pe X p21) dar sunt mai reduse, astfel că celulele musculare conțin mici cantități de distrofină sau o proteină asemănătoare cu talie anormală.

### **b. Mucoviscidoza**

Mucoviscidoza sau fibroza chistică este una din cele mai frecvente boli autosomal recesive în populațiile cauziene (1-2500 nn) (vezi capitolul 11.D.2). Boala se caracterizează clinic prin secreții reduse și vâscoase ale pancreasului exocrin (de unde denumirea inițială a bolii *cystic fibrosis of the pancreas*), care produc insuficiență pancreatică și malnutriție cronică; uneori se produce un ileus meconial (cu obstrucție intestinală) la nou născut. Glandele sudoripare sunt de asemenea afectate, producându-se un nivel crescut al clorului în sudoare ("testul transpirației"). Bărbații pot avea absența sau obstrucția canalelor deferente, fiind sterili. Problema cea mai gravă o reprezintă obstrucția cronică a bronșioloanelor prin mucus vâscos și infecțiile pulmonare recidivante, care în 90% de cazuri produc decesul bolnavului (la circa 30 de ani).

Datorită frecvenței și gravității sale mucoviscidoza a constituit un obiectiv important al strategiilor de clonare pozițională. După câțiva ani de cercetări, a fost stabilită în 1985 o înlănțuire a genei CF (prescurtare de la "*cystis fibrosis*") cu markeri situați pe cromosomul 7 (Tsui et al, 1985). Foarte repede au fost testați și alți markeri ADN ai cromosomului 7 și gena CF a fost localizată în regiunea 7q31-32, între markerii *met* (o oncogenă) și *D7S8* (o secvență anonimă). Distanța dintre acești markeri era de circa 1.6 milioane Kb (circa 2cM), o regiune suficient de mare pentru a conține circa 50 de gene. Prin analiza unui număr mare de familii cu CF s-a redus treptat aria de localizare a genei. Cu ajutorul unor markeri situați foarte aproape de locusul CF s-a evidențiat o asociere preferențială (un dezechilibru de înlănțuire) a genei CF cu doi markeri învecinați (XV-2c și KM-19) la 90% din familiile neînrudite care aveau un bolnav de CF. Într-o regiune de 500 Kb în apropierea acestor markeri au fost identificate, în 1989, patru gene; una din aceste gene avea o



secvență conservată în evoluție (prezentă deci și la alte specii), care a devenit gena-candidat pentru CF. Transcriptul (ARNm) al acestei gene a fost găsit în toate țesuturile afectate de CF (pancreas, plămâni, ficat, gande sudoripare). Acest ARNm matur (cu o lungime de 6129 pb corespunde unei gene (clonată prin tehnica ADNc) de circa 250 Kb, cu 27 exoni. El codifică o proteină de 1480 aminoacizi, fixată în membrana celulară și consumatoare de ATP, care funcționează ca o pompă moleculară, formând un canal pentru ionii clor; ea a fost numită proteina CFTR (de la "CF transmembrane conductance regulator")

Valoarea acestei gene-candidat necesita identificarea mutațiilor prezente numai la bolnavii cu CF. Prin secvențierea ADNc extras de la diferite persoane s-a identificat o deleție de 3 pb care duce la dispariția unui aminoacid (fenilalanina) în poziția 508. Această mutație (numită  $\Delta$  F508) se întâlnește la peste 70% din bolnavii cu CF.

Clonarea genei CF are multiple consecințe practice: diagnosticul prenatal în familiile cu risc; depistarea heterozigoților pentru CF (5% din populație); elucidarea unor mecanisme patogene ale bolii; optimizarea posibilităților terapeutice și abordarea terapiei genice.

Strategia clonării poziționale (a geneticii inverse), verificată perfect în cazul CF, DMD, NF1 etc a adus o enormă deschidere pentru abordarea altor boli produse de gene necunoscute.

### 3.3 . ANATOMIA PATOLOGICĂ (MORBIDĂ) A GENOMULUI UMAN

Strategiile de cartografiere fizică și genetică prezentate și exemplificate în acest capitol au permis identificarea și localizarea în genomul uman a peste 10.000 loci definiți printr-o genă identificată, un marker genetic sau o sondă anonimă. Dintre acestea 2372 sunt gene exprimate (din care 1502 sunt loci morbizi); restul sunt segmente anonime. În tabelul 3.5 prezentăm cele mai cunoscute boli monogenice localizate până în prezent, la care s-a identificat și proteina mutantă; pentru multe din ele este deja posibil un diagnostic prenatal sau presimptomatic. În figura 3.36 se poate observa harta genică a cromosomilor 7 și X cu localizările regionale ale genelor implicate în boli genetice.

**Tabel 3.5 Exemple de boli monogenice localizate pe cromosomi prin analiza de înlănțuire**

BOALA	MOD DE TRANSMITERE	LOCALIZARE
Ataxia FRIEDREICH	AR	9q13-21.1
Ataxia spinocerebeloasă 1	AR	6p
Ataxia telangiectazia	AR	11q22-23
Boala Alzheimer 1	AR	21q21-22.1
Boala HUNTINGTON	AD	4q16.3
Distrofia miotonică	AD	19q
Distrofia musculară DUCHENNE	LX	Xp21
Fibroza chistică (MV)	AR	7q31-32
Hipercolesterolemia cu xantomatoză	AD	6p21.3
Neoplazia endocrină multiplă (1)	AD	11q
Neoplazia endocrină multiplă (2A)	AD	10cen
Neoplazia endocrină multiplă (2B)	AD	1q
Neurofibromatoza tip 1	AD	17q11.2

Neurofibromatoza tip 2	AD	22q
Polichistoza renală tip adult	AD	16p13
Polipoza familială de colon	AD	5q21-22
Retinita pigmentară	LX	Xp11, Xp21
Retinita pigmentară (unele familii)	AD	3q21-24
Retinoblastomul	AD	13q14
Sindromul ALPORT	LX	Xq22
Sindromul MARFAN	AD	15q
Sindromul X fragil	LX	Xq27

### 3.4. DIAGNOSTICUL GENELOR MUTANTE PRIN ANALIZA ÎNLĂNȚUIRII GENETICE

Ideea folosirii înlănțuirii genetice dintre o genă mutantă și o genă-marker polimorfică pentru diagnosticul unor boli genetice datează de câteva decenii. Cu toată importanța practică a acestui concept, demonstrată efectiv în câteva cazuri (înlănțuirea distrofie miotonică - secretor sau deficiență în 21-hidroxilază și locusul HLA B), valoarea diagnostică a înlănțuirilor genetice a fost larg acceptată abia după 1980 când folosirea markerilor polimorfici ADN s-a dovedit accesibilă și valoroasă mai ales în situația în care gena morbidă a fost localizată dar nu a fost clonată și deci nu se cunosc informații despre natura moleculară sau biochimică a bolii. Acest lucru este util în special în cazul mutațiilor fără expresie fenotipică (debut tardiv al bolii, lipsă de penetranță) deci într-un *stadiu presimptomatic* (exemplul tipic îl reprezintă boala Huntington), precum și în *diagnosticul prenatal*.

Fără a intra în detalii (vezi capitolul 9.B.2) vom preciza că folosirea markerilor strâns înlănțuiți cu o genă mutantă este o metodă de *diagnostic genotipic indirect* care reclamă o serie de condiții: să existe o înlănțuire strânsă între mutație și marker astfel că o recombinare prin CO să fie improbabilă; familia să fie informativă deci să fie disponibili pentru analiză atât bolnavul cât și ascendenții săi iar toți să fie heterozigoți pentru ambii loci: boală și marker; să se cunoască faza de înlănțuire a genelor-boală și marker sau să poată fi presupusă cu mare probabilitate. Vom preciza de asemenea că există pericolul unui diagnostic eronat dacă: (1) se produce un CO meiotic între cei doi loci care nu sunt strâns înlănțuiți (de ex. în cazul unui marker ce prezintă 5% recombinări cu locusul morbid riscul de eroare al diagnosticului este 5%; în acest caz acuratețea diagnosticului poate fi sporită dacă se folosesc doi markeri genetici ce flanchează gena mutantă); (2) nu se alege corect markerul în bolile cu heterogenitate genetică.

Diagnosticul bazat pe înlănțuire genetică implică studiul extensiv al mai multor membri ai familiei fapt ce crește dificultatea și costul analizelor dar mai ales ridică probleme particulare de etică medicală (consimțământul, confidențialitatea, accesul limitat la informații a membrilor familiei, implicațiile deciziei și rezultatelor, informații neașteptate de tipul nonpaternității etc).

## 4. PROIECTUL GENOM UMAN

Rezultatele obținute prin cartografierea genetică și fizică a unor gene morbide au generat un consens al comunității științifice asupra necesității descifrării întregului genom uman, decisivă pentru înțelegerea geneticii umane, cu un beneficiu potențial considerabil pentru sănătatea umană. "Proiectul genom uman" a fost lansat în 1990 și reprezintă un model de cooperare interdisciplinară și internațională pentru a cartografia și secvenția tot ADN uman până în 2005. Coordonarea

activităților pe care le fac diferite grupuri de cercetători din peste 20 de țări este asigurată de *The Human Genome Organization (HUGO)*

Proiectul are trei obiective majore: (1) o hartă a markerilor genetici; (2) o hartă fizică; (3) secvențierea completă a genomului uman (3 giga baze). S-au făcut progrese importante în realizarea acestor obiective în primul rând datorită dezvoltării unor tehnologii performante, bazate pe automatizare și computere.

**Harta genetică.** Așa cum am precizat anterior, prin analiza de înlănțuire și clonare pozițională se pot identifica genele implicate în producerea multor boli umane, chiar fără să cunoaștem de la început funcția acestor gene. Metodele dezvoltate necesită însă existența unei hărți genetice precise și deaceia a fost firesc ca elaborarea unei astfel de hărți, cu markeri informativi spațiați la 2-5 cM, să reprezinte prioritatea Proiectului. Tehnologia de producție a markerilor genetici s-a perfecționat și în 1994 mai mult de 5000 de astfel de markeri (în special minisateliți) au fost plasați pe prima schiță de hartă genetică (de „joasă rezoluție”). Harta a fost apoi completată și include în prezent peste 20.000 de markeri polimorfici, distribuiți în întreg genomul, la intervale mai mici de 1 cM. Cu această gamă largă de markeri strâns înlănțuiți poate fi găsită orice genă. Recent a început identificarea și cartografierea a circa 100.000 de SNPs (de la *single nucleotide polymorphism*), variante ale unui singur nucleotid ușor de procesat prin noile tehnologii automate (DNA chips).

**Harta fizică.** A doua etapă a proiectului constă în realizarea unei *hărți de restricție* prin determinarea situsurilor de restricție din jurul markerilor genetici, care să permită *obținerea unor fragmente de ordinul  $10^6$  pb* (deci 1cM), prin secționare cu enzime de restricție care taie "rar" genomul uman (producând fragmente mari) ce vor fi separate prin electroforeză în câmp pulsatil. Fragmentele vor fi clonate în cromosomi artificiali (YACs, BACs, PACs, cosmide) și apoi ordonate cu ajutorul STSs, indicatori fizici valoroși (un fel de "amprente genetice") pentru a pune clonele în ordinea în care se găsesc în genom, cu ajutorul computerelor. S-a realizat (1998) o hartă de distribuție a peste 44.000 de STSs, distribuite la intervale de circa 100 Kb.

**Secvențierea completă a genomului uman.** Ultima etapă și cea mai laborioasă este determinarea *secvenței* nucleotidice reale a setului de clone suprapuse, ordonat după poziția naturală în genom. Ea va putea fi realizată numai cu ajutorul mașinilor automate de secvențiat. Dar aceasta nu înseamnă că genele structurale sunt ușor de identificat printre numeroasele secvențe necodante ce alcătuiesc 95% din ADN uman. Au fost elaborate alte tehnologii sofisticate pentru realizarea acestei sarcini de o mare dificultate. Așa cum am mai spus în februarie 2001 a fost publicată schița secvenței genomului uman.

Consecințele cartografierii genomului uman pentru biologia și genetica umană vor fi probabil enorme deoarece vor permite elucidarea structurii și funcției genomului uman în stare normală și patologică. Cercetările nu se vor încheia în 2005 deoarece înțelegerea complicatelor mecanisme ale reglării expresiei genice, interacțiunile dintre gene (genomics) sau dintre proteinele (proteomics) ce alcătuiesc organismul uman - vor reprezenta noi obiective, considerabile prin dificultăți și, evident, prin implicații. La aceasta se va adăuga dezvoltarea terapiei genice și identificarea genelor ce contribuie, alături de mediu, la producerea bolilor comune ca hipertensiunea arterială, boala coronariană, diabetul zaharat, psihoze, etc. Această acțiune a fost deja demarată și va duce cu certitudine la cunoașterea mai exactă a mecanismelor de producere a bolilor, creșterea eficienței tratamentului și mai ales a profilaxiei lor (pe baza identificării riscului individual), printr-o veritabilă medicină predictivă.

#### INTERNET

1. Dicționar de biologie celulară: <http://www.mlab.gla.ac.uk/~julian/Dict.html>
2. Genetică medicală - University of Utah School of Medicine: <http://medgen.genetics.utah.edu>
3. Principii de genetică - Indiana University Biotechnology: <http://biotech.chem.indiana.edu>
4. National Human Genome Research Institut: <http://www.nhgri.nih.gov>.

5. National Center for Biotechnology Information: : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
6. Whitehead Genome Institute at the Massachusetts Institute of Technology: <http://www-genome.wi.mit.edu>
7. Sanger Center in Cambridge, England: <http://www.sanger.ac.uk/>
8. Genethon, French Genetic Mapping Program: <http://www.genethon.fr>

### Bibliografie specifică selectivă

1. Ardlie K.G., Kruglyak L., Sielstad M. *Patterns of linkage disequilibrium in the human genome*. Nat Rev Genet. 2002;3:299-309.
2. Collins FS. *Sequencing the human genome*. Hosp.Practice. 1997; 32:35-54
3. Hurst G.D., Werren J.H. *The role of selfish genetic elements in eukaryotic evolution*. Nat Rev Genet. 2001;2:597-606.
4. Huxley C. *Mammalian artificial chromosomes and chromosome transgenics* . TIG, 1997;13:345-348
5. Jorde LB. *Linkage disequilibrium as a gene mapping tool*. Am.J.Hum.Genet. 1995;56:11-14
6. Kazazian H.H., Moran J.V. *The impact of L1 retrotransposons on the human genome*. Nature gen. 1998;19:19-23
7. Majevski J., Ott J. *Distribution and characterization of regulatory elements in the human genome*. Genome Res. 2002;12:1827-36.
8. Petes T.D. *Meiotic recombination hot spots and cold spots*. Nat Rev Genet. 2001; 2:360-9
9. Pingoud A., Jeltsch A. *Structure and function of type II restriction endonucleases*. Nucleic Acids Res. 2001;29:3705-27.
10. Pollack J.R., Iyer V.R. *Characterizing the physical genome*. Nat Genet. 2002;32 Suppl:515-21.
11. Rosenthal N. - *Fine structure of a gene - DNA sequencing* - N. Engl.J.Med 1995, 332, 589-591
12. Schwartz RS - *Jumping genes* - N. Engl.J.Med 1995, 332, 941-944
13. The International Human Sequencing Consortium. *The human genome: Sequencing and initial analysis*. Nature 2001; 409:860-921
14. WHO: *Genomics and World Health. Report of the Advisory Committee on Health Research*. WHO. Geneva. 2002

## CAPITOLUL 4

# EXPRESIA INFORMAȚIEI EREDITARE (FUNCȚIA GENEI)

Mendel (1865) a fost primul care a intuit existența unor “*factori ereditari*” (numiți mai târziu gene) ce determină formarea caracterelor fenotipice ereditare. Aforismul “*o genă → un caracter*” a dominat genetica clasică până când s-a stabilit că genele sunt alcătuite din ADN iar substratul molecular al oricărui caracter este o proteină structurală sau o enzimă. Conceptul clasic “*o genă → un caracter*” a devenit “*o genă (ADN) → o proteină*”, postulând că informația ereditară conținută în ADN se exprimă prin sinteza unor proteine specifice, care stau la baza caracterelor. Acest proces, care reprezintă în fond **funcția genei**, este *precis coordonat și reglat* în raport cu programul dezvoltării ontogenetice a organismului sau de către necesitățile sale în anumite condiții metabolice, impuse de mediu.

## A. CONCEȚIA CLASICĂ DESPRE FUNCȚIA GENEI

### 1. GENA UNITATE DE FUNCȚIE ȘI MUTAȚIE.

Relația “*o genă → un caracter*” este axioma fundamentală a geneticii clasice. Această “dogmă” poate fi demonstrată prin studiul mutațiilor: *modificarea genei va produce o modificare ereditară a caracterului determinat de genă*. Exemplele sunt numeroase și cunoscute. Să reamintim că pe cromosomul X există o genă care determină prezența pigmentului melanic în iris și retină; mutația ei are drept consecință absența melaninei și *albinismul ocular*.

Oricât ar părea de paradoxal la prima vedere, mutația “developează” existența unei gene normale și dă informații privind modul ei de acțiune și de transmitere. Geneticianul depinde de apariția mutațiilor pentru “a învăța” cum se produce și se transmite un caracter normal. De aceea, deseori denumirea unei gene normale s-a făcut printr-o abreviere de 2-3 litere a efectului genei mutante (denumit în limba engleză) iar numele locusului, după prima mutație detectată<sup>1</sup>. De ex:

- CF de la “*cystic fibrosis*” (sau mucoviscidoză);
- FH de la “*familial hypercholesterolemia*”;
- PKU de la “*phenylketonuria*”;
- NF1 de la “*neurofibromatosis*” tip I;
- DMD de la “*Duchenne muscular dystrophy*”;
- PKD de la “*polycystic kidney disease*”, ș.a

Gena normală evidențiată prin mutație (denumită uneori “genă de tip sălbatic”, pentru a sublinia forma “standard” sub care se găsește de obicei în natură), se notează cu semnul + după denumirea efectului fenotipic al mutației; în funcție de modul de transmitere genele dominante se scriu cu majuscule, iar cele recesive cu litere mici. În prezent, acțiunile de “descifrare” a genomului uman au impus utilizarea unei terminologii și nomenclaturi unice (internaționale) a

<sup>1</sup> De ex., la *Drosophila*, locusul pentru gena normală (de tip sălbatic) ce dă obișnuit culoarea roșie a ochilor a fost numit “*white*” (prescurtat *w+*) deoarece prima mutantă descrisă producea ochi de culoare albă.

genelor (care se regăsește în "GENATLAS", accesibil "în linie" la adresa <http://www.infobiogen.fr>).

Se poate concluziona că în toate studiile de genetică clasică se pleca de la caracter la genă iar *gena era considerată unitatea de funcție și de mutație*. Relația "o genă → un caracter", care reflectă în esență relația "genotip → fenotip", (vezi capitolul 1.B.3), este însă mult mai complexă, deoarece:

- alături de caracterele "monofactoriale" sau monogenice, produse de o singură pereche de gene alele, există numeroase *caractere poligenice sau "multifactoriale"*, determinate prin acțiunea mai multor gene nealele și influențate de factori de mediu; de obicei caracterele monogenice sunt caractere calitative, iar cele poligenice / multifactoriale sunt cantitative;
- în unele cazuri o genă poate avea *efecte multiple* și poate determina mai multe caractere; acest fenomen se numește pleiotropie; în alte cazuri două sau mai multe gene participă la realizarea unui caracter;
- există numeroase *interacțiuni alelice, nonalelice și cu mediul* - care influențează efectul genei, momentul sau tipul celular în care se exprimă o genă;
- mutații ale unor gene diferite se pot manifesta fenotipic identic sau asemănător; acest fenomen se numește *heterogenitate genetică*.

## 2. POLIGENIA

Anumite caractere fenotipice complexe, normale sau anormale) sunt produse prin acțiunea mai multor gene nealele (situat în loci diferiți) care *au efecte cantitative, mici și aditive* (cumulative). Acest fenomen se numește **poligenie**. În acest caz "abaterea" de la regula "o genă → un caracter" este aparentă, deoarece fiecare genă determină "o parte" din caracter. Numărul de gene care participă la realizarea caracterului este necunoscut; el variază la persoane diferite și de aceea *distribuția caracterului respectiv în populație va corespunde unei curbe normale, de tip Gaussian (distribuție continuă)*. În figura 4.1 sunt prezentate două caractere normale - talia și tensiunea arterială sistolică – care prezintă, într-o populație neselecționată, o distribuție continuă.

Trebuie să subliniem două caracteristici esențiale ale poligeniei:

- genele care produc caracterul *acționează independent* unele de altele; între ele nu există relații de dominanță-recesivitate sau epistazie;
- expresia fenotipică a genelor poate fi frecvent *influențată de factori de mediu*; de aceea caracterele produse prin acțiunea combinată a mai multor factori genetici și factori negenetici se numesc curent **caractere multifactoriale**. Acest termen este mai larg și nu trebuie echivalat cu cel de poligenie; acesta are un sens mai restrictiv și nu implică o componentă de mediu.

Caracterele multifactoriale normale (talia, tensiunea arterială, culoarea pielii, inteligența ș.a.) sau anormale (numeroase boli comune, malformații congenitale izolate / unice, unele forme de cancer etc.) sunt frecvente și ele vor fi discutate pe larg într-un capitol distinct. Vom sublinia totuși aici că în aceste caractere multifactoriale componenta genetică este deseori reprezentată totuși de un număr mic de gene, ce prezintă mai multe variante alelice în populație (unele dintre ele având efecte calitative, majore); în acest caz se vorbește de **oligogenie**.

## 3. PLEIOTROPIA

Prin **pleiotropie** (sau polifenie) definește fenomenul în care o singură genă (dominantă) sau o pereche de gene (recesive) produc efecte fenotipice diverse în mai multe sisteme de organe și funcții. În genetica clinică se întâlnesc numeroase cazuri de pleiotropie, ce reprezintă diferite

sindroame<sup>2</sup>. Un frumos exemplu îl reprezintă **sindromul Marfan** (vezi și **casetă 4.1**). Acesta se caracterizează prin trei categorii de semne:

- modificări scheletice: membre lungi, degete lungi și fine (arahnodactilie), hiperlaxitate articulară (ce produce frecvent luxații), deformații ale coloanei vertebrale (cifoză, scolioză) sau ale sternului (pectus carinatus sau excavatum) etc;
- modificări oculare: subluxație/ectopie de cristalin, miopie sau hipermetropie forte, megalocornee etc.;
- modificări cardiovasculare: aneurisme (dilații) ale aortei, prolaps de valvă mitrală etc.

#### CASETA 4.1

OMIM 154700

### **Sindromul Marfan**

**Definiție:** Afecțiune a țesutului conjunctiv transmisă autosomal dominant, cu expresivitate variabilă, și manifestată sub formă de anomalii oculare, articulare și cardio-vasculare.

**Incidență:** 1/10.000, fără predilecție geografică sau etnică.

**Manifestări clinice:** Boala se manifestă cu anomalii în trei sisteme major: scheletic, ocular, cardio-vascular; mai rar se întâlnesc afectări cutanate, pulmonare și durale. Anomaliile scheletice includ: talie înaltă disproporționată (pe seama membrelor), arahnodactilie, deformări ale sternului, scolioză, laxitate și hipermobilitate articulară. Anomaliile oculare sunt reprezentate de miopie, subluxație de cristalin, cornee plată, hipoplazie iriană. Malformațiile cardio-vasculare includ: prolaps de valvă mitrală, insuficiență aortică, dilatația și ruptura aortei ascendente.

Multe semne ale sindromului Marfan se dezvoltă cu vârsta

**Patogenie:** în sindromul Marfan se produce – prin mutația genei *FBN1* - o alterare a structurii țesutului conjunctiv, care explică manifestările sale clinice. Gena *FBN1* codifică fibrilina 1, o glicoproteină extracelulară ce formează microfibrile în structura țesutului conjunctiv. Mutațiile *FBN1* sunt foarte variate și produc boala printr-un fenomen de dominanță negativă (la heterozigoții *An*, fibrilina modificată produsă de gena *A*, inhibă formarea de microfibrile deși gena *n* codifică o fibrilină normală). Circa 20 % din cazuri sunt produse de mutații noi. Interesant de subliniat că unele mutații produc sindroame înrudite cu sindromul Marfan: arahnodactilia familială, fenotipul MASS (de la mitral, aorta, skeletal, skin), ectopia de cristalin AD.

**Genetică:** gena *FBN1* este localizată pe 15q15 și se transmite autosomal dominant. Bolnavii au risc de 50% de a avea un copil afectat cu sindrom Marfan.

**Diagnostic:** Pentru afirmarea diagnosticului de Sindrom Marfan este necesară îndeplinirea următoarelor condiții:

- **Cazul index:** criterii majore în cel puțin două sisteme diferite și implicarea unui al treilea;
- **Membri ai familiei:** prezența unui criteriu major și anamneza familială pozitivă

**Diagnostic prenatal, screening neonatal:** posibil în cazurile cu risc, prin analiza mutației sau studii de înlănțuire. Nu se folosește pe scară largă.

**Prognostic:** rezervat datorită afectării cardio-vasculare.

**Tratament:** medical (beta blocante, pentru a încetini progresia dilatației aortice; profilaxie cu antibiotice, pentru profilaxia unei endocardite) și chirurgical pentru complicațiile cardio-vasculare și osteo-articulare.

Toate modificările fenotipice din sindromul Marfan sunt rezultatul unei singure mutații genice, ce se transmite autosomal dominant. Aparent, în acest caz există o abatere de la regula "o genă → un caracter" dar explicația efectelor multiple produse de o singură genă este (astăzi) simplă: mutația genică determină un defect în structura primară a fibrilinei, componentă majoră a țesutului conjunctiv. Manifestările multiple, produse prin alterarea țesutului conjunctiv în diferite

<sup>2</sup> Prin sindrom se înțelege un ansamblu de semne / simptome care definesc o anumită entitate clinică sau un anumit mecanism patogenic.

teritorii, au o legătură patogenică (un mecanism comun). În acest caz *pleiotropia este relațională*. Într-un alt sindrom pleiotrop, **sindromul Treacher-Collins**, perturbarea dezvoltării fetale a celui de al doilea arc branhial va produce modificări regionale corelate în structurile ce se dezvoltă din acest arc: ureche, maxilar superior și mandibulă; pleiotropia este evident relațională<sup>3</sup>.

Pentru numeroase afecțiuni pleiotrope conexiunea dintre diferite manifestări nu este nici evidentă și nici bine înțeleasă. În aceste cazuri se vorbește de o *pleiotropie nerelațională*. De ex., în **sindromul Bardet-Biedl** nu există (încă) o legătură patogenică evidentă între diferitele sale semne: polidactilie, obezitate, surditate, hipogonadism, retinită pigmentară și retard mintal. Această "secvență" naturală de modificări (care apar succesiv, la vârste diferite) este produsă însă de o singură cauză: o mutație recesivă a unei perechi de gene alele (homozigotă). Progresul posibilităților actuale de explorare și analiză va elucida probabil mecanismul comun al manifestărilor multiple în pleiotropia nerelațională. Recent, în unele sindroame considerate pleiotrope s-au evidențiat microdeleții cromosomice (vezi capitolul 10.C.3); de ex. **sindromul WAGR** (*Wilms tumor-aniridia-genital defects-retardation syndrom* produs de o microdeleție în regiunea 11p13). Pierderea mai multor gene diferite dar vecine, situate în aceeași regiune cromosomică, ar explica diversitatea și lipsa de corelație a manifestărilor clinice. Aceste cazuri numite și "*sindroame ale genelor contigue*" (sau învecinate) ies însă din "sfera" pleiotropiei, care se referă, prin definiție, la efectele multiple ale unei singure gene.

Trebuie să subliniem faptul că în practica medicală sindroamele pleiotrope ridică probleme dificile de diagnostic pentru că semnele (care în ansamblu lor pun diagnosticul de sindrom) nu sunt prezente totdeauna în totalitatea lor (fie că unele nu se manifestă decât la anumite vârste, fie că pur și simplu nu apar, datorită unei expresivități variabile).

## 4. INTERACȚIUNILE GENEI

Expresia fenotipică a unei gene poate depinde de: interacțiunile cu gena alelă (situată în același locus pe cromosomul omolog), influența altor gene și/sau acțiunea mediului.

### 4.1. INTERACȚIUNILE ALELICE

Genele alele, situate în loci omologi, pot fi identice (la *homoziгоți*) sau diferite (la *heterozigoți*). În stare heterozigotă ( $A/a$ )<sup>4</sup> manifestarea genelor alele depinde de relațiile "de forță" care se stabilesc între ele. Uneori se manifestă fenotipic numai una din genele alele și atunci gena și caracterul corespunzător ( $A$ ) sunt numite **dominante**. Gena ( $a$ ) care nu se exprimă în această situație se numește **recesivă**; ea se manifestă numai în stare homozigotă ( $a/a$ ) sau la hemizigoți ( $X^aY$ ). Alteori, la heterozigoți se manifestă fenotipic ambele gene alele; în această situație genele sunt **codominante**. De ex., între alelele  $A1$ ,  $A2$ ,  $B$  și  $0$  ale locusului grup sanguin AB0 se stabilesc următoarele relații de dominanță și recesivitate: genele  $A1$ ,  $A2$  și  $B$  sunt dominante față de gena  $0$ . De aceea, genotipurile  $A1/o$ ,  $A2/o$  și  $B/o$  vor corespunde grupelor  $A1$ ,  $A2$  și respectiv  $B$ ; fenotipul  $0$  va fi determinat de genele recesive  $o/o$ ; gena  $A1$  este dominantă față de  $A2$  și genotipul  $A1/A2$  va determina fenotipul  $A1$ ; genele  $A1$ ,  $A2$  și  $B$  sunt codominante între ele, producând fenotipul  $A1B$  sau  $A2B$ .

Este important de precizat că noțiunile de dominanță și recesivitate sunt valabile pentru caracter, se referă deci la fenotip: genele sunt clasificate ca *dominante sau recesive pe baza expresiei lor fenotipice*. Totuși, așa cum vom vedea mai departe (Capitolul 4.B.1), la nivel

<sup>3</sup> Vom vedea mai târziu că există și alte explicații patogenice ale sindroamelor cu pleiotropie; de ex. interferența unor căi metabolice interconectate, ramificate.

<sup>4</sup> La scrierea concisă a unui genotip (de ex.  $A/a$ ,  $AB/ab$ ) linia ce separă simbolurile genelor ne arată că acestea sunt dispuse, separate, pe cromosomi omologi distincți.



molecular sau biochimic nu se poate face nici o distincție între genele "dominante" sau "recesive", deoarece de cele mai multe ori *ambele tipuri de gene se manifestă*, codifică o proteină.

În sfârșit, vom menționa că dominanța poate fi *completă*, atunci când fenotipul heterozigotului  $A/a$  este identic cu cel al homozigotului  $A/A$  (de ex., în sindromul Marfan) sau *incompletă* (parțială)<sup>5</sup>, când fenotipul heterozigotului  $A/a$  este intermediar între cel al homozigoților  $A/A$  și  $a/a$ ; deaceia în unele boli cu transmitere dominantă (de ex., hipercolesterolemia familială (vezi capitolul 11.E.1) homozigoții  $A/A$  sunt mult mai grav afectați decât heterozigoții  $A/a$ .

#### 4.2. INTERACȚIUNILE NEALELICE

Expresia fenotipică a unei gene nu depinde întotdeauna numai de gena însăși, fiind deseori influențată de acțiunea altei/altor gene (nealele), deci de "fondul genetic" al organismului, la care se poate adăuga și efectul unor factori de mediu. Aceste acțiuni determină gradul de *penetranță și expresivitate* a unei gene sau sunt implicate în fenomenul de *epistazie*.

a. **Penetranța** definește probabilitatea unei gene mutante de a se manifesta fenotipic (indiferent de intensitate). Este o noțiune cantitativă (de tipul "tot sau nimic") valabilă în special pentru genele dominante<sup>6</sup>, în stare heterozigotă. Multe gene au o *penetranță completă*, puternică, și se manifestă ori de câte ori există în genotip. Există însă gene mutante care au o *penetranță incompletă*, redusă. În aceste cazuri, unele persoane (de ex. III.3 din figura 4.2) posedă gena anormală, ce produce **camptodactilia**, care nu se poate manifesta fenotipic ("nonpenetranță") dar se transmite la urmași, unde se exprimă mai mult sau mai puțin complet; se realizează astfel "un salt" peste o generație.

Cauzele penetranței incomplete, reduse, nu sunt clare dar se discută *efectul antagonic* al unor gene ("*supresoare*" sau "*epistatice*") și/sau al unor factori de mediu. Asupra fenomenului de penetranță vom reveni mai pe larg ulterior (vezi capitolul 5.D.5); vom preciza însă că penetranța este un termen *clinic* ce poate fi influențat de vârstă și sex, precum și de capacitatea de explorare a fenotipului pacientului.

b. **Expresivitatea** reprezintă gradul (intensitatea sau severitatea) de manifestare clinică (fenotipică) a unei gene mutante și penetrante la bolnavii din aceeași familie (figura 4.2) sau din familii diferite. Expresivitatea, spre deosebire de penetranță, este o noțiune *calitativă*.

Deseori genele dominante cu efecte multiple (pleiotrope) se manifestă diferit la persoane cu același genotip ( $A/n$ ). În aceste cazuri expresivitatea variabilă poate interesa: spectrul semnelor (anomaliilor) manifeste, severitatea, vârsta de debut a bolii sau a unor elemente componente. La bolnavii diferiți din aceeași familie se pot întâlni forme complete de boală, forme parțiale sau fruste (oligo- / monosimptomatice). De ex., la bolnavii cu **sindrom Marfan** pot să nu apară toate anomaliile celor trei sisteme afectate (schelet, ochi, aparat cardiovascular) sau severitatea clinică poate să fie diferită. De menționat că expresivitatea variabilă este frecventă în bolile dominante autosomale pleiotrope, dar se poate întâlni la toate bolile ereditare, indiferent de modul de transmitere.

Cauzele expresivității variabile nu sunt de obicei cunoscute (vezi și 5.D.5). Se invocă *factori de mediu* ce influențează intensitatea de manifestare a bolii, interacțiunea genei boală cu alte gene, numite **modificatoare** și în final mutații diferite (ca localizare și efecte) în aceeași genă ("*heterogenitate alelică*"). O dovadă indirectă a existenței genelor modificatoare o reprezintă expresia mai frecventă sau exclusivă a unor caractere (determinate de gene autosomale) la un anumit sex. De ex: calviția frontală, guta și keratoza palmoplantară - mai

<sup>5</sup> Dominanța incompletă se mai numește semidominanță.

<sup>6</sup> Se consideră că fenomenul de penetranță poate interesa și gene recesive; în această situație pacientul homozigot (aa) care ar trebui să manifeste boala este sănătos și greu de deosebit de heterozigotul (Na) normal.

frecvente la bărbați și aplazia șmalțului dentar sau căderea precoce a dinților - mai frecvente la femei.

Așa cum am precizat, penetranța și expresivitatea unor gene mutante sunt *termeni clinici*. Cunoașterea lor are o deosebită importanță practică deoarece poate influența calitatea diagnosticului și, funcție de aceasta, corectitudinea sfatului genetic: neidentificarea prezenței unei gene mutante (nonpenetrantă sau manifestare oligo / monosimptomatică) la o persoană purtătoare va duce la o evaluare greșită a riscului de recurență la urmași.

Un alt fenomen de interacțiune genică se referă la situațiile în care două sau mai multe gene interacționează în realizarea normală a unui caracter; dacă una din gene suferă o mutație ea suprimă efectul celeilalte / celorlalte gene. Fenomenul în care o genă interferează / suprimă expresia fenotipică a unei alte gene nealele se numește **epistazie**. De exemplu, dezvoltarea și funcția normală a aparatului auditiv este dependentă de implicarea a două perechi de gene: una ( $D/D$ ) controlează formarea normală a cohleei, iar cealaltă ( $E/E$ ) - dezvoltarea nervului auditiv. Mutația uneia din aceste gene ( $d/d$  sau  $e/e$ ) produce surditate chiar dacă cealaltă pereche de gene este normală; o cohlee normală ( $D/D$ ) nu poate funcționa dacă nu se dezvoltă nervul acustic ( $e/e$ ) și invers nedeveloparea cohleei ( $d/d$ ) determină surditate (de percepție) chiar dacă nervul este integru ( $E/E$ ). Un alt exemplu de epistazie îl reprezintă **statusul secretor**, definit prin capacitatea unor indivizi ("secretori") de a elimina / secreta antigenele de grup sanguin ABO în secreții (salivă, lacrimi, lichid spermatic etc.). Această proprietate este determinată de o genă dominantă  $Se/-$ ; în stare recesivă ( $se/se$ ) nu se produc aceste antigene și indivizii sunt "nesecretori", chiar dacă există genele ABO.

Epistazia poate fi realizată fie de prezența unei gene supresoare (epistatice) în stare recesivă ( $aa$ ), fie de prezența unei gene dominante ( $An$ ) și de aceea există o epistazie recesivă, în primul caz, sau o epistazie dominantă, în al doilea caz. Indiferent de tip se pune firesc întrebarea: cum poate o genă să afecteze expresia altor gene? În exemplul surdității rezultă evident că dezvoltarea anormală a caracterului (aparat auditiv, în acest caz) depinde de dezvoltarea /realizarea ordonată a unor părți anatomice componente (cohlee; nerv acustic), fiecare controlată de o genă distinctă. În alte cazuri de interacțiune genică este vorba de o cale metabolică simplă sau ramificată, în care fiecare etapă este controlată de o enzimă distinctă, codificată de o anumită genă; mutația unei gene și absența unei enzime blochează calea metabolică și împiedică apariția produsului final, chiar dacă celelalte gene și enzime sunt normale. În cazul caracterului secretor gena  $Se/-$  și genele ABO acționează în diferite etape ale formării antigenelor de grup sanguin într-o formă hidrosolubilă (vezi 4.B.5).

#### 4.3. INTERACȚIUNILE GENELOR CU MEDIUL

Nu trebuie să uităm că activitățile tuturor genelor au loc în mediul celular, care la rândul lui este influențat de factorii ai mediului extern. De aceea, gradul de penetranță și expresivitate a multor gene depinde, într-o oarecare măsură, de factorii de mediu (fizici sau chimici). La *Drosophila*, variațiile de temperatură pot reduce penetranța unor gene de la 100% la zero sau pot influența intensitatea lor de expresivitate. La om, expresivitatea variabilă a polidactiliei este foarte probabil condiționată de mediu: faptul că o persoană poate avea un deget suplimentar complet la o mână și nici unul sau numai un rudiment la cealaltă mână sau la picior pledează pentru acțiunea unui factor de mediu uterin care a interferat expresivitatea genei.

Să ne reamintim că efectele nocive ale fenilcetonuriei (PKU) se manifestă numai atunci când se acumulează fenilalanină prin aport alimentar (vezi capitolul 1.B.2.1.c); eliminarea acestui aminoacid din alimentație previne retardul mintal pe care-l poate cauza expresia completă a genei pentru PKU. Răspunsul variabil al diferitelor persoane la anumite medicamente (farmacogenetica), reprezintă un alt exemplu convingător al interacțiunii dintre gene și factorii de mediu. Este deja cunoscut (vezi capitolul 1.B.2.3.b) efectul antimalaricelor, sulfamidelor sau al consumului de bob la persoanele cu **deficiență în G6PD**: absența enzimei, de obicei

nemanifestă, devine evidentă (printr-o criză de anemie hemolitică) după acțiunea acestor factori de mediu.

## 5. HETEROGENITATEA GENETICĂ

Numeroase boli ereditare umane, indiferent de modul lor de transmitere, prezintă o **heterogenitate genetică**. Termenul se referă de regulă la situația în care *mutații genice (genotipuri) diferite determină un fenotip identic sau asemănător*. Heterogenitatea poate fi produsă de mutații în loci diferiți (heterogenitate de locus sau nonalelică) sau mutații diferite în același locus (heterogenitate alelică) sau de ambele.

a. **Heterogenitatea de locus** / nonalelică poate fi ușor demonstrată prin analiza arborilor genealogici ai diferitelor familii în care o boală genetică se manifestă identic; această analiză genealogică va evidenția modalități diferite de transmitere ale aceleiași afecțiuni, dovedind existența unor mutații diferite în loci diferiți. Ele vor fi apoi confirmate prin studiul ADN. De ex., **retinita pigmentară** - o cauză frecventă de afectare și pierdere a vederii, datorată degenerării retiniene însoțită de o distribuție anormală a pigmentului în retină - se prezintă sub forme de transmitere ereditară diferite: autosomal dominante (12 forme), autosomal recesive (5 forme) și legat de X (trei forme). Au fost localizate peste 20 de regiuni cromosomice<sup>7</sup> ce conțin loci care produc retinita pigmentară (dintre aceștia 8 au fost deja identificați).

Există multe alte exemple de heterogenitate de locus: albinismul, surditatea congenitală, hipotiroidia congenitală etc. În prezent, analiza genotipică moleculară (la nivel ADN) a demonstrat că multe afecțiuni cu un mod unic de transmitere pot fi heterogene. De exemplu, nanismul hipofizar, osteogenesis imperfecta, rinichiul polichistic etc. pot fi produse de mutații în loci diferiți (tabelul 4.1). Evident, în aceeași familie toți bolnavii vor avea același genotip sau, mai exact, aceeași mutație.

**Tabel 4.1 Exemple de boli în care există heterogenitate de locus**

Boala	Descriere	Cromosomii pe care sunt localizați locii-boală
Boala Alzheimer	Demență progresivă	1, 4, 19, 21
Boala Charcot-Marie-Tooth	Neuropatie periferică	1, 5, 8, 11, 17, X
Boala polichistică renală a adultului (ADPKD)	Acumulare de chisti renali ducând la insuficiență renală cronică	16, 4
Cancerul colorectal nonpolipozic ereditar (AD)	Cancer colorectal	2p, 2q, 3, 7
Cancer de sân ereditar (AD)	Predispoziție la cancer de sân sau ovar aparut precoce	13, 17
Melanomul familial	Cancer piele	1, 9
Osteogenesis imperfecta	Boala oaselor de sticlă	7 și 17
Retinita pigmentară	Retinopatie progresivă și pierderea vederii	> 20 regiuni cromosomice
Scleroza tuberoasă	Convulsii, angiofibroame faciale, macule hipopigmentate pe piele, retard mintal	9, 16

b. **Heterogenitatea alelică** este reprezentată de mutații diferite în același locus (aceeași genă) care produc fenotipuri asemănătoare clinic, deosebite doar prin intensitatea de manifestare a bolii. Un exemplu caracteristic îl reprezintă *distrofia musculară Duchenne și boala Becker* -

<sup>7</sup> Dacă adăugăm și formele sindromice de retinită pigmentară (asociată cu alte anomalii / manifestări) există peste 30 de boli diferite ce se manifestă cu retinită pigmentară

afecțiuni caracterizate prin atrofie musculară progresivă și inexorabilă; ele sunt determinate de mutații diferite ale aceleiași gene (locus), situat pe cromosomul X. Deși efectele fenotipice sunt asemănătoare, boala Becker este o formă moderată de distrofie musculară. Explicația acestui fenomen este că unele alele nu abolesc complet sinteza și deci funcția unei proteine.

Există numeroase alte exemple de heterogenitate alelică: mucoviscidoza (forme cu sau fără insuficiență pancreatică), hemofilia A, beta-talasemia, neurofibromatoza, surditatea, boala Tay-Sachs etc. Se spune că *heterogenitatea alelică este o regulă* în bolile mendeliene la om. De aceea în multe boli recesive persoanele afectate nu au genotipuri pur homozigote; ele sunt **heterozigoți compuși** deoarece au două alele mutante diferite ( $a1/a2$ ).

În unele afecțiuni genetice (de exemplu, mucopolizaharidozele, homocistinuria, osteogenesis imperfecta, surditatea congenitală etc.) se întâlnesc ambele forme de heterogenitate, alelică și nonalelică (de locus). Un exemplu sugestiv îl reprezintă **sindromul Ehlers-Danlos (SED.)** (vezi capitolul 11.B.5), o afecțiune a țesutului conjunctiv (produsă printr-un defect în structura colagenului) caracterizată prin hiperelasticitate cutanată, hiperlaxitate articulară și fragilitate tisulară crescută. SED prezintă mai multe subtipuri clinice definite și prin alte semne clinice, care le diferențiază. În familii diferite SED se transmite diferit - autosomal dominant sau recesiv, legat de X - demonstrând o veritabilă heterogenitate de locus. Analiza clinică și moleculară relevă cel puțin 10 tipuri distincte de SED și o amplă heterogenitate alelică; există, spre exemplu, șase forme autosomal dominante, din care cel puțin o parte sunt produse de mutații diferite ale aceluiași locus (variante alelice).

**c. Heterogenitatea clinică.** Trebuie să menționăm că heterogenitatea alelică nu produce totdeauna fenotipuri asemănătoare. Din contra, mutații diferite ce interesează *aceeași genă* (în exoni diferiți) pot avea un aspect clinic variat, producând uneori chiar *boli diferite*; acest fenomen se numește *heterogenitate clinică sau fenotipică*. De exemplu, mutații diferite în gena pentru  $\beta$  globină produc sicklemlia (AR),  $\beta$  talasemia (AR), hemoglobina instabilă (AD) și methemoglobinemia (AD). Sindromul Hurler și sindromul Scheie sunt două forme diferite de mucopolizaharidoză (boală de stocaj a mucopolizaharidelor în lizozomi) deși sunt produse de variante alelice ale aceleiași gene (care afectează aceeași enzimă, alfa-L-iduronidaza) distincte. Un alt exemplu: unele mutații în **gena RET** (11q12) (ce codifică un receptor tirozinkinazic, implicat în migrarea celulelor din creasta neurală) care se însoțesc de *pierderea funcției* genei, produc o insuficientă dezvoltare a ganglionilor colonici și secundar distensia colonului, tulburări de motilitate și constipație severă cronică (**boala Hirschprung**); alte mutații în aceeași genă, care se însoțesc de *câștig de funcție*, produc trei forme de cancer ereditar al glandelor tiroidă și suprarenală (neoplaziile endocrine multiple **MEN2A** și **MEN2B** precum și *cancer medular tiroidian*); un al treilea grup de mutații în gena **RET** produc ambele boli la același individ. Din exemplele prezentate mai sus rezultă că heterogenitatea clinică este frecventă și importantă; explicația cea mai simplă a acestui fenomen este că exoni și, implicit, domenii distincte ale unei proteine pot îndeplini funcții diferite, iar prin mutații variate în aceeași genă sunt afectate aceste funcții, rezultând boli diferite.

#### **d. Importanța practică a fenomenului de heterogenitate genetică și clinică.**

Fenomenul de heterogenitate genetică, frecvent întâlnit în eredopatologie, are o deosebită importanță practică pentru acuratețea diagnosticului clinic și etiologic, tratamentul diferențiat al unei manifestări clinice produsă de genotipuri diferite și, bineînțeles, pentru realizarea unui sfat genetic corect (în funcție de modul diferit de transmitere). Iată succint câteva exemple și deci argumente care demonstrează importanța practică a cunoașterii acestui fenomen.

- *Tratamentul.* În cazul unei afecțiuni cu heterogenitate genetică (de ex., hemofilia A și B; hiperfenilalaninemie) diagnosticul va fi incomplet dacă nu se precizează tipul etiopatogenic și acest lucru poate avea consecințe negative în tratament; aplicarea unei terapii identice unor boli genotipic diferite, dar cu aceeași manifestare clinică, riscă să fie deseori fără succes. De exemplu, hiperfenilalaninemia, care produce secundar debilitate mintală, poate fi cauzată de o

deficiență a enzimei fenilalaninhidroxilaza (în PKU, forma clasică) sau de unele anomalii ale metabolismului bipterinei; PKU poate fi tratată cu succes prin restricția dietetică a fenilalaninei în timp ce în a doua situație același tratament este ineficace.

- *Prognosticul* bolilor cu heterogenitate alicică (de ex., distrofie musculară Duchenne și distrofie musculară Becker) este deasemeni diferit.
- *Sfatul genetic*. Riscul de recurență a retinitei pigmentare este 50% în formele autosomal dominante, 25% în cazurile autosomal recesive și 50% la băieți în formele recesive legate de X; fără precizarea modului de transmitere, deci a diagnosticului etiologic, sfatul genetic în retinita pigmentară nu poate fi corect realizat.

## B. CONCEȚIA ACTUALĂ DESPRE FUNCȚIA GENEI

### 1. GENELE CONTROLEAZĂ SINTEZA PROTEINELOR

Explicând funcția genei prin relația "o genă → un caracter", genetica clasică nu a putut răspunde la întrebarea: "*cum acționează genele în formarea, dezvoltarea și funcția organismului?*".

Prima formulare a unui răspuns corect aparține unui medic englez sir Archibald Garrod, care postulează o legătură specifică între gene și proteine. În 1902, Garrod descrie **alcaptonuria**, o boală ereditară care se transmite în succesiunea generațiilor în concordanță cu legile lui Mendel. Bolnavii suferă de artrită și urina lor devine neagră după expunerea la aer. Garrod a presupus că boala este determinată de un *bloc biochimic* produs de lipsa enzimei care metabolizează acidul homogentizic (figura 4.3). Simptomatologia bolii este rezultatul *acumulării* acidului homogentizic în organism ca urmare a "*barajului*" căii metabolice. Prin același mecanism el explică mecanismul altor trei boli ereditare, inclusiv **albinismul** unde a descris un bloc metabolic pe calea de transformare a tirozinei în melanină. Garrod a stabilit astfel o relație clară între gene și enzime și a introdus în medicină conceptul de "**erori înnăscute de metabolism**" (prefigurând era patologiei moleculare).

Din păcate, ca și în cazul lui Mendel, importanța remarcabilelor cercetări de genetică ale lui Garrod n-a fost percepută nici de medici și nici de biologi. Abia peste 40 de ani, experiențele efectuate de Beadle și Tatum la *Neurospora crasa* au demonstrat fără echivoc relația "o genă → o enzimă", aducându-le autorilor un binemeritat Premiu Nobel (1958).

Beadle și Tatum (1944) au studiat metabolismul triptofanului și argininei la *Neurospora crasa* (mucegaiul alb). Ei au stabilit etapele biosintezei triptofanului din arginină și au demonstrat că fiecare etapă este catalizată de o enzimă diferită. Apoi, au iradiat sporii ciupercii și cultivându-i pe medii nutritive au obținut mai multe variante (mutante); ele nu puteau sintetiza triptofanul deoarece una din etape era blocată, fie prin lipsa enzimei, fie prin inactivarea ei, produsă de modificarea structurii sale. Toate aceste modificări erau *ereditare*, reprezentând consecințe ale mutațiilor produse prin iradiere. Rezultă evident că genele își exercită efectul lor fenotipic prin controlul sintezei unor enzime (proteine).

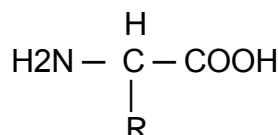
Numeroase alte dovezi obținute la microorganisme, plante, animale și om au demonstrat incontestabil că genele își exercită controlul asupra organismului prin influența lor asupra formării proteinelor. Prin enorma lor diversitate și complexitate structurală, ca și prin rolul lor structural, catalitic (enzime) sau regulator, proteinele determina aproape toate caracterele organismului. Relația "*o genă → o enzimă (proteină)*" a devenit în scurt timp "*o genă → un polipeptid*", deoarece unele proteine formate din două sau mai multe polipeptide (de ex., hemoglobina) sunt codificate de gene distincte, care controlează fiecare sinteza unui polipeptid.

Relația "o genă - un polipeptid" nu este general valabilă deoarece unele gene codifică diferite tipuri de ARN; de aceea gena a fost definită ca un segment de ADN ce determină sinteza unui produs funcțional. Genele care codifică proteine sunt numite și gene structurale.

### 2. STRUCTURA PROTEINELOR

Întrucât proteinele reprezintă "suportul" biochimic al caracterelor noastre fenotipice și sinteza lor este determinată genetic, pentru a înțelege mecanismul complex al relației "o genă → o proteină" sunt utile câteva noțiuni sintetice despre stuctura acestor compuși organici, cu rol vital în organism.

Proteinele sunt alcătuite din una sau mai multe catene polipeptidice, formate prin polimerizarea a 20 de tipuri de aminoacizi. Deși diferiți în complexitatea lor, ei au la bază o structură comună de tipul:



Radicalul R diferă de la un aminoacid la altul și determină structura și proprietățile aminoacidului. Aminoacizii se unesc între ei prin legături peptidice (figura 4.4) formând o catenă liniară polipeptidică; aceasta are "o coloană vertebrală" (în zig-zag) alcătuită din  $-\text{C}-\text{N}-$ , pe care se fixează lateral și în mod alternativ gruparea R (figura 4.5). Numărul, tipul și secvența aminoacizilor în lanțul polipeptidic alcătuiesc structura primară a polipeptidului (proteinei).

Secvența aminoacizilor dintr-o proteină reprezintă elementul esențial al structurii sale, deoarece: *este unică, constantă, specifică* fiecărei proteine și este *determinată genetic*. Secvența aminoacizilor *determină funcția proteinei și antigenicitatea ei* deoarece prin interacțiunile dintre aminoacizii situați în diferite situsuri din structura polipeptidului se realizează structurile spațiale, tridimensionale, ce determină activitatea sa biologică.

Prin legături de hidrogen între aminoacizii învecinați se formează, în anumite porțiuni/zone ale proteinei *structuri secundare* de tip alfa (în elice) sau beta (foaie pliată) (figura 4.6). Prin interacțiuni între aminoacizi din diferite poziții ale catenei aceasta capătă spontan o configurație tridimensională, spațială, ce reprezintă *structura terțiară* a polipeptidului (figura 4.7). Unele proteine au două sau mai multe catene identice sau diferite, ce formează singure sau împreună cu alte molecule neproteice complexe macromoleculare (*structura cuaternară*) *Configurația spațială caracteristică a unei proteine determină activitatea ei funcțională*<sup>8</sup>. De notat că proteinele funcționale nu sunt totdeauna sintetizate în forma lor activă. Ele suferă modificări post-translaționale care determină *activarea* proteinei.

Aminoacizii care interacționează între ei pentru a forma structura tridimensională, biologic activă, sau care alcătuiesc așa numitele "situsuri funcționale" ale proteinei sunt deosebit de importanți; înlocuirea lor, în urma unor mutații, duce la o *proteină anormală* (cu o structură spațială modificată) și la pierderea activității proteinei. Înlocuirea altor aminoacizi, neimplicați în legăturile spațiale sau în situsul funcțional este mai puțin importantă și poate produce *variante proteice normale*.

### 3. GENELE STRUCTURALE DETERMINĂ SECVENȚA AMINOACIZILOR ÎN PROTEINĂ

Genele care codifică proteine conțin mesajul codificat necesar pentru asamblarea specifică (într-o anumită ordine) a aminoacizilor în proteină. Această relație a fost elegant demonstrată prin studiul mutațiilor care produc diferite tipuri de hemoglobină anormală și, în special, prin cercetarea drepanocitozei sau sicklemiei, o anemie hemolitică cu hematii în formă de seceră ("falciforme").

**Drepanocitoza (sickleemia)** este o boală genetică, cu transmitere autosomal recesivă, frecventă în populația originară din Africa tropicală (1:500 n.n), precum și în bazinul Mediteranean, Orientul Mijlociu și India. Această distribuție geografică caracteristică se explică prin avantajul selectiv față de malarie pe care îl au heterozigoții sănătoși (1 : 25 n.n) protejați de formele grave de paludism.

<sup>8</sup> Prin diverse tratamente fizico-chimice legăturile dintre diferiți aminoacizi ce formează structura terțiară se pot rupe și proteina "denaturată" își pierde activitatea biologică.

Boala se manifestă la homozigoți (*a/a*) printr-o *anemie hemolitică severă*, produsă prin distrugerea hematiilor cu *formă anormală "în seceră"* (figura 4.8.a); aceste hematii se formează în condițiile scăderii tensiunii (concentrației) oxigenului în anumite teritorii capilare. Formele acute se însoțesc de dureri în mâini / picioare sau alte organe (splină, mezenter, rinichi etc.), produse de *microinfarcte* prin ocluzia capilarelor de către hematiile în seceră, care au o deformabilitate redusă. *Hemoliza* se asociază cu *splenomegalie* și infarcte splenice recurente care determină pierderea funcției ei imune și cu susceptibilitatea crescută la unele infecții bacteriene (pulmonare), cauza principală de deces. Heterozigoții (*N/a*) prezintă "*trăsătura sicklemică*"; obișnuit ei sunt sănătoși, dar scăderea brutală a concentrației O<sub>2</sub> (altitudine) poate produce prin "*sicklizarea*" hematiilor, o anemie hemolitică acută și infarcte splenice.

În 1949, Pauling și colaboratorii săi au demonstrat existența unei anomalii a hemoglobinei din eritrocitele "în seceră", numită HbS, care se deosebește electroforetic de HbA (normală) deoarece, datorită unei mutații genice, moleculele lor de beta-globină sunt diferite (figura 4.8.b). Cercetătorii au stabilit că la persoanele heterozigote (*N/a*), cu trăsătură sicklemică, există un amestec de HbA și HbS. Ulterior (1956), Ingram a descoperit că HbS are unul din cei 146 de aminoacizi ai catenei beta, și anume cel din poziția 6 înlocuit cu un alt aminoacid (beta 6 acid glutamic → valină). Această unică schimbare a moleculei de Hb produce modificarea formei eritrocitului și toate manifestările clinice ale bolii. Pauling și Ingram au demonstrat astfel pentru prima dată că *mutația unei gene structurale poate produce o substituție a unui aminoacid în proteina* corespunzătoare și au postulat că drepanocitoza sau sicklemlia reprezintă prototipul de "**boală moleculară**".

După 1975, identificarea, localizarea și secvențarea genei normale pentru beta-globină și a alelei sale mutante ( $\beta^S$ ) au stabilit cu precizie tipul de mutație: în codonul 6 (GAG) al genei beta-globinei, adenina este înlocuită cu timina, formând codonul GTG care semnifică valina. Iată deci, că modificarea unui singur nucleotid din cele trei miliarde de nucleotide care alcătuiesc genomul uman este cauza modificărilor patologice observate la bolnavii cu drepanocitoză. Explicația patogenică a acestei boli moleculare este acum simplă (figura 4.8.c): moleculele de HbS conținând subunitatea beta mutantă fixează în mod normal O<sub>2</sub> dar în sângele deoxigenat ele sunt relativ insolubile, comparativ cu HbA normală; această proprietate fizică stă la baza fenomenului de sicklizare. În condițiile scăderii concentrației de oxigen molecula de HbS agregă și formează polimeri având forma unor fibre care distorsionează eritrocitul și-l fac mai puțin deformabil ca în mod normal; el nu mai este capabil să traverseze prin capilarele fine (cu un diametru inferior celui al hematiei), blochează fluxul sanguin și produce hipoxie locală (microinfarcte dureroase). Eritrocitele în seceră se hemolizează (în splină) generând o anemie cronică.

Studii ulterioare au evidențiat numeroase alte tipuri de hemoglobinopatii ereditare în care schimbarea structurii Hb era rezultatul substituției unui singur aminoacid. De exemplu, HbC rezultă printr-o substituție nucleotidică în același codon 6 al genei bet-globinei, care duce la înlocuirea acidului glutamic cu lizina. A devenit astfel evident și unanim acceptat că genele determină secvența primară a aminoacizilor dintr-o proteină specifică.

Descrierea amplă a defectului molecular în drepanocitoză permite câteva concluzii importante privind concepția actuală despre funcția genei:

- (1) Genele care codifică proteine conțin (sub forma unei secvențe de nucleotide) informația genetică necesară pentru *asamblarea specifică (într-o anumită ordine) a aminoacizilor* într-o proteină specifică; mutațiile genice produc o schimbare (substituție) a secvenței unui/unor codon(i) și secundar o modificare a structurii proteinei, care poate genera o *boală moleculară*;
- (2) În acțiunea genei se pot identifica trei categorii de efecte corelate: *efectul primar*, la nivel molecular (proteină); *efectul secundar*, la nivel celular și *efectele terțiare* multiple (pleiotropie), la nivel fenotipic, de organ / organism (semne și simptome). În practica medicală se recunosc clinic sau paraclinic efectele terțiare ale genei mutante adică boala ereditară cu diversele sale manifestări; efectele primare (proteina anormală) nu sunt cunoscute în multe boli monogenice

dar tehnicile recente de analiză a structurii și funcției genei vor rezolva enigma acestor "pete albe";

(3). La heterozigoți ( $N/a$ ) se manifestă (exprimă) la nivel molecular ambele gene și persoanele heterozigote cu trăsătura sicklemică (genotip  $A/S$ ) produc și HbA și HbS. Rezultă că *noțiunile de dominant și recesiv NU sunt valabile la nivel molecular, cu numai la nivel fenotipic* (de organism);

(4). Expresia ambelor gene alele la heterozigoți permite identificarea lor, prin studiul efectelor primare și uneori secundare (la nivel celular). *Depistarea heteozigoților* sănătoși purtători de genă mutantă are o deosebită valoare practică în prevenirea nașterii unor homozigoți bolnavi (doi părinți heterozigoți,  $N/a$ , au un risc de 25% de a avea un copil  $a/a$  homozigot, bolnav).

(5). Cunoașterea modificării nucleotidice în gena mutantă care produce o boală moleculară permite, prin metodele actuale de analiză a ADN, *diagnosticul genotipic precoce* al bolii, fie prenatal fie postnatal, în stadiile asimptomatice. Se deschide, de asemenea, perspectivele unei terapii genice, prin inserția unei gene normale pentru beta-globină în celulele unui pacient la care boala este consecința mutației acestei gene.

#### 4. RELAȚIA "O GENĂ → UN POLIPEPTID" ESTE MULT MAI COMPLEXĂ

Evoluția cunoștințelor despre structura moleculară a genei, bazată pe posibilitatea analizei ei directe, a evidențiat o serie de fenomene care se abat de la relația fundamentală "o genă (de structură) → un polipeptid". În esență este vorba de situațiile în care o genă poate produce *mai multe polipeptide* asemănătoare sau diferite sau invers, *mai multe gene distincte*, situate uneori la distanță una de alta. O astfel de genă participă la sinteza unui singur polipeptid sau a unei proteine multipeptidice .

Primul fenomen, "**o genă → mai multe polipeptide**", se realizează prin mecanisme diverse ce intervin în diferite etape ale expresiei genei (transcripție, maturare, translație, procesarea postranlațională a proteinelor). Fără a intra în detalii vom preciza că cel mai frecvent mecanism este *matisarea alternativă*. După cum știm deja (capitolul 3.B.1), marea majoritate a genelor umane au o structură discontinuă, fiind alcătuite din exoni și introni; în procesul de formare a ARNm matur din preARNm, intronii sunt excizați iar exonii sunt uniți / legați unul de altul (matisare). Unele celule "decid" să folosească însă numai anumiți exoni și astfel dintr-un mesager primar unic se pot produce (printr-o "selecție" a exonilor și "matisare alternativă"), în același țesut sau în țesuturi diferite, fie proteine înrudite, cu funcție analogă – numite *isoforme* - (de ex: cele patru tipuri de bază ale mielinei, troponinei C, distrofinei etc) sau chiar proteine complet diferite ca funcție (figura 4.9.). De exemplu, gena calcitoninei produce un transcript primar din care în celulele C ale tiroidei se formează ARNm pentru calcitonină iar în neuroni (creier), printr-o maturare diferită, se formează un mesager pentru un "polipeptid înrudit" cu funcție de tip neuromedior. Fenomenul de matisare alternativă a jucat, foarte probabil, un rol important în evoluție deoarece prin rearanjarea diferitelor segmente codante (exoni) din structura genei s-au produs proteine cu funcții noi.

Așa cum vom vedea (vezi capitolul 4.B.) există și alte mecanisme prin care o genă (ca unitate de transcripție) poate produce o varietate de "produse". Alături de matisarea alternativă vom mai menționa acum *folosirea alternativă a unuia dintre promotorii multipli* prin care rezultă isoforme cu diferite proprietăți: expresia în diferite perioade ontogenetice, specificitatea tisulară, localizarea subcelulară, capacitatea funcțională. Un alt mecanism este *clivarea postranlațională* prin care dintr-un singur polipeptid "gigant" se produc, prin secționarea, mai multe polipeptide "mici"; acest mecanism se întâlnește în cazul sintezei unor hormoni dintr-un prohormon (de ex., *pro-opiomelanocortina* din care rezultă ACTH,  $\gamma$ MSH,  $\delta$ MSH,  $\gamma$ LPH,  $\beta$ -endorfina)

Al doilea fenomen, "**mai multe gene → un polipeptid**" se observă în cazul polipeptidelor alcătuite din regiuni diferite. De ex., lanțurile ușoare (L) și grele (H) ale



imunoglobinelor prezintă o regiune variabilă (V) - care alcătuiește situsul de recunoaștere și fixare al antigenului - și o regiune constantă (C); ele sunt specificate de gene distincte, situate la distanță pe același cromosom. În limfocitele B care produc anticorpi se produce o rearanjare (recombinare somatică) a genomului (vezi capitolul 15) și o anumită genă V este asociată cu o gena C, formând o secvență completă funcțional ce codifică lanțul respectiv al imunoglobinei (figura 4.10).

## 5. INTERACȚIUNILE GENICE ÎN CONCEPȚIA ACTUALĂ

Concepția clasică despre funcția genei postulează că expresia fenotipică a unei gene este influențată de alte gene alele sau nealele, precum și de acțiunea mediului. Aceste interacțiuni sunt mult mai evidente la nivel molecular.

*Interacțiunile alelice* exprimate prin relațiile de dominanță-recesivitate dintre genele alele sunt valabile la nivel fenotipic, influențând expresia unui caracter. La nivel molecular se manifestă de obicei ambele gene alele, producând o proteină normală sau anormală, în cazul genelor mutante. Uneori anumite gene nu au nici un efect primar (gene amorfe / silențioase). De ex., gena 0 a sistemului de grup sanguin AB0 sau genele mutante recesive pentru agamaglobulinemie sau afibrinogenemie. La heterozigoții  $N/a$ , gena mutantă  $a$  poate codifica o proteină (enzimă) nefuncțională; cantitatea totală de proteină / enzimă normală *se reduce la jumătate* fiind totuși suficientă, în condiții bazale, pentru a asigura o funcție normală și ca atare individul să fie (aparent) sănătos (vezi "trăsătura sicklemică").

*Interacțiunile nealelice* și în special fenomenul de **epistazie** pot fi demonstrate mai convingător la nivel molecular, prin acțiunea coordonată a mai multor gene ce intervin în producerea unui compus final. Un frumos exemplu îl reprezintă formarea antigenelor ABH pe suprafața hematiilor și în secreții.

Antigenele A, B și H sunt macromolecule complexe prezente sub formă alcool-solubilă (glicosfingolipide) pe suprafața hematiilor și hidrosolubilă (glicoproteine) în secreții, dar numai la persoanele "*secretoare*". Antigenele ABH eritrocitare sunt glicosfingolipide complexe care au o parte centrală fixată cu un capăt în membrana eritrocitului; pe acest "miez" se leagă lateral, în zona extramembranară, mai multe catene glucidice. Specificitatea antigenică este determinată de glucidul terminal. Formarea antigenelor A, B, H este determinată de acțiunea coordonată a genelor H, Se și A,B,O<sup>9</sup> care, prin intermediul unor enzime (glicoziltransferaze), fixează diferite tipuri de glucide la axul sfingolipidic sau glicoproteic (figura 4.11).

- *Gena dominantă H* codifică o enzimă (fucoziltransferază) care acționează asupra unui precursor și adaugă o moleculă de fucoză, formând substanța H.
- *Genele dominante A și B* acționează asupra substanței H și, prin intermediul unor transferaze specifice, fixează o moleculă de acetilgalactozamină (antigenul A) și, respectiv, galactoză (antigenul B). *Gena recesivă 0* este inactivă, nu modifică substanța H, care se va regăsi ca atare la persoanele de grup sanguin 0.
- S-a înregistrat și situația foarte rară de homozigoți ( $h/h$ ) pentru gena H la care precursorul nu este transformat în substanță H; genele A sau B, deși există în stare normală nu au efect și fenotipul (numit Bombay) corespunde grupei 0 (dar fără substanță H).
- La secretori, alături de *gena H/*, acționează și *gena dominantă Se/* care va determina sinteza și excreția antigenelor A, B și H; la nesecretori ( $se/se$ ) efectul genei H este "anulat" prin acțiunea genelor  $se/se$  iar precursorul rămâne netransformat. Gena  $Se/$  are deci acțiune epistatică asupra genei H.

<sup>9</sup> Analiza moleculară a genelor A, B, 0 a fost recent realizată. Între alelele A și B există o diferență de secvență de numai patru nucleotide. Alela 0 prezintă o deleție a unui nucleotid care (fiind o mutație "frameshift") determină pierderea activității transferazice

Efectul mediului asupra expresiei genelor se manifestă în reglajul cantitativ (și uneori calitativ) al sintezei proteinelor.

## C. MECANISMELE MOLECULARE ALE EXPRESIEI GENICE

Expresia informației genetice se realizează în toate celulele pe baza unui *flux informațional, unidirecțional și universal*<sup>10</sup>, care se conformează dogmei centrale a geneticii: **ADN → ARNm → polipeptid (proteină)** (figura 4.12). Prima etapă a expresiei informației ereditare este sinteza ARN (cu ajutorul unei ARN polimeraze ADN-dependente<sup>11</sup>), prin copierea informației din ADN; această etapă are loc în *nucleu și mitocondrii* și se numește **transcripție**. A doua etapă este sinteza unui polipeptid, prin decodificarea ("*traducerea*") informației ARNm într-o secvență caracteristică de aminoacizi; acest proces are loc în citoplasmă, pe *ribosomi*, și este denumit **translație**. Realizarea acestor etape se bazează pe **principiul coliniarității**: o secvență liniară de nucleotide din ADN este copiată (complementar) într-o secvență liniară de nucleotide în ARN; apoi ea este decodificată (prin "*citire*" în grupe de trei nucleotide numite codoni) într-o secvență, de asemenea, liniară de aminoacizi ce formează un polipeptid.

Înainte de a descrie mecanismele moleculare ale expresiei genice sunt utile următoarele precizări:

- Numai o mică proporție din ADN al celulelor eucariote este exprimat și determină o proteină. Este vorba de ADN genic codant (vezi capitolul 2.C.2.3.), iar din acesta diferite tipuri de celule diferențiate transcriu numai anumite segmente de ADN (*unități de transcripție*).
- Întregul proces al exprimării informației genetice este supus unui riguros *control* care reglează *tipul de celulă* în care se produce sinteza proteinei, precum și *momentul, cantitatea și ritmul* acestui proces.
- Erorile mecanismelor moleculare ale exprimării informației genetice vor genera, firesc, o serie de boli; descifrarea acestor mecanisme va crește posibilitățile de diagnostic și tratament.

### 1. TRANSCRIȚIA

#### 1.1 DATE GENERALE

**Transcripția** este procesul de *copiere* a informației genetice a unei gene, sub formă *codificată, complementară și antiparalelă*, într-o moleculă de ARN. Acest proces are loc în nucleu.

ARN este format din ribonucleotide, cu structura generală  $[P-R-N]_n$ , în care **P** = acid fosforic, **R** = riboza<sup>12</sup> iar **N** = baza azotată (Adenina, Guanina, Citozina și Uracilul). Prin polimerizarea ribonucleotidelor (în sensul 5'→3') rezultă o monocatenă, de obicei scurtă. Se deosebesc mai multe tipuri de ARN, cu funcții diferite: ARNm sau mesager este codant deoarece prin translație va determina sinteza unui polipeptid; ARNr sau ribosomal (mai multe tipuri) va participa la formarea ribosomilor, iar ARNt sau de transfer intervine direct în transportul aminoacizilor la ribosomi; alte tipuri sunt ARNs și ARNsno

<sup>10</sup> În realitate fluxul informațional nu este exclusiv unidirecțional și universal: unele secvențe de ADN (retrotranspozoni) sunt transcrise în ARN și apoi sub acțiunea unei *transcriptaze* inverse sunt retrocopiate și integrate aleatoriu în ADN; prin același mecanism unele retrovirusuri (de ex., HIV) care au ca material genetic ARN se pot insera în ADN-ul celulelor eucariote prin retrotranscripție.

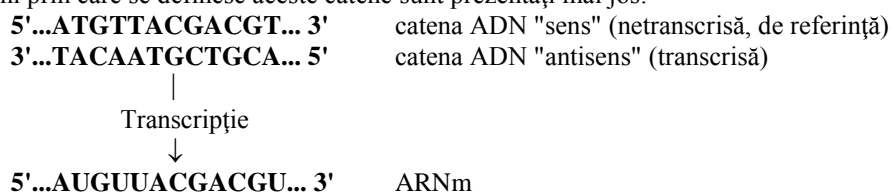
<sup>11</sup> Există trei tipuri de ARN polimeraza: I - pentru ARNr; II - pentru pre-ARNm; III - pentru ARNt.

<sup>12</sup> Riboza este "*oza*" (glucidul) descoperit la "Rockefeller Institut of Biochemistry" din New York.

(ce intervin în procesarea intronilor sau a ARNr). În cele ce urmează vom discuta mai ales transcripția ARNm realizată de ARN polimeraza II ADN dependentă.

Pentru a se sintetiza *in vivo* un ARNm sunt necesare: *ADN ca model sau matriță*, enzima *ARN polimerază II*, *factori de transcripție* necesari pentru ghidarea și activarea ARN polimerazei și *ribonucleotide* activate. Numai una din cele două catene ale ADN ( $3' \rightarrow 5'$ ) este transcrisă și servește ca "matriță" pentru sinteza unei molecule complementare și antiparalele ( $5' \rightarrow 3'$ ) de ARNm; dar aceasta nu este, la diferite gene, aceeași catenă care este copiată în lungul moleculei ADN, la diferite gene (figura 4.13). Alegerea catenei transcrise depinde în mare parte de localizarea și orientarea *promotorului*, locul unde se fixează prin intermediul factorilor de transcripție, ARN polimeraza.

Cele două catene ale ADN-ului, catena transcrisă ( $3' \rightarrow 5'$ ) și catena "de referință" ( $5' \rightarrow 3'$ ), au o "nomenclatură" diferită. ARNm, care se formează prin transcripție, va avea *aceeași secvență* de nucleotide (exceptând înlocuirea T cu U) și *aceiași sens* ( $5' \rightarrow 3'$ ) ca și catena ADN *netranscrisă* motiv pentru care aceasta se numește **catenă sens** iar catena transcrisă este numită adesea **antisens**<sup>13</sup>. Raportul dintre secvența și polaritatea ARNm pe de o parte și cele două catene ale ADN pe de altă parte, precum și unii termeni prin care se definesc aceste catene sunt prezentați mai jos:



Înainte de a descrie procesul de transcripție este necesar să precizăm un element important. *ADN este identic în toate celulele somatice* (rezultate prin mitoze succesive din celula zigot); *diferențierea* lor structurală și funcțională implică expresia anumitor gene specifice de țesut, care funcționează împreună cu genele constitutive ("domestice sau menajere" de la "housekeeping genes" deoarece sunt active în toate celulele) ce controlează metabolismul celular (vezi capitolul 3.B.3). De aceea, expresia genelor specific tisulare implică **activarea selectivă** a acestor gene (prin intervenția unor molecule specific tisulare), **recunoașterea** lor de către ARN polimerază și **modularea expresiei lor** ca moment, cantitate și ritm. Fără a intra în detalii, vom preciza că aceste procese se realizează prin:

- (1) realizarea unei *configurații "deschise" active a cromatinei* în anumite teritorii prin relaxarea structurii sale ("decondensare") și acetilarea histonelor nucleosomale (vezi capitolul 2.D.2.3);
- (2) intervenția secvențelor sau *elementelor cis-reglatoare* din regiunea 5' situată în amonte de zona centrală, transcrisă, a genei: promotorul (cu *casetele* TATA sau GC și CAAT) reprezintă semnalul de start al transcripției, ce stabilește *localizarea și direcția* de acțiune a ARN polimerazei; secvențele specifice de țesut; activatorii etc (vezi structura genei, capitolul 3.B.1.2). Toate aceste elemente sunt ținta unor *proteine trans-reglatoare* numite generic **factori de transcripție** (TF); fixarea lor este determinantă atât pentru demarajul transcripției cât și pentru intensitatea ei. *Fiecare genă posedă o combinație particulară de elemente cis-reglatoare* (figura 4.14).

Procesul de transcripție la eucariote se desfășoară în două mari etape, determinate de structura "discontinuu" ("fragmentată") a genelor eucariote. Acestea sunt:

- *formarea ARN mesager precursor* (pre-ARNm) sau transcriptul primar<sup>14</sup>, prin transcripția integrală a genei (exoni și introni);
- *maturarea pre-ARNm*, printr-o serie de modificări din care rezultă ARNm matur, ce va trece în citoplasmă.

<sup>13</sup> Referirile la structura genei se fac întotdeauna la catena sens (de ex., *secvențele reglatoare de la capătul 5' al genei* se referă la secvențele situate la capătul 5' al catenei *sens* și nu al catenei transcrisă, unde de fapt ele există și acționează !!!).

<sup>14</sup> Moleculele de transcript primar au fost denumite inițial *ARN nuclear heterogen* (hnARN).

## 1.2. FORMAREA ARNm PRECURSOR

Formarea pre-ARNm începe prin *decondensarea* zonei din ADN care conține gena sau genele ce vor fi transcrise. Acest proces implică intervenția unor **factori de transcripție de clasă I** (TF I), modificarea chimică a histonelor (acetilare, deplasarea H1 etc) care *va reduce gradul de compactare* a filamentelor cu nucleosomi și deplasarea (printr-un mecanism încă necunoscut) a nucleosomilor din zona de ADN transcrisă într-un anumit moment.

Formarea pre-ARNm se realizează în trei etape.

(1) *Inițierea transcripției*. Prin convenție primul nucleotid din ADN cu care se începe transcripția reprezintă "situsul de inițiere al transcripției" (SIT sau INR)<sup>15</sup> și este numit +1 iar nucleotidul care îl precede -1. Primul "pas" al transcripției este fixarea **ARN polimerazei** în regiunea **promotor**, situată spre capătul 5' al genei, în amonte de S.I.T. În această regiune, de circa 100 pb, se găsesc secvențe nucleotidice speciale, identice la majoritatea genelor (secvențe "consensus"), numite TATA box, CCAAT box și GC box. Trebuie spus foarte clar că *ARN polimeraza nu poate recunoaște direct promotorul și nici nu poate iniția singură transcripția*. Pentru aceasta sunt necesari o serie de **factori de transcripție** (TF II sau de clasă II) care se fixează pe secvențele promotorului pentru a *ghida și activa ARN polimeraza*. Enzima și factorii de transcripție formează un **complex multiproteic de inițializare**<sup>16</sup>. ARN polimeraza este poziționată și activată pentru a începe transcripția la SIT, cu nucleotidul +1.

(2) *Transcripția propriuzisă (elongația)*. După fixarea ARN polimerazei, cele două catene ale ADN sunt separate (prin acțiunea TF IIF, cu acțiune de helicază), eliberându-se *catena transcrisă 3'→5'*, care servește drept **matriță** (tipar) pentru așezarea *secvențială și complementară* a ribonucleotidelor activate; ele vor fi apoi polimerizate de către ARN polimerază<sup>17</sup>, formându-se ARNm; *Transcripția se face numai în sensul 5'→3'* (deci ARNm este *antiparalel* față de catena transcrisă), fapt ce asigură marea *fidelitate a "citirii" informației genetice*. ARNm se desprinde treptat de pe catena transcrisă (rămânând fixat temporar numai la capătul 3'), iar cele două catene ale ADN se reunesc treptat, sub acțiunea unei topoisomerase, și refac dublul helix. Trebuie subliniat un fapt important: în molecula de ARNm precursor care se formează - numită și transcriptul primar<sup>18</sup> - *sunt copiați atât exonii cât și intronii*.

(3) *Terminarea transcripției* se face când ARN polimeraza întâlnește *situsul de terminare a transcripției*; aici se află secvența AATAAA (citită pe catena netranscrisă) care semnalează *clivarea 3' a transcriptului primar*; ea va corespunde în preARNm secvenței AAUAAA.. Secționarea ARNm sintetizat are loc (sub acțiunea unei nucleaze) la 15-30 nucleotide în aval de secvența AAUAAA din ARN, în dreptul "**situsului de poliadenilare**".

Transcripția unei gene poate fi realizată de mai multe molecule de ARN polimerază, formându-se mai multe copii de ARNm ce conțin aceeași informație genetică (această "*amplificare*" va crește considerabil în cursul translației și astfel o genă va determina mii de molecule proteice identice).

## 1.3. MATURAREA ARNm PRECURSOR

Maturarea nucleară a pre-ARNm cuprinde două procese distincte, destinate să facă ARNm mai "disponibil și mai util" translației (figura 4.15).

<sup>15</sup>Orice abatere de la "SIT" va determina sinteza unui mesager diferit de cel normal.

<sup>16</sup>TF IID se fixează pe secvența TATA iar TF IIB și E fixează ARN polimeraza; complexul este stabilizat de TF IIA; la aceștia se adaugă TF IIF, cu activitate de *helicază*, care desface cele două catene ale ADN.

<sup>17</sup>ARN polimeraza se deplasează ca "un cursor pe un fermoar"

<sup>18</sup>Moleculele de pre-m ARN sunt cunoscute și sub numele de "ARN heterogen" (hnARN).

**a. Modificarea extremităților ARNm** determină creșterea *stabilității* sale (protecție la degradarea de către endonucleaze) și facilitează *transportul* în citoplasmă, *recunoașterea* și *fixarea* sa la subunitatea 40S ribosomală.

- La *capătul 5'* se adaugă, la primul nucleotid al transcriptului primar, o moleculă de 7-metil-guanozină, ce formează o structură specială, numită în l. engleză "*cap*" (*bonetă*);
- La *extremitatea 3'* se adaugă<sup>19</sup> o serie de 50-200 de nucleotide cu adenină, formând o "*coadă*" *poliadenilică*. Această operație de poliadenilare este caracteristică ARNm (există o singură excepție: ARNm pentru histone nu este poliadenilat).

**b. Procesarea ARN precursor.** Așa cum am precizat, transcriptul primar ARN conține secvențe complementare cu întreaga regiune transcrisă din genă (zona centrală sau *cadrul de lectură*) ce conține exoni (regiuni *exprimate*, codante) și introni (regiuni *intercalare*, necodante). După sinteză, transcriptul ARN primar suferă o procesare complexă ce constă în *decuparea* precisă și eliminarea ARN intronic urmată de *reunirea/legarea* "*cap la cap*" a ARN exonic, care va forma **ARNm matur**, alcătuit dintr-o serie continuă și contiguă de exoni (cineva spunea foarte plastic că în această operație "*se separă grăul de neghină*"). Aceste fenomene sunt denumite "*splicing*" în limba engleză, "*epissage*" în limba franceză; termenii corespund cuvântului românesc "*matisare*", termen tehnic care se referă la "*înădirea a doua capete*". *Excizia și reunirea* sunt operații foarte delicate care trebuie să fie deosebit de *precise*: o eroare de decupare cu un singur nucleotid modifică "*cadrul de lectură*" și, după translație, va produce o proteină anormală.

Procesul este dependent de existența unor secvențe nucleotidice-semnal situate la granița exoni-introni: **5'GT**(GU în ARN) sau *situs donor* și **3'AG** sau *situs acceptor*; o altă secvență importantă este "*branch site*" (ce poate fi tradus ca *situs de bransare, de legătură*), ce conține nucleotidul **A**, situat foarte aproape de capătul 3' al intronului. Mecanismul de decupare (figura 4.16) se derulează în trei etape: (1) secționare la joncțiunea 5'GU; (2) atașarea nucleotidului terminal G la nucleotidul A al situsului de bransare și formarea unei lasou/buclă; (3) secționarea intronului la joncțiunea 3'AG, îndepărtarea lui și unirea segmentelor de ARN exonic. Reacțiile sunt mediate de un complex ARN-proteine ("*spliceosome*") ce cuprinde cinci tipuri de ARNs ("small nuclear"), numite U1-U6, dotate cu activitate enzimatică (*ribozime*) și peste 50 de proteine

Ordinea exonilor în ADN și transcriptul primar este păstrată în ARNm matur. Dar există o anumită flexibilitate în utilizarea exonilor, în sensul că (sub acțiunea unor factori încă necunoscuți) în celule diferite, vor fi "reținuți" în ARNm matur numai o parte din exoni, alții putând fi îndepărtați o dată cu intronii. Acest proces denumit *matisarea alternativă* a exonilor (figura 4.9) explică producerea în țesuturi diferite a unor mesageri și deci a unor proteine diferite (asemănătoare dar nu identice) pe baza informației unei singure gene (vezi capitolul 4.B.4).

## 2. TRANSLAȚIA

A doua etapă a expresiei genice este **translația**<sup>20</sup> - procesul de *decodificare* a informației genetice din mRNA care permite *aranjarea secvențială specifică* a amino acizilor și polimerizarea lor într-o catenă polipeptidică.

Procesul de translație necesită, firește, "un dicționar" reprezentat de codul genetic și un aparat de translație care trebuie să includă, printre alte componente, și "traducătorul", reprezentat de moleculele de ARN de transfer (ARNt).

<sup>19</sup>Prin acțiunea unei poli-A polimeraze

<sup>20</sup>Denumirea de *translație* semnifică *traducerea* informației scrise în "limbajul" nucleotidelor în ARNm în "limbajul" de aminoacizi al peptidelor.

## 2.1. CODUL GENETIC.

Informația din structura unei gene este “scrisă” sub forma unei anumite secvențe a celor patru tipuri de nucleotide: A,G,T,C. Ea este copiată (transcrisă) complementar (U,C,A,G) în ARNm și apoi “tradusă” într-o anumită secvență de aminoacizi, care vor forma o catenă polipeptidică; această *translație* se face cu ajutorul unui fel de “dicționar bilingv” care este codul genetic.

Codul genetic reprezintă “un sistem de corespondențe” între o anumită secvență de trei nucleotide numită **codon** și un anumit aminoacid (tabelul 4.2). Cu cele patru “litere” ale alfabetului genetic se pot scrie “cuvinte” alcătuite din trei litere; gena ar fi deci “o frază” formată dintr-o înșiruire de codoni, ce determină o anumită secvență a aminoacizilor într-un polipeptid. Descifrarea<sup>21</sup> codului genetic (1965) a fost o descoperire extraordinară, “mai fantastică decât descifrarea hieroglifelor”, deoarece a marcat decisiv debutul erei biologiei moleculare; de aceea Khorana și Nirenberg au primit premiul Nobel (1968).

**Tabelul 4.2 Codul genetic**

Prima bază	A doua bază								A treia bază
	U		C		A		G		
<b>U</b>	UUU	phe	UCU	ser	UAU	tyr	UGU	cys	<b>U</b>
	UUC	phe	UCC	ser	UAC	tyr	UGC	cys	<b>C</b>
	UUA	leu	UCA	ser	UAA	<b>stop</b>	UGA*	<b>stop</b>	<b>A</b>
	UUG	leu	UCG	ser	CAU	<b>stop</b>	UGG	trp	<b>G</b>
<b>C</b>	CUU	leu	CCU	pro	CAG	his	CGU	arg	<b>U</b>
	CUG	leu	CCC	pro	CAA	his	CGC	arg	<b>C</b>
	CUA	leu	CCA	pro	CAG	gln	CGA	arg	<b>A</b>
	CUG	leu	CCG	pro	CAG	gln	CGG	arg	<b>G</b>
<b>A</b>	AUU	ile	ACU	thr	AAU	asn	AGU	ser	<b>U</b>
	AUC	ile	ACC	thr	AAC	asn	AGC	ser	<b>C</b>
	AUA	ile	ACA	thr	AAA	lys	AGA	arg	<b>A</b>
	AUG	met	ACG	thr	AAG	lys	AGG	arg	<b>G</b>
<b>G</b>	GUU	val	GCU	ala	GAU	asp	GGU	gly	<b>U</b>
	GUC	val	GCC	ala	GAC	asp	GGC	gly	<b>C</b>
	GUA	val	GCA	ala	GAA	glu	GGA	gly	<b>A</b>
	GUG	val	GCG	ala	GAG	glu	GGG	gly	<b>G</b>
<b>Abrevieri pentru aminoacizi</b>									
ala (A) - alanina	gly (G) - glicina	pro (P) - prolina							
arg (R) - arginina	his (H) - histidina	ser (S) - serina							
asn (N) - asparagina	ile (I) - isoleucina	thr (T) - treonina							
asp (D) - acidul aspartic	leu (L) - leucina	trp (W) - triptofanul							
cys (C) - cisteina	lys (K) - lizina	tyr (Y) - tirozina							
gln (Q) - glutamina	met (M) - metionina	val (V) - valina							
glu (E) - acidul glutamic	phe (F) - fenilalanina	X - stop							
* în anumite condiții UGA poate specifica <i>selenocisteina</i> (“al 21-lea aminoacid)									

Fără a intra în detalii vom menționa succint proprietățile codului genetic.

(1). *Codul genetic este triplet* pentru motivul logic că 3 este prima putere a lui 4 (cele patru tipuri de nucleotide) care formează 64 de combinații, suficiente pentru cei 20 de amino acizi care se găsesc în structura proteinelor.

<sup>21</sup>Codul genetic a fost descifrat experimental folosind drept ARNm polinucleotide sintetice cu o secvență cunoscută și analizând secvența de aminoacizi a proteinei sintetizate artificial. De exemplu, ARNm sintetic poliuracil a produs un polipeptid alcătuit exclusiv din fenilalanină; astfel s-a stabilit că tripletul UUU codifică fenilalanină.

(2). *Codul genetic are un codon inițiator (AUG) și trei codoni stop (UAA, UAG, UGA)*, veritabile semne de punctuație cu care se începe și se termină sinteza polipeptidului. Codonii stop sunt numiți și "*codoni nonsens*" deoarece nu semnifică nici un aminoacid. Ceilalți 61 de codoni sunt "*codoni sens*" ce semnifică 20 de amino acizi (tabelul 4.1).

(3). *Codul genetic este degenerat (redundant)* deoarece mai mulți codoni semnifică un același amino acid (de aceea ei se numesc "*codoni sinonimi*"). Exceptând metionina și triptofanul, codificați de un singur codon, ceilalți 18 amino acizi sunt codificați de 2-6 codoni (deseori deosebiți prin al treilea nucleotid). Degenerescența nu s-a stabilit la întâmplare deoarece aminoacizii cei mai reprezentați în proteine sunt cei care posedă cei mai mulți codoni. Cu toată conotația sa peiorativă, *caracterul degenerat al codului genetic este un avantaj* pentru celulă deoarece unele mutații genice ce produc codoni sinonimi nu modifică proteina codificată de genă (mutații  *silențioase* sau *iso-semantic*). Se poate afirma că degenerescența codului genetic este un veritabil *sistem de protecție contra efectelor mutațiilor*.

(4). *Codul genetic este nesuperpozabil* (deoarece codonii vecini nu au un nucleotid comun) și *fără virgule* (întrucât codonii sunt adiacenți, neseparați printr-un nucleotid cu rol de "virgulă"); codonii sunt definiți prin *simpla grupare de câte trei*<sup>22</sup>. Dacă, printr-o mutație, într-unul dintre codon se suprimă (deleție) sau se inseră (adiție) 1-2 nucleotide (sau un alt număr care nu este un multiplu de trei) se produce o *decalare a cadrului de lectură al genei*, rezultând (printr-o nouă grupare câte trei, alți codoni; în proteina sintetizată se modifică *toți* aminoacizii începând cu locul în care s-a produs mutația (numită "*frame-shift*").

(5). *Codul genetic este lipsit de ambiguitate* întrucât un codon semnifică întotdeauna un anumit aminoacid, totdeauna același.

(6). *Codul genetic este universal*, același la toate organismele, bacterie, plantă, animal sau om. Totuși codul genetic mitocondrial are câteva mici diferențe față de cel nuclear (codoni cu sensuri diferite); unele au fost găsite și la levuri, paramecii și la unele arheobacterii. Cu toate aceste foarte mici excepții caracterul universal al codului genetic este evident. Acest lucru este foarte important în "ingineria genetică" deoarece bacteriile recombinante, în care s-a introdus o genă umană, fabrică proteina umană folosind codul genetic bacterian care, în fond, este același ca și la om.

Înainte de a încheia, vom sublinia importanța cunoașterii codului genetic și pentru înțelegerea mecanismului și consecințelor unor mutații genice (punctiforme) ce produc înlocuirea sau inserția/adiția unui nucleotid (tabelul 4.3) (vezi capitolul 6.B.2).

**Tabelul 4.3. Consecințele unor mutații genice prin substituția, inserția sau adiția unui nucleotid într-un codon**

<b>Substituția unui nucleotid</b> AUG UGU AAA CCA Met cis lys pro		
<b>Mutație silențioasă</b> AUG UGC AAA CCA Met cis lys pro	<b>Mutație missens</b> (cu sens greșit) AUG UGG AAA CCA Met trp lys pro	<b>Mutație nonsens</b> AUG UGA AAA CCA Met <b>Stop</b>
<b>Inserția sau deleția unui nucleotid</b> AUG UUU AAA GUU UCG Met – Phe – Lys – Val – Ser		
<b>Mutații frameshift</b> (mutații cu decalarea cadrului)		

<sup>22</sup>Orice deleție sau adiție a unui nucleotid va schimba "cadrul de lectură al genei" deci practic toți codonii (formați prin gruparea câte trei) ce urmează după locul deleției/adiției nucleotidice.

AUG UUU <b>GAA</b> AGU UUC G
Met-Phe – Glu – Ser – Phe

AUG UUU AA-G UUU CGA
Met – Phe – Lys – Leu – Arg

## 2.2. APARATUL DE TRANSLAȚIE.

Aparatul de translație este alcătuit din numeroase componente: ARNm, ribosomii, ARNt, aminoacizi, factori de inițiere, factori de elongație, enzime, surse de energie etc. În sinteză, ARNm furnizează informația (secvența de codoni) care va fi translată într-o secvență de amino acizi în proteină; el se fixează pe ribosom (o particulă alcătuită din ARNr și proteine) și care reprezintă platforma de sinteză a polipeptidului. ARNt fixează un aminoacid specific și apoi amplacează acest aminoacid în polipeptid, folosind informația din ARNm

**a). Ribosomii** sunt organite citoplasmatic (descrise de George Emil Palade, premiul Nobel, în 1974), veritabile "*platforme de asamblare a aminoacizilor în proteine*" pe baza instrucțiunilor ARNm. Ribosomii eucariotelor sunt alcătuiți din două subunități inegale, [deosebite prin constanta de sedimentare (S): 40S și 60S], care sunt de obicei disociate și libere în citoplasmă; ele *se reunesc* la începutul translației pentru a forma *ribosomul activ*. Fiecare subunitate este alcătuită din **ARN ribosomal** și proteine<sup>23</sup>, care au rol structural și funcțional/catalitic (facilitează: fixarea moleculelor de ARNm și ARNt la ribosom; deplasarea ribosomului, ș.a.). Ribosomii prezintă patru *situsuri funcționale*: pe subunitatea mică se află situsul de fixare al extremității 5' a ARNm iar pe subunitatea mare: situsul P (*peptidil*) și A (*aminoacil*) unde se fixează moleculele de ARNt cuplate cu aminoacizii lor specifici, precum și situsul de fixare al peptidil-transferazei, enzima ce polimerizează aminoacizii într-un polipeptid. În procesul de translație, ribosomii *se deplasează* în lungul moleculei de ARNm, spre capătul 3'. Pe măsura deplasării, alți ribosomi pot începe translația aceleiași molecule de ARNm, alcătuiind împreună un **poliribosom**.

**b). ARN de transfer (ARNt)** *transportă* aminoacizii din citoplasmă la ribosomi, locul sintezei proteice. Aici ARNt *recunoaște* codonul din ARNm corespunzător aminoacidului respectiv, pe care îl poziționează în dreptul acestui codon; deci ARNt are rolul de "*translator*".

ARNt este un micropolimer de ribonucleotide (75-100 nucleotide), monocatenar, cu o structură secundară și terțiară "în treflă" (figura 4.17), relativ identică la toate tipurile de ARNt. El posedă două situsuri importante):

- extremitatea 3'OH este terminată prin *nucleotidele CCA*, iar la poziția 3' a ribozei adeninei se fixează aminoacidul transportat, cu ajutorul unei enzime *aminoacil-ARNt-sintetaza*;
- *anticodonul*, un grup de trei nucleotide situat în bucla opusă extremității 3'OH; el recunoaște, prin complementaritate, codonul din ARNm corespunzător aminoacidului<sup>24</sup>.

**c). Enzimele și cofactorii proteici** ai translației sunt, deasemeeai elemente importante. În procesul de translație sunt implicate amino-acil-ARNt-sintetazele și peptidil-transferaza. **Aminoacil-ARNt-sintetazele** sunt 20 de enzime cu o dublă specificitate: recunosc fiecare un anumit aminoacid (foarte probabil pe baza configurației sale spațiale) precum și ARNt corespunzător. În acest proces de "încărcare", mecanismul de recunoaștere între o anumită enzimă și ARNt specific a fost recent descifrat: enzima recunoaște specific fie

<sup>23</sup>La eucariote subunitatea mică are un tip de ARNr (18S) și 33 proteine ribosomale iar cea mare trei tipuri de ARNr (5S, 5.8S, 28S) și 45 proteine ribosomale. Moleculele de ARNr sunt codificate de gene prezente în mii de copii pe brațele scurte ale cromosomilor acrocentrici, care formează "regiunile organizatoare de nucleoli". Structura ARNr și a proteinelor ribosomilor la procariote este diferită de cea de la eucariote și acest lucru are o importanță deosebită deoarece unele antibiotice (de ex., streptomcina) care acționează la nivelul ribosomilor sunt active la bacterii și fără efect asupra ribosomilor și sintezei proteice la om.

<sup>24</sup>Teoretic ar trebui să existe în celulă 61 de molecule diferite de ARNt pentru cei 61 de codoni sens. În realitate numărul lor este mai mic (~40) dar superior celor 20 de aminoacizi; deci un același tip de aminoacid va fi purtat de mai mulți ARNt specifici (iso-acceptori), diferiți prin anticodonul lor prin al treilea nucleotid; această flexibilitate este denumită în limba engleză "*wobble*" (a șovăi).



anticodonul unor molecule de ARNt fie o pereche de nucleotide (de exemplu, UG pentru E+alanină) situate spre extremitățile terminale 5' și 3' ale ARNt (figura 4.17); ele formează un veritabil *al doilea cod genetic*. **Peptidil-transferaza** catalizează formarea legăturii peptidice între doi aminoacizi.

**Cofactorii proteici** intervin în diferite etape ale translației. Ei sunt reprezentați de *factorii de inițiere* (IF 1-6), factorii de elongație (EF 1-2) și un factor de terminare (RF). Inactivarea lor (prin diferite toxine microbiene) blochează procesul de translație și produce moartea celulară.

### 2.3. PROCESUL DE TRANSLAȚIE.

Translația se realizează în trei etape succesive: inițierea, elongația și terminarea translației (figura 4.18); fiecare etapă implică molecule diferite și necesită energie (furnizată de ATP sau GTP).

**Inițierea translației** este o etapă complexă care, în esență, va plasa primul aminoacid (AA) al proteinei (de la extremitatea sa NH<sub>2</sub>-terminală) în dreptul codonului inițiator AUG din ARNm, ce corespunde metioninei, și va asambla în această poziție cele două subunități ce vor forma ribosomul activ.

Într-un prim timp, ARNm se fixează (cu *Cap* și secvența 5'.CCACCAAUGC-3') pe subunitatea mică a ribosomului<sup>25</sup>; apoi, se formează un *complex de inițiere* între ARNm, ARNt-1 "Încărcat" cu AA-1 (metionină) și diferiți factori de inițiere ai translației (IF2, IF3) cu rol catalizator; anticodonul ARNt-inițiator este în contact cu codonul AUG al ARNm. Apoi, prin acțiunea unui alt IF, se fixează subunitatea mare 60S și ribosomul devine *activ*, deci capabil de a participa la sinteza polipeptidică. ARNt-inițiator se va pala direct în situsul P al subunității mari a ribosomului (figura 4.18).

**Elongația** este o etapă relativ simplă și repetată succesiv în cursul căreie se formează legături peptidice între AA așezați secvențial pe baza ordinii codonilor din ARNm.

După plasarea ARNt1 în poziția P a ribosomului în situsul A (amino-acil) liber vine și se plasează ARNt-2 încărcat<sup>26</sup> cu AA-2, codificat de al doilea codon din ARNm. În acest moment, sub acțiunea enzimei **peptidil-transferaza** se realizează *legătura peptidică* între primii doi aminoacizi, formându-se un dipeptid (legat la ARNt2). După formarea dipeptidului, sub influența factorului de elongație EF2, GTP și a unei *translocaze*, ribosomul se deplasează cu trei nucleotide în lungul ARNm, în direcția 5'→3'. Astfel ARNt-1 este scos din situsul P care va fi ocupat de ARNt-2, care poartă dipeptidul<sup>27</sup>. În situsul A eliberat se fixează ARNt-3 cu AA-3 și, printr-o nouă legătură peptidică, AA-3 este fixat la dipeptid.

Ciclul celor trei faze (acroșarea AA~ARNt la ribosom, formarea legăturii peptidice, translocarea ribosomului) se repetă și astfel catena polipeptidică crește la fiecare ciclu cu un amino acid. De subliniat că pe măsură ce un ribosom avansează în lungul catenei de mRNA alți ribosomi<sup>28</sup> pot începe "lectura" acestei catene formându-se astfel sute sau mii de molecule proteice identice ("*amplificare*"). Desigur în procesul de sinteză a polipeptidului se pot produce erori dar ele sunt corectate prin diferite mecanisme, ce implică diferite enzime și factori de elongație.

**Terminarea.** Elongația polipeptidului **se oprește** când ribosomul ajunge la un codon stop, situsul de terminare a translației. I

<sup>25</sup>Asociere ARNm la această subunitate și potrivirea exactă a codonului AUG se face printr-o secvență purinică specială, situată chiar înaintea codonului inițiator și complementară unei secvențe pirimidinice din ARNr subunității mici. Un rol cert dar încă neclar are și structura "*cap*" de la extremitatea 5' a ribosomului

<sup>26</sup>Fixarea este favorizată de un factor de elongație, EF1.

<sup>27</sup>Trecerea ARNt din situsul P în A se numește *translocație*.

<sup>28</sup>Ribosomii fixați la aceeași moleculă de ARNm formează "*un polisom*" (sau poliribosom).

n acest moment se produce dezasmblarea complexului ribosom-ARNm-poliipeptid (prin intervenția unui factor proteic, RF) și poliipeptidul este eliberat din ribosom. Ribosomul poate fi reciclat pentru o nouă sinteză iar poliipeptidul suferă o serie de modificări posttrnslanționale și capătă forma tridimensională specifică

### 3. LOCALIZAREA PROTEINELOR

Fiecare proteină, sintetizată pe baza informațiilor unei gene, funcționează într-un anumit compartiment celular; de ex., tubulina-în citosol; histonele-în nucleu; succinat coenzima A reductaza-în mitocondrii; glicozil-transferazele-în aparatul Golgi; receptorii hormonilor peptidici-pe membrana celulară; colagenul-în spațiul extracelular etc. Orice proteină cu o localizare specială posedă în structura ei una sau mai multe "secvențe-semnal" care vor determina, ca un veritabil "cod poștal", adresa sa de destinație.

O primă sortare a poliipeptidelor nou sintetizate separă proteinele care vor ramâne în interiorul celulei de cele care vor fi "exportate"/excretate la exteriorul celulei. Această decizie inițială este determinată de prezența unei secvențe de 15-30 aminoacizi (hidrofobi), situată la capătul N terminal al proteinelor care vor fi excretate; ea se numește **peptid signal** (semnal peptidic) și lipsește la proteinele cu destinație intracitoplasmatică. După ce s-au încorporat circa 70 de AA dintr-o proteină excretată, secvența semnal devine "vizibilă" din canalul ribosomic și pe ea se fixează o particulă numită SRP (*Signal Recognition Particule*)<sup>29</sup>, care oprește tranlația. Complexul *SRP-semnal peptidic* recunoaște și se fixează pe un receptor ("*docking protein*") situat pe suprafața citosolică a reticulului endoplasmic (RE) (figura 4.19). După fixare, semnalul peptidic traversează membrana RE iar ribosomii ce efectuează tranlația se fixează la RE; apoi particula SRP este eliberată și tranlația se reia dar poliipeptidul sintetizat este dirijat în lumenul RE (unde secvența peptidică care "și-a făcut datoria" a fost deja clivată), fiind apoi transportat la exteriorul celulei.

Printr-un mecanism asemănător se realizează transportul proteinelor nucleare sau mitocondriale sau celor destinate aparatului Golgi. În cazul proteinelor lizozomale și membranare mecanismele sunt diferite. Proteinele (proteazele) destinate lizozomilor au o secvență de aminoacizi care determină adiția posttrnslanționă a *manozei-6-fosfat*; această modificare determină dirijarea acestor glicoproteine din RE sau aparatul Golgi în interiorul lizozomilor. Dacă accidental modificare nu se produce transportul proteazele lizozomale neprocesate va fi anormal (în mucopolidoze și boala celulei I). Proteinele atașate la membrană se fixează prin secvențe peptidice și SRP la un receptor din vecinătatea unui por membranar; ele încep să traverseze membrana prin acest por până când se ajunge la o secvență ce oprește transferul și determină inserția proteinei în pătura lipidică a mebranei.

### 4. MODIFICĂRILE POST-TRANLAȚIONALE ALE PROTEINELOR.

Pe măsură ce un poliipeptid se sintetizează, în anumite zone se formează prin repliere *structuri secundare* ( $\alpha$ -elice în proteinele fibrilare sau  $\beta$ -pliere, în proteinele globulare) (figura 4.6) prin interacțiuni (punți de hidrogen, punți disulfidice) între diferiți aminoacizi învecinați sau situați mai la distanță; în felul acesta, la sfârșitul sintezei, poliipeptidul ia configurația spațială, tridimensională, specifică, care îi determină activitatea.

Structura tridimensională a proteinelor este rezultatul interacțiunilor fizice care se stabilesc între aminoacizii constituenți. Cu toate acestea s-a constatat că plicaturarea inițială a moleculelor proteice este un proces mediat de o serie de proteine numite "*chaperones*" (Hsp60, Hsp70 și Hsp90). Ele se cuplează la nivelul lanțului poliipeptidic nascent și previn mai întâi inițierea plicaturării extremității N-terminale până când întregul proces de tranlație nu este finalizat. De asemeni, proteinele chaperones au un rol important

<sup>29</sup> SRP este alcătuită din 6 proteine și o mică moleculă de ARN 7SL,

în cazul proteinelor care trebuie transportate în diferite compartimente celulare, precum mitocondriile sau reticulul endoplasmatic, prevenind plicaturarea acestora până la atingerea destinației.

În afara modificărilor conformaționale, polipeptidele pot suferi și alte modificări calitative, permanente sau reversibile care, în esență, fac ca o proteină să devină activă.

Modificările reversibile ale proteinelor sunt reprezentate în special de *acetilarea Lys* (în cazul histonelor) sau *fosforilarea Ser* (în cazul kinazelor); aceste modificări pot influența, uneori decisiv, activitatea proteinei.

Modificările permanente pot fi de asemenea numeroase și importante.

- *Clivarea proteolitică a catenei peptidice*. După sinteza catenelor polipeptidice are loc cel mai adesea clivarea metioninei inițiale și, la unele proteine, a mai multor aciziaminați de la extremitatea NH<sub>2</sub> (secvența "peptid signal"). Numeroase proteine sunt sintetizate sub forma unui precursor *inactiv* (pro-hormon, proferment) care nu poate acționa asupra substratului; după sinteză, precursorul este clivat proteolitic și rezultă o proteină matură, activă funcțional. Un exemplu sugestiv este reprezentat de sinteza insulinei (figura 4.20). Alteori dintr-un singur precursor proteic (de exemplu, proopiomelanocortina) se pot produce mai multe polipeptide cu funcție diferită
- *Hidroxilarea unor aminoacizi*, de exemplu prolina și lizina în cazul colagenului, asigură stabilitatea unor complexe proteice (tripla elice de colagen).
- *Glicozilarea* este un proces întâlnit în cazul glicoproteinelor, care sunt de regula fie secretate, fie localizate la suprafața celulelor. Glicozilarea poate fi inițiată la nivelul RE (N-glicozilarea unei asparagine prin adăugarea unui oligozaharid comun alcătuit din 14 reziduuri glucidice care va fi procesat ulterior) sau în interiorul aparatului Golgi (O-glicozilarea unei serine prin atașarea unui rest de N-acetilglucozamină sau a unei treonine).
- *Adăugarea de lipide* este caracteristică proteinelor care vor fi ancorate în membrana plasmatică. În cazul proteinelor care se vor localiza la fața internă a membranei plasmatică pot fi întâlnite trei tipuri principale de adiții lipidice: N-miristoilarea (la nivelul glicinei situate la extremitatea amino a proteinelor), prenilarea (la nivelul lanțurilor laterale ale aminoacizilor ramificați: cisteina, serina și treonina) și palmitoilarea (la nivelul atomului de sulf al cisteinei). În cazul proteinelor care se localizează la fața externă a membranei plasmatică sunt atașate grupări glicolipidice, de regulă la capătul C-terminal al lanțului peptidic.

Proteinele pot fi compuse din unul sau mai multe polipeptide (formând o proteină multimerică; de exemplu, hemoglobina, fibrele de colagen etc), fiecare fiind supuse unor modificări posttranslaționale. Astfel, ele pot interacționa cu o serie de *cofactori specifici* (de exemplu, cationi bivalenți Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> sau molecule mici necesare activității enzimatice, cum ar fi NAD<sup>+</sup>) sau *liganzi*. Toate acestea vor influența puternic conformația și deci activitatea proteinei.

## 5. SINTEZA PROTEINELOR , ORIGINEA ȘI EVOLUȚIA VIEȚII .

Originea acizilor nucleici și a proteinelor, a codului genetic, a aparatului și mecanismului de translație sunt probleme interesante și actuale, deoarece ele reprezintă, în esență, substratul biochimic al originii vieții. Faptele certe sunt puține iar ipotezele numeroase și divergente. Dogma centrală a geneticii: **ADN → ARN → proteine** implică existența unor molecule informaționale dar și a unor proteine catalitice care să realizeze diferitele etape ale transferului informației genetice. Se pune firesc întrebarea: cine a apărut mai întâi pe Pământ, proteinele sau acizii nucleici; dacă se acordă prioritate acizilor nucleici atunci nimeni nu poate răspunde la întrebarea: cum a fost posibilă replicarea, transcripția sau translația acizilor nucleici în absența unor proteine catalitice. Astfel, la nivel molecular, clasică dilemă "oul sau găina" se traduce printr-o nouă dilemă "acizii nucleici sau proteinele".

ADN nu poate fi "molecula originară" deoarece este lipsită de activități catalitice. Recent s-au descoperit însă **ribozimele**, molecule de ARN dotate cu activitate catalitică și s-a presupus că ARN ar putea fi în același timp o moleculă informațională și enzimatică, putând să realizeze singură stocarea, conservarea și expresia informației ereditare. S-ar putea deci prezuma că viața a început "în supa prebiotică" prin formarea spontană a moleculelor de ARN, amino acizi și polipeptide care, acționând în simbioză, ar fi realizat complexe ribonucleoproteice capabile de "proliferare și perenizare". Foarte probabil, ARN a apărut înaintea ADN. Caracterul chimio-reactiv al sistemului determină însă instabilitatea sa și riscul de auto-distrugere. Pentru a evita acest lucru s-a trecut la o etapă superioară "acizi nucleici bicatenari", prin asocierea a două molecule complementare de ARN. Această structură mult mai complexă pierde activitatea enzimatică (preluată de alte molecule polipeptidice) dar asigură stabilitate precum și perpetuarea informației, prin replicare.

Caracterul universal al codului genetic permite ipoteza logică că toate organismele vii au avut un strămoș comun. El avea un cod genetic deja "elaborat", identic cu cel actual; în cursul evoluției acest cod genetic a rămas "înghețat", nu a suferit modificări. Se poate concluziona că apariția codului genetic și a aparatului său traducător s-a făcut deci în etapa prebiotică. Acizii nucleici, primul "pas" al evoluției biologice, au apărut pe cale *abiogenă* și apoi s-au specializat, unii jucând rol de matriță, alții pe cel de translați. Astfel, acizii nucleici au dobândit capacitatea de a dirija asamblarea aminoacizilor (apăruți prin același mecanism abiogen). Inițial ei realizau acest proces ambiguu și bidirecțional; ulterior, selecția și evoluția au exclus ambiguitatea și au stabilit un sens unidirecțional de lectură a informației din ADN. Evident, în absența unor "molecule fosile", toate acestea rămân la nivel de ipoteze.

O problemă, corelată cu evoluția inițială a lumii vii, este absența intronilor la bacteriile actuale și prezența lor la eucariote sau ...la bacteriile fosile de tip arheobacterii. Până nu de mult se considera că organismele eucariote provin dintr-o bacterie. Ori, această idee pare greșită: procariotele și eucariotele actuale provin probabil dintr-un strămoș comun asemănător arheobacteriilor, care posedă un genom cu introni. Probabil că și codul genetic avea mici diferențe față de cel actual, fiind foarte asemănător cu cel al mitocondriilor. Evoluția s-a făcut prin pierderea intronilor, totală la procariotele actuale parțială la eucariote<sup>30</sup>. Deci bacteriile actuale, lipsite de introni ar fi ...punctul maxim al evoluției (!!) deoarece utilizarea ADN este mai performantă decât la eucariote. Explicația s-ar putea baza pe timpul de înmulțire foarte scurt (minute) ce face posibilă succesiunea în timp a unui număr aproape infinit de generații, oricum mult mai mare ca al eucariotelor superioare. Această schemă seducătoare nu explică însă amplificarea taliei genomului odată cu "pășirea" pe treptele superioare ale evoluției eucariotelor.

O altă problemă vizează însăși originea genelor actuale cu o structură "în mozaic". Compararea (cu ajutorul ordinatoarelor) a secvenței de aminoacizi a diferitelor proteine relevă la unele proteine existența unor domenii comune cu ale altor proteine. Spre exemplu, în structura receptorilor pentru lipoproteinele LDL există un domeniu care se găsește în structura proteinei C9 a complementului sau alte domenii care există în receptorul EGF (*epidermal growth factor*) în factorul IX a coagulării sau proteinei C. Deoarece fiecare domeniu este codificat de un anumit exon, se poate conchide că genele care determină proteinele respective au exoni comuni. Pentru a explica acest fenomen s-a presupus că "...genele pentru proteinele actuale s-au format ca jocul de Lego" adică, prin asamblarea unor exoni (ce ar putea fi niște "gene mai mici") ce codifică anumite unități funcționale, într-o structură mai complexă, deci o genă "mai mare" ce determină o proteină mai complexă, cu proprietăți specifice; mai clar, aceeași exoni ar fi fost folosiți în asamblarea unor gene

<sup>30</sup>Studiul genelor pentru actină la diferite organisme relevă diferențe în numărul intronilor, care scade odată cu evoluția.

diferite. Intronii prezenți încă de la primele bacterii ancestrale ar fi, în această concepție, “fragmente de gene nefuncționale”

## D. REGLAREA EXPRESIEI GENELOR.

Celulele corpului uman, indiferent de structura și funcția lor, posedă aceeași informație genetică, deoarece rezultă prin mitoze succesive din zigot. Expresia genică este însă diferită. Unele gene (constitutive / domestice, de la *housekeeping genes*) sunt exprimate continuu, în toate tipurile celulare, fiindcă produșii lor proteici sunt necesari permanent celulei (sinteze proteice, producere de energie etc); multe alte gene au o expresie limitată la anumite țesuturi specifice iar altele sunt complet și permanent inactivate. În plus, expresia genelor „autorizate” să se exprime prezintă o *limitare spațială* (pentru anumite organe, țesuturi, celule, componente celulare) și *temporală* (stadii diferite ale dezvoltării, diferențierii, ciclului celular), fiind adaptată la natura și intensitatea stimulilor extracelulari (factori inductibili). Toate aceste fenomene presupun intervenția unor mecanisme complexe de control a expresiei genice.

Mecanismele de reglare ale expresiei genelor au fost descifrate inițial la procariote; ele se bazează pe celebrul “model al operonului” descris în 1961 de către Jacob și Monod la *E. coli*. (Premiul Nobel, 1965).

Operonii regroupează într-o singură unitate funcțională mai multe gene de structură (ce codifică enzime diferite care sunt însă implicate în același lanț metabolic), precum și gene de reglare a transcripției.

Genele reglatoare produc prin intermediul unor substanțe (represori) inactivarea sau activarea genelor de structură, de obicei sub acțiunea unor factori de mediu (inductori, corepresori).

Mecanismele de reglaj genic descrise la procariote nu sunt însă decât parțial aplicabile la eucariote (reglarea inductibilă), și deci la om, pentru două motive esențiale: genomul uman nuclear este *enorm* (comparativ cu al bacteriilor) și puternic *compactat* în fibrele de cromatină, în nucleu. Recunoașterea și activarea unei secvențe scurte de nucleotide, corespunzătoare unei gene, într-un timp minim este foarte dificilă. De aceea în celulele diferențiate, anumite gene sunt deja *preselecționate*, prin modificarea dispoziției cromatinei.

La eucariote funcționează în mod cert *mecanisme de reglaj multiple* ce acționează în fiecare etapă (la niveluri diferite) a exprimării genelor sau “fluxului de informație” **ADN → ARNm → proteine**; ele sunt adesea înlănțuite și/sau arborescente, reducând considerabil efortul de *selecție al unor gene* ce trebuie exprimate și permițând o *ajustare a vitezei și intensității reacției* la diferiți stimuli. Etapa principală a reglării expresiei genice se desfășoară în toate celulele la nivelul inițierii transcripției ADN (controlul transcripțional, ce vizează recrutarea, poziționarea și activarea ARNpolimerazei II). Dar mecanismele de control acționează și la celelalte niveluri, post-transcripționale, în care este implicat ARNm (procesarea preARNm, transportul și stabilitatea ARNm, translația, procesarea proteinelor).

Mecanismul molecular comun pentru majoritatea formelor de reglare a expresiei genice este reprezentat de fixarea și interacțiunea unor factori proteici la secvențele de reglare ale acizilor nucleici, situate în vecinătatea genei (pe ADN) sau pe ARN transcris. Factorii proteici reglatori sunt codificați de gene situate la distanță; deoarece ei trebuie să “migreze” la situsul de acțiune sunt numiți generic **factori trans-reglatori** (sau trans-activi). Secvențele de reglare la care se fixează acești factori se găsesc în aceiași regiune ADN sau moleculă de ARN ca și gena sau transcriptul ARN ce trebuie reglat; de aceea aceste secvențe se numesc generic **elemente cis-reglatoare** (sau cis-active). În afară de factorii genetici, controlul expresiei genice poate fi influențat și de factori negenetici (care nu interesează secvența de nucleotide a ADN), cu alte cuvinte informația genetică rămâne nemodificată și, de aceea, au fost denumite **modificari epigenetice** (*epi* – peste).

## 1. REGLAREA PRETRANSCRIPTIONALĂ (EPIGENETICĂ) A EXPRESIEI GENICE

Reglarea pretranscripțională a expresiei genice vizează manifestarea lor “spațială” în anumite organe, țesuturi, linii sau tipuri celulare și chiar celule individuale. După cum se știe, conținutul în ADN al tuturor celulelor umane nucleate (provenite prin mitoze succesive din zigot) este virtual identic dar, exceptând genele “domestice/constituționale” care se exprimă în toate celulele (deoarece codifică proteine esențiale pentru viața celulei), toate celelalte gene au o expresie specific tisulară sau celulară. Aceasta presupune *selecția* anumitor gene în celulele embrionare diferențiate și *menținerea* acestei expresii diferențiate în descendența lor. Ambele fenomene sunt realizate prin intervenția unor mecanisme epigenetice și a unor mecanisme de control la distanță prin structura cromatinei.

### 1.1 MECANISMELE EPIGENETICE

În nucleul celulelor, moleculele de ADN formează cu histonele structuri compacte sub forma fibrelor de cromatină. Pentru ca să se inițieze transcripția unei gene trebuie ca factorii proteici de reglare să aibe acces la promotorul genei. Aceasta implică o modificare a structurii cromatinei, mai ales în regiunile de eucromatină, active transcripțional. În general este vorba de o serie de *modificări ale histonelor* sau de *metilarea ADN* (mecanism general de menținere a represiei transcripției). Toate aceste **modificări epigenetice** au două trăsături esențiale: *caracterul reversibil* (care le fac extrem de utile în reglarea expresiei genice) și *potențialul lor ereditar* (se pot transmite în succesiunea generațiilor, precum și în cursul diviziunilor celulare).

#### a). Modificări ale histonelor

Modificările histonelor (metilare, acetilare, fosforilare și ubiquitinare) au rol important în reglarea expresiei genice și reprezintă un marker epigenetic esențial. Aceste modificări interesează “cozile aminotermiale” ale histonelor, bogate în aminoacizi precum lizina, arginina și serina, care sunt “ținta” modificărilor epigenetice. Fiecare dintre modificările menționate mai sus interesează specific anumiți aminoacizi.

(1). **Metilarea histonelor** poate avea loc la nivelul mai multor reziduuri de lizină sau arginină ale acestor histone, dar cele mai importante sunt: metilarea la nivelul rezidului Lys4 al histonei H3 (H3-K4) care este asociată cu *expresia activă* a genelor, respectiv metilarea rezidului Lys9 al histonei H3 (H3-K9) care este asociată cu *atenuarea transcripției*. Aceste modificări sunt rezultatul activității unor histon-metiltransferaze.

(2). **Acetilarea histonelor** se afla sub controlul unor histon-acetiltransferaze (HAT) care determina o *relaxare* a structurii cromatinei ce favorizează transcripția și, respectiv a unor histon-deacetilaze (HDAC) care produc o *compactarea* a structurii cromatinei și suprimarea transcripției.

Modificările histonelor se asociază cu modificări ale structurii cromatinei. Cromatina inactivă transcripțional se află într-o conformație puternic condensată și asociată cu fixarea strânsă a histonei H1. În schimb cromatina activă adoptă o conformație “mai deschisă” produsă de acetilarea histonelor nucleosomale și, probabil, de hipometilarea citozinei. În sfârșit, există o serie de **modificări ale cromatinei** induse componenta SWI/SNF a complexului transcripțional care, în prezența ATP, desfăcă structura nucleosomilor și favorizează transcripția.

#### b). Metilarea ADN.

Metilarea ADN este al doilea marker epigenetic esențial. La om, metilarea ADN are loc aproape exclusiv în poziția 5' a citozinei din cadrul *dinucleotidelor CpG*<sup>31</sup>, concentrate în anumite regiuni denumite *insule CpG*, localizate foarte adesea la nivelul regiunilor promotor a numeroase gene, precum și în interiorul unor gene amprentate (vezi mai jos). Metilarea ADN este guvernată de acțiunea unor **ADN-metiltransferaze** și, probabil, a unor ADN-demetilaze.

Au fost identificate două clase importante de ADN-metiltransferaze: *DNMT1* este metiltransferaza de menținere, care metilează dinucleotidele CpG din catenele ADN nascente în cursul procesului de replicare a ADN; funcția sa este esențială în menținerea modelului de metilare a ADN în succesiunea generațiilor de celule (figura 4.21). *DNMT3A* și *DNMT3B* sunt metiltransferaze *de novo*, implicate în stabilirea modelului nou de metilare a ADN în diversele etape ale dezvoltării. DNMT1 și DNMT3A interacționează cu histon-deacetilazele (HDAC) și ca urmare pot repressa transcripția. Ca urmare, între metilarea ADN și deacetilarea histonelor există o stransă interdependență.

Metilarea ADN asociată cu deacetilarea histonelor (care crește gradul de condensare al cromatinei) reprezintă mecanismul principal de represie al transcripției la vertebrate și poate fi considerată ca “o poziție standard”. Toate secvențele care sunt transcrise activ trebuie să fie nemetilate (cel puțin în regiunea promotor). Pentru aceasta pledează modificările în metilare care au loc în timpul gametogenezei și dezvoltării embrionare.

Dezvoltarea embrionară precoce necesită capacitatea de a activa numeroase gene, urmată de inactivarea selectivă a unora dintre acestea, pe măsură ce are loc diferențierea celulară. Aceasta reprogramare a întregului genom a fost demonstrată a apare imediat după fertilizare și este consecința, cel puțin în parte, a unei demetilări rapide a ambelor genomuri parentale asociată cu decondensarea cromatinei și activarea genelor esențiale dezvoltării precoce. Demetilarea apare inițial la nivelul pronucleului masculin și se pare că prin mecanisme active (intervenția unor ADN-demetilaze), pentru ca după formarea zigotului să continue pasiv, la nivelul întregului genom nou constituit (figura 4.22). Până în stadiul de blastocist majoritatea genomului este demetilată, excepție făcând genele amprentate (vezi mai jos). După implantarea embrionului au loc fenomene de metilare *de novo* care sunt asociate cu stabilirea diferitelor linii celulare și, deci, cu diferențierea celulară. Metilarea apare inițial la nivelul celulelor interne ale blastocistului care vor forma ulterior viitorul embrion, în timp ce celulele care formează trofoblastul (din care deriva placenta, sacul galben etc.) rămân hipometilate.

Metilarea ADN poate interveni în represia expresiei genice prin câteva mecanisme distincte. În primul rând, prezența grupărilor metil atașate ADN poate inhiba legarea unor factori de transcripție la secvențele lor țintă. În al doilea rând, represarea expresiei genice poate fi mediată de către o serie de proteine (MECP2, MBD1, MBD2, etc) etc care au capacitatea de a recunoaște și a se lega specific la grupările metil atașate citozinei.

Cunoașterea acestor fenomene este departe de a fi încheiată dar consecințele practice încep să se întrevadă. Vom menționa două aspecte:

- O serie de proteine implicate în reglarea metilării ADN sau a reglării metil-dependente a expresiei genice au fost identificate recent a fi ținta mutațiilor care produc câteva *boli genetice*. Astfel, mutațiile MECP2 sunt responsabile de producerea **sindromului Rett** (OMIM 312750) boală genetică dominantă legată de X, letală la sexul masculin, caracterizată prin dezvoltare neurologică normală până la vârsta de 7-18 luni urmată de o deteriorare rapidă a funcțiilor neurologice cu demență, autism, mișcări caracteristice ale mâinilor, ataxie și microcefalie dobândită. Mutațiile DNMT3B sunt asociate

---

<sup>31</sup> Reamintim că litera *p* desemnează aici legătura fosfodiester ce există între C și G și nu punțile de hidrogen ce se stabilesc între catenele complementare)

**sindromului ICF** (OMIM 242860), boală autosomal recesivă caracterizată prin anomalii faciale, imunodeficiență și hipometilarea regiunilor cu ADN satelit ale cromosomilor 1, 9 și 16, cu instabilitatea cromosomilor respectivi.

- O caracteristică a modificărilor epigenetice amintite (modificări ale histonelor și metilarea ADN) este *potențialul lor reversibil*, ceea ce a condus la posibilitatea dezvoltării unor noi ținte terapeutice în diverse boli în care aceste mecanisme de reglare sunt perturbate. Așa sunt azacitidina și decitabina, inhibitori ai metilării ADN sau acidul hidroxamic, inhibitor al histon-deacetilazelor (HDAC).

#### c) Variații în configurația ADN

Așa cum am precizat în capitolul 2.B.2, structura ADN nu este fixă, rigidă. Ea poate suferi o serie de modificări conformaționale care influențează interacțiunea dintre anumite secvențe ale ADN și diferite molecule exogene reglatoare. **Supraîntrularea ADN** (controlată de *topoisomerase*) ar face bazele din regiune promotor a genelor mai accesibile proteinelor reglatoare. Mutațiile genelor pentru *topoisomerase* sau inhibitorii acestor enzime produc o diminuare importantă a transcripției unor gene.

Trecerea de la forma B a ADN unor gene la **forma Z a ADN** ar putea fi vitală pentru reglarea activității genice. Astfel, la nivelul unei gene care codifică o componentă a sistemului imun s-a dovedit că secvența reglatorie din regiunea promotor este mai întâi convertită în forma de ADN-Z și abia apoi este activată. Spre deosebire de concepția clasică se consideră că trecerea tranzitorie în configurația Z ar face secvențele ADN mult mai accesibile la factorii de transcripție.

Au fost identificate și alte variații de la forma elicoidală clasică a ADN. Astfel, porțiunea monocatenară a ADN, cu care se termină telomerele fiecărui cromosom, formează o buclă care se plicaturează și determină un aspect de **quadruplex** (quadruplex G). Asemenea structuri au fost însă identificate și în alte regiuni ale ADN bogate în G; de exemplu, în imediata vecinătate a genei c-MYC, implicată în producerea multor cancere. Mutațiile care determină abolirea acestei structuri au drept consecință activarea acestei oncogene.

În sfârșit, există situații în care expresia unor gene este asociată cu o adevărată **reconfigurare a genomului** produsă prin *recombinari somatice*. Așa este cazul genelor implicate în sinteza imunoglobulinelor sau a receptorilor TCR.

## 1.2 IMPLICAȚII ALE MECANISMELOR EPIGENETICE ÎN CONTROLUL EXPRESIEI GENICE

### a) Controlul la distanță al expresiei genice

La eucariote majoritatea genelor sunt transcrise individual. Totuși s-au descris elemente cis-actives care exercită un control la distanță asupra unei regiuni cromosomice ce conține un grup de gene, a căror activitate va fi reglată în mod coordonat. De asemenea, foarte probabil, cromosomii sunt organizați în *domenii funcționale de expresie genică* (domenii de cromatină) active (eucromatină) sau inactive (heterocromatină), separate de *elemente de graniță* (numite și "*insulators*") ce împiedică răspândirea efectelor secvențelor activatoare (enhancer) și atenuatoare (silencer) de la o regiune la alta. Se pare că există o organizarea funcțională a cromosomilor în domenii cromatiniene cu expresie genică diferită.

#### (1). Reglarea expresiei genelor prin "efecte de poziție"

O dovadă elegantă a existenței unor domenii de cromatină cu activități transcripționale diferite a fost adusă de rearanjamentele cromosomice care, atunci când re poziționează o genă activă în proximitatea unor blocuri de heterocromatină centromerică sau telomerică, pot suprima expresia genică. Acest **efect de poziție** demonstrat inițial la *Drosophila* a fost identificat recent și la om. Astfel, în **distrofia musculară facio-scapulo-humerală**, boală



neuromusculară progresivă, autosomal dominantă, gena FSHD este situată aproape de telomerul cromosomului 4q; în cazul în care se produce o deleție a segmentului intercalar aflat între genă și blocul de heterocromatină telomerică se reduce distanța dintre ele, gena este repressată printr-un efect de poziție. Fenomene asemănătoare s-au descris și în alte boli.

Existența unor secvențe nucleotidice care controlează la distanță un domeniu de cromatină mai larg a rezultat din studiul bolilor asociate cu rupturi cromosomice. Astfel, activitatea genelor *PAX6* de pe 11p13 și *SOX9* de pe 17q24 poate fi suprimată prin rupturi produse la sute de Kb de aceste gene (care sunt normale și nemodificate ca localizare); este vorba de un efect la distanță analog efectului de poziție descris mai sus.

## (2). Reglarea coordonată a expresiei genelor (“locus control region”)

Se presupune că unul din efectele diferențierii celulare este de a *selecta genele* ce vor fi transcrise într-o anumită celulă și de a le *plasa într-o configurație spațială specială* (de tipul unei bucle cromatinice) care face promotorii genelor din această structură mai accesibili la ARN polimerază și la factorii de transcripție. S-a demonstrat, de exemplu, că genele din familia alfa-globinei ( $\zeta$ ,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ) și familia beta-globinei ( $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  și  $\beta$ ) sunt situate una după alta (vezi figura 3.13) în aceeași buclă cromatiniană. Expresia lor în linia eritroidă este determinată de niște situsuri situate la extremitățile buclei (regiunea **LCR** de la *Locus Control Region*), direct accesibile proteinelor reglatoare. Această regiune asigură reglarea temporală și specificitatea tisulară a expresiei genelor din familia  $\beta$ -globinei: genele globinelor sunt activate într-o secvență temporală precisă, în anumite stadii ale dezvoltării ontogenetice, care corespunde cu ordinea lor lineară pe cromosom

În cursul dezvoltării umane se sintetizează forme diferite de hemoglobină – embrionară, fetală, adultă (vezi caseta 3.3). La această *diversitate ontogenetică* a tipurilor de Hb se adaugă și faptul că procesul de sinteză a Hb are loc în *situsuri diferite* în diferite perioade (sac galben, ficat, splină, măduvă osoasă). Ambele fenomene implică activarea și inactivarea secvențială, în momente precise și țesuturi variate, a diferitelor gene ce alcătuiesc familia alfa-globinei ( $\zeta$ ,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ) și beta-globinei ( $\epsilon$ ,  $G\gamma$ ,  $A\gamma$ ,  $\delta$  și  $\beta$ ); acest proces de „*comutare a hemoglobinei*” („*hemoglobin switching*”) permite sinteza subunității adecvate de hemoglobină pentru o anumită perioadă de dezvoltare (figura 3.14).

Mecanismele care determină expresia unei anumite gene într-o anumită perioadă și țesut implică secvențele de reglare din regiunea promotor a fiecărei gene precum și o secvență reglatoare comună numită *Locus Control Region (LCR)* situat în amonte de genele de structură. *LCR* este necesar pentru a stabili care genă din grup se va exprima într-o anumită perioadă de timp și în ce țesut. Interesant este faptul că în familia  $\beta$  globinei expresia temporală a genelor se face *în direcția 5'→3'*, *în ordinea ( $\epsilon \rightarrow \gamma \rightarrow \beta$ ) în care se găesc pe cromosom*, față de *LCR*. De asemenea s-a stabilit că *LCR* pentru globină are mai multe secvențe *cis-reglatoare* pe care se fixează factorii de transcripție GATA-1 și NFE-2 ce determină expresia genelor numai în celulele eritroide. Fixarea factorilor de transcripție la *LCR* *modifică structura cromatinei* la nivelul genelor beta, permițând altor TF să acceseze gene individuale din grup. Apoi, între factorii de transcripție (TF) fixați pe *LCR* și TF fixați pe promotorul unei anumite gene are loc o interacțiune (inclusiv o apropiere fizică, prin realizarea unei bucle în ADN) care activează sau represează transcripția unei anumite gene. Comutările de expresie în anumite țesuturi se fac de asemenea prin intervenția unor TF specifici tisulari.

Abilitatea unei singure regiuni de control, cum este *LCR*, să regleze un grup de gene și nu una singură, reprezintă un nivel superior de control al expresiei genice<sup>32</sup>. Controlul combinat prin *LCR* și TF specifici în diferite țesuturi produc o comutare ordonată a sintezei Hb în cursul dezvoltării.

### b). Expresia monoalelică

La majoritatea genelor, ambele alele maternă și paternă se exprimă (la nivel molecular); nu există nici-o discriminare între ele (dacă nu intervine o mutație deci o diferență genetică). Totuși, la om mai multe gene bialelice exprimă *în mod normal* numai una din cele două alele parentale, fie cea maternă, fie cea paternă; prin această **excluzie alelică** sau **expresie monoalelică** se produce un fel de *hemizigoție funcțională*. Deși inițial era considerată

<sup>32</sup> Asemenea mecanisme s-au descris și pentru alte grupe de gene (de ex., genele pentru receptorii celulelor T)

o raritate, expresia monoalelică a fost demonstrată la mai multe gene și se poate împărți în două categorii:

- Excluzia alelică în funcție de originea parentală, reprezentată de fenomenul de amprentare genomică;
- Excluzia alelică independentă de originea parentală; decizia de excludere, prin represie, a uneia din cele două alele este “întâmplătoare” dar definitivă, se transmite ca atare celulelor fiice; în acest grup se încadrează:
  - excluderea alelică prin inactivarea cromosomului X;
  - excluderea alelică după un rearanjament ADN programat (de exemplu, expresia genelor imunoglobulinelor în limfocitele B sau a receptorilor celulelor T în limfocitele T)
  - excluderea alelică prin mecanisme necunoscute (de exemplu, genele receptorilor olfactivi în neuroni ș.a. )

### (1). Amprentarea genomică

Fenomenul de amprentare genomică se referă la prezența unor modificări epigenetice cromosomice care pot avea drept consecință expresia într-o manieră dependentă de originea parentală a genelor. Amprentarea genomică a fost identificată prin studii de partenogeneză care au dovedit faptul ca genomul patern și matern nu sunt echivalente. Ulterior au fost identificate o serie de boli produse ca urmare a disomiei uniparentale a unor cromosomi, adică moștenirea ambelor copii ale unui cromosom de la același părinte. Studiul unor asemenea boli a permis identificarea primelor gene amprentate.

Bolile genetice asociate unor tulburari ale genelor amprentate se caracterizează prin manifestări fenotipice care depind de originea parentală a defectului genetic. Cele mai bine caracterizate asemenea sindroame sunt sindroamele Beckwith-Wiedemann (cromosomul 11p15.5) și Prader-Willi/Angelman (15q11-13).

**Sindromul Beckwith-Wiedemann** (OMIM 130650) este caracterizat prin gigantism, macroglosie, omfalocel și predispoziție pentru dezvoltarea unor tumori. Boala este asociată cu expresia bialelică a genei pentru *factorul de crestere insulin-like tip 2* (IGF2), genă exprimată în mod normal numai de pe cromosomul patern, sau prin mutații ale unei alte gene amprentate din vecinătate, CDKN1C.

În cazul sindroamelor Prader-Willi și Angelman sunt implicate cel mai adesea deleții largi ale regiunii cromosomice 15q11-13.

- Atunci când defectul interesează cromosomul de origine paternă manifestările clinice corespund **sindromului Prader-Willi** (OMIM 176270) caracterizat prin obezitate, hipostatură și retard mintal moderat. Genele incriminate sunt SNRPN și NDN, ambele cu expresie de pe cromosomul patern.
- Defectele care interesează cromosomul de origine maternă determină **sindromul Angelman** (OMIM 105830) caracterizat prin ataxie, hiperactivitate, retard mintal sever cu lipsa vorbirii și crize de râs. În unele cazuri boala este determinată de defecte ale genei UBE3A care este exprimată exclusiv matern la nivel cerebral.

În ultimii ani au fost identificate cel puțin 40 de gene amprentate (o listă a genelor amprentate la om poate fi găsită pe Internet la adresa: [www.geneimprint.com](http://www.geneimprint.com)). Acestea sunt localizate grupat, în anumite regiuni cromosomice (de exemplu grupările de pe cromosomii 11p și 15q). Genele amprentate au o serie de trăsături comune:

- expresia monoalelică care depinde de originea parentală (expresia fie numai a alelei materne, fie numai a alelei paterne),
- prezența unor insule CpG în regiunea promotor sau într-un intron care suferă metilare diferențiată (dependentă de asemeni de originea parentală),
- prezența frecventă a unor molecule de ARN care sunt transcrise de pe catena ADN opusă (ARN antisens) – cu rol important în reglarea expresiei acestor gene.

Expresia monoalelică a genelor amprentate este un fenomen extrem de complex. Numeroase gene prezintă acest model monoalelic doar în anumite etape ale dezvoltării ontogenetice sau doar în anumite țesuturi. De exemplu, gena IGF2 este exprimată bialelic în cursul dezvoltării embrionare precoce (și aceasta favorizează procesele de creștere caracteristice acestei etape), pentru a dobândi apoi expresie exclusiv de pe cromosomul patern; excepție fac unele țesuturi (ficat etc.) în care se pastrează expresia bialelică.

Genele amprentate sunt implicate în controlul unor procese extrem de importante în cursul dezvoltării și, ca urmare, alterarea expresiei normale a acestora (fenomen denumit **pierderea amprentării** – de la *loss of imprinting* – LOI) este asociată cu numeroase boli, precum cancerele sau bolile asociate cu tulburări de comportament.

### (2). Inactivarea cromosomului X la femei

La femeile XX compensarea dozajului genic (față de bărbații XY) este realizată prin inactivarea unui cromosom X, fenomen care apare precoce în cursul dezvoltării embrionare. Procesul de inactivare convertește un cromosom X din forma de eucromatină activă într-o formă heterocromatiniană puternic condensată și inactivă transcripțional (cromatina sexuală X sau corpusculul Barr în celulele epiteliale bucale). Inactivarea nu interesează cromosomul X în întregime: regiunile pseudoautosomale de la extremitățile cromosomului X pot rămâne active ca și o serie de gene de-a lungul cromosomului. Acest proces de inactivare este eminent epigenetic și este controlat de un **centru de inactivare XIC**, care a fost identificat la nivelul porțiunii proximale a bratului lung (Xq13). La scurt timp după implantarea embrionului feminin, la acest nivel, pe unul din cei doi cromosomi X se constată creșterea marcată a expresiei genei XIST (de la *X inactivation specific transcript*) care codifică o moleculă de ARN netranscrisă. Acest tip particular de ARN “îmbracă” cromosomul X și acest fenomen este esențial în cadrul procesului de inactivare.

Deși gena XIST este esențială pentru inactivarea cromosomului X, expresia sa nu este suficientă pentru realizarea acestui proces complex. Catena opusă celei de pe care este transcrisă gena XIST conține informația codificată pentru o moleculă antisens numită TSIX, care reglează în cis expresia XIST. Alte modificări asociate cromosomului X inactiv sunt *metilarea ADN*, în special la nivelul promotorilor genelor, *hipoacetilarea* histonei H4, *metilarea* Lys9 a histonei H3 și asocierea cu unele variante histonice precum macroH2A1 și macro H2A2.

La om inactivarea cromosomului X este considerată a fi *întâmplătoare*<sup>33</sup>. Totuși, în cazul unor anomalii cromosomice care interesează un cromosom X (precum delețiile unuia dintre cromosomii X sau translocății X-autosomale) se observă o *inactivare preferențială*, neîntâmplătoare, a cromosomului X normal. În aceste cazuri se consideră că fenomenul de inactivare s-a produs la întâmplare dar rezultatul final este consecința unor procese de selecție secundară în cursul dezvoltării embrionare precoce a acelor celule care sunt caracterizate printr-un echilibru genetic mai bun. Cu toate acestea, mai recent au fost identificate și cazuri aparent idiopatice de inactivare preferențială a unui dintre cei doi cromosomi X, a căror etiologie genetică a fost documentată.

### (3). Expresia monoalelică prin excludia întâmplătoare a unei alele

Expresia monoalelică datorată amprentării genetice interesează un număr relativ redus de gene. Cu toate acestea, expresia monoalelică este un fenomen relativ frecvent întâlnit la nivelul genomului uman. În acest caz este însă vorba despre **excludia alelică**, fenomen care se referă la expresia unei gene de la nivelul unui singur cromosom din perechea de omologi, fără a se ține cont de originea parentală a acestuia. Expresia poate deci interesa cromosomii materni în unele celule și cromosomii paterni în alte celule. Acest mod de expresie este însă păstrat fix în cursul succesiunii generațiilor de celule.

Deși nu este bine înțeles, fenomenul de excludie alelică implică cu siguranță mecanisme epigenetice care au permis coordonarea expresiei unor gene aflate la distanță în

<sup>33</sup> La unele mamifere există dovezi privind implicarea unor fenomene de amprentare.

genom. În unele cazuri excluzia alelică este foarte probabil și consecința unor rearanjamente cromosomice care apar la nivel somatic. Așa este cazul expresiei monoalelice întâlnite în cazul genelor care codifică imunoglobulinele în limfocitele B sau receptorii TCR la nivelul limfocitelor T (vezi și capitolul Imunogenetica). Expresia monoalelică este întâlnită și în cazul genelor legate de X la femei, dar în acest caz este explicată de inactivarea întâmplătoare a unuia din cei doi cromosomi. Un exemplu foarte complex îl reprezintă genele care codifică receptorii olfactivi la nivelul neuronilor mucoasei nazale. Familia genelor pentru receptorii olfactivi este cea mai mare familie de gene la om, conținând peste 1000 de copii organizate în circa 25 de grupuri (clusters) la nivelul a numeroși cromosomi. În fiecare neuron olfactiv are loc expresia unui singur asemenea grup de gene, și aceasta implică existența unor fenomene de reglare a expresiei genice capabile să acționeze la nivelul întregului genom.

## 2. REGLAREA TRANSCRIPTIIONALĂ.

Controlul transcripțional al expresiei genice vizează reglarea activității ARN polimerazei II, enzima ce transcrie genele care codifică proteine și sintetizează ARNm. Reglarea transcripțională implică interacțiunea unor proteine (*factori trans-reglatori*) cu secvențe specifice de pe ADN (*elemente cis-reglatoare*), interacțiuni care determină transcripția specifică a anumitor gene într-un anumit moment pentru a se produce o cantitate adecvată dintr-o anumită proteină.

### 2.1. ELEMENTELE CIS-REGLATOARE

Elementele cis-reglatoare sunt secvențe scurte de ADN ale căror funcții sunt limitate la o anumită genă; după fixarea unor factori "trans-reglatori" specifici (factori de transcripție), aceste secvențe permit recunoașterea genei de către ARN polimerază și reglează specificitatea și intensitatea transcripției, adaptând-o la nevoile celulare

Reamintim (vezi capitolul 3.B.1.2) că unele elemente cis-reglatoare au o localizare perfect definită în promotorul genei: *TATA box*, *CAAT box*, *GC box*; pe aceste secvențe se fixează factorii de transcripție generali care formează, împreună cu ARN polimeraza, complexul de inițiere a transcripției sau *complexul transcripțional bazal* (vezi capitolul 4.C.1.2). Alte secvențe (situate mai în amonte) conferă *specificitatea tisulară* a expresiei genelor ce le posedă iar *secvențele RE*<sup>34</sup> (de la "responsive element") care fixează factori transcripționali inductibili, activați în prealabil de către un stimul extracelular: hormoni, AMPc, ioni etc. Ultimul tip de secvențe au o *localizare variabilă* (în regiunea 5' sau în 3' sau în introni) și reglează intensitatea transcripției; ele pot fi *secvențe stimulative* ale transcripției (*enhancers*) sau *secvențe atenuatoare* (*silencers*).

Se poate spune că regiunile reglatoare ale unei gene sunt constituite dintr-o serie de *module* pe care se fixează *factorii de transcripție* realizând o *anumită combinație*; prin interacțiunea lor se produce o *repliere a cromatinei* care creează o structură spațială ce permite ARN polimerazei să se *poziționeze* lângă situsul de inițiere a transcripției și să declanșeze procesul de transcripție cu o anumită viteză.

Fiecare genă posedă "un sistem de reglare" alcătuit din *mai mulți factori transcripționali* care nu sunt însă specifici unei singure gene. Numărul lor este mic dar acțiunea lor particulară este produsă prin *combinația specifică* a anumitor factori trans și elemente / secvențe cis. Situația este comparabilă cu scrisul sau muzica în care un număr limitat de simboluri sau sunete permite o infinitate de combinații diferite.

<sup>34</sup> Pentru a indica activatorul unui RE se adaugă o literă suplimentară: **G**RE pentru elementul de răspuns la glucocorticoizi; **E**RE pentru răspunsul al estrogeni, **T**RE pentru hormonul tiroidian, **A**RE pentru androgeni, **C**RE pentru răspunsul la AMPc etc

## 2.2. FACTORII DE TRANSCRIPTIE TRANS-REGLATORI

Factorii de transcripție trans-reglatori sunt proteine reglatoare care se fixează pe elementele cis-reglatoare ale ADN (de regulă, în marea încizură a dublei elice aADN) și interacționează cu alți factori de transcripție, controlând inițierea transcripției<sup>35</sup>.

Toate aceste proteine transcripționale conțin un *domeniu de fixare la ADN* prin intermediul cărora proteina recunoaște atât genele "țintă" cât și *domeniul de transactivare* prin care interacționează cu alți factori de transcripție pentru a regla transcripția. Unele proteine *trans* pot conține un al treilea domeniu care este un situs de fixare pentru hormon, ioni etc. Domeniul de fixare la ADN are o structură particulară de aminoacizi ce formează un "*motiv structural*" *specific*; în funcție de alcătuirea sa, există mai multe tipuri de factori de transcripție (figura 4.23).

- **Proteine cu "degete de zinc"**, în care aminoacizii se dispun spațial sub forma unor degete de mână (2-13) la baza cărora se fixează (de cisteină și/sau histidină) un ion de  $Zn^{++}$ , indispensabil activității proteinei; din această categorie fac parte receptorii nucleari de hormoni, proteina Sp1 care se fixează pe promotorul a numeroase gene "*domestice*" (*menajere*);
- **Proteine "elice-cot-elice**, în care aminoacizii ce alcătuiesc domeniul de fixare la ADN formează două elice  $\alpha$  unite între ele printr-un "cot"  $\beta$ ; acest tip de structură (numit și *homeodomeniu*) se întâlnește într-o serie de proteine implicate în dezvoltare, numite *homeoproteine*: *proteinele HOX, SOX etc*;
- **Proteine "elice-buclă-elice"** sunt proteine dimerice alcătuite dintr-un domeniu de fixare specifică la ADN, o elice  $\alpha$ , o buclă laterală și o altă elice  $\alpha$ ; cele două molecule ce formează dimerul se leagă prin interacțiuni ce se stabilesc între zonele din elice; astfel de structuri sunt prezente la proteinele care stimulează sinteza de imunoglobuline;
- **Proteine cu "fermoar de leucină"** ("*Leucin zipper*") sunt proteine dimerice, alcătuite dintr-un domeniu de fixare specifică la ADN și un domeniu în  $\alpha$  elice, bogat în leucină, care interacționează cu domeniul omolog al celeilalte catene; exemple: proteina CREB, produsele oncogenelor *JUN* și *FOS*.

De menționat că factorii de transcripție diferiți pot conține domenii similare de fixare la ADN dar au domenii diferite de trans-activare; în acest caz TF se fixează la aceeași secvență de ADN dar activează transcripția în mod diferit. Există și situația inversă: TF cu domenii diferite de fixare la ADN și cu domenii identice de trans-activare.

Factorii de transcripție se pot clasifica în cinci grupe.

- (1) Factori de transcripție *generali* (GTF sau TFII); se asamblează pe secvența TATA;
- (2) Factori de transcripție *comuni* care se fixează la secvențele CAAT și GC;
- (3) Factori de transcripție *inductibili* care după ce sunt activați de către stimuli externi se fixează pe secvențele RE, producând o creștere a transcripției genelor ce posedă RE;
- (4) Factori de transcripție *specifici* pentru anumite celule (de exemplu Pit-1, factorul specific glandei hipofize);
- (5) Proteine activatoare sau repressoare care se fixează pe activatori (enhancers) sau atenuatori (silencers) și intensifică sau inhibă transcripția genei.

*Factorii de transcripție generali* (GTF) se asamblează pe TATA box într-o ordine secvențială pentru a forma *complexul transcripțional bazal* care fixează, poziționează și activează ARN polimeraza II (de aceea se mai numesc TF II) (figura 4.24 A).

Primul se fixează TF IID, un complex multiproteic) care se leaga la TATA prin proteina TBP; apoi se fixează în ordine: TFIIA, TDIIB, TFIIIF/ARN polimeraza, TFIIIE și TFIIIF. Unii din acești factori au și alte activități: de helicază, de protein-kinaze, asemănătoare ciclinelor, de reparare a ADN (TFIIIF).

<sup>35</sup>Se numesc "trans" pentru că sunt proteine produse de alte gene decât cele asupra cărora acționează.

*Factorii de transcripție* comuni activează/intensifică asamblarea GTF și ARN polimerazei la miezul promotorului. Ei se fixează la secvențele CAAT, GC, OCT și apoi interacționează prin domeniul lor trans-activator cu TFIID intensificând asamblarea complexului de inițiere al transcripției. De exemplu, TF Sp1 se leagă pe GC prin intermediul unui domeniu de fixare cu “degete de zinc”; apoi domeniul de transactivare recunoaște o componentă a TFIID și-l activează (figura 4.24 B).

*Factorii de transcripție inductibili* sunt activați în prezența unui stimul specific (glucocorticoizi; TPA; estrogeni; calciu; metale grele) din mediul exterior și apoi se fixează la un element de răspuns (RE) specific (GRE; TRE; ERE; Ca<sup>++</sup>RE), stimulând transcripția. Acest mecanism funcționează în anumite tipuri de gene.

De exemplu, TF inductibil AP1 este sintetizat într-o formă inactivă (fosforilată); în prezența unui stimul – de tipul TPA (ester de forbol), factori de creștere, citokine sau neurotransmițători; el activează cascada protein kinazei C, care produce defosforilarea AP1 și activarea sa; aceasta îi permite să se fixeze la promotorii genelor care conțin secvența TRE. După fixarea la ADN, AP1 interacționează cu complexul transcripțional bazal și crește rata de inițiere a transcripției. Un alt exemplu frumos de transcripție inductibilă este răspunsul celulelor la hormonii steroizi, un proces care implică fixarea hormonului (H) la un receptor(R) și apoi fixarea H-R la un RE specific (GRE, ERE, etc) (Castea 4.2).

#### CASETA 4.2.

##### **Controlul transcripției mediat de receptori**

Hormonii steroizi (gluco-, mineralo-, sex-steroidi) și elementele similare (de exemplu, vitamina D) controlează creșterea, dezvoltarea și homeostazia corpului uman. Secretați de celulele endocrine, steroizii ajung prin sânge la celulele „țintă”. Fiind liposolubili, ei traversează membrana celulară și, ajunși în interiorul celulei, se fixează pe un receptor hormonal specific, prezent fie în citoplasmă (de exemplu, receptorii pentru glucocorticoizi) fie în nucleu (de exemplu, receptorii de androgeni) (figura 4.25). Receptorii hormonilor steroizi sunt factori de transcripție care au un domeniu de fixare a hormonului și un domeniu de fixare la ADN ce conține motive sub formă de „degete de zinc”. Complexul activ receptor steroid se fixează în nucleu la situsurile RE corespunzătoare (HRE) și – prin interacțiunea dintre receptor și TF din complexul bazal de transcripție - este activată inițierea transcripției unei clase specifice de gene (care au HRE)

*Factorii de transcripție specific tisulari* sunt deseori reprezentați de secvențele activatoare sau atenuatoare (*inhibitorii*). De exemplu: activatorii genelor imunoglobulinelor funcționează numai în limfocitele B; represorul *neural restrictive silencer element* (NRSE) inhibă activitatea unor gene în toate țesuturile, exceptând țesutul nervos; aici un factor de transcripție specific, REST, produce blocarea elementului NRSE. Alteori intervin secvențe și *factori de transcripție specifici* anumitor țesuturi. De exemplu, TF specifici celulelor eritroide (NF-E2 sau GATA) se fixează pe secvențe specifice de ADN din promotor și inițiază transcripția anumitor gene în eritroblast; TF specifici pentru celulele pancreatice beta (PDX1) se fixează pe secvențele A1,A2,A3 ale promotorului insulinei.

*Factorii de transcripție care se fixează pe activatori sau atenuatori* ridică o problemă interesantă: cum pot controla transcripția unei gene secvențe situate la mii de pb de genă, în amonte sau în aval de situsul de inițiere (deci indiferent de orientare). Ipoteza cea mai probabilă presupune că TF fixat pe secvența activator interacționează cu o componentă a complexului bazal de transcripție și determină formarea unei bucle a ADN care aduce cele două secvențe în strânsă apropiere (figura 4.24 b).

### 2.3. REGLAREA TRANSCRIPTIEI CA RĂSPUNS LA SEMNALE EXTRACELULARE (“EXPRESIA INDUCTIBILĂ A GENELOR”).

O varietate de mecanisme realizează reglarea transcripțională ca răspuns la *semnale*<sup>36</sup> (*stimuli*) *extracelulari*, numiți generic **liganzi**; aceștia produc o modificare *temporară și reversibilă* a transcripției unor gene (“*expresia inductibilă a genelor*”). Indiferent de mecanism, punctul final în acest tip de reglare este același: un factor de transcripție inițial *inactiv* este activat specific de către calea de semnalizare și apoi se fixează la secvențele reglatoare specifice (numite **elemente de răspuns**) (RE) din promotorul genelor țintă, activând transcripția lor. Pentru a răspunde imediat la un stimul, factorul transcripțional necesar trebuie să fie deja *prezent în celulă sub o formă inactivă*. Activarea sa se poate face prin mai multe procese.

#### **a). Activarea transcripției printr-un ligand inductibil (controlul hormonal al transcripției)**

*Hormonii* hidrofobi cu moleculă mică (de exemplu, hormonii steroizi) sau unele *morfogene* (de exemplu, acidul retinoic) difuzează prin membrana celulelor-țintă și se fixează pe un **receptor intracelular**, citoplasmatic sau nuclear; ei funcționează ca factori de transcripție inductibili (figura 4.25). Fixarea ligandului la receptor produce activarea lui; complexul ligand (hormon) receptor se fixează pe ADN la RE (elementul de răspuns) (GRE, TRE, ERE, ARE) localizat în promotorul mai multor gene țintă și activează transcripția lor.

Receptorii steroizi fac parte din *superfamilia receptorilor nucleari de hormoni*. Acești receptori au o structură globală identică, fiind alcătuiți din mai multe domenii: domeniul A de lungime variabilă și specific de receptor; domeniul B cu o structură *în degete de zinc*, foarte asemănătoare la diferiți receptori, prin care receptorul *se fixează la ADN*; domeniul C; domeniul D (relativ asemănător) unde *se fixează hormonul*.

#### **b). Activarea transcripției prin transducția semnalului.**

Anumiți factori extracelulari (hormoni peptidici, citokine, neurotransmițători) pot declanșa transcripția unor gene fără a intra în celule (nu pot trece prin membrana plasmatică). Ei se fixează pe un **receptor specific de pe suprafața celulei** (cu activitate kinazică sau care poate activa kinaze intracelulare) care, după fixarea ligandului, își schimbă conformația spațială și devine activ; în această stare el transmite semnalul ligandului altor molecule din celulă. Prin activarea transcripției unor gene specifice, acest proces, numit **transducția semnalului**, joacă un rol important în controlul diviziunii celulare, creșterii și diferențierii.

Există două mecanisme posibile de transducție:

- *Transducția directă* când receptorul („cu un pasaj membranar”) dotat cu activitate tirozin-kinazică (receptor RTK) recunoaște semnalul extracelular și îl *traduce el însuși*, declanșând autofosforilarea unei molecule de tirozină (Tyr) din segmentul său intracitoplasmatic;
- *Transducția indirectă* în care receptorul („cu șapte pasaje membranare”) este *cuplat* cu un o proteină care, prin interacțiuni cu alte proteine, transmite semnalul *efectorului*, în cazul de față unui factor de transcripție inactiv, situat în citoplasmă sau nucleu.

#### **(1). Calea directă de transmitere a semnalului prin cascada kinazelor**

Receptorul RTK (**r**eceptor cu activitate **T**yr-**k**inază) este alcătuit dintr-un domeniu extracelular care are situsul de recunoaștere al ligandului, un domeniu transmembranar și un

<sup>36</sup> Se deosebesc patru tipuri de semnalizare celulară: (1) Semnalizarea directă, celulă-celulă: un semnal de pe suprafața unei celule (de exemplu, factor de creștere) este fixat de un receptor specific al altei celule; (2) Semnalizarea endocrină: hormonii se fixează pe receptori specifici în celulele țintă; (3) Semnalizarea paracrină: o moleculă eliberată de o celulă (de ex., un neurotransmițător) acționează local asupra celulelor vecine; (4) Semnalizarea autocrină: o moleculă produsă de o celulă acționează asupra celulei respective.

domeniu intracitoplasmatic dotat cu proprietăți enzimactice de Tyr-kinază. Există o mare diversitate de RTK dintre care în figura 4.26 sunt reprezentate cele mai importante clase (receptorii pentru EGF, Insulină, PDGF, FGF).

Fixarea unui ligand pe receptorul (cu un pasaj membranar) acestei căi declanșează o serie de reacții intracelulare în lanț care vor duce în final la transcripția genelor implicate în diviziunea celulară (figura 4.27). Fixarea ligandului produce o *dimerizare* a RTK care stimulează activitatea TK intrinsecă receptorului și declanșează *autofosforilarea Tyr* situată în domeniul intracitoplasmatic. Tyr fosforilată este recunoscută de proteina<sup>37</sup> *GRB2* (de la *growth factor receptor bound*) legată cu proteina *SOS*; *GRB2* este deci un adaptor între RTK și *SOS*; care poziționează o proteină *SOS*. Proteina *SOS* este acum poziționată la extremitatea substratului său, care este proteina *P21* (codificată de gena *RAS*), o proteină ancorată pe fața internă a membranei celulare; *sos* facilitează astfel activarea *P21 RAS-GDP*. Proteina *RAS*, activată prin legarea cu GTP (grație lui *SOS*), poate acționa asupra mai multor tipuri de efectori; cel mai cunoscut este kinaza *RAF-1* care (sub acțiunea *P21-RAS-GTP*) suferă o modificare a localizării sale (o translocare), ajungând în contact cu membrana celulară, fosforilată și activată. Ea va determina *activarea în cascadă* a altor kinaze, MEK și MAPK. În final MAPK activată este translocată în nucleu unde fosforilează mai mulți factori de transcripție ca **fos**, **jun**, **myc**, care vor *controla expresia genelor implicate în diviziunea celulară*.

De precizat că domeniul citoplasmatic al RTK posedă *mai multe molecule de Tyr* care se pot autofosforila independent; aceasta va face ca fiecare moleculă Tyr fosforilată să fie recunoscută de altă proteină (diferită de *GRB2*) producând *răspunsuri biologice diferite* în tipuri celulare diferite. Invers, două RTK diferite (de ex., EGF-R și PRGF-R) pot avea o aceeași moleculă Tyr ce se va fosforila, activând o aceeași cale de semnalizare.

## (2). Calea directă de transmisie a semnalului prin kinaza „Jak”<sup>38</sup>

O cale mai scurtă de transmisie a semnalului (folosită de unii factori de creștere sau citokine) implică proteinele *JAK* (figura 4.28). Fixarea ligandului la RTK activează *JAK1*, o Tyr-kinază citoplasmatică, care la rândul ei fosforilează o Tyr a unui factor de transcripție *STAT* (de la *signal transducer and activator of transcription*). Acest factor activat patrunde în nucleu și stimulează transcripția unor gene, în special a genei **c-fos**.

## (3). Calea indirectă de transmitere a semnalului, prin receptorii de suprafață cu șapte pasaje membranare, cuplați cu proteine G

Cea mai mare familie de receptori membranari (câteva sute) este constituită din receptorii cu șapte pasaje transmembranare (receptori pentru proteine, amine, cationii de  $Ca^{++}$ , fotoni etc). Segmentele transmembranare delimitează o cavitate unde se găsește de obicei situsul de legare. Receptorii sunt cuplați cu intermediari (de obicei *proteine G heterotrimerice*) între receptorul care primește semnalul și efectorul (factorul de transcripție inactiv) responsabil de acțiune. (Robbell și Gilman, Premiul Nobel 1994).

Activarea transcripției pe această cale folosește două mecanisme ce permit transmiterea rapidă a semnalului de la receptorii de suprafață la nucleu, ambele implicând fosforilarea proteinelor.

- În primul mecanism, receptorul cuplat cu o proteină G (de la **GTP-binding regulatory proteins**) activează anumite protein kinaze care apoi sunt translocate din citoplasmă *în nucleu* unde fosforilează factorii de transcripție țintă. Exemplul cel mai edificator este **semnalizarea hormonală pe cale AMP ciclic**.

<sup>37</sup> Este vorba de un tip special de proteine, cu domenii SH2/SH3 care au niște „buzunare” ce recunosc specific o Tyr fosforilată.

<sup>38</sup> Denumirea „JAK” provine de la „Janus kinase” și face aluzie la Janus, zeul roman cu 2 fețe, care era zeul porților.



Prin fixarea hormonului la receptorul cuplat cu proteina G (heterotrimerică -  $\alpha, \beta, \gamma$ - în care subunitatea  $\alpha$  este legată la GDP) se produce o modificare conformațională care permite activarea și disocierea subunității  $\alpha$  a proteinei G (figura 4.29 A); subunitatea  $\alpha$ +GTP va activa adenilat-ciclaza, fixată de membrană, care va sintetiza (din ATP) AMP ciclic, **mesagerul secund** al diferitor hormoni și altor molecule de semnalizare. AMPc va activa, prin intermediul protein kinazei A, un factor specific de transcripție, CREB (de la CRE-binding protein), care se va fixa pe elementul de răspuns al AMPc numit CRE și situat în promotorul unor gene, declanșând transcripția lor.

- În al doilea mecanism, factorii de transcripție *inactivi* se găsesc în citoplasmă și, după activarea lor prin fosforilare, ei sunt translocați în nucleu, unde declanșează transcripția.

Un exemplu pentru acest mecanism este *activarea NF-kB pe calea de semnalizare a protein kinazei C* (figura 4.29 B).

NF-kB este un factor de transcripție implicat în activarea diferitelor gene ale imunității, care se găsește în citoplasmă sub formă inactivă datorită cuplării cu I $\kappa$ B. După fixarea ligandului (un factor de creștere) la un receptor cuplat cu o protein kinază se produce activarea fosfolipazei C, legată și ea la receptor, care convertește apoi PIP2 (fosfatidilinositol bifosfat) în IP3 (inositol-trifosfat) și diacilglicerol. Diacilglicerolul va activa protein kinaza C care la rândul ei activează NF-kB (prin degradarea I $\kappa$ B) care este translocat în nucleu și activează transcripția unor gene țintă.

#### 2.4 SELECTAREA PROMOTORILOR

Unele gene umane au doi sau mai mulți promotori și prin folosirea lor alternativă se pot produce diferite **isoforme** ale unei proteine, cu proprietăți diferite: sinteza în țesuturi diferite sau perioade diferite de dezvoltare, localizarea subcelulară sau capacitatea funcțională variată. Promotorii au "forțe" inegale, determinând tipul și cantitatea de mesager transcris. Alegerea promotorilor nu se face la întâmplare ci prin acțiunea unor factori trans-regulatori, dintre care unii sunt specifici unui țesut; acest fapt explică de ce unele țesuturi exprimă un tip de mesager iar alte țesuturi un alt tip (exemplu,  $\alpha$ -amilaza; figura 4.30). Un exemplu frecvent citat de selecție a promotorilor privește gena gigantă a distrofinei (2.4 Mb; 79 exoni) care are cel puțin opt promotori; patru sunt situați în regiunea reglatoare 5' și sunt specifici pentru cortexul cerebral, mușchi, cerebel, limfocite; se produc patru isoforme mari de distrofină, diferite prin capătul amino-terminal, datorită folosirii alternative a exonului 1. Alți patru promotori sunt "interni", în structura zonei centrale a genei; transcripția care începe de la nivelul acestor promotori va folosi numai o parte din exoni, rezultând isoforme mici de distrofină, prezente în rinichi, retină, celulele Schwann.

### 3. REGLAREA POSTTRANSCRIȚIONALĂ.

Reglarea expresiei genelor se poate face și prin mecanisme ce pot interveni post-transcripțional, modificând calitativ sau cantitativ formarea ARNm matur. Mai frecvent este vorba de matisarea sau poliadenilarea alternativă prin care o genă codifică mai multe proteine; mai rar se întâlnește "editarea" ARN. Aceste mecanisme, deseori combinate, implică recunoașterea unor secvențe specifice din ARN de către proteine sau molecule de ARN reglatoare. Vom prezenta câteva din mecanismele mai cunoscute.

#### 3.1. MATISAREA ALTERNATIVĂ SAU DIFERENȚIALĂ.

În procesul de maturare celulară, printr-un mecanism "de alegere" (ce implică factori de transcripție specifici de țesut), elimină din ARNm precursor nu numai intronii, ci și unii exoni codanți; prin acest proces de matisare și/sau poliadenilare alternativă, dintr-un transcript primar se formează mai multe molecule diferite de ARNm matur și, prin translație, aceeași genă poate produce mai multe proteine diferite (figura 4.9). Uneori acestea au funcții analoge (sunt "*isoforme*"), așa cum este cazul genei mielinei, sau cu localizări tisulare sau intracelulare diferite (genele pentru imunoglobulina M, tropomiosina, receptorul hormonului de creștere, eritropoietina etc). Alteori se produc proteine complet diferite ca structură și

funcție; exemplul deja clasic este reprezentat de *gena calcitoninei* care, în celulele C din tiroidă produce *calcitonina* (un hormon ce asigură homeostazia  $C^{2+}$  circulant) iar în hipotalamus, un *peptid înrudit cu calcitonina* (CGRP), cu funcții neuromodulatoare și trofice. Fenomenul de selecție a exonilor /matisare alternativă se întâlnește la numeroase gene umane, explicând probabil că prin utilizarea a circa 35.000 de gene se pot sintetiza peste 100.000 de tipuri diferite de proteine. Pentru moment mecanismele de control al acestui proces nu se cunoaște prea bine; intervin probabil regulatori ai matisării, proteine din familia SR (ce conțin un domeniu de fixare la ARN, alcătuit din serină-arginină) sau ribonucleoproteine nucleare heterogene (ARNhn). Specificitatea tisulară a acestui proces implică existența certă a unor molecule reglatoare diferite.

### 3.2. POLIADENILAREA ALTERNATIVĂ

Numeroase gene conțin la nivelul regiunii lor 3'UTR două sau mai multe semnale de poliadenilare și, ca urmare, pot suferi procese de adenilare alternativă, cu specificitate tisulară. În alte cazuri, matisarea alternativă poate să evedentieze un asemenea situs alternativ de adenilare (ca în cazul genei pentru calcitonina și CGRP menționat anterior).

### 3.3. MODIFICAREA STRUCTURII PRIMARE A ARNm ("RNA EDITING").

"Editarea" ARN este o formă rară de procesare post-tranlațională a ARNm în care se produc modificări enzimatiche specifice (substituția, inserția sau deleția) unui nucleotid. La om au fost descrise: substituția  $C \rightarrow U$  (în gena pentru apolipoproteina B), substituția  $A \rightarrow I$  (Inositol) (în gena pentru receptorul glutamat B), substituția  $U \rightarrow C$  (în gena WT1). În felul acesta, același ARNm, în țesuturi diferite, poate suferi o modificare a structurii primare producând proteine diferite prin lungimea lor. Spre exemplu, ARNm pentru apolipoproteina B produce în ficat **Apo-B100** și în intestinul subțire o proteină mai mică, **Apo-B48**, care are o secvență de aminoacizi identică cu prima parte a Apo B-100; explicația acestei tranlații diferite este "simplă": în intestin, în codonul 2152 al ARNm, C este înlocuită cu U și această modificare transformă codonul *sens* într-un codon *stop* și oprește tranlația ARNm la amino acidul 48.

### 3.4. MODIFICAREA STABILITĂȚII (DURATEI DE VIAȚĂ) A ARNm.

Intensitatea sintezei unei proteine depinde de concentrația (cantitatea) ARNm corespunzător iar aceasta de durata lui de viață. De exemplu, ARNm produs de genele *c-MYC* sau *c-FOS* are o stabilitate anormal crescută și determină o sinteză excesivă a proteinelor corespunzătoare, care intensifică proliferarea celulară. Creșterea stabilității este determinată de lungimea secvanței poliadenilice din regiunea 3'. Un alt exemplu: sinteza de *histone* este intensă în timpul replicării ADN și foarte scăzută în alte momente din viața celulei; acest fenomen este rezultatul modificării stabilității mesagerului pentru histone.

### 3.5. MODIFICAREA STOCAJULUI ARNm.

Stocajul post-transcripțional al moleculelor de ARNm în nucleu sau în citoplasmă și distribuția / disponibilitatea lor în momentul tranlației este cert o modalitate de reglare a sintezei proteinelor. De exemplu, unii stimuli hormonal pot produce o intensificare rapidă a sintezei de proteine prin eliberarea ARNm deja stocat și nu prin stimularea tranlației. Mecanismele prin care se "*decide și se realizează*" stocarea anumitor mesageri nu sunt cunoscute.

### 3.6. INTERVENȚIA MOLECULELOR DE ARN INTERFERENT (ARNi)

Conform "dogmei centrale" a geneticii emisă în anii '50, fluxul informației genetice se desfășoară în direcția ADN  $\rightarrow$  ARN  $\rightarrow$  proteine. De atunci, numeroase studii au dovedit că ARN este mai mult decât un simplu intermediar. Foarte recent au fost descrise însă câteva

clase de molecule ARN care ar putea modifica complet viziunea asupra acestor molecule. Conform unor date majoritatea moleculelor de ARN sunt "actori principali" într-o adevărată rețea moleculară implicată în reglarea expresiei genice. Printre asemenea clase noi de molecule ARN fac parte și moleculele de ARNi (interferent). Ele sunt codificate de gene care pot avea diverse localizări cromosomice și, odată transcrise, adoptă o conformație bicatenară. Sub acțiunea unor enzime (precum enzima *Dicer*) asemenea molecule de ARN bicatenar sunt fragmentate în piese scurte de 21-23 nucleotide, monocatenare, care se pot fixa pe baza de complementaritate la moleculele de ARNm. Atunci când complementaritatea este perfectă, rezultatul poate fi împiedicarea translației. Când legăturile pe bază de complementaritate sunt imperfecte efectul de inhibiție a translației poate fi redus sau nul. Prima genă din această clasă a fost identificată la om în anul 2000 (gena LET-7), iar analiza secvenței sale a permis evidențierea rapidă a mai multor gene identice la nivelul câtorva cromosomi.

#### 4. REGLAREA TRANSLAȚIONALĂ.

##### 4.1. REGLAREA TRANSLAȚIONALĂ CA RĂSPUNS LA ACȚIUNEA UNOR FACTORI EXTERNI.

Există cu certitudine o reglare translațională a sintezei de proteine dar aceasta este puțin cunoscută. Probabil că unele mecanisme care produc acest tip de reglare influențează stocajul mesagerilor, descris mai sus. Alte mecanisme implică recunoașterea specifică a unor secvențe *cis*-reglatoare din regiunile netranslate 5'UTR sau 3'UTR din ARNm, de către anumite proteine *trans*-reglatoare. Cel mai cunoscut exemplu de reglare translațională este reglarea sintezei de feritină (proteină ce fixează și transportă  $Fe^{2+}$ ) în funcție de nivelul fierului: creșterea nivelului de fier stimulează producția de feritină și invers. În regiunile 5'UTR și 3'UTR se găsește un element *cis*-reglator (în formă de "ac de păr"), numit IRE (de la Iron Response Element), pe care în absența  $Fe^{2+}$  se fixează o proteină ce oprește temporar sinteza pe matrița de ARN și o protejează.

Un alt mecanism de reglarea a translației implică *modularea activității unor factori de inițiere ai translației*, precum IF-2. IF-2 activat prin cuplarea sa cu GTP are rolul de a fixa prima moleculă de ARNt (metionil-ARNt) la nivelul ribosomului. Eliberarea sa ulterioară este însoțită de hidroliza GTP, cu transformarea consecutivă în GDP. Pentru a participa la un nou ciclu de inițiere, este nevoie de schimbul GDP cu o nouă moleculă de GTP. Acest nivel s-a dovedit a fi un punct critic de reglarea a translației în o serie de celule. Fosforilarea IF-2 blochează GDP și împiedică schimbul său cu GTP. Un tip de celulă în care apare aceasta fosforilarea este reticulocitul, celula dedicată în principal sintezei hemoglobinei. Atunci când cantitatea de hem nu este suficientă, este activată o proteinkinază care induce fosforilarea IF-2 și blochează astfel translația.

Au fost evidențiate și alte niveluri la care poate interveni reglarea translațională, precum factorul de inițiere IF-4E care se leagă la structura "cap" a ARNm.

##### 4.2. CONTROLUL TRANSLAȚIONAL AL EXPRESIEI GENICE ÎN CURSUL DEZVOLTĂRII EMBRIONARE PRECOCE.

Lungimea cozii poliadenilice are un rol important în cursul dezvoltării embrionare precoce. După fertilizare, nici o moleculă de ARNm nu este nou sintetizată până în stadiul de embrion cu 4-8 celule. În citoplasma ovocitului se găsesc numeroase molecule de ARNm de origine maternă care au o coadă poliadenilică scurtă, de aproximativ 20 nucleotide. Aceste molecule sunt doar stocate, iar translația lor în cursul unor faze specifice ale dezvoltării este consecința unor mecanisme care implică adăugarea a noi adenine numai în cazul în care sunt identificate în amonte secvențe poliuridilice specifice, precum și interacțiunea acestei cozi cu o serie de proteine specifice.

### 4.3. LOCALIZAREA INTRACELULARĂ A ARNm.

Anumite secvențe ale ARNm localizate la nivelul extremităților 5' și 3' (regiunile UTR) pot determina localizarea țintită a acestor molecule la nivelul anumitor compartimente ale celulelor. Un asemenea mecanism pare a fi mai eficient decât țintirea ulterioară a proteinelor prin atașarea unor secvențe semnal: o singură moleculă de ARNm poate fi suficientă pentru sinteza a mii de molecule proteice în compartimentul celular dorit. Asemenea mecanisme au fost descrise în special în cazul unor celule cu dimensiuni considerabile, precum neuronii. De exemplu, moleculele de ARNm pentru proteina mielinică bazică sunt transportate cu ajutorul kinezinei direct la nivelul prelungirilor oligodendrocitelor; ARNm pentru proteina *tau* sunt transportate direct la nivelul protubiilor proximale ale axonilor.

#### INTERNET

1. Dicționar de biologie celulară: <http://www.mlab.gla.ac.uk/~julian/Dict.html>
2. Genetică medicală - University of Utah School of Medicine: <http://medgen.genetics.utah.edu>
3. Gene amprentate: <http://www.mgu.har.mrc.ac.uk/imprinting>
4. Principii de genetică - Indiana University Biotechnology: <http://biotech.chem.indiana.edu>
5. National Human Genome Research Institut: <http://www.nhgri.nih.gov>.
6. National Center for Biotechnology Information: : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
7. Whitehead Genome Institute at the Massachusetts Institute of Technology: <http://www-genome.wi.mit.edu>

#### Bibliografie specifică selectivă

1. Akashi H. *Gene expression and molecular evolution*. Curr. Opin. Genet. Dev., 2001;11: 660-666.
2. Bass B.L. *RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA*. Annu. Rev. Biochem., 2002;71:817-846.
3. Bird, A. *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes Dev., 2002;16: 6-21.
4. Brannan C.I., Bartolomei M.S. *Mechanisms of genomic imprinting*. Curr. Opin. Genet. Dev., 1999; 9:164-170
5. Day D.A., Tuite M.F. *Post-transcriptional gene regulatory mechanism in eukaryote: an overview*. J. Endocrinol., 1998; 157:361-371
6. Dever T.E. *Gene-specific regulation by general translation factors*. Cell 2002;108:545-556.
7. Hannon G.J. *RNA interference*. Nature, 2002;418:244-251.
8. Hartl F.U., Hayer-Hartl, M. *Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein*. Science. 2002;295:1852-1858.
9. Hirose Y., Manley L. *RNA polymerase II and the integration of nuclear events*. Genes Develop., 2000;14:1415-1429.
10. Jenuwein T., Allis C.D. *Translating the histone code*. Science. 2001;293:1074-1780.
11. Jones P.A. *The DNA methylation paradox*. Trends Genet., 1999;15:34-37
12. Kolman J.A., Stemmer, W.P. *Directed evolution of proteins by exon shuffling*. Nat. Biotechnol., 2001;19:423-428.
13. Kiejan D.J., van Heyningen V. *Position effect in human genetic disease*. Hum. Mol. Genet., 1998;7:1611-1618
14. Li E. *Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development*. Nat. Rev. Genet., (2002) 3, 662-673.
15. Lyon M.F. *X-chromosome inactivation*. Curr. Biol., 1999; 9:R235-237
16. Paulsen M., Ferguson-Smith A.C. *DNA methylation in genomic imprinting, development and disease*. J. Pathol., 2001;195: 97-110.

17. Roberts G.C., Smith C.W. *Alternative splicing: combinatorial output from the genome.* Curr. Opin. Chem. Biol., 2002; 6:375-383.
18. Tilgman S.M. *The sins of the fathers and mothers: genomic imprinting in mammalian development.* Cell, 1999; 96:185-193.

## CAPITOLUL 5

# TRANSMITEREA INFORMAȚIEI EREDITARE

Informația ereditară, necesară pentru sinteza diferitelor proteine și realizarea caracterelor fenotipice, se transmite din generație în generație, în două etape (vezi figura 1.1):

- biosinteza unor noi molecule de ADN identice cu molecula inițială – prin *replicare semiconservativă* – care va conduce la dublarea cantității de ADN;
- distribuția totală, egală și precisă a materialului genetic dublat, prin *diviziune celulară*.

Aceste procese, riguros controlate, se realizează de obicei cu mare *fidelitate* (exactitate) asigurând astfel *stabilitatea* proceselor ereditare. Evident, ele pot suferi și *erori* (de replicare sau de distribuție) care, în absența unor mijloace eficiente de reparare și eliminare a erorilor, pot avea consecințe importante la descendenți, producând boli.

Transmiterea informației și caracterelor ereditare în succesiunea generațiilor de celule și organisme eucariote este supusă unor legi obiective și universale.

## A. REPLICAREA ADN.

Descriind modelul structurii ADN, alcătuit din două catene polinucleotidice, antiparalele (cu polaritate inversă), legate între ele (prin punți de hidrogen) în mod complementar (A-T; G-C), Watson și Crick au intuit de la început că modelul propus de ei *explică mecanismul de copiere a informației genetice*: fiecare catenă servește drept matriță pentru formarea unei catene noi.

Schematic, dubla spirală a ADN se *separă* în cele două catene componente (asemenea deschiderii unui fermoar), formând o structură în formă de Y numită "*furcă de replicare*". Fiecare catenă servește apoi ca *matriță* sau tipar pentru aranjarea complementară (A-T, G-C) și secvențială (în direcția 5'→3') a deoxiribonucleotidelor activate, care vor fi polimerizate sub acțiunea ADN polimerazei (figura 5.1.). Astfel, o moleculă bicatenară de ADN va forma două molecule noi, *identice* între ele precum și cu molecula "parentală", fiecare formată dintr-o catenă "*veche*" și o catenă "*nou sintetizată*"; de aceea procesul de sinteză al ADN a fost numit **replicare semiconservativă**. În felul acesta informația genetică a fost transmisă întocmai, în succesiunea generațiilor de molecule.

Experimental, s-a dovedit<sup>1</sup> că procesul real al replicării genomului este concordant cu această ipoteză dar prezintă un nivel de complexitate care a evoluat de la organismele inferioare la cele superioare. Cele mai multe studii ale mecanismului de replicare a ADN au fost efectuate la procariote, din cauza facilităților experimentale, dar *mecanismul de bază este similar și la eucariote*. Cu toate acestea replicarea ADN în celulele animale este un proces foarte complex datorită *mărimii* enorme a genomului, fragmentării sale în cromosomi, asocierii cu proteine histonice în *nucleosomi* și *compactării*, prin spiralizare, în fibre de cromatină. De aceea, replicarea ADN implică numeroase interacțiuni proteină-proteină și proteine-ADN și este precis reglată temporal și spațial, în concordanță cu fazele ciclului celular. Pentru a putea discuta aceste "particularități" de complexitate, decisive pentru acuratețea transmiterii informației ereditare, vom prezenta mai întâi "mașinăria" de sinteză și mecanismul molecular "de bază" al replicării ADN.

## 1. PROTEINELE IMPLICATE ÎN REPLICAREA ADN

<sup>1</sup> Demonstrarea experimentală a replicării semiconservative a fost realizată, cu eleganță și precizie, prin încorporarea unor nucleotide marcate radioactiv (Meselson și Stahl, 1957; Taylor, 1957) sau a bromodeoxiuridinei în moleculele de ADN care se sintetizează (Zaharov, 1972; Latt, 1973)

Replicarea ADN se face sub acțiunea precisă și rapidă a unui *complex multiproteic* (numit și *sintetom*), o veritabilă “mașină de replicare”, care se mișcă în lungul ADN (figura 5.2). Fiecare piesă componentă are funcții precise.

**ADN polimerazele.** La om au fost identificate cinci tipuri de ADN polimeraze, denumite  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  și  $\epsilon$ ; în replicarea ADN nuclear sunt implicate ADN polimeraza  $\delta$ , *enzima replicativă majoră*, și ADN polimeraza  $\alpha$ ; ADN polimeraza  $\gamma$  realizează replicarea ADN mitocondrial iar ADN polimerazele  $\beta$  și  $\epsilon$  participă la repararea ADN.

ADN polimerazele folosesc catena matriță și orientarea legăturilor de hidrogen ale purinelor și pirimidinelor pentru a “stabili” care deoxiribonucleotid va fi adăugat în catena nouă. ADN polimerazele catalizează formarea legăturilor fosfodiesterice între deoxiribonucleotidele adiacente care vor forma catena de ADN. În legătură cu activitatea ADN polimerazelor sunt important de subliniat două caracteristici generale:

- toate ADN polimerazele sintetizează ADN *numai în direcția 5'→3'*, deci fiecare nou nucleotid va fi adăugat la gruparea 3'OH a nucleotidului deja încorporat într-o catenă polinucleotidică, de regulă catena în curs de sinteză;
- ADN polimeraza “*nu știe*” să înceapă sinteza unei catene ci numai să o alungească, adăugând un nucleotid la extremitatea 3'OH a unui acid nucleic (indiferent dacă este ADN sau ARN) care este legat complementar prin intermediul punților de hidrogen la catena matriță; de aceea sinteza unei catene noi de ADN începe de fapt cu sinteza unei *amorse de ARN* (!) (în engleză *primer*).

**ADN helicazele** *desfac* dublu helixul de ADN (folosind energia furnizată de ATP) și “eliberează” monocatenele ce vor funcționa ca matrițe pentru replicare; ele acționează în puncte specifice, precis localizate, numite și *origini ale replicării*, și apoi asigură înaintarea furcii de replicare, prin ruperea legăturilor de hidrogen, debobinarea și deschiderea moleculei de ADN, care devine accesibilă proteinelor care inițiază replicarea.

**ADN topoisomerasele** I și II *despiralizează* helixul ADN și eliberează tensiunea din molecula de ADN, acumulată prin debobinarea sa de către helicaze (care produc o *superîntrulare a ADN* în aval de locul de acțiune). Topoisomerasele secționază una sau ambele catene ale ADN (la nivelul axului fosfodiesteric), le derulează (relaxând molecula de ADN, prea strâns înfășurată) și apoi resudează breșa din fiecare catenă.

Există două tipuri de asemenea enzime: topoisomerasele I determină secționarea unei singure catene ADN, iar topoisomerasele tip II determină rupturi ADN simultan la nivelul celor două catene. În plus, topoisomerasele II pare a interveni și în alte procese celulare precum condensarea cromosomilor în cursul mitozei și separarea anafazică a cromatidelor surori.

**Proteinele de replicare A (RPA)** numite și proteine SSB (de la *single-strand binding proteins*) *mențin separate* cele două catene desfăcute de helicaze, prin fixare la monocatene și “*mascarea*” perechilor de baze, care au tendința naturală de a se reuni, prin refacerea punților de hidrogen; RPA împiedică reîmperecherea bazelor.

**Complexul ADN primază – ADNpolimerază  $\alpha$**  este implicat în sinteza *amorselor* și replicarea catenei “*întârziate*” a ADN. Sub acțiunea ADN primazei se sintetizează amorse scurte (3-10 nucleotide) de ARN la care ADN polimeraza  $\alpha$  adaugă, la capătul 3' terminal, circa 30 de deoxiribonucleotide. Apoi complexul ADN primază-ADN polimeraza  $\alpha$  este îndepărtat și ADN polimeraza  $\delta$  “*preia ștafeta*” continuând sinteza lanțului de deoxiribonucleotide început. Amorsele ARN vor fi distruse prin hidroliză enzimatică și înlocuite cu ADN.

**Proteinele de replicare C (RPC)** recunosc specific și se leagă la joncțiunea dintre primer și matriță, fiind responsabile de medierea și stabilizarea interacțiunii ADN polimerazei cu matrița ADN.

**PCNA** (de la *Proliferating Cell Nuclear Antigen*) se leagă în imediata vecinătate a proteinelor RPC și, împreună, sunt principalele proteine asociate ADN polimerazei. PCNA se organizează sub forma unor dimeri care au configurația spațială a unui inel ce luncă de-a lungul matriței ADN și permit încorporarea neîntreruptă a mii de nucleotide în catena ADN nou sintetizată. Blocarea PCNA (de exemplu, prin proteina *p21*) oprește replicarea ADN.

**Ribonucleaza H1** (RNaza H1) îndepărtează amorsele ARN<sup>2</sup> folosite de ADN polimeraze pentru inițierea replicării; lacuna rezultată este completată, refăcută, de ADN polimerază  $\delta$  iar refacerea continuității catenei este realizată prin sudarea capetelor, de către o **ADN ligază**.

## 2. MECANISMUL MOLECULAR AL REPLICĂRII ADN.

Procesul de replicare începe în “puncte” definite ale genomului numit **origini de replicare** (“ori”) și de aici progresează în *ambele direcții*, până ce ADN este complet duplicat. La nivelul originilor replicării se fixează pe ADN *proteinele de inițiere* ale replicării – care formează **complexele prereplicative (pre-RC)** - de care se leagă apoi celelalte enzime ale “aparaturii de replicare”: topoisomazele, helicazele, primazele, ADN polimerazele.

La nivelul originilor replicării, în cursul fazei G1 a ciclului celular, are loc formarea așa-numitelor **complexe prereplicative** (pre-RC) prin asamblarea secvențială a unor proteine (ORC, Cdc6, Cdt1 și Mcm2-7). Odată format, complexul va fi activat prin intervenția unor kinaze ciclin-dependente care declanșează tranziția către replicarea ADN. Aceasta tranziție implică asamblarea succesivă a unor factori de replicare adiționali (precum Mcm10, CDK, DDK, Cdc45, Sld3 și proteinele de replicare A) care facilitează despiralizarea ADN la nivelul originilor replicării și culminează cu asocierea ADN polimerazelor la ADN-ul despiralizat.

Dubla elice este apoi despiralizată sub acțiunea *topoisomerezilor* iar catenele sunt separate temporar de către *ADN helicaze*, într-o regiune localizată, formând o structură în formă de Y – *furca de replicare*. Pentru a menține catenele desfăcute, pe fiecare catenă “eliberată” se fixează *proteinele RPA (sau SSB)*, care împiedică re-împerecherea bazelor complementare și refacerea spontană a dublului-helix (figura 5.2.).

Pe cele două catene “matriță” are loc, în prezența ADN polimerazei  $\delta$ , *aranjarea secvențială și complementară* a deoxiribonucleotidelor *activate* în prealabil (deci sub formă de nucleosid trifostați), pentru a aduce energia necesară reacției de polimerizare.

Polimerizarea nucleotidelor se face diferit pe cele două catene matriță, datorită a două elemente caracteristice, menționate anterior:

- cele două catene ale ADN sunt *antiparalele*;
- *ADN polimeraza* nu poate iniția sinteza de novo a unui lanț polinucleotidic prin *legarea* a două mononucleotide; ea este capabilă doar să inducă adiția unui nucleotid la capatul 3'OH al unui lanț polinucleotidic preexistent; de aceea, declanșarea replicării ADN necesită utilizarea unor *amorse* de tip ARN (“primer”) - sintetizate sub acțiunea *primazei*; sinteza se face așadar numai în direcția 5' → 3' iar ADN polimeraza “știe” numai să alungească catena în curs de sinteză.

Aceste două caracteristici determină “o *asimetrie*” în procesul de replicare: pe catena matriță 5'→3' sinteza catenei noi este *continuuă și rapidă* (“leading strand” sau catenă avansată), pe măsura desfacerii celor două catene, iar pe catena 3'→5' sinteza ADN este *discontinuuă*, sub forma unor secvențe scurte (100-1000 nucleotide) de ADN numite și “*piese Okazaki*”<sup>3</sup>, fiind mult mai lentă (“lagging strand” sau catenă întârziată) (figura 5.3). Ulterior amorsa este distrusă prin hidroliză și înlocuită cu secvențe de tip ADN, sub acțiunea ADN polimerazei  $\delta$  iar fragmentele sunt unite de către o *ligază*. Pentru catena avansată amorsa este necesară numai la începutul replicării; în schimb pentru catena întârziată sinteza fiecărui fragment Okazaki necesită o amorsă.

## 3. PARTICULARITĂȚILE REPLICĂRII ADN LA EUCARIOTE.

Mecanismele de replicare a ADN la eucariote sunt în general asemănătoare celor de la procariote. Apar totuși anumite particularități determinate de: mărimea enormă a genomului, asocierea ADN cu proteinele în nucleosomi și fibre de cromatină și momentul replicării în ciclul celular (faza S). ADN nuclear este localizat în mai mulți cromosomi, fiecare cu o structură nucleoproteică complexă. Acest fapt implică inițierea replicării în mai multe puncte de origine, sinteza concomitentă a proteinelor histonice necesare menținerii organizării cromosomilor, reglarea precisă temporo-spațială a replicării în unitățile de replicare sau repliconi. Sinteza ADN nuclear

<sup>2</sup> RNaza H1 degradează specific hibridul format de amorsa ARN și ADN (numele H provine de la *Hybrid*)

<sup>3</sup> Piesele Okazaki se vor sintetiza în direcția 5'→3', care va fi în direcția opusă furcii de replicare.



depinde de multiple proteine enzimatic sintetizate în citoplasmă precum și de transmiterea stimulilor extracelulari care declanșează replicarea. Există o reglare a sintezei ADN dependentă de ciclul celular.

### 3.1. ORIGINILE REPLICĂRII ȘI REPLICONII

Datorită lungimii mari a genomului, asocierii cu proteine în nucleosomi și organizării în fibre de cromatină, viteza de replicare a ADN la eucariote este redusă (circa 50 nucleotide pe secundă comparativ cu 500 nucleotide pe secundă la procariote, unde ADN este “gol”, neasociat cu proteine). ADN trebuie însă să fie replicat integral în circa 8 ore; pentru a echilibra această situație “conflictuală”, replicarea ADN la eucariote *debutază în mai multe puncte de origine*, ce corespund unor mici unități de replicare numite **repliconi**. Replicarea progresa bidirecțional pentru fiecare replicon (figura 5.3) și, după ce se termină, repliconii fuzionează treptat până ce întregul cromosom este duplicat (figura 5.4). Fiecare cromosom uman are puncte de origine multiple, situate la 150-200 kb iar întregul genom posedă circa 30.000 de puncte de origine.

Punctele de origine a replicării sunt reprezentate de secvențe specifice de ADN (de circa 3000 nucleotide) care semnalează startul replicării și permit asamblarea “aparaturii de replicare”. Aceste secvențe nucleotidice specifice, în care se începe replicarea, conțin două categorii de elemente: elemente de tip A, puternic conservate la toate eucariotele, reprezentate de **secvențele de replicare autonomă** sau **ARS** (de la *autonomously replicating sequence*) bogate în repetiții AT<sup>4</sup> și elemente de tip B, mai puțin conservate.

### 3.2. APARATUL DE REPLICARE.

La eucariote există o “mașină” de replicare ce conține toate elementele menționate anterior (vezi A.1). De subliniat că ADN polimeraza  $\alpha$  acționează pe catena întârziată (“*lagging*”) și ADN polimeraza  $\delta$  atât pe catena avansată (“*leading*”) cât și pe cea întârziată. În reglarea activității ADN polimerazelor sunt implicate: PCNA sau antigenul nuclear de proliferare celulară și factorul de replicare C (RF-C), ambele cu roluri importante în controlul pornirii sau opririi replicării.

### 3.3. REPLICAREA ADN ȘI NUCLEOSOMII.

ADN-UL eucariotelor este asociat cu proteine histonice formând nucleosomii, structuri compacte în care ADN se înfășoară (de două ori) în jurul unui octamer de histone (vezi capitolul 2.D.2.3). Se pune firesc întrebarea: cum se comportă nucleosomii înainte și după replicare? Se presupune că atunci când furca de replicare ajunge în dreptul nucleosomului, ADN se derulează și miezul histic se desface în două jumătăți care rămân atașate la una din cele două molecule de ADN formate prin replicare; ele vor reface ulterior nucleosomul original. Pe cealaltă moleculă de ADN se vor constitui însă noi nucleosomi. Acest model este ipotetic dar s-a demonstrat cu certitudine că o dată cu sinteza ADN are loc în nucleu o sinteză importantă de histone necesare constituirii de nucleosomi noi.

### 3.4. REPLICAREA ADN ARE LOC ÎN FAZA S A CICLULUI CELULAR.

Celulele umane realizează procesul de replicare într-o perioadă particulară a ciclului lor de viață, faza S. Toate celulele ce se divid trec prin acest *ciclu celular* alcătuit din patru faze G1, S, G2 – ce corespund interfazei - și M sau faza mitotică.

În celulele de mamifere faza S durează circa 8 ore (pentru un ciclu celular de 24 de ore); este un timp scurt pentru replicarea întregului genom uman diploid de peste 6 miliarde de pb. La această constrângere temporală se adaugă obligația ca replicarea ADN să fie foarte precisă deoarece orice eroare de plasare a nucleotidelor în catena nou sintetizată produce mutații. Celula are mijloacele

---

<sup>4</sup> Repetițiile multiple ale dinucleotidului AT sunt asociate frecvent cu regiunile de atașare la “axul - intern al cromosomului – (“*scaffold*”) și codifică elemente specifice necesare destabilizării structurii helicale a ADN; de aceea sunt numite și “*DNA unwinding elements*” (DUEs)

necesare pentru a se asigura că întregul genom este integral și corect replicat în cursul fazei S. La aceasta se adaugă mecanisme multiple de identificarea și corecție a erorilor

**Reglarea replicării ADN** - se realizează prin interacțiuni coordonate între diferite proteine: ciclina, CDK, inhibitorii CDK, precum și anumiți factori de transcripție (care activează punctele de origine ale replicării)(vezi 5.B.1):

- Ciclinele<sup>5</sup> D și E facilitează trecerea G1/S iar ciclina A asigură progresia prin faza S;
- CDK4 este o protein kinază activatoare;
- Factorii de transcripție: **RLF** (inclus în complexul de pre-replicare) - activează punctele de origine a replicării și împiedică re-replicarea în cursul aceluiași ciclu iar **E2F** stimulează expresia genelor necesare intrării în faza S;
- Inhibitorii kinazelor dependente de ciclina sau CKI (proteinele P21, P27 ș.a.) formează al doilea nivel de reglare al intrării și progresii celulelor prin faza S; ei blochează aceste procese (inhibând complexele CDK-ciclina și PCNA) fie atunci când apar leziuni în ADN fie în cursul diferențierii terminale a unui țesut (însoțită de pierderea capacității de replicare și diviziune).

Unitățile de replicare (ce includ 20-80 repliconi) nu sunt activate concomitent și la întâmplare ci *asincron și într-o anumită ordine*, în funcție de structura cromatinei în care ele se găsesc. Cromatina puternic condensată (heterocromatina) este replicată tardiv, la sfârșitul fazei S, în timp ce eucromatina, mai decondensată, se replică precoce, la începutul fazei S. Deci regiunile din genom în care cromatina este mai puțin condensată și deci mai accesibilă mașinării de replicare sunt replicate mai precoce; acestea sunt de regulă benzile R (bogate în G-C) regiuni de ADN care conțin în special genele "domestice" (active în toate celulele). Regiunile din cromosomi care sunt replicate tardiv coincid cu benzile G, bogate în A-T.

În mod normal, în faza S întregul genom este replicat *o singură dată*. Deoarece replicarea ADN este asincronă există riscul teoretic ca unele regiuni să fie replicate repetat. Acest lucru nu se întâmplă deoarece o serie de factori inhibitori se fixează pe cromatina replicată și nu permit replicarea ei repetată, până ce celula nu trece prin mitoză. Acești factori sunt îndepărtați prin diviziune și celulele rezultate pot începe un nou ciclu, cu faza S, în care se produce o nouă replicare.

### 3.5. REPLICAREA TELOMERELOR

**Telomerele** sunt structuri cromatiniene *specializate*, situate la capetele cromosomilor eucariotelor, care asigură stabilitatea cromosomilor și împiedică unirea cromosomilor prin capetele lor.

Telomerele cromosomilor umani, alcătuite din *ADN și proteine*, au o structură *identică* la specii diferite și *puternic conservată* în cursul evoluției (acest fapt atestă importanța lor funcțională deosebită). Telomerele sunt formate din elemente repetitive hexanucleotidice (la om TTAGGG) dispuse în tandem, care se extind pe o lungime variabilă de 5-20 kb, în funcție de țesut și de vârsta individului. Datorită particularităților de replicare ale capetelor ADN liniar din cromosomi (ce implică folosirea unor amorse degradabile pentru inițierea replicării), la fiecare *capăt 5' al catenelor nou sintetizate* de ADN rămâne o mică regiune (corespunzătoare ultimei amorse) care nu este replicată (figura 5.3.b). Extremitatea moleculelor de ADN rămâne cu o prelungire monocatenară 3', protuberantă și instabilă. Aceasta se pliază (spre înapoi) și formează o structură *"în ac de păr"*, care stabilizează ADN<sup>6</sup>; efectul stabilizant este favorizat și prin asocierea, la acest nivel, a unor proteine speciale (TRF1 și TRF2).

Un fenomen caracteristic telomerelor este *pierderea inexorabilă a unor secvențe de ADN la fiecare replicare* (diviziune celulară). Deoarece, la capătul 5' al catenelor de ADN nou sintetizate **replicarea este incompletă** și la fiecare ciclu celular se pierd 25-200 pb. Aceasta duce la *scurtarea progresivă a telomerelor* și, după un număr de replicări, la *oprirea replicării și diviziunii* (în Go, prin acțiunea proteinelor P53). Telomerele ar fi *"câlcâiul lui Achile al dublei spirale a ADN"* (Olovnicov, 1993). Datorită eroziunii permanente a telomerelor, celulele umane au număr limitat de

<sup>5</sup> Ciclinele D, E și A împreună cu CDK4 alcătuiesc **SPF** (*S-phase promoting factor*) care controlează faza S

<sup>6</sup> După Greider, 1999, se formează chiar o structură triplu catenară, asemănătoare cu bucla D de la ADN mitocondrial

diviziuni atât *in vivo*<sup>7</sup> cât și *in vitro*. Se poate spune că lungimea telomerelor este un *indicator al istoriei replicative* a celulelor și poate fi considerată un fel de "*ceas molecular*" care arată potențialul replicativ *restant* al celulelor normale; când telomerele ating o *lungime minimă critică* celula încetează să se dividă și "*ceasul*" se oprește.

Pierderea secvențelor telomerice poate fi compensată prin adăugarea *de novo* a secvențelor TTAGGG la capătul 3' al unei catene de ADN, de către enzima **telomerază**, care stabilizează telomerele și previne scurtarea lor. Telomeraza este o ribo-nucleoproteină ce conține o scurtă secvență de ARN, complementară repetițiilor telomerice (la om această secvență este: 3'-CCCAAUCCC-5') ce funcționează ca *matriță internă* (figura 5.5). Telomeraza este un tip neobișnuit de revers transcriptază (ADN polimerază ARN dependentă) care adaugă la capătul 3'(bogat în G) noi secvențe de nucleotide telomerice, fără să necesite o matriță exogenă. Sinteza celeilalte catene complementare a telomerului, bogată în C, implică o amorsă+ADN polimeraza  $\alpha$ , ce folosește ca matriță catena telomerică bogată în C, care a fost deja sintetizată de telomeraza.

Telomeraza este exprimată în celulele germinale<sup>8</sup> tinere (din gonade), în blastocist și cele mai multe țesuturi embrio-fetale în săptămânile 16-20 ale dezvoltării; Activitatea telomerazei *scade progresiv* în viața fetală și *dispare postnatal*, în aproape toate celulele somatice normale; excepție fac celulele stem din măduva oaselor. Dispariția activității telomerazice în celulele somatice după naștere determină *scurtarea progresivă a telomerelor (după fiecare diviziune)*, odată cu vârsta. Când se atinge (la o vârstă înaintată) o lungime critică minimă *diviziunea celulară se oprește* și începe **senescența**. Pierderea telomerelor generează de asemenea *instabilitatea genomică* și creșterea frecvenței *rearanjamentelor* cromosomice.

Telomeraza poate fi însă *reactivată* în procesele inflamatorii dar mai ales în celulele canceroase. Acest lucru oprește scurtarea telomerelor, crește stabilitatea lor (prin adăugarea secvențelor repetitive hexanucleotidice la capetele cromosomilor) și astfel *stimulează proliferarea celulară*. Componenta catalitică a telomerazei, numită TERT, a fost localizată pe cromosomul 5p15.33 și a fost clonată în 1999. Componenta ribosomală numită TERC este codificată de o genă scurtă (451 nucleotide) care a fost localizată pe cromosomul 3q21-q28.

Recent, mutații ale genei TERC au fost identificate la pacienți care prezintă o formă transmisă autosomal dominant de *discheratoza congenitală*. La acești pacienți s-a documentat o lungime semnificativ mai scurtă a telomerelor. Mutații ale TERC au fost identificate de asemeni și la unii pacienți cu anemie aplastică idiopatică. Și în aceste cazuri lungimea telomerelor a fost gisită a fi redusă.

În ultimii ani se acordă un interes deosebit studiului corelației dintre scurtarea telomerelor, senescența celulară, expresia telomerazei și cancerelor umane. A apărut ceea ce se cheamă "**ipoteza telomer - telomerază a îmbătrânirii și cancerului**" (Caseta 5.1).

#### Caseta 5.1

##### Telomerele și senescență.

"*Ipoteza telomerică a senescenței*" (Harley, 1991) se bazează pe faptul că în celulele somatice normale lungimea secvențelor telomerice repetitive *scade cu vârsta* (de la 20.000 pb la embrion, la circa 6000 pb la vârstnic). Acest fenomen a fost demonstrat atât *in vitro* cât și *in vivo*. În consecință, lungimea telomerelor poate fi considerată un indicator ce măsoară *capacitatea proliferativă restantă* a celulei iar scurtarea progresivă a telomerelor (prin replicarea incompletă) - un **biomarker al îmbătrânirii**. Astfel, în *sindroamele de îmbătrânire accelerată* - în sindromul Werner, sindromul Hutchinson-Gilford și alte stări progeroide - telomerele sunt mult mai mici decât la persoane normale de aceeași vârstă.

Nu credem că relația dintre scurtarea telomerelor și senescență este mecanismul fundamental (și nici decum unic) al îmbătrânirii. Dar ipoteza este plauzibilă, ca o componentă a îmbătrânirii celulare, și studiul ei poate aduce multe surprize și, de ce nu, acțiuni benefice. De ex., (1) *încetinirea ratei de scurtare a telomerelor* în celulele și țesuturile normale ar putea afecta profund vârsta debutului și severitatea multor boli asociate cu vârsta; (2) *alungirea ex vivo a telomerelor* în limfocitele T, fibroblastele dermice sau celulele

<sup>7</sup> la om, celulele somatice pot produce prin diviziune *maximum 80 de generații celulare* (ipoteza Hayflick); (excepție fac însă celulele stem pluripotente)

<sup>8</sup>Datorită numărului mare de diviziuni ce au loc în spermatogeneză, absența telomerazei ar duce la extincția rapidă a acestei prețioase populații celulare .

endoteliale ar putea avea un impact major asupra răspunsului imun în HIV, vindecarea rănilor și poate în bolile cardiovasculare

### Telomerele, telomeraza și boala canceroasă.

În mod cert telomerele asigură *protecția și stabilitatea cromosomilor*. Pierderea telomerelor produce rearanjamente cromosomice sau poate duce la *pierderea cromosomului* respectiv din celulă. Aceasta ar putea explica pierderea heterozigozității locilor pentru genele supresoare ale creșterii tumorale, un mecanism fundamental în cancerogeneză. În plus, s-a constatat că în cancer se produce o **reactivarea a telomerazei**, care stabilizează lungimea telomerelor, adăugând secvențele hexamerice specifice, și *celulele încep să se dividă activ*. Acest fenomen este, foarte probabil, implicat în *imortalizarea celulară*<sup>9</sup> și/sau *creșterea continuă a tumorilor* (favorizând poate și metastazarea). Desigur relația dintre reactivarea telomerazei și cancer nu este simplă. În *primul rând* existența reală a unor tumori telomerazo-negative arată însă că activarea telomerazei nu este obligatorie pentru formarea / creșterea tumorilor<sup>10</sup>; există foarte probabil și alte mecanisme de imortalizare celulară, independente de telomerază. În *al doilea rând*, producerea cancerului necesită și alte mecanisme celulare, alte mutații adiționale care să determine invazia și metastazarea. În *al treilea rând* nu se cunosc mecanismele moleculare de reactivare a telomerazei. Un exemplu este gena c-MYC care a fost identificată ca reglator esențial al activității TERT. c-MYC interacționează cu promotorul genei TERT, iar mutațiile cu câștig de funcție ale genei c-MYC pot explica cel puțin parțial reactivarea activității telomerazice în unele cancere. Se presupune că ar exista gene implicate în represia normală a telomerazei postnatal, care prin mutație ar produce reactivarea enzimei. Nu se cunoaște încă rolul telomerelor și telomerazei în transformarea de la tumori benigne la tumori maligne.

Cu aceste precizări și păstrând un entuziasm ponderat se poate afirma că determinarea activității telomerazei este un marker pentru diagnosticul precoce al cancerului și pentru evaluarea prognosticului iar folosirea unor inhibitori ai telomerazei (în special molecule antisens<sup>11</sup> complementare față de componenta ARN a telomerazei umane) ar putea deveni un tratament eficient contra cancerelor. În concluzie, *"telomeraza îndeplinește multe din criteriile pentru o metodă ideală în terapia cancerului și deși există încă multe întrebări fără răspuns despre ipoteza telomerică, optimismul pare justificat"* (Shay et al., 1996).

Cert este că ipoteza telomer - telomerază a îmbătrânirii și cancerului, chiar dacă nu pare perfectă este seducătoare și în anii care vin vom mai auzi cu siguranță multe lucruri noi, care sperăm să fie cât mai benefice practicii medicale în gerontologie și oncologie.

### 3.6.FIDELITATEA REPLICĂRII ADN.

Acuratețea replicării ADN este critică pentru transmiterea informației ereditare în succesiunea celulelor și organismelor. De aceea, organismul uman posedă numeroase mecanisme care determină ca rata erorilor de împerechere ("*mismatch*") apărute în cursul procesului de replicare să fie extrem de redusă, de circa o încorporare greșită la  $10^9 - 10^{10}$  nucleotide.

În momentul în care cele două catene ADN sunt separate, nucleotidele activate se aranjează "spontan" și pe bază de complementaritate pe întreaga porțiune a matriței de ADN astfel expusă. Stoichiometria reacției de așezare pe bază de complementaritate permite împerecheri greșite (în special unele precum G-T) cu o probabilitate de 1 la 10.000. Gradul crescut de fidelitate al replicării este rezultatul unor activități specifice ale ADN polimerazelor.

Un prim mecanism prin care ADN polimerazele ajută la creșterea fidelității replicării este prin inserția corectă a bazelor în catena ADN nou sintetizată. ADN polimerazele nu catalizează încorporarea pasivă a oricărui nucleotid care este deja legat prin punți de hidrogen la catena matriță, ci discriminează activ împotriva unor împerecheri greșite probabil pe baza de conformație tridimensională. Recunoașterea erorii se face pe seama *distorsiunii* pe care o produce în diametrul constant de 2nm al moleculei de ADN împerecherea greșită a două nucleotide cu purină (molecule mari) sau două nucleotide cu pirimidină (molecule mici). Această distorsiune acționează ca semnal pentru îndepărtare noii baze inserate greșit. Mecanismul crește acuratețea replicării de aproximativ 100 de ori, reducând rata așteptată a erorilor de la  $10^{-4}$  la aproximativ  $10^{-6}$ .

<sup>9</sup>De aceea dispariția postnatală a activității telomerazei ar putea fi considerată un "mecanism de prevenire" a proliferării excesive și anormale a celulelor somatice.

<sup>10</sup>Unele cancere care necesită puține mutații pentru a deveni maligne și deci nu implică decât un număr mic de diviziuni celulare ar putea fi telomeraz negative

<sup>11</sup>Oligonucleotide modificate de tipul "peptide nucleic acids (PNAs) (7) în care deoxiriboza a fost înlocuită de N-glicină

Un alt mecanism major responsabil pentru acuratețea replicării ADN este activitatea de *autocorecție* (sau editare de la *proofreading*) a ADN polimerazelor. Aceasta este rezultatul capacității exonucleazice 3' – 5' care acționează în sensul opus sintezei ADN și înlătură nucleotidele încorporate greșit în catena nouă. Asemenea activitate exonucleazică 3' – 5' a fost documentată pentru ADN polimerazele delta și epsilon și permite creșterea acurateții replicării ADN de circa 100-1000 ori.

În sfârșit, puținele erori de împerechere care apar totuși în ciuda intervenției mecanismelor mai sus amintite vor fi ținta unor *meanisme de reparare a ADN* (în principal sistemul de reparare al erorilor de împerechere) care vor fi discutate în capitolul 6. Lipsa corectării lor va conduce la apariția mutațiilor, prin replicari celulare ulterioare. De exemplu, dacă în dreptul A de pe matriță se va plasa eronat C, în loc de T, la următoarea replicare se va produce substituția perechii de baze A-T cu C-G.

Cert este că integritatea structurală a ADN este extrem de importantă pentru supraviețuire și toate celulele vii au mecanisme evolute de reparare a leziunilor ADN. Această paradigmă a fost tragic confirmată prin descoperirea unor *sindroame de predispoziție la cancer* care se produc prin mutații ale genelor ce codifică proteinele implicate în reparare. Astfel de mutații ale genelor (numite firesc gene *mutator*) determină o creștere de peste 100 de ori a ratei mutațiilor și produc o predispoziție individuală la cancer, în special cancer de colon.

## B. TRANSMITEREA INFORMAȚIEI GENETICE DE LA O CELULĂ LA CELULELE „FIICE”

În celulele somatice, materialul genetic dublat în interfază, se distribuie în mod *egal și total* celulelor fiice, prin procesul de diviziune mitotică. Rezultă două celule noi („fiice”), identice din punct de vedere genetic, atât între ele, cât și cu celula („mamă”) din care provin. Procesele prin care o celulă își replică materialul genetic, îl divide egal și îl transferă celulelor fiice se desfășoară într-o ordine progresivă, precis reglată, ce formează **ciclul celular**. *Controlul ciclului celular* decide în ultimă instanță dacă o celulă își va continua progresia prin ciclu (va crește și se va divide) sau va suferi o diferențiere sau va trece într-o stare de repaus proliferativ. Pierderea controlului ciclului va genera o creștere celulară anormală (celule tumorale, defecte de dezvoltare) sau va duce la moarte celulară programată (apoptosis). Se pot produce de asemenea *erori* în segregarea cromosomilor în mitoză care vor genera anomalii cromosomice. Pentru aceste rațiuni, cunoașterea proceselor ce alcătuiesc ciclul celular prezintă o importanță deosebită pentru înțelegerea unor mecanisme patogenice generatoare de boli.

### 1. CICLUL CELULAR.

**Ciclul celular** reprezintă succesiunea de evenimente biochimice și morfologice care se produc în viața unei celule, din momentul formării și până la sfârșitul diviziunii sale. Ciclul celular are două mari perioade: *interfaza* și *diviziunea* (figura 5.6).

*Interfaza* reprezintă perioada cuprinsă între două diviziuni succesive, în care se desfășoară toate activitățile specifice unei celule. Evenimentul cel mai important al interfazei este *sinteza de ADN* (replicarea), prin care se *dublează cantitatea de material genetic* (4C). Ea se produce într-o perioadă limitată a interfazei, denumită *faza S*. Datorită acestui proces, interfaza poate fi subdivizată în trei etape succesive: *faza G<sub>1</sub>* (presintetică), *faza S* (de sinteză) și *faza G<sub>2</sub>* (postsintetică sau premitotică).

*Diviziunea celulară* sau *faza M* ("mitotică") este alcătuită dintr-o serie de procese secvențiale prin care materialul genetic (ADN), replicat în interfază, *se distribuie egal și total* (segregare cromatidiană) formând doi nuclei distincți, iar celula se împarte în două celule fiice (citokineză); acestea vor fi *identice* cu celula din care au provenit (vezi capitolul 1, figura 1.1.B). Prin replicarea ADN-ului și diviziune se asigură *transmiterea fidelă a informației genetice* în succesiunea generațiilor celulare.

Durata ciclului celular poate varia mult între diferite țesuturi, datorită variabilității fazei G<sub>1</sub>, celălalte

faze fiind relativ constante ca durată. Pentru o durată medie de 24 ore, duratele aproximative ale fazelor sunt:  $G_1 = 10$  ore,  $S = 9$  ore,  $G_2 = 4$  ore,  $M = 1$  oră.

**Tabelul 5.1. Caracteristicile principale ale fazelor ciclului celular mitotic<sup>12</sup>**

PERIOADA	FAZA ȘI DURATA (ore)	EVENIMENTE	CANTITATE ADN	ASPECT LA MICROSCOPUL ELECTRONIC
Interfază	$G_1$ (10 h)	Sinteză intensă de ARN și Proteine	2C	2n cromosomi monocromatidieni
	S (9h)	Sinteză de ADN și histone	4C	
	$G_2$ (4h)	Sinteza proteinelor fusului de diviziune Sinteza factorului de declanșare al mitozei	4C	2n cromosomi bicromatidieni despiralizați
Diviziune	M (1h)	Profază Metafază Anafază Telofază	4C 4C ↙ ↘ 2C 2C	Cromosomi bicromatidieni condensați (vizibili la microscopul optic) Cromosomi monocromatidieni

### 1.1. FAZELE CICLULUI CELULAR MITOTIC

#### **a. Faza $G_1$**

Faza  $G_1$  (în engleză *gap* – interval, lacună, gol – deoarece nu i se cunoștea semnificația) reprezintă faza de start a ciclului celular, pentru celulele stimulate (de factori de creștere) să se dividă (tabelul 5.1). Fiecare cromosom (puternic despiralizat) este *monocromatidian*, fiind alcătuit dintr-o *singură moleculă de ADN*. Cantitatea de material genetic este 2C molecule de ADN sub forma a 2n (46) cromosomi despiralizați. În prima parte a fazei  $G_1$  ( $G_{1A}$ ), se produce o sinteză intensă de substanțe (ARN, proteine) necesare creșterii și funcționării celulei. Se acumulează ARN și proteine până la o concentrație prag, numită **punct de restricție "R"**, după care celulele trec în subfaza  $G_{1B}$ , fiind *condiționate* să intre în faza S și să se dividă (figura 5.6).<sup>13</sup>

În anumite condiții (lipsa factorilor de creștere, prezența unor inhibitori ai sintezei proteinelor etc.), celulele aflate în subfaza  $G_{1A}$  pot trece într-o fază de *activitate metabolică redusă*, numită faza  $G_0$  sau  $G_{1Q}$  (de la "*quiescence*" - repaus, liniște), în care rămân viabile și pot supraviețui timp îndelungat. Dacă aceste condiții restrictive dispar, celulele  $G_0$  pot reveni în  $G_1$  și apoi pot progresa spre faza S, deoarece își păstrează capacitatea de diviziune. Fazele  $G_1$  și  $G_0$  sunt două stări fiziologice distincte ale celulei.

Unele celule aflate în subfaza  $G_{1A}$  (sub influența unor inductori ai diferențierii) părăsesc definitiv ciclul celular și trec în faza  $G_{1D}$ , ce corespunde *celulelor diferențiate*; ele nu se mai divid și mor după un anumit timp.

#### **b. Faza S**

Faza S (în engleză "*synthesis*"- sinteză) se caracterizează prin *sinteza de ADN* (realizată prin replicarea semiconservativă) și *sinteza de histone* (vezi capitolul 5.A). În această fază cantitatea totală de ADN (2C) trebuie să fie replicată complet dar numai o *singură dată*; se produce astfel o *dublare* a cantității de material genetic (4C), condiție obligatorie pentru desfășurarea diviziunii celulare. Numărul de cromosomi rămâne 46, dar fiecare cromosom va fi **bicromatidian**, alcătuit din două cromatide identice ("*surori*"), deci va conține două molecule de ADN.

Replicarea ADN în faza S este **asincronă**: unele segmente de ADN (bogate în perechi de baze G-C) se replică *precoce*, la începutul fazei S, iar alte segmente (bogate în perechi de baze A-T) se replică *tardiv*, la sfârșitul fazei S. Informații precise despre sinteza/replicarea ADN pot fi obținute fie prin **autoradiografie** (cu ajutorul unui izotop radioactiv, de regulă timidină tritiată  $T^3H$ ), fie prin **utilizarea bromodeoxiuridinei** (BrdU), un analog al timinei. Ele se vor încorpora în molecula nou sintetizată, marcând-o radioactiv, în primul caz, sau modificându-i configurația, în al doilea caz.

Uneori, în faza S a ciclului celular mitotic se produce un "schimb egal de material genetic

<sup>12</sup> Ciclul celular meiotic are o serie de particularități (vezi capitolul 5.C.1)

<sup>13</sup> Poziția punctului de oprire  $G_1$  este incertă, fie aproape de faza S, fie la mijlocul fazei  $G_1$

între cromatidele surori" (SCE – în engleză "sister chromatide exchange") (Casetă 5.2)

## CASETA 5.2

### SCHIMBURILE DINTRE CROMATIDELE SURORI

În faza S a ciclului celular mitotic se poate produce un "*schimb egal de material genetic între cromatidele surori*" (SCE - "*sister chromatide exchange*"). Frecvența SCE este în mod normal de 7-10 per metafază; ea crește însă în anumite boli (sindroamele de instabilitate cromosomică), precum și după expunerea organismului la substanțe mutagene, clastogene (ce rup cromosomii) sau carcinogene. Astfel, SCE reprezintă o *metodă de evaluare a acțiunii mutagene* a diferiților compuși chimici din mediul ambiant.

SCE care poate fi evidențiat prin tehnici speciale. Celulele în cultură efectuează *două cicluri de replicare* în prezența unui analog al timinei, numit *5-bromodeoxiuridină* (BrdU). BrdU se *încorporează*, în locul timinei, în moleculele de ADN nou sintetizat, modificând proprietățile de colorare ale cromatidelor. Folosind soluția Giemsa sau colorantul fluorescent Hoechst 33258 se colorează cromatida în care numai *o catenă* a încorporat BrdU (figura 5.8.). În zonele în care se produce SCE se observă aspectul particular ("arlechin") al cromatidelor, cu zone colorate alternând cu zone necolorate.

#### c. Faza G<sub>2</sub>

Faza G<sub>2</sub> se caracterizează prin sinteza unor proteine specifice și a unor mici cantități de ADN (necesare în procesul de "corectare" a erorilor de replicare). Fiecare cromosom este *bicromatidian* (cantitatea de ADN este 4C), dar despiralizat. Spre sfârșitul fazei G<sub>2</sub> se activează/ sintetizează un "*factor de declanșare al mitozei*" (MPF), ce determină condensarea filamentelor de cromatină în cromosomi și formarea fusului de diviziune.

O demonstrație elegantă a existenței MPF este fenomenul de "*condensare prematură a cromosomilor*", realizat prin *fuziunea* unei celule în diviziune (metafază) cu o celulă în interfază (figura 5.7.); se produce rapid o *condensare* precoce a filamentelor de cromatină interfazică, care în mod obișnuit, sunt puternic despiralizate și deci invizibile la microscopul optic, iar membrana nucleară se dezassemblează.

În lipsa factorului de condensare celulele *se opresc în faza G<sub>2</sub>* și pot abandona ciclul celular, formându-se *celule tetraploide* (4n cromosomi); unele dintre ele devin celule binucleate (de exemplu cardiomiocitele adulte)(figura 5.6).

#### d. Faza M

Faza M corespunde diviziunii mitotice și are o durată de aproximativ o oră. Ea începe cu diviziunea nucleului (mitoză) și se termină cu diviziunea citoplasmei (citokineză). Subliniem din nou că, în această etapă, materialul genetic dublat în interfază (4C molecule ADN în 46 cromosomi bicromatidieni) *segregă*, adică *se distribuie în mod egal și total* celulelor "fiice" (2C molecule ADN în 46 cromosomi monocromatidieni), care vor fi astfel identice cu celula din care provin. Procesul de "distribuție" a materialului genetic prin diviziune se desfășoară de obicei cu mare precizie asigurând *fidelitatea transmiterii informației genetice* în succesiunea generațiilor de celule. El poate suferi însă și erori, care vor genera anomalii cromosomice.

## 1.2. EVOLUȚIA CELULELOR REZULTATE PRIN DIVIZIUNE

Celulele rezultate după diviziune pot evolua în trei direcții: *proliferare, diferențiere* și trecerea în *stadiul de repaus*.

#### a. Proliferarea.

Celulele parcurg un nou ciclu și se divid repetat; aceste "celule ciclice" alcătuiesc *compartimentul proliferativ* al organismului și se găsesc în țesuturile embrionare, măduva hematogenă, stratul bazal al epidermului, etc.

#### b. Diferențierea.

Celulele părăsesc definitiv ciclul celular și se transformă în *celule specializate*, cu anumite structuri și funcții, care *nu se mai divid* și mor după un timp determinat. De exemplu: neuronii, celulele musculare, granulocitele, hematiile mature, etc.

### c. Stadiul de repaus.

Unele celule (de exemplu: celulele "stem" sau sușă; limfocitele ș.a.) părăsesc ciclul celular în faza  $G_1$  și rămân în faza  $G_0$ , având o activitate metabolică mai redusă, dar păstrându-și capacitatea de diviziune. Aceste celule formează *compartimentul neproliferativ*. În condiții speciale, ele reacționează la anumiți stimuli din mediu (factori de creștere, unii hormoni, substanțe mitogene etc.) și pot reintra în ciclul de diviziune. Un exemplu edificator îl reprezintă activarea limfocitelor T din sângele periferic sub acțiunea fitohemaglutininei (PHA); ele se transformă în limfoblaste, celule tinere, care se divid intens. Acest fenomen este utilizat pentru studiul cromosomilor prin culturi de limfocite (vezi capitolul 2.D.3).

## 1.3 CONTROLUL CICLULUI CELULAR.

Progresia ordonată și desfășurarea normală a ciclului celular sunt realizate prin reacții biochimice în care multiple **kinaze ciclin-dependente (CDK)**(1-7) sunt *activate*, prin fixarea unor proteine numite **ciclina** (A-H). După *activare*, fiecare complex proteic **CDK-ciclină fosforilează** anumite proteine sepecifice, necesare pentru reacțiile care au loc într-o anumită fază a ciclului. Apoi, complexul CDK-ciclină poate fi *inactivat* determinând trecerea la faza următoare a ciclului celular; inactivarea se poate face fie prin degradarea proteolitică a ciclinei (de către complexul proteasomilor, în urma *ubiquitinării*) fie prin intervenția unor **molecule inhibitoare CKI**<sup>14</sup> (*proteine KIP: P21, P27 sau proteine INK: P15, P16*).

Interacțiunea dintre activarea și inactivarea activităților CDK, în diferite momente cheie, asigură *progresia normală și reglarea ciclului celular*. Fiecare fază a ciclului are un **control specific** (figura 5.9), realizat:

- în  $G_1$  de complexul *CDK4-ciclina D*,
- la tranziția  $G_1/S$  de complexul *CDK 2-ciclină E*,
- în faza S de complexul *CDK 2-ciclină A*,
- iar în fazele  $G_2$  și M de complexul *Cdc2-ciclină B*.

Tranziția de la o fază la alta a ciclului celular este controlată prin mecanisme specifice, care acționează în anumite **puncte de control** și verifică dacă *anumite procese sunt terminate înaintea începerii altora* sau dacă nu există *alterări* ale componentelor "mașinărilor" de replicare și segregare cromatidiană. În cazul identificării unor devieri de la normal sau defecte se blochează progresia celulei în ciclul celular (prin inactivarea CDK) și se induce "repararea" sau, dacă aceasta nu este posibilă, apoptoza (moartea celulară programată). Prin aceste mecanisme se asigură creșterea normală și se elimină defectele, care nu vor trece astfel la celulele fiice.

Pe parcursul ciclului celular se produc următoarele evenimente corelate cu reglarea ciclului:

- În faza "de start"  $G_1$  celulele reacționează la stimuli externi (mitogeni, factori de creștere) formându-se complexul *CDK4-ciclină D*, care fosforilează și deci activează diferite proteine ce funcționează în această fază. Printre acestea, un rol important îl are *proteina RB*<sup>15</sup>, care (după fosforilare) eliberează un *factor activator (E2F)* al transcripției genelor ce funcționează în faza S și realizează replicarea ADN.
- Intrarea în faza S este determinată de un semnal activator, complexul *CDK2-ciclină E*. Formarea acestui complex este însă blocată de *inhibitorul P27 al CDK*; trecerea în faza S implică deci mai întâi degradarea proteolitică a *P27* (prin sistemul *ubiquitină-proteasomi*)
- În **punctul de control  $G_1/S$**  are loc o verificare a parametrilor de evoluție normală a celulei: orice alterare a ADN, depleție de oxigen / metaboliți / energie sau perturbare fiziologică declanșează sinteza *proteinei TP53* ("gardianul" genomului uman)<sup>16</sup> care activează transcripția genei ce codifică *proteina P21*, un inhibitor al complexelor CDK-ciclină precum și al PCNA (antigenul nuclear al celulelor proliferante)<sup>17</sup>. Celulele sunt oprite în  $G_1$ , oferindu-li-se timp de corecție (figura 5.10); dacă alterările (în special cele din structura ADN) nu sunt reparate, celula va fi direcționată spre *apoptoză*

<sup>14</sup> Moleculele CKI (de la *Cyclin-dependent Kinase Inhibitors*) sunt de două feluri: *KIP* (de la *kinase inhibitory proteins*) care acționează pe multiple complexe CDK-ciclină și *INK* (de la *Inhibitors of CDK*) care acționează specific pe complexul CDK-ciclina D

<sup>15</sup> *Proteina RB* este codificată de o genă supresoare de tumori situată pe 13q14; mutațiile genei Rb pot produce anumite cancere, inclusiv retinoblastoame.

<sup>16</sup> Gena *TP53* este o genă supresoare de tumori; mutațiile ei se regăsesc în peste 60% din cancere

<sup>17</sup> *PCNA* stimulează ADN polimeraza  $\delta$



- Progresia ulterioară prin faza S și replicarea ADN sunt reglate de către *CDK2-ciclina A*<sup>18</sup>.
- În faza G2, la **punctul de control G2/M**, se decide dacă celula *intră în mitoză*; acest lucru este determinat de activarea bruscă a complexului *Cdc2*<sup>19</sup>-*ciclina B* (numit anterior și *factorul MPF*, de la "*Mitosis Promoting Factor*"). Celulele cu aberații cromosomice sau defecte ale aparatului mitotic sunt oprite să intre în mitoză (prin acțiunea TP53 și P21, care blochează formarea complexului Cdc2-ciclina B).
- În cursul mitozei, în metafază, mai există un **punct de control M** în care diviziunea se oprește și este verificată *alinierea perfectă a cromosomilor*, înaintea separării cromatidelor surori. Acțiunea este realizată de către o *proteină inhibitoare ISS*; degradarea proteolitică a acestei proteine (determinată de *ubiquitină*) declanșează anafaza, prin separarea cromatidelor.
- La sfârșitul mitozei are loc *degradarea bruscă a ciclului B* (produsă de către *ubiquitină*) și inactivarea Cdc2, fenomene ce permit celulei să treacă într-o nouă fază G1.

Proliferarea celulară este reglată pe o durată limitată de *factori extracelulari* (hormoni, factori de creștere etc.) precum și de anumite *gene de proliferare* sau "mitogene" (ce codifică ciclone, receptori ai factorilor de creștere, proteine necesare sintezei de ADN, etc.). Deoarece prin mutația și activarea lor anormală se produce o proliferare celulară aberantă și cancer, aceste gene normale mai sunt numite și **proto-oncogene**. O altă categorie de gene, numite *antiproliferative*, au rolul de a inhiba proliferarea celulară. De aceea aceste gene mai sunt numite **gene supresoare de tumori** sau **antioncogene**.

În cancer se produce o perturbare a desfășurării normale a ciclului celular. Celulele canceroase, purtătoare de mutații, "scapă" de sub controlul mecanismelor care reglează proliferarea normală, parcurg rapid și repetat ciclul celular, multiplicându-se permanent și anarhic. Multe medicamente anticanceroase (citostatice) determină "blocarea" proliferării celulelor, prin oprirea evoluției lor în diferite faze ale ciclului celular.

## 2. MITOZA

Mitoza este o diviziune caracteristică celulelor somatice ale organismului. Ea asigură *creșterea* biomasei organismului, care, între stadiul de zigot unicelular și cel de organism adult necesită  $1 \times 10^{14}$  diviziuni celulare. În unele țesuturi, cum ar fi măduva hematogenă sau țesutul epitelial, mitoza se desfășoară continuu, pe tot parcursul vieții, asigurând *reînnoirea* celulară dar și *repararea* unor leziuni tisulare. Prin mitoză, materialul genetic dublat în interfază, se distribuie *total* și *egal* celulelor fiice. Mitoza este o diviziune eucariotă, deoarece din celula inițială (celula "mamă") cu 46 cromosomi rezultă două celule "fiice" care au, de asemenea, 46 cromosomi (celule diploide). Mitoza permite *transmiterea cu mare fidelitate a informației genetice* în succesiunea generațiilor de celule, ceea ce asigură *stabilitatea* proceselor ereditare.

### 2.1. FAZELE MITOZEI

Mitoza este un proces continuu, care durează circa o oră, și se desfășoară în cinci etape succesive: profaza, prometafaza, metafaza, anafaza și telofaza (figura 5.11). Fiecare din aceste faze sunt definite prin *acțiunea cromosomilor* și distribuția conținutului citoplasmatic iar desfășurarea lor este riguros controlată pentru a se asigura că fiecare celulă fiică va primi o copie exactă a genomului parental. Orice eroare de distribuție va genera anomalii cromosomice la celulele fiice.

#### a. Profaza

La începutul profazei, în celule pot fi observate o serie de fenomene citoplasmice și nucleare.

În citoplasmă, centrosomul (un organit citoplasmatic perinuclear) se divide, iar cei doi centrosomi rezultați se deplasează în direcții opuse, formând polii *fusului de diviziune*. Din fiecare centrosom se ansamblează radiar microtubulii, care formează fibrele fusului de diviziune, ce pot fi centriolo-cromosomiale și centriolo-centriolare (figura 5.12.a). De asemenea, componentele microtubulare ale citoscheletului celular suferă transformări esențiale, prin depolimerizare în dimeri de  $\alpha$ -tubulină și  $\beta$ -tubulină și reansamblare în fibre ale fusului de diviziune. Alte componente, cum

<sup>18</sup> Acest complex produce fosforilarea proteinelor implicate în despiralizarea ADN precum și a proteinei RPA care se fixează în punctele de origine ale replicării. După declanșarea replicării complexul RPA-origine este blocat de către CDK-ciclinaB și replicarea nu se poate repeta (se face o singură dată) până ce celula nu trece prin mitoză, care degradează complexul CDK-ciclina B

<sup>19</sup> Cdc2 este o CDK specifică, numită așa de la *cell division cycle mutant 2*

ar fi moleculele de  $\gamma$ -tubulină și o proteină minoră - pericentrina formează prin ansamblare centriolii. Centriolii au un ciclu propriu de diviziune, după fiecare mitoză fiecare celulă fiică moștenește doi centrioli, iar în interfaza ce urmează ei se divid, astfel încât înainte de diviziune vor fi patru centrioli, grupați câte doi și dispuși perpendicular unul pe altul.

În nucleu are loc *condensarea fibrelor de cromatină* care se scurtează și se îngroașă, devin intens colorate și vizibile la microscopul optic sub formă de *cromosomi*. Nucleolii diminuează ca mărime și în cele din urmă se dezintegrează.

Fiecare cromosom este alcătuit din două *cromatide surori*, deoarece materialul genetic s-a replicat (dublat) în faza S a interfazei. Ele sunt atașate la nivelul *centromerului*, o structură cromosomică esențială pentru a asigura *distribuția* (segregarea) fiecărei cromatide în celulele fiice.

Regiunile centromerice sunt bogate în secvențe de ADN satelit  $\alpha$  și conțin cantități considerabile de heterocromatină constitutivă. Componenta centromerică cu rol în segregare este **kinetocorul**, care este situat în interiorul centromerului, având la examinarea prin microscopie electronică aspectul unui corpuscul fibros mai dens cu diametrul de 400 nm. Kinetocorul este structura de care se atașază câte o fibră a fusului de diviziune. Locul unde se formează kinetocorul este dictat de o secvență specifică de ADN de circa 120 pb, dispusă într-o zonă rezistentă la acțiunea nucleazelor. Aceste secvențe sunt similare la toți cromosomii, deoarece experimental s-a constatat că prin schimbarea lor reciprocă între neomologi, funcția de segregare se păstrează. Secvența de circa 120 pb din zona kinetocorului cuprinde trei tipuri de motive: a) CDE-I, formată din 9 pb, dispusă la capătul 5' al secvenței kinetocorice și conservată cu mici variații; b) CDE-II, formată din 80-90 pb ce conțin în proporție de peste 90% AT (la eucariotele superioare prezintă secvențe scurte repetitive, ce permit câteva distorsiuni considerabile ale dublului helix), dispusă în mijlocul secvenței kinetocorice; c) CDE-III, formată din 11 pb, dispusă la capătul 3' și înalt conservată. Importanța acestor secvențe este sugerată de consecințele mutațiilor la acest nivel. Astfel, mutațiile în CDE-I și CDE-II, duc la pierderea parțială a funcției centromerului, în timp ce mutațiile punctiforme din porțiunea centrală a CDE-III duc la pierderea totală a funcției centromerului. De asemenea, pentru funcția centromerului este important un complex proteic de 240 kD, format din trei polipeptide, denumit Cbf-III, cu rol de legare a secvenței CDE-III. Mutațiile în una din cele trei gene care codifică polipeptidele Cbf-III blochează segregarea cromatidelor surori.

Cromatidele conțin în regiunea centromerului o secvență specifică de ADN repetitiv, unde se assemblează complexe proteice specializate, numite **kinetocori** (figura 5.12.b). Fiecare cromatidă are un kinetocor, la care se va fixa un microtubul, ce leagă centromerul fiecărui cromosom de polii fusului de diviziune. Atașarea cromatidelor este rezultatul intervenției unor complexe proteice numite *coezina* și *condensina*.

### b. Prometafaza

Prometafaza începe cu dezansamblarea membranei nucleare, datorată disocierii *laminei nucleare* în subunități de *laminină*. Simultan cu dezansamblarea membranei nucleare, are loc și dezintegrarea reticulului endoplasmatic și a aparatului Golgi în mici vezicule membranare, prin mecanisme insuficient clarificate. Dezintegrarea membranei nucleare este urmată de deplasarea fusului mitotic în arie pe care a ocupat-o nucleul. Unii microtubuli se atașează la kinetocorii fiecărui cromosom, legând centromerul fiecărui cromosom de polii fusului de diviziune, ceea ce permite deplasarea cromosomilor spre ecuatorul celulei.

### c. Metafaza

În metafaza propriu-zisă, cromosomii bicromatidieni se *aliniază independent* unul de altul la ecuatorul fusului de diviziune, în același plan, formând așa-numita *placă metafazică*<sup>20</sup>.

### d. Anafaza

Anafază începe brusc cu separarea cromatidelor surori, simultan la toți cromosomii, și mișcarea lor spre polii opuși ai fusului de diviziune. Prin acest proces de **disjuncție (segregare) cromatidiană**, fiecare cromosom bicromatidian formează doi cromosomi monocromatidieni. După separare, cromosomii monocromatidieni sunt, în același timp, trași spre polii fusului de diviziune prin scurtarea (depimerizarea) fibrelor centriolo-cromosomiale, respectiv prin alungirea (polimerizarea) fibrelor centriolo-centriolare.<sup>21</sup> Deplasarea cromosomilor spre poli se face *simultan, cu aceeași viteză*. Astfel, se produce împărțirea *totală și egală* a materialului genetic între celulele fiice.

### e. Telofaza

<sup>20</sup> Să reamintim că metafaza este stadiul optim pentru studiul cromosomilor, deoarece aceștia sunt contractați, bine individualizați morfologic și dispuși într-un singur plan.

<sup>21</sup> Funcția microtubulilor poate fi demonstrată prin tratament cu colchicină, care inhibă formarea lor și împiedică aranjarea cromosomilor în plan ecuatorial, precum și migrarea lor anafazică.

Se caracterizează prin evenimente opuse celor din profază: cromosomii suferă un proces de *decondensare* și *despiralizare*, fusul de diviziune se dezassemblează, se refac membranele ce delimitează nucleul, reticulul endoplasmic și aparatul Golgi. Începe diviziunea citoplasmei (**citokineză**) prin acțiunea continuă a unui inel contractil de actină, care produce diviziunea citoplasmei, cele două celule fiice se separă, fiecare conținând  $2n$  cromosomi monocromatidieni cu aspect interfazic și o cantitate aproximativ egală din masa citoplasmatică.

## 2.2. REGLAREA MITOZEI

Desfășurarea mitozei este riguros controlată (prin 3 puncte de control) de către celula „mamă” pentru a se asigura că fiecare celulă „fiică” va primi o copie exactă a genomului parental și o cantitate aproximativ egală din masa citoplasmatică. Orice eroare de distribuție va genera anomalii cromosomice la celulele fiice.

La tranziția  $G_2/M$  există un *punct de control (1)* crucial, în care se decide dacă celula *intră în mitoză*, asupra căruia acționează Cdc2 și ciclina B. Activarea bruscă a *complexului Cdc2-ciclină B* (numit și MPF de la *M-phase promoting factor*) determină inițierea mitozei.

MPF acționează prin activarea unor protein-kinaze sau prin fosforilarea directă a unor proteine responsabile pentru modificările asociate mitozei. Printre proteinele țintă se numără *condensinele* care sunt responsabile de declanșarea condensării cromosomilor, *laminele* a căror fosforilare determină fragmentarea membranei nucleare, *proteinele GM130* a căror fosforilare induce degradarea aparatului Golgi și a reticulului endoplasmic și *proteinele asociate microtubulilor* care induc formarea fusului de diviziune.

Dacă există o alterare cromosomică sau un defect al aparatului mitotic este activată proteina TP53, care induce sinteza proteinei 21, un inhibitor al CDK, ce blochează celula în  $G_2$ .

După ce fiecare cromosom s-a aliniat în placa metafazică procesul se oprește (circa 20-30 minute) într-un nou *punct de control (2)*, pentru a se verifica dacă toți cromosomii sunt *perfect aliniați* înaintea separării cromatidelor surori (figura 5.13). Dacă totul este „perfect” atunci se declanșează degradarea proteolitică a proteinelor (*coezina* și *condensina*) ce atașează cele două cromatide la nivelul centromerului, sub acțiunea unui complex proteic cu activitate enzimatică numit *separază* care a fost activat de către complexul de promovare al anafazei, prin îndepărtarea așa-numitei *securine*, o componentă inactivatoare. Aceste fenomene permit separarea cromatidelor surori și inițierea anafazei.

În anafază există *punctul de control (3)* al mitozei când se produce inactivarea complexului Cdc2-ciclină B, prin degradarea proteolitică bruscă a ciclinei B (de către *ubiquitină*) și inactivarea Cdc2, fapt ce va permite celulei *terminarea mitozei* și trecerea într-o nouă fază  $G_1$ .

## 2.3. ERORI DE DISTRIBUȚIE A MATERIALULUI GENETIC ÎN MITOZĂ

Principalele erori de distribuție a materialului genetic în mitoză sunt: nedisjunția cromatidiană, întârzierea anafazică și clivarea transversală a centromerului. Ele generează anomalii cromosomice în țesuturile somatice (vezi capitolele 6.B.1 și 10.C)

### **a. Nedisjunția cromatidiană**

Nedisjunția cromatidiană apare atunci când cele două cromatide ale unui cromosom *nu se separă* în timpul anafazei mitozei, ci rămân unite și migrează împreună în una din cele două celule fiice. Consecința acestei erori este apariția unor celule anormale: una cu un cromosom în plus ( $2n+1$ ) = *trisomică* (47 cromosomi) alta cu cromosomul respectiv lipsă ( $2n-1$ ) = *monosomică* (45 cromosomi).

### **b. Întârzierea anafazică**

Întârzierea anafazică constă în *migrarea cu întârziere* a unui cromosom monocromatidian, care în momentul formării membranelor nucleare va rămâne în afara nucleilor celulelor fiice. El formează un „*micronucleu*” care dispare la următoarea diviziune. Rezultă clone celulare cu  $2n-1/2n$ , adică 45/46 cromosomi. Prezența micronucleilor (ce se formează din cromosomi care nu au migrat și care nu au fost incluși în nici unul din nucleii fii), indică tulburări ale desfășurării mitozei, ce pot fi produse de cauze externe. De aceea *testul micronucleilor* este utilizat pentru studiul efectelor cromosomice produse de radiațiile ionizante sau alți factori mutageni.

### **c. Clivarea transversală a centromerului**

Clivarea *transversală* a centromerului produce **isocromosomi** (“cromosomi cu brațe egale”) alcătuiți numai din brațe scurte (p) sau numai din brațe lungi (q)(figura 5.14). Aceștia sunt anormali, deoarece au duplicate genele de pe brațul prezent și le lipsesc genele de pe brațul pierdut. În patologia umană au fost descriși mai frecvent isocromosomi Xp sau Xq în disgeneziile gonadale sau i(12p) în sindromul Pallister-Killian, cu anomalii congenitale multiple și retard mintal.

#### d. Absența citokinezei

Celulele somatice după duplicarea ADN-ului în interfază au 2n cromosomi bicromatidieni (4C). Dacă are loc mitoză dar nu se produce citokineza rezultă o celulă *tetraploidă* cu 4n cromosomi monocromatidieni (4C). Acest proces, numit și *endomitoză*, se observă, în mod fiziologic, în procesul de regenerare hepatică.

#### e. Consecințele erorilor mitotice

Erorile de distribuție a materialului genetic în mitoză determină apariția unor anomalii de număr și structură ale cromosomilor în celulele fiice. Ele vor avea consecințe asupra evoluției celulelor, influențând *viabilitatea și capacitatea de multiplicare*. Acești parametri depind mai ales de cromosomul afectat și tipul de anomalie cromosomică (trisomie sau monosomie) produsă. Dacă celulele rezultate sunt viabile și se multiplică ulterior, rezultă o *clonă* (grup de celule ce au o particularitate comună și provin prin mitoze repetate dintr-o celulă inițială modificată) iar în organism apar **mozaicuri cromosomice** (figura 5.15). Se întâlnesc mai frecvent în sindromul Turner (25% cazuri), sindromul Down (2-4% bolnavi) și sindromul Klinefelter (vezi capitolul 10.C)

Apariția unor clone celulare anormale la un organism, prin oricare din erorile amintite, determină efecte diferite în raport cu *momentul ontogenetic* în care s-a produs accidentul (și deci cu proporția celulelor anormale care se formează). Perturbarea precoce și apariția unui număr mare de celule anormale în primele stadii de dezvoltare are consecințe negative majore (anomalii congenitale) asupra fenotipului purtătorilor de anomalii cromosomice (vezi capitolul 10.C). Un alt factor ce influențează efectele fenotipice ale clonelor anormale este distribuția lor în diferite țesuturi. A fost descris, de exemplu, un *mozaicism limitat la placentă*, cu un făt euploid (vezi capitolul 18.3).

## C. TRANSMITEREA INFORMAȚIEI GENETICE DE LA PĂRINȚI LA DESCENDENȚI

Transmiterea informației genetice în succesiunea generațiilor de organisme este un proces complex care se desfășoară în două etape: formarea gameților, celule sexuale mature cu un număr haploid de cromosomi (23 la om) și fecundarea lor, care reface la zigot numărul diploid de 46 de cromosomi, caracteristic speciei umane și realizează o structură genetică nouă, unică și constantă (individualitatea genetică) caracteristică viitorului individ. Ambele etape se efectuează de obicei cu mare precizie dar uneori se pot produce erori care generează anomalii genetice.

### 1. GAMETOGENEZA

Gametogeneza are loc în gonade, prin meioză - un tip special de diviziune reduțională - care asigură transmiterea informației genetice la generația următoare și îndeplinește două funcții majore:

- *Reduce la jumătate (n) numărul de cromosomi* și asigură astfel, după fecundare, menținerea constantă a numărului de cromosomi ai speciei;
- Creează *diversitatea genetică* ce apare la copii născuți din aceiași părinți<sup>22</sup>, prin fenomenele de recombinare genică (din profaza I) și recombinare intercromosomică (din anafaza I); meioza este principala sursă de variabilitate genetică.

#### 1.1 CARACTERELE GENERALE ALE MEIOZEI

---

<sup>22</sup> În acest context, termenul de “reproducere” este impropriu pentru că individul ce rezultă după fecundare nu este o reproducere a nici unuia din părinți.

Meioza este un proces complex care se realizează prin *două diviziuni succesive*: meioza I (diviziunea meiotică primară, heterotipică, reduțională) și meioza II (diviziunea meiotică secundară, homotipică, euațională), neseparate de interfază, deci ADN se replică numai o singură dată.

#### a. Meioza I

Este o formă specială de diviziune celulară<sup>23</sup>, unică și foarte complexă, cu o durată lungă, în special la organismele feminine. Prezintă patru etape: profaza I, metafaza I, anafaza I, telofaza I, fiecare cu anumite particularități (figura 5.16.A).

(1). **Profaza I** este foarte lungă (90 % din durata meiozei I) și cuprinde cinci stadii.

- **Leptoten.** Prin condensarea fibrelor de cromatină, cromosomii devin vizibili ca *filamente subțiri și lungi*, atașate prin telomere la membrana nucleară. Astfel, datorită lungimii mari și grosimii mici a cromosomilor, deși cromosomii sunt bicromatidieni, ei apar *monocromatidieni* la examinarea la microscopul optic.
- **Zigoten.** Cromosomii omologi (matern și patern) se apropie, se dispun paralel de-a lungul cromatidelor, fenomen numit *sinapsă* sau *conjugare cromosomică*; se realizează astfel o aliniere "genă la genă" sau, mai exact, o împerechere între secvențele omologe<sup>24</sup>, rezultând structuri numite *bivalenți* (în realitate fiecare unitate este o *tetradă*, deoarece prezintă patru cromatide). Cromosomii omologi sunt *uniți (lipiți)* în anumite regiuni, la nivelul *complexului sinaptonemal*, vizibil la microscopul electronic. O excepție de la acest model de sinapsă, este prezentă la sexul masculin, la care cromosomii X și Y, nefiind omologi, fac sinapsă "cap la cap", printr-o mică regiune omologă ("regiune pseudoautosomală") aflată la capătul brațelor scurte, și formează prin condensare o structură specifică - *vezicula sexuală*.
- **Pahiten.** Cromosomii se scurtează și se îngroașă. Din loc în loc devin vizibile niște puncte mai intense colorate numite *cromomere*, al căror număr și poziție sunt caracteristice fiecărui cromosom<sup>25</sup>. În faza de pahiten are loc fenomenul de **încrucișare cromosomică** între cromosomii omologi - **crossing-over** - care constă în "ruperea" cromatidelor nesurori *exact în același punct* și schimbarea *reciprocă* (încrucișată) a unor *fragmente egale* („recombinare omologă”)<sup>26</sup>; astfel, un fragment de cromatidă de pe un cromosom matern se *transferă* pe omologul său patern și invers, realizând o *nouă combinație genică* cu material genetic de la ambii părinți (vezi figura 3.4.). Fenomenul implică numai două din cele patru cromatide, care vor conține gene de la ambii părinți; se realizează astfel o **recombinare genică (intracromosomică)**, care reprezintă o *sursă de variabilitate genetică*, datorită noilor combinații de gene care apar și se transmit la descendenți (vezi capitolul 3.A.2.2). La om se produc 1-3 recombinări per cromosom, în funcție de dimensiunea cromosomului. În meioza masculină totalul recombinărilor este de circa 50 per celulă, în timp ce meioza feminină se caracterizează printr-un număr mai mare de recombinări (aproximativ 70 per celulă). Frecvența recombinării care se produce între două gene situate pe același cromosom depinde de distanța dintre ele; calculul frecvenței de recombinare permite alcătuirea *hărților cromosomice*, care indică localizarea genelor în lungul cromosomilor (vezi capitolul 3.D.1).
- **Diploten.** Cromosomii omologi încep să se separe longitudinal, ca și cum "s-ar respinge" reciproc. Cromatidele lor rămân în contact la nivelul anumitor puncte ("chiasmata", pluralul de la "chiasma") care marchează localizarea crossing-over-ului.
- **Diakineza.** Cromosomii devin mai scurți și mai groși, omologii se separă aproape complet, iar chiasmatele se observă numai la capetele lor (*terminalizarea chiasmatorilor*). În această fază se observă clar că fiecare bivalent conține patru elemente: cromatidele surori sunt unite prin centromer, iar cromatidele nesurori sunt unite prin chiasmatele la nivelul cărora s-a produs crossing-over-ul.

<sup>23</sup> Există două diferențe majore între meioză și mitoză: prin meioză rezultă celule haploide, care genetic sunt diferite

<sup>24</sup> Alinierea / împerecherea cromosomilor omologi "marginale" la "marginale" la nivelul sinapselor este favorizată de secvențele repetitive multiple și identice ca tip și localizare din cei doi cromosomi omologi.

<sup>25</sup> Dispoziția cromomerelor coincide cu cea a benzilor G (vezi capitolul **Cromosomii umani**)

<sup>26</sup> Mecanismul molecular al recombinării la om nu este prea clar dar se presupune ca intervine un sistem genic similar cu genele „SOS” descrise la procariote, care prin enzimele codificate taie, schimbă și resudează fragmentele de cromosomi.

(2) **Metafaza I.** Membrana nucleară dispăre complet și se formează fusul de diviziune. Bivalentii, formați din cromosomi bicromatidieni, se fixează cu centromerul pe filamentele fusului și se deplasează spre placa metafazică, la ecuatorul celulei. Centromerul cromosomilor omologi se dispune aleatoriu de o parte și de alta a planului ecuatorial. Metafaza I este etapa optimă de studiu a cromosomilor în meioză.

(3). **Anafaza I** cuprinde un fenomen genetic foarte important: **disjuncția cromosomică**. Cei doi cromosomi bicromatidieni ai fiecărui bivalent *se separă* și se repartizează câte unul la fiecare celulă fiică. Spre deosebire de mitoză, *cromatidele surori nu se despart*, ci rămân atașate la nivelul centromerului. Apoi are loc *migrarea anafazică* prin deplasarea cromosomilor (bicromatidieni) simultan și cu aceeași viteză, spre polii opuși ai celulei. În final, se produce o reducere a numărului de cromosomi, de la  $2n$  la  $n$  și fiecare celulă va avea numai un exemplar din perechea de omologi. Acest fenomen stă la baza primei legi a lui Mendel, *legea segregării*.

Segregarea sau separarea aleatorie a fiecărei perechi de cromosomi omologi determină *asortarea independentă a omologilor*, fenomen denumit **recombinare intercromosomică**. Deoarece fiecare pereche de cromosomi *se separă independent* de celelalte perechi rezultă un număr mare de combinații cromosomice în gameți, în raport direct cu numărul de perechi de cromosomi ai speciei (figura 5.17). Se formează  $2^{23}$  tipuri de gameți, deci peste 8,4 milioane de gameți diferiți, la fiecare din cele două sexe.

Asortarea independentă a cromosomilor omologi, prin fenomenul de recombinare cromosomică, asociată cu recombinația intracromosomică prin crossing-over, *explică marea variabilitate a gameților*. Ea confirmă cea de a doua lege a lui Mendel, referitoare la *combinarea liberă a "factorilor ereditari"* (genelor) astfel că fiecare gamet, care rezultă în urma meiozei, are un set unic de gene, diferit de al celorlalți. Prin combinarea, pe bază de probabilitate, a gameților masculini cu cei feminini în procesul de fecundare are loc formarea unor *zigoți diferiți din punct de vedere genetic*, iar indivizii rezultați vor fi **unicate genetice**.

(4). **Telofaza I.** Are loc reasamblarea nucleilor; citokineza se realizează fără separarea completă a celulelor fiice, care rămân atașate printr-o punte citoplasmatică, formând o *diadă*.

#### **b. Meioza II**

Meioza II începe imediat după terminarea meiozei I și se aseamănă cu o diviziune mitotică dar care se realizează în celule cu număr haploid de 23 de cromosomi bicromatidieni (dintre care unii sunt recombinanți) și nu este precedată de o replicare a ADN. Este deci o *diviziune homotipică, ecuațională*. Ea cuprinde, de asemenea, cele patru stadii: profaza II, metafaza II, anafaza II și telofaza II (figura 5.16. B).

(1). **Profaza II:** cromosomii bicromatidieni se individualizează, cromatidele surori devin vizibile distinct, iar membrana nucleară dispăre.

(2). **Metafaza II.** Cromosomii se condensează și se atașează fiecare pe câte un filament al fusului de diviziune, aliniindu-se în *placa metafazică ecuatorială*.

(3). **Anafaza II.** Prin diviziunea centromerelor - *disjuncție cromatidiană* - fiecare cromosom se separă în două cromatide; acestea devin cromosomi independenți și se deplasează spre polii opuși ai celulelor.

(4). **Telofaza II.** Din cele două celule fiice se formează *patru seturi haploide de cromosomi monocromatidieni* (câte două pentru fiecare celulă). În final, prin reorganizarea nucleilor și separarea celulelor rezultate apar *patru celule haploide*, care prin maturare se transformă în gameți fecundabili. *Gameții rezultați nu sunt identici*, fiecare are o altă combinație de gene datorită fenomenelor de crossing-over și segregare independentă a cromosomilor.

## 1.2. PARTICULARITĂȚILE GAMETOGENEZEI LA BĂRBAT ȘI FEMEIE

Meioza prezintă o serie de particularități la cele două sexe, legate de cronologia, desfășurarea și finalitatea ei. La bărbat se formează în final patru spermatozoizi, în timp ce la femeie, prin eliminarea globulilor polari, rezultă doar un ovul.

#### **a). Gametogeneza masculină**

Spermatogeneza începe la *pubertate* (sub acțiunea FSH și LH) și *continuă* toată viața adultă. Fiecare spermatoцит primar va produce prin meioza I două spermatoците secundare haploide, care

după ce parcurg meioza II dau naștere la patru spermatozoizi; ele se vor diferenția în spermatozoizi, de două feluri: jumătate au *un cromosom X*, iar jumătate au *un cromosom Y*. Cromosomii X și Y conțin fiecare gene de sexualizare specifice fiecărui sex. Așa cum am văzut, în profaza meiozei I ei se unesc „*cap la cap*” (și nu „*marginile la marginile*”, ca autosomii); această configurație împiedică schimbul de gene dintre X și Y și, deci, păstrarea unui singur tip de determinanți sexuali, fie masculini, pe Y, fie feminini pe X. Acest fenomen, important în evoluție, a permis realizarea gonocorismului (gonade distincte la indivizi diferiți)

Întregul proces de spermatogeneză durează aproximativ 64 de zile, indiferent de vârstă; deci meioza masculină este un proces *rapid* iar bărbatul este totdeauna „tânăr” prin gameții săi.

Meioza masculină este un proces *intens*, 1 ml de spermă conținând în mod normal circa 70 de milioane de spermatozoizi. Ținând cont de faptul că numai un singur spermatozoid este fecundant, am putea aprecia că gametogeneza masculină este „neeconomică” și prin aceasta, lipsită de sens biologic („natura nu face risipă”). În realitate numărul enorm de spermatozoizi realizează o populație considerabilă în care șansele de realizare a unui fenomen sunt teoretic egale cu cele de realizare a fenomenului contrar. Așadar, șansele unui spermatozoid cu X de a fecunda un ovul cu X și a da un zigot XX sunt egale cu șansele unui spermatozoid cu Y de a se uni cu un ovul cu X și de a forma un ou XY. În felul acesta *proporția sexelor la naștere este aproape 1:1*.

Studiile efectuate asupra timpului și ritmului desfășurării meiozei masculine au evidențiat că acest proces este *autoreglabil*, căci odată declanșat el se autoîntreține *ritmic*, ca „o reacție în lanț”, nefiind condiționat de factori externi; dar meioza masculină este *sensibilă* la acțiunea factorilor de mediu (poziția intra-abdominală în criptorhidie, temperatura ridicată, ischemia) care pot reduce eficiența spermatogenezei.

Desfășurarea ritmică și regulată a meiozei masculine asigură o *deplină siguranță procesului de distribuție al cromosomilor*. Creșterea vârstei tatălui nu produce o creștere a frecvenței erorilor de distribuție și deci a anomaliilor cromosomice. În schimb, meioza masculină produce fără oprire copii celulare identice (20-25 cicluri replicative pe an). Dacă apare o mutație genică aceasta este copiată neîntrerupt: la vârste tinere numărul de celule ce vor avea mutația este mic dar la vârste mai înaintate el devine semnificativ, producând un veritabil *mozaic germinal*. De aceea, odată cu creșterea vârstei, bărbații sănătoși au un risc crescut și recurent de a avea copii cu afecțiuni monogenice autosomal dominante (neurofibromatoză, acondroplazie, ș.a.) (vezi capitolul 5.D.6), deoarece o mutație apărută este copiată neîntrerupt.

**Tabel 5.2 Diferențe în gametogeneză la bărbat și femeie**

	Bărbat	Femeie
Debut	La pubertate	În viața embrionară
Desfășurare	Continuă	Discontinuuă
Număr de mitoze în formarea gameților	30-500	20-30
Reglare	Autoreglabil	Condiționat de factori externi
Număr de gameți per meioză	4 spermatozoide, de două feluri (cu X și cu Y)	1 ovul + 3 globule polare (numai cu X)
Durata procesului	Rapid: 64 zile	Lent: 10-50 de ani
Intensitate: număr de gameți în viața adultă	Intens: circa 100-200 milioane per ejaculare	F. puțin intens: 1 ovul per ciclu menstrual
Erori	De copiere (risc de mutații genice)	De distribuție a materialului genetic (risc de anomalii cromosomice)

### b) Gametogeneza feminină

Spre deosebire de bărbat, la femeie ovogeneza începe *prenatal și este discontinuuă*: în luna a III-a de viață intrauterină ovogoniile încep să se dividă și se transformă în ovocit primare; în luna VIII-a ovogoniile dispar aproape complet deoarece s-au diferențiat în ovocite. Deci, spre deosebire de bărbat, la care spermatogoniile se produc (după pubertate) continuu până la bătrânețe, „capitalul” de ovocite al ovarului este limitat (la naștere există circa 2 milioane de ovocite în fiecare ovar iar la pubertate mai puțin de 200.000).

Ovocitele primare au deasemenea câteva particularități ce le deosebesc de spermatoците: sunt celule mari, au un nucleu *excentric* și încep imediat meioza I (luna III-a) dar nu depășesc stadiul de leptoten, fiind blocate într-o „fază de așteptare” numită dictioten (prin intervenția unei proteine numită OMI de la „*oocyte meiosis inhibitors*”); ele rămân în această fază mulți ani, până la ovulație. După pubertate, sub acțiunea LH hipofizar, câteva ovocite își încep *lunar* maturarea dar de regulă numai unul singur (maximum două) termină meioza I, formând două celule haploide inegale (datorită poziției excentrice a nucleului): ovocitul II (care preia aproape toată citoplasma ovocitului I) și primul globul polar. Meioza II începe imediat dar este oprită în metafaza II și nu se reia decât dacă s-a produs fecundarea. Atunci are loc expulzia celui de al doilea globul polar. Devine evident că meioza la femeie este *un proces discontinuu și condiționat de factori externi* (FSH și LH, ovulația, fecundarea). La femeie, prin meioză, dintr-un ovocit I rezultă *o singură celulă sexuală matură*, aptă de fecundare (și trei globule polare, care vor degenera). Toate ovocitele vor avea un cromosom X.

Ritmul lent al ovogenezei (un ovul pe lună) face ca gametogeneza feminină să fie *puțin intensă*: în cursul perioadei reproductive (de numai 30 ani, deoarece meioza feminină *se oprește definitiv* la menopauză) se maturează numai 300-400 ovocite. Din acest motiv apar puține „erori de copiere” (se produc copii puține dar impecabile). Totuși, ovogeneza nu este ferită de accidente: odată cu creșterea vârstei reproductive, mai ales după 35 de ani, se produc mai frecvent *accidente de distribuție a cromosomilor* rezultând gameți cu anomalii cromosomice de număr care, după fecundare, vor produce zigoți anormali. Aceste erori sunt determinate de particularitățile meiozei la femeie și în special de faptul că meioza este discontinuă, necesită intervenția unor factori externi iar ovocitele...”*au vârsta femeii*”.

### 1.3. ACCIDENTE DE DISTRIBUȚIE A LE MATERIALULUI GENETIC ÎN MEIOZĂ ȘI CONSECINȚELE LOR

În desfășurarea meiozei se pot produce două categorii de erori, corespunzătoare celor două procese majore care au loc în acest proces: recombinația genică și segregarea (disjuncția) anafazică a cromosomilor. Prima categorie este reprezentată de crossing-overul inegal iar cea de a doua de nedisjuncția meiotică, pierderea unor cromosomi sau neseperarea citelor de ordinul II.

#### **a. Erorile de recombinare**

Fenomenul normal de recombinare genică produs în profaza MI (pahiten), prin crossing-over, presupune alinierea cromosomilor omologi, împerecherea secvențelor omologe și un schimb *reciproc și egal* de material genetic. Uneori se poate produce accidental un **crossing-over inegal**, o recombinare „ilegitimă”, care are loc între secvențe omologe de ADN (deseori repetitive) dar nealele (nu sunt situate în aceeași poziție în cromosomi), care s-au aliniat (împerecheat) incorect în zigoten (figura 5.18); după crossing-over rezultă cromosomi cu *duplicații* sau *deleții* ale unor segmente mici (ce conțin una sau mai multe gene).

Fenomenul de **recombinare omologă nealelică** (inegală sau ectopică) este considerat procesul fundamental al *evoluției unor gene prin duplicație* (de exemplu, evoluția genelor globinelor; capitolul 3, figura 3.10) precum și mecanismul creșterii numărului de secvențe repetate în tandem, din structura ADN înalt repetitiv (vezi figura 6.8). CO inegal are, evident, și consecințe patologice deoarece duplicația sau deleția unor mici regiuni cromosomice poate produce un fenotip anormal. Acest mecanism de producere a ”macroleziunilor din ADN” a fost identificat relativ recent, prin analiză moleculară, în mai multe boli (talasemia  $\alpha$ , boala Charcot-Marie-Tooth, daltonismul, ș.a) precum și în multe sindroame cu microdeleție sau microduplicație (care alcătuiesc împreună grupul de *boli genomice*) (vezi capitolul 6.B.1.3.a).

- **Boala Charcot-Marie-Tooth (CMT)** sau *neuropatia motorie și senzorială ereditară* este cea mai frecventă boală neurologică ereditară (1:2500 nn), se caracterizează prin degenerarea progresivă a mielinei nervilor periferici și consecutiv, hipotonie și atrofie musculară (în special peonieră). Boala este heterogenă (3 tipuri) cel mai frecvent fiind tipul 1A, autosomal dominant, cu locusul lângă centromerul cromosomului 17 (în banda 17p11.2). CMT 1A este asociată cu o duplicație a unui segment de ADN de 1.5 Mb, ce conține gena *PMP22* ce codifică o proteină a mielinei periferice (figura 5.18). La fiecare capăt al genei se află o secvență nucleotidică identică, de circa 30 K.b,



numită MITE<sup>27</sup>; prin aliniere incorectă și CO inegal rezultă un cromosom cu duplicație genei care va da clinic CMT și un cromosom cu deleția genei care va da clinic o altă boală neurologică HNPP (de la *hereditary neuropathy with liability to pressure palsies* – *neuropatie ereditară cu predispoziție la pareze presionale*).

- **Sindroamele cu microdeleții sau microduplicații** (vezi capitolul 10.C.2) sunt sindroame dismorfe în care prin deleția / duplicația unor segmente cromosomice mici (identificabile prin tehnici de înaltă rezoluție sau FISH, vezi capitolul 2.D.3.a) se produce pierderea (*haploinsuficiența*) sau trisomia parțială a unor gene multiple, contigue (vecine) (de unde și denumirea *sindroamele genelor contigue*). Analiza moleculară fină a relevat că punctele de ruptură se localizează în secvențele repetitive *identice* ce flanchează segmentul implicat și că recombinarea anormală între copiile vecine ale secvențele repetitive, produce deleția sau duplicația regiunii respective (figura 5.19); un alt exemplu îl reprezintă *sindromul velocardiofacial* (deleția 22q11.2), cu o frecvență de 1:4000 nn.

### b. Erorile de distribuție

În anafazele meiozei I și II materialul genetic este împărțit egal și total celulelor fiice. Acest proces poate suferi, ca și în mitoză, erori de distribuție (de segregare) care vor duce la formarea unor *gameți neechilibrați genetic*; după fecundarea lor vor rezulta *zigoți anormali*. În funcție de evoluția acestor zigoți se pot produce avorturi spontane, nou-născuți morți sau nou-născuți vii plurimalformați. Mecanismele principale de apariție a acestor erori sunt: *nedisjunctia* (cromosomică, cromatidiană), *pierderea unor cromosomi* (ca urmare a migrării întârziate în anafază), *neseapararea citelor de ordinul II* (celule rezultate după meioza II).

(1). **Nedisjunctia** este lipsa separării cromosomilor ce formează o pereche de omologi, în anafaza meiozei I (*nedisjunctie cromosomică*) sau a cromatidelor surori ale unui cromosom (*nedisjunctie cromatidiană*) în meioza II; datorită acestei erori, ambele „unități” (cromosomul sau cromatida) trec într-o celulă fiică și vor lipsi în cealaltă celulă. Prin nedisjunctie în meioza I sau II rezultă gameți **disomici** și **nulisomici** care, după fecundarea cu un gamet normal, vor forma un zigot trisomic sau monosomic (vezi capitolul 6.B.1). Deși dezechilibrul cromosomic produs de cele două tipuri de nedisjunctia este de același tip, între nedisjunctia din meioza I și nedisjunctia din meioza II sunt totuși diferențe mai subtile (figura 5.20). Dacă eroarea are loc în meioza I, toți gameții vor fi anormali iar gametul disomic, cu 24 de cromosomi, va avea ambii cromosomi (matern sau patern) ai perechii; dacă nedisjunctia are loc în meioza II numai jumătate din gameți vor fi anormali iar gametul disomic va avea ambele copii (cromatide) fie ale cromosomului matern, fie ale celui patern (disomie uniparentală).<sup>28</sup> (Casetă 5.3)

(2). **Întârzierea anafazică** constă în pierderea unui cromosom în cursul anafazei meiozei I sau II. În consecință, apar *gameți nulisomici* (n-1) care prin fecundare, vor forma *zigoți monosomici* (2n-1); majoritatea sunt incompatibili cu supraviețuirea (excepție 45, X)

(3). **Neseapararea "citelor" de ordin II** este un eveniment prin care se formează *gameți diploizi*, care au întregul set de cromosomi (2n). Prin fecundare cu gameți normali apar *zigoți triploizi*, neviabili (3n = 69 cromosomi).

### CASETA 5.3

#### NEDISJUNCȚIA

Nedisjunctia reprezintă o eroare de segregare (separare) a cromosomilor în anafaza meiozei sau mitozei. În nedisjunctia meiotică se pot produce gameți anormali (disomici și nulisomici) care, după fecundare, vor da zigoți cu anomalii cromosomice numerice. În nedisjunctia cromatidiană se formează (în diferite momente ale dezvoltării) clone celulare anormale, ce vor evolua alături de celulele normale, formând un mozaic cromosomic. Trebuie să precizăm că există două tipuri de erori de separare: (1) neseapararea cromosomilor omologi (meioza I) sau a cromatidelor surori (meioza II) (figura 5.20); (2) separarea prematură a cromatidelor surori în meioza I în loc de meioza II. Ambele tipuri de erori produc gameți anormali.

Nedisjunctia este un fenomen „tulburător” atât din punct de vedere teoretic cât și din punct de vedere practic. „Tulburător” pentru că ridică câteva întrebări importante dar dificile: este frecvent? se produce la fel de des în meioza maternă și paternă? care sunt cauzele nedisjunctiei? poate fi evitată? care este riscul de nedisjunctie și deci de naștere a unor feți cu anomalii cromosomice de număr?

<sup>27</sup> MITE (de la *mariner insect transposon-like element*) are o structură similară cu transposonul *mariner* de la insecte. MITE nu este însă un transposon activ; în genomul uman au mai fost identificate și alte secvențe tip MITE dar originea lor este misterioasă.

<sup>28</sup> În această situație, când ne referim la cromosomi avem în vedere centromerele deoarece o parte din materialul lor s-a schimbat prin CO, deci fiecare cromosom are și segmente maternel și patern.

La prima întrebare răspunsul este afirmativ: nedisjuncția este frecventă, mai ales în meioză și în mod special în meioza maternă. Se estimează că 8% din toate concepțiile (zigoții) umane au anomalii cromosomice; majoritatea sunt neviabile și se elimină prenatal, astfel că numai 0,7-1% din nou născuții vii au o anomalie cromosomică. În toate cazurile predomină anomaliile numerice (aproape 90%), produse în special de nedisjuncție.

Originea nedisjuncției, maternă sau paternă, se poate stabili în prezent relativ ușor cu ajutorul unor markeri ADN polimorfici. Toate studiile demonstrează că nedisjuncția este mult mai frecventă în ovogeneză, în special în meioza I. Dacă ne referim numai la trisomia 21, cea mai frecventă boală cromosomică (1:700 nn), s-a stabilit (Antonarkis,1993) că în 92% din cazuri sindromul Down este produs prin nedisjuncție maternă în meioza I, în 5% din cazuri prin nedisjuncție paternă în meioza II și în 3% din cazuri prin nedisjuncție în mitozele postzigotice. La aceste date clare se adaugă un alt lucru cert: riscul nedisjuncției crește odată cu creșterea vârstei reproductive materne, mai ales după 35 de ani. Statisticile, pe loturi mari, sunt foarte detaliate stabilind un risc precis pentru fiecare an de vârstă; dar pentru a ilustra fenomenul este suficient să precizăm că la gravidele de 30 de ani riscul nașterii unui copil cu sindrom Down este de 1:1000; el crește la 1:100 la 37 de ani și la 1:10 peste 45 de ani (Gardner și Sutherland, 1996). Nedisjuncția maternă este principala „cauză” a sindromului Down și ale altor trisomii autosomale (după Hassold, 1996 peste 50% din ovocitele ovulate la femei de 40-45 de ani pot fi aneuploide). Sunt totuși situații în care nedisjuncția meiotică paternă este regula (de exemplu trisomia XYY) sau este relativ frecventă (70% din sindromul Turner, 45,X).

Care sunt cauzele nedisjuncției meiotice? Aici există trei certitudini dar care ...nu rezolvă problema, deși sunt utile în practica sfatului genetic.

- (1) Efectul vârstei materne (ca factor predispozant la nedisjuncție) este sigur și foarte probabil se corelează cu particularitățile meiozei materne<sup>29</sup>, care (printre altele) blochează ovocitele timp de câteva decade în profaza meiozei I („ovulele au vârsta femeii”). Aceasta duce la o recombinare meiotică aberantă (sinapse incorecte, schimburile intercromosomice cu o rată redusă și o localizare anormală) și la anomalii în formarea fusului de diviziune. Nu trebuie însă să uităm că numai un sfert din cazurile de sindrom Down se nasc din femei peste 35 de ani; deci nedisjuncția maternă are probabil și alte cauze decât vârsta maternă reproductivă avansată, care, de ce nu, ar putea acționa și la femeile peste 35 de ani. Si mai trebuie să spunem clar un lucru: la 40 de ani o gravidă are doar un risc de 1-2% de a naște un copil cu sindrom Down (este drept, mult mai mare decât la 25 de ani), deci un risc relativ mic și acceptabil, mai ales în condițiile existenței diagnosticului prenatal;
- (2) În ciuda cercetărilor intense, nu există nici-o dovadă științifică care să susțină rolul posibil al unor factori externi: infecții virale, radiații, medicamente, hormoni, contraceptive, cafeaua sau fumatul, reducerea frecvenței raporturilor sexuale etc. De aceea în practica sfatului genetic rolul invocat de alții al acestor factori trebuie cel puțin...temperat.
- (3) La om, nu există probabil factori genetici care să crească riscul de nedisjuncție); pentru aceasta pledează riscul de recurență mic (1%) pentru un al doilea copil afectat (atenție: la acest risc trebuie adăugat riscul dependent de vârsta maternă). Totuși nu trebuie să uităm că la alte specii nedisjuncția este sub control genetic iar diferiți cromosomi au rate diferite de trisomie în avorturile spontane (de exemplu, trisomia 16 reprezintă o treime din aceste avorturi). Oricum, controlul genetic al meiozei este încă departe de a fi elucidat

## 2. FECUNDAREA

Prin fecundare se înțelege unirea celor doi gameți, ovulul și spermatozoidul, și formarea zigotului (celula ou), din care se va dezvolta un nou organism. În felul acesta, părinții transmit, prin gameți, „zestrea” lor ereditară viitorilor descendenți.

Fecundarea este un fenomen complex, cu anumite caracteristici; dintre acestea vom reține, pentru cadrul discuției noastre, faptul că la om fecundarea este *monospermică*: pătrunderea unui singur spermatozoid în ovul determină o serie de evenimente biochimice ce împiedică intrarea altor spermatozoizi. Concomitent, aparatul mitotic al ovocitului (situat la periferie) este brusc activat și se finalizează meioza II, eliminându-se al doilea globul polar. Setul de cromosomi ce rămâne în ovocit formează *pronucleul feminin*. În citoplasma ovulului, spermatozoidul suferă o serie de

<sup>29</sup> S-a discutat și reducerea competenței „imunologice” dintre mamă și făt odată cu creșterea vârstei materne, fapt ca ar permite supraviețuirea embrionilor trisomici; lipsesc probe pentru această ipoteză.

modificări (coada și piesa intermediară, ce are câteva mitocondrii, sunt dezintegrate) iar nucleul său devine *pronucleul masculin*. Cei doi pronuclei se aproprie unul de altul, cromosomii lor se replică sincron și, după ruperea membranelor nucleare, se fixează pe fibrele primului fus de diviziune; zigotul se divide și formează primele două celule fiice diploide.

În cursul fecundării au loc mai multe evenimente genetice. În primul rând, prin fuziunea celor doi gameți haploizi ( $n=23$ ) se reface numărul diploid de cromosomi, caracteristic speciei umane ( $2n=46$ ). Începând cu zigotul toate celulele somatice vor avea cromosomii în perechi de omologi, identici ca morfologie și structură genetică dar diferiți ca origine. În momentul fecundării, genele parentale din cromosomii gameților formează o structură nouă, total diferită de a părinților, unică și constantă; ea determină *individualitatea genetică* a organismului. Contribuția părinților la ereditatea copiilor nu este perfect egală deoarece ADN mitocondrial provine exclusiv de la mama, prin mitocondriile din citoplasma ovulului.

În al doilea rând, în momentul fecundării se stabilește sexul genetic XX sau XY al viitorului organism, prin asortarea cromosomilor sexuali din gameți. Întrucât la mamifere și om sexul masculin este heterogamic, el va produce două tipuri de spermatozoizi cu X și cu Y, care fecundând un ovul cu Y vor realiza sexul genetic XX și respectiv XY. Așa cum am arătat, numărul foarte mare de spermatozoizi lansat în cursul unui raport sexual fecundant asigură condițiile statistice care oferă celor două tipuri de spermatozoizi șanse egale de fecundare; de aceea raportul sexelor la naștere este aproape 1:1.

În realitate, studiile sexului genetic la fetuși au arătat o ușoară predominanță a sexului masculin (120 fetuși masculini la 100 feminini, deci 54,5%); o explicație posibilă ar fi mobilitatea mai mare a spermatozoidilor cu Y, care ajung mai frecvent la „șintă”. Diferențele se mai reduc la naștere (51,5%) și se pare că se anulează la pubertate, pentru ca în a treia decadă de viață raportul să fie favorabil sexului feminin. Această „dinamică” nu este clar explicată; o ipoteză susține că sexul feminin este „mai rezistent” la agresiunile externe deoarece are un cromosom X în plus, care nu ar fi total inactivat (conform ipotezei Lyon) (vezi capitolele 2.D.2.2 și 4.B.4.a).

În cursul fecundării se pot produce o serie de devieri de la mecanismul sau rezultatul procesului normal de fecundare. Există astfel posibilitatea rară a unei **duble fecundări** atunci când ovarul eliberează în momentul ovulației două ovule. Prin fecundarea lor individuală se vor forma doi gameți; ei pot evolua separat, independent unul de altul, formând *gemenii dizigoți* sau se pot uni într-o singură masă embrionară ce va produce un singur individ cu două componente genetice distincte ca origine („doi indivizi într-unul singur”), numit *himeră* (după monstrul din mitologia greacă care avea cap de leu, corp de capră și coadă de balaur). În ultimul caz, dacă zigoții vor avea același sex genetic se realizează o sexualizare normală și numai studiul unor caractere ereditare normale (grupe sanguine, serice etc) va evidenția existența unei duble populații celulare<sup>30</sup>. Dacă zigoții care s-au unit aveau sexe genetice diferite, se realizează o constituție genetică XX/XY care va produce o tulburare de sexualizare, numită hermafroditism adevărat.

O altă anomalie de fecundare este *dispermia*, situația foarte rară în care un ovul este fecundat de către doi spermatozoizi. Rezultă un zigot triploid ( $3n$ ). Același rezultat poate fi obținut atunci când unul din gameți este diploid (*diginie* sau *diandrie*) (vezi capitolul 6.B.1). Evoluția unui zigot triploid va depinde de originea setului haploid suplimentar: dacă este de proveniență maternă (*diginie*) atunci dezvoltarea embrionară este sever întârziată, placenta este mică și fibrotică iar embrionul este avortat precoce; dacă este de origine paternă (*diandrie*) se va forma o placenta anormală, mare și polichistică, cu un embrion slab dezvoltat (*molă hidatiformă parțială*)

Vom menționa în sfârșit situația în care un spermatozoid 23,X fecundează un ovul fără nucleu și setul de cromosomi al spermatozoidului se dublează formând un zigot 46,XX în care toți cromosomii sunt de origine paternă și toate genele alele vor fi homozigote; se produce o dezvoltare anormală a trofoblastului și dezorganizarea/absența embrionului numită *mola hidatiformă completă*. Există și situația inversă, în care celule 46,XX conțin numai cromosomi materni; ele proliferază și produc un teratom ovarian (alcătuit din celule embrionare dar nu și din țesut placentar). Din cele două situații prezentate mai sus rezultă că dezvoltarea fetală normală necesită ambele contribuții genetice, maternă și paternă.

<sup>30</sup> Himeră se deosebește de *mozaic* deoarece populațiile (clonele) celulare diferite au origini diferite; în mozaicuri, clonele celulare anormale au origine comună cu cele normale, provin din același zigot.

## D. EREDITATEA MONOGENICĂ

### 1. LEGILE LUI MENDEL.

Transmiterea caracterelor ereditare de la părinți la copii a fost remarcată din cele mai vechi timpuri. Dar explicațiile date similitudinii familiale și încercările de a stabili legile eredității au cunoscut numeroase eșecuri. Ele erau generate de ipoteza greșită a “*amestecării caracterelor ereditare*”. Potrivit acestei ipoteze, descendenții prezintă un amestec al caracterelor parentale; ele își pierd identitatea și nu se vor mai regăsi ca atare în generațiile următoare.

Pe baza unor cercetări experimentale de mare finețe și precizie, Gr. Mendel a demonstrat (1865) că la urmași nu se produce nici un amestec al caracterelor parentale; unele caractere nu se exprimă în prima generație filială dar pot apărea neschimbate ulterior. Pentru a explica aceste fenomene, Mendel a presupus că fiecare caracter este determinat de o *pereche de factori ereditari* (numiți mai târziu „gene”), care în momentul formării gameților se separă, *segregă*, distribuindu-se la întâmplare în celulele sexuale. Mendel a observat că transmiterea caracterelor ereditare este un proces statistic ce poate fi descris în termeni de probabilitate, și a formulat legile care guvernează acest proces: *legea segregării și legea asortării independente*; ele stau la baza geneticii ca știință.

Cercetările și rezultatele obținute de Mendel au fost ignorate de către contemporanii săi “nepregătiți” pentru a le înțelege. În anul 1900 principiile stabilite de Mendel au fost *redescoperite* simultan în trei laboratoare, demonstrându-se că legile eredității ar fi fost descoperite, la un anumit nivel al dezvoltării cunoștințelor, chiar și...în absența lui Mendel, deoarece *legile eredității sunt legi obiective*. Doi ani mai târziu, Sutton, pornind de la ipoteza (plauzibilă) că materialul ereditar se găsește în cromosomi, stabilește o corelație strânsă între comportamentul cromosomilor în meioză și principiile enunțate de Mendel, formulând “**teoria cromosomică a eredității**”. În același an (1902), un medic englez, sir A.Garrod, a raportat primul exemplu de ereditate mendeliană la om – *alcaptonuria* – o anomalie biochimică congenitală, transmisă ereditar, recesiv. Ulterior el a studiat și alte boli ereditare (albinismul, cistinuria și pentozuria), veritabile “*erori înnăscute de metabolism*”, și a pus astfel bazele geneticii medicale.

Datele acumulate de genetica secolului XX au demonstrat *universalitatea* legilor lui Mendel. Numeroase caractere umane normale sau anormale, determinate monogenic, se transmit în concordanță cu aceste legi. „*Dacă Mendel ar fi trăit în epoca noastră, i-ar fi fost probabil mult mai ușor să descopere legile geneticii studiind ereditatea familiilor umane*” (Ch. Salmon, 1973).

Dezvoltarea geneticii moleculare a modificat în mare măsură “mendelismul clasic” mai ales prin înțelegerea modului de exprimare a genei și a interacțiunilor complexe dintre gene. “*Nu este vorba de o răsturnare a principiilor care guvernează transmiterea mendeliană, ci numai de o dezvoltare a lor*” (Hull, 1978).

#### 1.1. PRIMA LEGE A LUI MENDEL: LEGEA SEGREGĂRII

Prima lege a lui Mendel sau legea segregării<sup>31</sup> a fost stabilită și poate fi demonstrată prin urmărirea rezultatelor încrucișărilor între indivizi care diferă printr-un singur caracter (monohibridare), sau - mai exact - printr-un cuplu de caractere alternante sau contrastante.

Vom analiza un exemplu concret. După capacitatea de a simți gustul amar al feniltiocarbamidei (PTC) sau al feniltioureei, circa 70% din populație este alcătuită de “*gustători*” și 30% din “*negustători*”. Din căsătoria unui gustător cu un negustător (generația P sau parentală) rezultă în F1 (prima generație filială) numai descendenți gustători (100%); încrucișarea lor va produce în F2 atât gustători cât și negustători. Caracterul parental gustător care se manifestă în F1 și F2 este **dominant** iar cel negustător, care apare numai în F2, se numește **recesiv**. Cumulând mai multe observații familiale și calculând proporția celor două fenotipuri, se obține în F2 un rezultat egal sau vecin cu 3:1.

Persoanele negustătoare din F2, prin încrucișare cu indivizi asemănători lor, vor da numai

---

<sup>31</sup> Se mai numește legea disjuncției caracterelor parentale sau legea purității gameților.

descendenți negustători. În schimb, din încrucișarea gustătorilor din F<sub>2</sub> cu negustători<sup>32</sup> rezultă, în circa 1/3 din cazuri, numai gustători iar în restul de 2/3 apar în proporții egale gustători și negustători; acest lucru ne arată că deși fenotipic gustătorii din F<sub>2</sub> sunt identici, genotipic ei sunt diferiți. Ținând cont de această diferență și de raporturile procentuale, rezultă că indivizii din F<sub>2</sub> aparțin fenotipic la două categorii, în proporție de 3 : 1, iar genotipic ei alcătuiesc trei grupe, în raportul de 1 : 2 : 1.

Pe baza acestui exemplu se poate realiza un model general valabil al transmiterii caracterelor în monohibridări. El va fi interpretat în spiritul gândirii mendeliene, folosind însă noțiunile și cunoștințele acumulate ulterior de genetica clasică și în special cele despre cromosomi și dinamica lor în meioză.

Mendel a presupus că orice individ rezultat prin unirea celor două tipuri de gameți parentali primește material genetic de la *ambii părinți*. De aceea, fiecare caracter este determinat de o pereche de “factori ereditari” (termenul îi aparține lui Mendel) sau gene alele (ce ocupă același locus pe cromosomii omologi). Organismele din generația parentală (P) sunt “pure” din punct de vedere genetic, au genele alele identice, sunt homozigote:  $A/A$  și  $a/a$ . În anafaza meiozei I *genele alele segregă* și gameții (haploizi) conțin un singur “factor ereditar” sau genă: ( $A$ ) și ( $a$ ); deci homozigoții sunt homogametici. Prin fecundarea acestor gameți rezultă un zigot (diploid) în care factorii ereditari materni și paterni *se asociază* alcătuind genotipul  $A/a$  al tuturor descendenților hibridi din F<sub>1</sub>. Ambii părinți contribuie *în mod egal* la ereditarea copiilor (tabelul 5.3).

**Tabelul 5.3 Monohibridarea și legea I a lui Mendel**

Generație	Fenotipuri	Genotipuri	
<b>P</b>	<b>A</b> x <b>a</b>	$A/A$ x $a/a$ (A) (a)	<b>homozigoți gameți</b>
<b>F<sub>1</sub></b>	<b>A</b> (100%)	$A/a$	<b>heterozigoți</b>
↑ Incrucișare indivizi F <sub>1</sub>	<b>A</b> x <b>A</b>	$A/a$ x $A/a$ (A) și (a) (A) și (a)	<b>heterozigoți gameți</b>
<b>F<sub>2</sub></b>	<b>A</b> și <b>a</b> (75%) (25%)	$A/A$ $A/a$ $a/a$ ( 25% 50% ) 25%	
Retroîncrucișare <b>F<sub>1</sub></b> x <b>P</b> <sub>(recesiv)</sub>	<b>A</b> <sub>(F<sub>1</sub>)</sub> x <b>a</b>  <b>A</b> și <b>a</b> (50%) (50%)	$A/a$ x $a/a$ (A) și (a) (a)  $A/a$ $a/a$	<b>gameți</b>
Retroîncrucișare <b>F<sub>2</sub></b> x <b>P</b> <sub>(recesiv)</sub>	(1/3) <b>A</b> <sub>(F<sub>2</sub>)</sub> x <b>a</b>  <b>A</b> (100%)	$A/A$ x $a/a$ (A) (a)  $A/a$	<b>gameți</b>
	(2/3) <b>A</b> <sub>(F<sub>2</sub>)</sub> x <b>a</b>  <b>A</b> și <b>a</b> (50%) (50%)	$A/a$ x $a/a$ (A) și (a) (a)  $A/a$ $a/a$	<b>gameți</b>

Descendenții din F<sub>1</sub> au gene alele diferite, sunt heterozigoți. Întrucât au un genotip identic ( $A/a$ ), toți indivizii (hibridi) din prima generație filială sunt fenotipic identici, uniformi. Aceasta este o regulă generală denumită “*principiul uniformității hibridilor din F<sub>1</sub>*” (după unii este “prima” lege a lui Mendel): când se încrucișează indivizi homozigoți (“puri”) ce diferă printr-un caracter particular, descendenții lor (F<sub>1</sub>) sunt uniformi.

<sup>32</sup> Negustătorul este asimilat tipului parental și atunci încrucișarea F<sub>2</sub> (sau F<sub>1</sub>) x P se numește retroîncrucișare.

Să analizăm acum încrucișările dintre indivizii din generația  $F_1$ . În  $F_2$  se obțin fenotipic două tipuri de urmași: unii dintre ei se aseamănă cu fenotipul dominant din P și  $F_1$ , iar alții cu fenotipul recesiv din P. Proporția lor este de 3 dominanți la 1 recesiv. Se observă că în  $F_2$ , alături de caracterul dominant reapare caracterul parental recesiv, care nu s-a exprimat în prima generație filială, deși gena corespunzătoare ( $a$ ) era prezentă ( $A/a$ ). Rezultă că factorii ereditari sau genele care determină caracterul recesiv își mențin neschimbată identitatea lor, chiar dacă nu se manifestă fenotipic în  $F_1$ . Ele nu se “contaminează”, nu „se amestecă” (așa cum se credea înainte de Mendel), rămân neschimbate, constante și riguros “pure”. Gena recesivă devine manifestă în momentul în care (în  $F_2$ ) se realizează starea homozigotă ( $a/a$ ). “Un caracter recesiv circulă de-a lungul generațiilor ca un râu subteran, care reapare din timp în timp, atunci când se produce confluența a două din brațele sale” (Ph. Sentis).

Prin studiul descendenților  $F_3$  (sau prin retroîncrucișare  $F_2 \times P_{\text{recesiv}}$ ) s-a demonstrat că în  $F_2$  au rezultat în realitate trei tipuri de descendenți:  $\frac{1}{4}$  seamănă cu părintele dominant,  $\frac{1}{2}$  sunt hibrizi ca și indivizii din  $F_1$  și  $\frac{1}{4}$  erau puri și asemănători părintelui recesiv. Acest raport genotipic 1:2:1 în  $F_2$  indică faptul că jumătate din gamații unei persoane  $F_1$  poartă gena dominantă iar cealaltă jumătate - pe cea recesivă. Această concluzie a fost capitală pentru Mendel, căci ea i-a permis să înțeleagă mecanismul transmiterii genetice și să formuleze **legea segregării**:

- orice individ primește, în mod egal, material genetic (gene) de la ambii părinți;
- genele parentale se separă (segregă) atunci când acel individ produce la rândul său gameți;
- gameții vor fi “puri” genetic (au o singură genă din perechea de alele);
- prin combinarea întâmplătoare a gameților, în  $F_2$  se produce o separare, o disjuncție, a caracterelor parentale, în proporția de 3 dominanți la 1 recesiv.

Legea segregării se explică astăzi perfect prin dinamica cromosomilor omologi în meioza primară (tabelul 5.3): ei se separă (disjuncție) și merg în celule distincte. Heterozigoții ( $A/a$ ) din  $F_1$  produc două tipuri de gameți ( $A$ ) și ( $a$ ). Fiecare genă alelă din genotipul  $A/a$  are o probabilitate egală de a se transmite și de a se găsi în gameți, indiferent dacă este dominantă sau recesivă. Cele două tipuri de gameți se produc în cantități statistic egale. Fiecare gamet are, de asemenea, o probabilitate egală de a se combina (fecunda) cu ceilalți. Prin întâlnirea lor întâmplătoare pot rezulta în  $F_2$  trei tipuri de indivizi cu genotipurile  $A/A$ ,  $A/a$ ,  $a/a$  în proporție de 1 : 2 : 1. În funcție de raporturile de dominanță /recesivitate dintre gene vor rezulta proporțiile fenotipice de 3 dominați : 1 recesiv.

Menționăm, în finalul acestei discuții, că acțiunea genei este independentă de originea sa maternă sau paternă. Când se formează un zigot, genele “par a uita” originea lor parentală.

## 1.2. A DOUA LEGE A LUI MENDEL: LEGEA ASORTĂRII INDEPENDENTE

A doua lege a lui Mendel sau *legea asortării independente*<sup>33</sup> poate fi demonstrată prin încrucișări între organisme ce se deosebesc prin două (dihibridare) sau mai multe cupluri de caractere. Ele *se transmit independent* unul de altul: ereditatea primului caracter nu influențează ereditatea celui de al doilea. Explicația acestui fenomen rezidă în faptul că genele ce determină aceste caractere sunt *neînlănțuite*, situate pe cromosomi omologi diferiți și independente una față de alta; ele *se pot combina liber* între ele, dând genotipuri și fenotipuri noi.

De exemplu: încrucișarea dintre o persoană “gustător și cu grup sanguin A” cu alta “negustător și cu grup sanguin 0”, va produce în generația  $F_1$  numai indivizi “gustători, cu grup sanguin A” (caractere dominante) (tabelul 5.4). Din încrucișarea lor rezultă în  $F_2$  patru tipuri de descendenți: gustători – grup A; gustători – grup 0; negustători – grup A; negustători – grup 0, în proporție de 9 : 3 : 3 : 1. Prima remarcă pe care o putem face în acest caz se referă la reparația în  $F_2$  a tipului parental recesiv: negustător – grup 0: Se remarcă apoi că în  $F_2$  apar, alături de fenotipurile parentale, două *fenotipuri noi* ce rezultă prin *recombinarea* caracterelor din generația P. Explicația acestor fenomene este astăzi simplă, întrucât cunoaștem structura și funcția genelor, precum și dinamica cromosomilor în meioză (anafaza I).

<sup>33</sup> Se mai numește și legea liberei combinații a factorilor ereditari sau “legea segregării independente a perechilor de caractere”.

**Tabelul 5.4. Dihibridarea și legea a II-a a lui Mendel**

GENERAȚIE			
P	fenotip:	GUSTĂTOR; GRUP SANGUIN A	x negustător; grup sanguin 0
	genotip:	$G/G ; A/A$	$g/g ; o/o$
	gameți:	$(G ; A)$	x $(g ; o)$
F <sub>1</sub>		GUSTĂTORI; GRUP SANGUIN A. (100%)	

F<sub>1</sub> x F<sub>1</sub> fenotip: GUSTĂTOR ; GRUP SANGUIN A x GUSTĂTOR ; GRUP SANGUIN 0  
 genotip:  $G/g ; A/o$   $G/g ; A/o$

Combinatii fenotipice	gameți	G ; A	G ; o	G ; A	G ; o
	G ; A	$G/G ; A/A$	$G/G ; A/o$	$G/g ; A/A$	$G/g ; A/o$
	G ; 0	$G/G ; A/o$	$G/G ; o/o$	$G/g ; A/o$	$G/g ; o/o$
	g ; A	$G/g ; A/A$	$G/g ; A/o$	$g/g ; A/A$	$g/g ; A/o$
	g ; 0	$G/g ; A/o$	$G/g ; o/o$	$g/g ; A/o$	$g/g ; o/o$

F<sub>2</sub> Combinatii parentale

Combinatii noi	→	GUSTĂTORI ;	GRUP SANGUIN A	9
	↘	GUSTĂTORI ;	grup sanguin 0	3
	↘	negustători ;	GRUP SANGUIN A	3
	→	negustători ;	grup sanguin 0	1

	GUSTĂTORI	Negustători	
GRUP SANGUIN A	9	3	12
grup sanguin 0	3	1	4
	12	4	

Organismele parentale diferă prin două caractere distincte, determinate de gene situate pe cromosomi diferiți (*neînălțuite*). Aceste organisme sunt *homozigote*, întrucât genele alele sunt identice: ( $G/G ; A/A$ ) și ( $g/g$  și  $o/o$ ). Ele vor forma fiecare un singur tip de gameți ( $G;A$ ) și ( $g;o$ ), care - după fecundare - vor da prima generație filială (F<sub>1</sub>) de indivizi “uniformi” fenotipic și dublu heterozigoți ( $G/g ; A/o$ ); caracterul “gustător – grup A” este dominant. Prin încrucișarea acestor persoane F<sub>1</sub> între ele, rezultă patru fenotipuri diferite, deoarece în momentul în care se formează gameții, genele ce alcătuiesc cele două perechi de alele ( $G/g$ ) și ( $A/o$ ), segregă (se separă) și se asortează independent una de alta, întocmai ca și cromosomii omologi în anafaza meiozei primare. Fiecare persoană F<sub>1</sub> formează patru tipuri de gameți:  $GA ; Go ; gA ; go$  – care, prin fecundare *întâmplătoare*, vor da 16 genotipuri (de 9 feluri) (tabelul 5.4). Deoarece genele  $G$  și  $A$  sunt dominante față de  $g$  și  $o$ , rezultă numai patru categorii fenotipice parentale, în proporție de 9:3:3:1; două sunt identice cu fenotipurile parentale, celelalte două sunt noi și rezultă prin recombinarea lor. Apariția acestor combinații noi pledează pentru faptul că asortarea genelor în gameți este un proces în întregime întâmplător. Remarcăm faptul că fiecare caracter, luat separat, segregă independent de celălalt, realizând raportul specific pentru monohibridare de 3 : 1 (12 gustători : 4 negustători și 12 grup A : 4 grup 0).

Legea a doua a lui Mendel sau **legea asortării independente** (sau a liberei combinații a factorilor ereditari) afirmă faptul că:

- genele ce determină un caracter segregă independent de genele ce determină alt caracter;

- genele ce alcătuiesc diferite perechi de alele ( $A/a$ ;  $B/b$ ; ș.a.m.d.) se asortează (se combină) independent una de alta, atunci când se formează gameți;

- în cazul a două perechi de caractere, raportul de segregare fenotipică în  $F_2$  este  $9 : 3 : 3 : 1$

La baza acestei legi stă fenomenul de asortare independentă a cromosomilor din perechile de omologi, ce are loc în cursul anafazei meiozei primare (recombinare cromosomică).

Legea a doua a lui Mendel poate fi demonstrată și în cazul încrucișărilor între indivizi ce diferă prin 3, 4 ... n cupluri de alele independente, distincte. Numărul și diversitatea genotipurilor și fenotipurilor care rezultă (admițând că există o dominantă totală a unei alele asupra celeilalte) poate fi calculat conform tabelului 5.5

**Tabelul 5.5 Diversitatea fenotipurilor și genotipurilor ce rezultă din încrucișările între heterozigoți pentru 1, 2, 3 ... n cupluri de alele independente (după Bocque, 1974)**

Număr de cupluri alele independente	Număr de categorii genotipice	Proporții a diferitelor fenotipuri	Număr de categorii genotipice
1 (monohibridare)	$2^1 = 2$	$(3:1)^1$	$3^1 = 3$
2 (hibridare)	$2^2 = 4$	$(3:1)^2$	$3^2 = 9$
3 (trihibridare)	$2^3 = 8$	$(3:1)^3$	$3^3 = 27$
4 (tetrahibridare)	$2^4 = 16$	$(3:1)^4$	$3^4 = 81$
n	$2^n$	$(3:1)^n$	$3^n$

Numărul tipurilor de gameți formați de fiecare sex este egal cu numărul categoriilor fenotipice indicate. La om, pentru  $n = 23$ , descendența posibilă între heterozigoți numai pentru o singură pereche de alele pe fiecare din cele 23 perechi cromosomi ar fi  $2^{23} = 8\ 398\ 608$  categorii fenotipice și  $3^{23} = 94\ 143\ 178\ 827$  categorii genotipice. Acest număr enorm de combinații teoretic posibile la descenți, ne arată de ce ființele umane sunt practic unice, genotipic și fenotipic.

## 2. TRANSMITEREA CARACTERELOR MONOGENICE

### 2.1. DATE GENERALE

Caracterele monogenice sunt cele mai simple caractere genetice a căror prezență sau absență depinde de alelele, normale sau mutante, ale unui singur locus, situat pe autosomi sau pe cromosomul X. Desigur, manifestarea caracterului poate depinde și de alți factori, genetici sau de mediu, dar genele respective sunt *necesare și suficiente* pentru exprimarea caracterului. Ele au *efecte mari* și se conformează în mod obișnuit principiului “o genă → o proteină → un caracter”, deși, după cum știm deja, mutații diferite în aceeași genă pot produce fenotipuri (boli) diferite sau, invers, mutații în gene diferite se pot manifesta fenotipic identic (vezi heterogenitatea genetică, capitolul 4.A). Aceste caractere monogenice se moștenesc de obicei într-un mod simplu, identic sau similar cu cel descris de către Mendel; de aceea ele se numesc și caractere mendeliene.

Se cunosc peste 10.000 de caractere mendeliene, normale sau patologice, listate în lucrarea de referință a lui Victor McKusick *Mendelian Inheritance of Man* (ed.12, 1998), indispensabilă medicilor geneticieni. Versiunea online, numită *OMIM* este continuu actualizată și disponibilă prin internet (caseta 5.4)

#### CASETA 5.4

#### **OMIM**

*Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) este un catalog al genelor și bolilor genetice care se transmit mendelian, accesibil prin Internet la adresa de web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/OMIM>. OMIM este bazat pe textul celebrului catalog “Mendelian Inheritance in Man” care a fost elaborat în 1966 sub conducerea profesorului Victor McKusick de la Universitatea Johns Hopkins din Baltimore și se află în prezent la ediția a 12-a*



(1998). Spre deosebire de forma publicată care apare periodic, varianta online este actualizată zilnic. Astfel, la 1 Martie 2003, numărul total de intrări era de 14231, număr care include atât fenotipuri pentru care sunt identificate genele cauzatoare, cât și descripții fenotipice fără loci identificați sau loci fără fenotip asociat.

Numărul de intrări OMIM la 21 februarie 2003

	<b>Autosomale</b>	<b>Legate de X</b>	<b>Legate de Y</b>	<b>Mitocondriale</b>	<b>Total</b>
Gene localizate sau fenotipuri cu loci precizați (prefix *)	9956	541	41	37	10574
Fenotipuri cu doi sau mai multi loci asociați (prefix #)	1120	94	0	23	1237
Alți loci sau fenotipuri (fără prefix)	2260	158	2	0	2419
<b>Total</b>	<b>13335</b>	<b>793</b>	<b>43</b>	<b>60</b>	<b>14231</b>

\* Un asterisc prezent înaintea unei intrări semnifică un fenotip determinat de gena situată la locusul precizat și faptul că modul de transmitere a fenotipului a fost demonstrat, după aprecierea autorilor și editorilor.

# Acest simbol înaintea unei intrări înseamnă că acest fenotip poate fi cauzat de mutații la nivelul a două sau mai multe gene.

Fiecare intrare are un număr unic din șase cifre. Prima cifră corespunde modului de transmitere a genei asociate: 1 – boli (sau loci) cu transmitere autosomal dominantă desemnate înainte de 15 mai 1994; 2 – boli (sau loci) cu transmitere autosomal recesivă stabilite înainte de 1994; 3 – boli (sau loci) legate de X; 4 – boli (sau loci) legate de Y; 5 – boli (sau loci) mitocondriale; 6 – boli (sau loci) autosomale desemnate după 15 mai 1994. După cum se observă, după 1994 s-a renunțat la clasificarea genelor autosomale în dominante sau recesive deoarece unele gene pot avea mutații diferite cu transmiteri diferite. Variantele alelice ale unui locus sunt desemnate prin numere zecimale alcătuite din 4 cifre care urmează după codul de șase cifre. De exemplu, variantele alelice (mutațiile) genei pentru factorul IX al coagulării sunt desemnate prin 306900.0001 până la 306900.0101. Locusul pentru beta-globina (HBB) este numerotat 141900, iar hemoglobina S (implicată în producerea sicklemiei) este numerotată 141900.0243.

Bolile monogenice sunt caracterizate prin modul lor de transmitere în familie, stabilit în urma unei anamneze (istoric) familiale și reprezentat grafic (cu ajutorul unor simboluri standard), sub forma unui arbore genealogic (în engleză *pedigree*<sup>34</sup>) (figura 5.21).

Asupra acestei acțiuni, importante în diagnosticul bolilor genetice, ne vom referi cu detalii mai târziu (vezi capitolul 9.A), dar acum vom introduce câțiva termeni de bază, pentru a facilita discuțiile privind transmiterea genealogică. Persoana afectată (■ sau ●) de la care începe recenzarea unei familii cu o boală genetică se numește **proband** (*caz index* sau *propositus/proposita*, în funcție de sex) iar aceea care consultă medicul (rudă sănătoasă sau afectată cu probandul) se numește **consultand**. Relațiile intrafamiliale și gradele de rudenie sunt redată în figura 5.22. Poziția unei persoane în arbore este indicată prin numere romane pentru generație și numere arabe pentru locul unui individ într-o generație.

Modelul de transmitere ereditară a unui caracter monogenic în familie depinde de doi factori:

- localizarea genei pe un autosom (caracter autosomal) sau pe cromosomii sexuali, X sau Y (caracter legat de X sau de Y);
- fenotipul dominant sau recesiv determinat de genă.

Astfel există cinci modele de bază pentru transmiterea monogenică: autosomal dominant (AD), autosomal recesiv (AR), recesiv-legat de X (RLX), dominant-legat de X (DLX) și legat de Y (LY).

<sup>34</sup> „Pedigree” derivă din expresia franceză „*ped de grue*” (picior de cocor) care exprimă aspectul ramificat al diagramei

Anamneza familială poate indica și alte modele de transmitere, nemendeliene (de exemplu transmiterea maternală în bolile mitocondriale), dar la acestea ne vom referi distinct, ulterior.

Înainte de a descrie caracteristicile modelelor de transmitere monogenică sunt utile câteva considerații.

(1). Distincția dintre ereditatea autosomală și legată de X sau Y este evidentă dar trebuie subliniat că bărbații XY au un singur cromosom X și deci nu sunt niciodată homozigoți sau heterozigoți pentru genele localizate pe cromosomii sexuali, ci numai *hemizigoți*. De asemenea, între genele situate pe cei doi X, la femeile XX, și genele de pe o pereche de autosomi apar diferențe, deoarece ambele alele autosomale sunt *active* (exceptând fenomenul de amprentare, la care ne vom referi mai târziu) dar genele de pe X, deși se găsesc în „doză dublă”, în marea lor majoritate sunt exprimate *numai* de pe unul din cei doi cromosomi X, celălalt fiind inactivat.

(2). Deși există caractere determinate de gene/loci situate pe Y ele sunt foarte probabil neesențiale pentru sănătate, deoarece femeile XX sunt perfect normale; aceste gene sunt implicate, în marea lor majoritate<sup>35</sup>, numai în funcțiile sexuale, specific masculine, iar mutațiile lor afectează numai aceste funcții. Deci foarte probabil (exceptând bolile corelate cu funcția sexuală masculină) la om nu există alte boli legate de Y

(3). Termenii de dominant și recesiv sunt proprietăți ale caracterelor și nu ale genelor; ei se referă mai ales la fenotipul clinic, deși descriptiv, sintetic, se folosesc termenii de alelă dominantă sau recesivă<sup>36</sup>. Clasic, *distincția dintre dominant și recesiv se realizează la heterozigoți*: caracterele dominante se manifestă la heterozigoți iar cele recesive nu se manifestă la heterozigoți, ci numai la homozigoți (sau heterozigoți compuși). Evident, la bărbații hemizigoți pentru loci de pe X sau Y nu se pune problema de dominant sau recesiv. Diferența dintre ereditatea dominantă și recesivă nu este absolută ci relativă (arbitrară) deoarece în multe boli recesive heterozigoții au manifestări ale ambelor gene la nivel molecular/biochimic, celular și uneori (în anumite condiții) și la nivel clinic. Să ne reamintim că *sicklemia* (vezi capitolul 4.B.1) este o afecțiune recesivă deoarece numai homozigoții (*a/a*) manifestă obișnuit boala; heterozigoții (*N/a*) prezintă însă *trăsătura sicklemică* deoarece produc atât HbA cât și HbS, iar în anumite condiții (scăderea concentrației de oxigen) pot manifesta și semne clinice. Mai mult, mutații diferite în aceeași genă autosomală (de exemplu, gena pentru hormonul de creștere) se pot transmite ereditar diferit, unele dominant altele recesiv.

*Deficiența familială izolată de hormon de creștere* (IGHD) – manifestată prin hipostatură severă – este produsă prin mutații diferite în gena hormonului de creștere (*GHI*) situată pe cromosomul 17. Formele recesive de IGHD sunt produse de mutații nonsens ce alterează structura produsului astfel că el nu poate fi secretat. La heterozigoți, gena normală produce o cantitate de hormon de creștere redusă la jumătate dar suficientă pentru o talie cvasinormală; deficiența se va manifesta numai la homozigoți. În formele dominante de IGHD, la heterozigoți, în alela mutantă se produce frecvent o mutație a situsului de clivare a intronului doi, care va deleta exonul trei al genei *GHI*; rezultă o proteină anormală, care se secretă (!); ea se combină (punți disulfidice) cu proteina normală (codificată de alela normală), anulându-i efectele (*dominanță negativă*) și producând boala.

De aceea, în catalogul M.I.M, după anul 1994, caracterele autosomale au încetat să fie clasificate în dominante și recesive.

În aceste condiții se pune firesc întrebarea: *cum vom diferenția caracterele și genele dominante?* Distincția este relativ simplă. Heterozigoții cu o alelă normală și alta mutantă vor avea doar jumătate din produsul normal al genei; dacă această jumătate este suficientă pentru realizarea funcțiilor genei, atunci alela mutantă este numită recesivă. Dacă acest lucru nu se întâmplă și o alelă mutantă produce boala chiar dacă există o alelă normală, atunci alela mutantă este dominantă.

(4). Clasic, orice fenotip exprimat la heterozigoți este definit ca dominant; această definiție este prea rigidă deoarece în multe boli dominante homozigoții (deși foarte rari) sunt mai sever afectați decât heterozigoții; pentru aceste cazuri, în care heterozigoții au un fenotip intermediar între homozigoții afectați și cei normali, s-ar putea folosi termenii de *dominanță incompletă* sau *semidominanță* iar dacă ambele alele diferite se exprimă (de exemplu, în cazul alelelor HLA sau genelor A și B pentru grupul sanguin ABO), termenul de *codominanță*. Totuși, în cazul bolilor monogenice acești termeni sunt rar folosiți.

<sup>35</sup> Excepție fac genele „paseudoautosomale” care au alele funcționale atât pe X cât și pe Y

<sup>36</sup> Se recomandă ca alelele ce determină caractere dominante să fie notate cu majuscule iar alelele ce determină caractere recesive cu litere mici. Noi preferăm simbolurile *A* sau *a*, pentru genele mutante și *N* sau *n* pentru cele normale.

(5). Distincția dintre dominant și recesiv în cazul caracterelor/bolilor legate de X se estompează datorită fenomenului de inactivare (lyonizare) a unui cromosom X (inactivare precoce în viața embrionară, întâmplătoare și definitivă). Într-adevăr, purtătoarele (heterozigotele  $X^a/X^N$ ) pentru boli recesive legate de X manifestă adesea unele semne, atunci când sunt comparate cu bărbații XY afectați, iar heterozigotele pentru boli dominante legate de X sunt mai ușor și variabil afectate. Explicația este deja cunoscută (vezi capitolele 2.D.2.b și 4.B.4): o femeie heterozigotă pentru un caracter legat de X este un *mozaic* de celule care exprimă fie alela normală, fie alela anormală; în funcție de proporția și localizarea celulelor cu  $X^a$  activ apar semne variate de boală.

(6). În sfârșit, vom sublinia faptul că, în practica medicală, modelul de transmitere ereditară a unei boli *poate fi rareori definit fără ambiguitate într-o singură familie!* Familiile umane au, de obicei, un număr limitat de membri, mai ales când apar și copii afectați, iar multe afecțiuni genetice pot fi consecința unei mutații noi sau pot prezenta fenomenul de heterogenitate genetică. De aceea, determinarea modului de transmitere, deși este foarte importantă pentru sfatul genetic, este cel mai adesea o *ipoteză de lucru* și nu un fapt stabilit. Numai atunci când gena a fost clonată și mutația cauzatoare de boală poate fi determinată prin analiza ADN este posibilă stabilirea certă a modului de transmitere a mutației. În celelalte cazuri un diagnostic precis ne permite să consultăm *OMIM*, unde intrările cu un mod de transmitere ereditară bine stabilit sunt notate cu asterisc.

(7) Pentru înțelegerea termenilor ce vor fi folosiți în analiza transmiterii monogenice este necesară cunoașterea datelor esențiale privind structura și funcția genei, prezentate în capitolele 3.A și 4.A, precum și a terminologiei de bază (locus, alelă; homozigot, heterozigot simplu, dublu și compus; dominant, codominant și recesiv; pleiotropie, penetranță, expresivitate; heterogenitate genetică etc, pe care cititorul îi poate găsi definiții și în glosarul de la sfârșitul cărții)

## 2.2 TRANSMITEREA AUTOSOMAL DOMINANTĂ

Mai mult de 50% din intrările incluse în OMIM reprezintă caractere transmise autosomal dominant (AD) iar bolile AD afectează, la diverse vârste, circa 20 din 1000 de nou născuți. Multe dintre ele sunt frecvente și serioase prin consecințele lor: *hipercolesterolemia familială, boala polichistică renală-AD a adultului (ADPKD), neurofibromatoza 1, boala Huntington, polipoza adenoamtoasă familială, cancere ereditare de sân sau colon etc.*

### **a). Caracteristici și criterii de transmitere AD**

În această situație, caracterul este determinat de o pereche de gene alele, situată în loci omologi, pe unul dintre *autosomi*. Una din genele alele suferă o mutație (A) și se manifestă fenotipic (clinic) la heterozigoți (A/n), deoarece alela normală (n) este insuficientă pentru a compensa efectul alelei mutante. Cele două alele A și n pot forma trei genotipuri: A/n (mai frecvent), A/A (mai rar) și n/n; primele două genotipuri vor determina un fenotip anormal (o boală) autosomal dominantă, în care bărbații și femeile vor fi *egal afectați*.

Teoretic, cu cele trei genotipuri se pot realiza șase combinații sau tipuri de încrucișări (tabel 5.6), dar practic, frecvența lor într-o populație depinde de severitatea manifestării clinice, care determină sau nu supraviețuirea până la vârsta adultă și capacitatea reproductivă (fertilitatea). Evident primele două combinații sunt cele mai frecvente, a treia este rară și, împreună cu următoarele trei (rarissime), se întâlnesc în familiile mari, numai pentru boli „ușoare” (de exemplu, *brahidactilia, hemeralopia, prognatismul*) sau pentru cele cu debut tardiv (după 40 de ani).

**Tabel 5.6. Transmiterea dominantă autosomală a unui caracter patologic. Sănătoși (n/n) și bolnavi (A/A; A/n)**

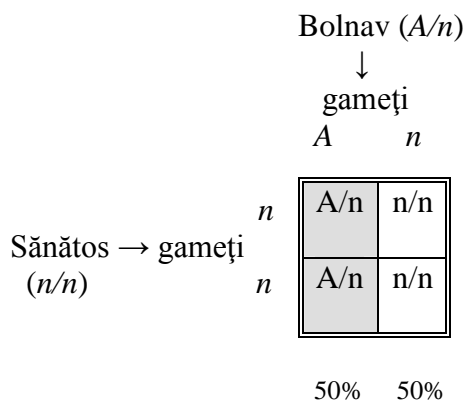
Combi-nații genotipice parentale	Gameți	Descendenți	
		Genotipuri	Fenotipuri (indiferent de sex)
1. n/n + n/n	n x n	n/n	toți sănătoși
2. A/n + n/n	(A+n) x n	½ A/n ½ n/n	½ bolnavi ½ sănătoși
3. A/n + A/n	(A+n) x (A+n)	¼ A/A; ½ A/n	¾ bolnavi

		$\frac{1}{4} n/n$	$\frac{1}{4}$ sănătoși (indiferent de sex)
4.	$A/A + n/n$	$A \times n$	$A/n$ toți bolnavi
5.	$A/A + A/n$	$A \times (A+n)$	$\frac{1}{2} A/A; \frac{1}{2} A/n$ toți bolnavi
6.	$A/A + A/A$	$A \times A$	$A/A$ toți bolnavi

Din analiza acestor combinații / încrucișări rezultă o serie de caracteristici (reguli) ale transmiterii autosomal dominante.

Doi indivizi sănătoși ( $n/n + n/n$ ) nu pot avea copii cu afecțiuni AD; boala nu este transmisă prin persoane neafectate deoarece, teoretic, nu există purtători sănătoși de genă mutantă. Această regulă are o excepție: producerea unor mutații (AD) germinale noi (în gametogeneza unuia dintre părinții sănătoși) poate determina apariția unui copil afectat; există de asemenea „abateri” determinate de heterogenitatea genetică de locus (mutații diferite, dominate și recesive, pot da același fenotip; de exemplu în *retinita pigmentară*; vezi caseta 3.6) sau de genotipul unuia dintre părinții sănătoși care este în realitate  $A/n$  dar alela  $A$  nu se exprimă deloc fenotipic (non-penetrantă) sau se va exprima mai târziu decât la copilul afectat (anticipație). În același context se pot include și cazurile de non-paternitate (în care tatăl nelegitim este  $A/n$ ).

Din încrucișarea dintre un bolnav heterozigot ( $A/n$ ) și un sănătos ( $n/n$ ) rezultă, teoretic, 50% bolnavi ( $A/n$ ) și 50% sănătoși ( $n/n$ ):



Rezultatul acestei încrucișări ne permite să formulăm alte reguli de bază ale transmiterii AD: fiecare bolnav are (cel puțin) un părinte afectat; cu alte cuvinte, *boala este prezentă în fiecare generație* și în arborele genalogic al unei familii (suficient de mare) se observă o frecvență relativ ridicată a bolnavilor și o *transmitere verticală* (figura 5.23). Aceste caracteristici, și mai ales prezența, *continuitatea, bolii în succesiunea generațiilor*, se observă frecvent în bolile AD mai puțin severe, compatibile cu reproducerea și, deseori, la cele cu debut tardiv.

*Boala se manifestă (cu o frecvență și o severitate relativ egală) atât la bărbați cât și la femei* iar gena mutantă (situată pe un autosom) poate fi moștenită și transmisă cu o probabilitate egală de către ambele sexe (deci independentă de sex). Toate acestea pledează pentru o transmitere autosomală. În plus, *transmiterea tată → fiu este posibilă*; deși acest criteriu nu este obligatoriu pentru transmiterea AD, prezența lui exclude alte tipuri de transmitere.

Evident, de la aceste reguli există și excepții, care complică interpretarea, și pe care le vom discuta mai jos; este vorba de mutații noi, mozaicuri germinale, penetrantă redusă, anticipație, s.a.

Acum însă vom sublinia alt element important: fiecare bolnav, heterozigot (situația cea mai frecventă în bolile AD), are un risc de 50% de a avea descendenți afectați, dacă gena are o penetrantă completă. Acest *risc de 50% este valabil la fiecare sarcină* (ca eveniment *independent*), indiferent dacă anterior s-a născut un copil normal sau afectat. Dar transmiterea gameților, la fel ca și aruncarea unei monede, este supusă *fluctuațiilor întâmplării* și este posibil, spre exemplu, ca toți copiii (III-6, III-7, III-8, în figura 5.23) sau nici-unul dintre ei să fie afectați.

În transmiterea bolilor AD se poate întâlni uneori situația încrucișării dintre doi bolnavi heterozigoți  $A/n \times A/n$  (combinația 3 în tabelul 5.6) din care pot rezulta indivizi afectați și homozigoți (situațiile 5 și 6 din tabelul 5.6 sunt aproape numai teoretice). În multe boli AD (*hipercolesterolemia familială, acondroplazia, sindromul Marfan, ș.a.*) *homozigoții sunt mai grav*

afecțați decât heterozigoții și deseori prezintă forme letale, neonatal, de boală. Spre deosebire de aceste boli cu semidominanță ( $A/A > A/n > n/n$ ) există și cazuri de boli cu dominanță completă (în care  $A/A = A/n$ ) iar exemplul cel mai cunoscut fiind cel al *bolii Huntington*. Revenind la situația rară a încrucișării dintre doi bolnavi heterozigoți vom semnala, ca o caracteristică a bolilor dominante, faptul că ei pot avea descendenți sănătoși care, în bolile AD, vor fi și fete (!) și băieți.

Pe baza datelor discutate mai sus se pot formula următoarele *criterii privind transmiterea AD*:

- fiecare bolnav are de obicei un părinte afectat
- orice bolnav transmite boala la jumătate din copiii săi; riscul de 50% este valabil la fiecare sarcină;
- fenotipul anormal apare în fiecare generație (continuitate în succesiunea generațiilor) iar în arborele genealogic se observă o transmitere verticală;
- indivizii sănătoși nu transmit boala;
  - Excepțiile de la aceste reguli sunt determinate de: penetranța redusă, mutații noi sau mozaicuri germinale, debut tardiv de manifestare, non-paternitate și, mai rar, heterogenitate genetică și fenocopii;
- boala se manifestă (cu o frecvență și o severitate relativ egală) atât la bărbați cât și la femei iar gena mutantă poate fi moștenită și transmisă cu o probabilitate egală de către ambele sexe (deci independentă de sex; excepția o constituie bolile care predomină sau sunt limitate la un sex).
- transmiterea tată → fiu este posibilă și caracteristică eredității AD.
- doi bolnavi (cu o afecțiune compatibilă cu supraviețuirea și reproducerea) pot avea descendenți sănătoși, fete și băieți, iar dintre copiii afectați o parte pot fi homoziigoți, cu o formă mai gravă de boală.

Pe lângă aceste criterii majore ale transmiterii AD, în arborii genealogici există și alte indicii pentru acest mod de transmitere: frecvența crescută a bolnavilor sau absența legăturilor consanguine.

#### **b). Excepții de la regulile transmiterii AD.**

(1). **Penetranța redusă.** În bolile AD, mai ales cele cu pleiotropie și expresivitate clinică variabilă (vezi capitolul 4. A), uneori un individ moștenește alela mutantă dar nu o manifestă fenotipic; el poate însă să o transmită la descendenți, care pot să fie afectați (figura 5.24.a; la subiectul II.1 gena mutantă este *non-penetrantă*, nu se manifestă clinic dar se transmite). Se realizează astfel un „salt” peste generația parentală, aparent sănătoasă. Dacă o genă mutantă se manifestă la toți heterozigoții ( $A/n$ ) atunci are o **penetranță completă**; dacă manifestarea ei este sub 100% atunci gena mutantă are o **penetranță redusă** sau incompletă.

Penetranța se poate *măsura cantitativ* prin determinarea proporției heterozigoților ( $A/n$ ) care exprimă fenotipic gena mutantă din totalul „purtătorilor obligatorii” de mutație. În exemplul din figura 5.24.A penetranța este de  $\frac{3}{4}$  deci 75% sau 0,75. Cunoașterea penetranței este importantă în sfatul genetic deoarece riscul unui bolnav cu o afecțiune AD cu penetranță redusă (de exemplu, 0,75) de a avea copii afectați este mai mic de 0,5 (50%), fiind  $0,5 \times 0,75 = 0,37$ . În acest context, vom preciza, din nou, că este foarte important să facem diferența dintre o mutație cu penetranță redusă (cu risc suficient de mare, chiar dacă este sub cel teoretic de 50%) și o mutație nouă (cu risc mic de recurență); în acest scop vom folosi toate mijloacele posibile de diagnostic presimptomatic.

Penetranța este o noțiune cantitativă (de tipul „tot sau nimic”), care se referă la expresia clinică a genei mutante (prezentă sau absentă), ce poate fi influențată de diferiți factori: metoda de diagnostic, vârsta de debut, sexul.

- *Metoda de diagnostic* este decisivă pentru a stabili dacă o genă se manifestă sau nu. De exemplu, în *boala polichistică renală a adultului (ADPKD)* o persoană tânără, ce a moștenit gena mutantă, poate să nu prezinte ecografic chisti renali vizibili (cu dimensiuni prea mici) dar ei ar putea fi puși în evidență prin CT sau RMN. Într-un anumit sens, penetranța poate fi considerată „un artefact” determinat de abilitatea noastră de a *recunoaște* (clinic și/sau paraclinic) expresia sau fenotipul genei mutante.
- *Vârsta de debut* a primelor manifestări clinice este variabilă în multe boli AD (vezi mai jos); Vom menționa aici că în *boala Huntington* penetranța genei mutante este zero la naștere, 25% la 30 de ani, 50% la 40 de ani și 100% la 70 de ani.
- *Sexul persoanei* poate unora influența manifestarea genei mutante; de exemplu, în *cancerul de sân familial produs prin mutația genei BRCA2*, penetranța genei este redusă la bărbați al căror țesut glandular este redus și nedependent de stimularea hormonală.

Cauzele penetranței reduse, incomplete, nu sunt clare dar intervin probabil factori genetici și negenetici, care pot avea – într-o anumită conjunctură – un efect antagonic, „supresor”, asupra manifestării unei gene. Un exemplu edificator este *deficiența în factorul V Leiden*, prezentată în caseta 5.5; vom mai adăuga faptul că în *hipercolesterolemia familială* depozitele de colesterol din pereții vaselor sanguine, ce determină simptomatologia principală a bolii, pot fi reduse de o dietă sau o medicație adecvată (statine); vom aminti de asemenea „bolile induse de medicamente” (farmacogenetica) – ca *porfirie acută intermitentă* sau *hipertermia malignă* – care vor fi „declanșate” numai în anumite condiții de mediu (vezi capitolul 8.A.3).

CASETA 5.5

OMI 227400.

### DEFICIENȚA ÎN FACTORUL V LEIDEN

*Un exemplu interesant și util de știut îl furnizează deficiența în factorul V Leiden, transmisă AD (gena este localizată pe cromosomul 1q23). Factorul V este o componentă a cascadei de coagulare a sângelui. Mutația Leiden (numită astfel după orașul din Olanda în care a fost descoperită) produce o alterare a funcției factorului V. Heterozigoții pentru alela factorului V Leiden prezintă o stare de hipercoagulabilitate, care determină un risc crescut de producerea unor tromboze venoase profunde (TVP) la membrele inferioare<sup>37</sup>, de unde cheagurile se pot desprinde și ajunge, prin circulație, în plămâni producând o embolie pulmonară (EP). Fenotipul clinic TVP se manifestă numai la circa 50% din heterozigoți, deci nu orice persoană care moștenește gena mutantă va dezvolta boala deoarece trebuie să intervină alți factori de risc pentru TVP și EP: folosirea de contraceptive orale (!), sedentarismul, sarcina, prezența unui cateter venos central, alți factori de mediu sau genetici ce contribuie la hipercoagulabilitatea sângelui; toate acestea explică penetranța redusă a genei.*

(2). **Mutații germinale noi.** Pacienții afectați pot fi primul și singurul caz de boală AD din familie; în această situație se presupune că apariția bolnavului din părinți sănătoși și homozigoți (*n/n*) (figura 5.24.c) este consecința unei *mutații spontane noi (neomutații)* apărută în timpul gametogenezei, de obicei la bărbat; această ipoteză se va lua în considerație după ce s-au eliminat celelalte posibilități: penetranța redusă, expresivitatea variabilă și non-paternitatea.

De altfel, mutațiile noi sunt frecvente în numeroase boli AD care, datorită gravității handicapului clinic sau reducerii până la anulare a capacității reproductive, nu pot fi transmise de la părinți la descendenți. În *osteogenesis imperfecta tipul II (OMIM 166200)*, boală AD – caracterizată prin fragilitate osoasă – letală perinatal, toate cazurile reprezintă mutații noi. Un alt exemplu frecvent citat este al *acondroplaziei (OMIM 100800)* – un nanism disproporționat pe seama membrelor, foarte scurte – în care se apreciază că 80% din cazuri sunt produse prin neomutații. În *neurofibromatoză* acestea reprezintă 50% din cazuri.

(3). **Mozaicismul germinal.** Mult mai rar, mutațiile se pot produce precoce în viața embrionară, afectând unii din precursorii gameților; se formează astfel o sub-populație de gonocite ce poartă mutația, deci un *mozaicism germinal* care poate explica apariția *mai multor copii afectați* din părinți sănătoși (figura 5.24.d). Considerat foarte rar, acest mecanism începe să fie probat prin analizele moleculare: de exemplu, a fost demonstrat în 6% din cazurile de copii cu *osteogenesis imperfecta* născuți din părinți sănătoși, precum și în alte boli (neurofibromatoză sau unele boli recesive legate de X).

#### c). **Expresivitatea variabilă.**

Expresivitatea, spre deosebire de penetranță, este o noțiune calitativă, care definește gradul, intensitatea, natura, severitatea manifestării fenotipice a unei gene mutante și penetrante la bolnavi diferiți. Atunci când acești parametri sunt diferiți pentru expresia unei gene mutante se folosește termenul de **expresivitate variabilă** (figura 5.24.b).

Expresivitatea variabilă interesează:

<sup>37</sup> Circa 40% din indivizii care fac TVP sunt heterozigoți pentru alela factorului V Leiden

- spectrul de manifestare a simptomelor și distribuția lor,
- vârsta de debut a semnelor,
- intensitatea (severitatea) exprimării,
- limitarea manifestării la pacienții de un anumit sex.

**(1). Spectrul de manifestare al simptomelor și distribuția lor.** Numeroase boli AD, mai ales cele cu pleiotropie (manifestări variate în organe multiple) prezintă o expresivitate variabilă. În capitolul 4.A.4.2 exemplificăm acest concept la bolnavii cu sindrom Marfan (caseta 4.1), la care pot să nu apară toate anomaliiile celor trei sisteme afectate (schelet, ochi, aparat cardiovascular) sau la care severitatea clinică este diferită; prezentăm acum un arbore genealogic ilustrativ (figura 5.25), în care toți indivizii vii afectați au *aceiași mutație* în gena fibrilinei dar prezintă o variabilitate marcată în vârsta de debut, distribuția și severitatea semnelor. Un alt exemplu ilustrativ este cel al neurofibromatozei (*NFI*) sau boala Von Recklinghausen (vezi capitolul 11.E.1) care prezintă manifestări cutanate (multiple pete *café au lait*, pistrui axilari, ș.a), oftalmologice (noduli Lisch în iris, ș.a), musculoscheletice (scolioză, statură mică ș.a.), neuropsihiatrice (dificultăți de învățare sau retard mintal, convulsii etc) și tumorale (neurofibroame de diverse mărimi, gliome de căi optice sau SNC, feocromocitoame ș.a). Toate aceste modificări se dezvoltă la vârste diferite (primele semne ce apar la copii sunt petele multiple *café au lait*) și au o mare variabilitate a distribuției severității.

Modul și gradul (severitatea) de manifestare a unei boli AD determinată de o anumită genă mutantă *nu poate fi prezis*, nici chiar la bolnavii din aceeași familie, care au aceeași mutație genică. În schimb, cunoașterea întregului *spectru de manifestare* al unei boli monogenice AD permite evaluarea și diagnosticul complet al unui pacient, precum și cercetarea unor cazuri oligo- sau mono-simptomatice, puțin evidente, în familie. Toate acestea vor influența calitatea diagnosticului, conduita medicală, prevenția unor complicații și acuratețea sfatului genetic.

**(2). Vârsta de debut a semnelor.** O problemă corelată cu expresivitatea variabilă este vârsta de debut a manifestărilor unor boli AD pleiotrope. Diversele semne apar în timp, la vârste diferite (penetrantă dependentă de vârstă); uneori primele manifestări ale unor boli (ca *ADPKD*, *hipercolesterolemia familială*, *polipoza de colon*, *boala Huntington* ș.a) apar tardiv la adult. În figura 5.26 prezentăm exemplul clasic al *coreei Huntington* – o boală degenerativă neurologică caracterizată prin mișcări anormale (coree) și pierderea progresivă a funcțiilor mintale (demență) – în care primele semne apar, în medie la 35 de ani. Persoana care a moștenit gena mutantă este mult timp asimptomatică, fără să știe că posedă mutația în momentul în care își alcătuiește o familie și decide să aibe copii (cărora, evident, le poate transmite gena anormală). Acest lucru scoate în evidență utilitatea anamnezei familiale și importanța unor teste de diagnostic presimptomatic (vezi capitolul 18).

În acest context, vom menționa și fenomenul de **anticipație**: în unele afecțiuni AD semnele de boală se manifestă în generații succesive la o vârstă tot mai precoce și cu o severitate tot mai mare. Mult timp existența anticipației a fost discutabilă dar astăzi se știe că este un fenomen cert, mai ales în *bolile prin amplificarea repetițiilor trinucleotidice* (vezi capitolele 6.B.1.4 și 11.C), în care numărul acestor expansiuni instabile va crește în succesiunea generațiilor determinând o vârstă de debut tot mai precoce și o severitate mai mare.

**(3). Limitarea manifestării la pacienții de un anumit sex.** Expresivitatea variabilă a unor boli poate să se manifeste și prin afectarea predominantă (sau chiar limitată) a unui anumit sex. Ne referem mai sus la *cancerul de sân familial produs prin mutația genei BRCA2* care este foarte rar la bărbați, dar sunt și alte exemple de boli AD manifeste la un anumit sex; vom mai cita: *porfîria acută intermitentă* predominantă la sexul feminin sau *pubertatea precoce familială limitată* la sexul masculin.

În acest ultim exemplu, pubertatea apare precoce la 4-5 ani, datorită unei mutații a receptorului pentru hormonul luteinizant care, așa cum se observă în figura 5.27, se transmite AD (vezi transmiterea tată → fiu) dar gena este nemanifestă la persoanele de sex feminin (I-1, II-1, II-5) care o moștenesc și o transmit la descendenți.

*Cauzele expresivității variabile* sunt greu de definit. Sigur, la bolnavii cu aceeași afecțiune dar din familii diferite, prima explicație a expresivității variabile poate fi *heterogenitatea alelică*, deci existența unor mutații diferite. De exemplu, în *osteogenesis imperfecta* mutațiile care afectează aminoacizii dinspre capătul carboxil al moleculei de procolagen vor da forme mai grave de boală decât cele care afectează aminoacizii dinspre capătul amino terminal.

Pentru bolnavii din aceeași familie sau din familii diferite care au aceeași mutație cauzele fenomenului sunt, însă, altele. Se invocă interacțiunea genei-boală cu alte *gene modificatoare* (casetă 5.6) și/sau cu unii *factori de mediu*; o dovadă indirectă a existenței genelor modificatoare o reprezintă expresia mai frecventă/predominantă sau exclusivă/limitată a unor gene autosomale la un anumit sex.

### 2.3 TRANSMITEREA AUTOSOMAL RECESIVĂ

Circa 1/3 din caracterele monogenice sunt transmise autosomal recesiv (AR). Cele mai frecvente boli AR în populația europeană sunt hemocromatoza și fibroza chistică sau mucoviscidoza. Alte afecțiuni AR: surditatea congenitală (unele forme), fenilcetonuria, atrofia musculară spinală, cecitatea recesivă, sindromul adrenogenital, sicklemlia, talasemia, albinismul oculo-cutanat, etc. Marea majoritate a erorilor înăscute de metabolism se transmit de asemenea AR:

#### CASETA 5.6.

##### **Genele modificatoare**

Multe boli mendeliene prezintă diferențe în ceea ce privește vârsta de apariție, severitatea bolii și alte caracteristici fenotipice. De fapt, expresia unitară/identică a unor asemenea boli pare să fie excepția și nu regula (o asemenea excepție pare să fie de exemplu albinismul, boală genetică determinată de deficiența completă a tirozinazei). Printre factorii care determină această diversitate fenotipică sunt implicate variantele alelice, mediul și genele modificatoare. Exemplele privind variantele alelice și factorii de mediu sunt relativ numeroase și bine caracterizate. Existența unor gene modificatoare a fost inițial postulată o dată cu descrierea unor diferențe fenotipice la purtătorii aceleiași variante alelice și în absența intervenției unor factori de mediu. Asemenea gene modificatoare pot afecta penetranța, expresivitatea și pleiotropia sau pot modifica dominanța unor mutații. În funcție de natura efectului lor, genele modificatoare pot determina fenotipuri mai severe, mai puțin severe sau chiar fenotipuri noi. Epistazia, care apare atunci când o alelă a unei gene maschează fenotipul unei alte gene, este o formă de modificare genetică. Deși sunt probabil extrem de numeroase, numărul genelor modificatoare bine documentate la om este în prezent relativ redus.

- *Gene modificatoare ale penetranței.* Deși penetranța incompletă este o trăsătură comună a unor numeroase boli mendeliene, există puține exemple pentru care să se știe că variabilitatea penetranței se datorează unor gene independente. Un exemplu a fost descris în cazul surdității non-sindromice determinată de mutații ale genei DFNB26 de pe cromosomul 4q31. Au fost descrise cazuri în care indivizi homozigoți pentru mutația prezentă în familie au totuși auz normal. La acești indivizi a fost cartografiată o genă modificatoare dominantă localizată pe cromosomul 7 care reduce penetranța mutației cauzatoare de boală. De asemenea, pe cromosomul 8, în apropierea markerului D8S277, a fost localizată o genă care modifică penetranța mutației 1555A>G de la nivelul genei mitocondriale pentru ARNr 12S, ce produce surditatea transmisă matriliniar.
- *Gene modificatoare ale dominanței.* Una dintre mutațiile implicate în producerea retinitei pigmentare cu transmitere autosomal recesivă este cea a genei pentru periferina-1 (PRP1). Au fost însă descrise cazuri în care mutații heterozigote ale acestei gene se însoțesc de prezența bolii, deși se aștepta ca numai indivizii homozigoți să fie bolnavi. Aceste cazuri au fost explicate prin asocierea unor variante alelice la nivelul genei neînlanțuite ROM1 (care codifică proteina 1 a porțiunii externe a celulelor cu bastonaș de la nivelul retinei). Ca urmare, o alelă care are în mod normal un efect recesiv în producerea retinitei pigmentare poate să acționeze ca o alelă dominantă atunci când se asociază o alela particulară a genei neînlanțuite ROM1.
- *Expresivitatea variabilă.* Un exemplu de genă modificatoare implicată în producerea expresivității variabile este cel al hipercolesterolemiei familiale, boală transmisă autosomal dominant care afectează una din 500 de persoane din populația generală și determină o creștere semnificativă a riscului pentru bolile cardiovasculare ca urmare a creșterii colesterolemiei. S-a constatat că unii purtători heterozigoți pentru mutația cauzatoare de boală au un nivel al colesterolemiei care este cu 25% mai mic decât cel așteptat. La asemenea indivizi a fost cartografiată o genă modificatoare localizată pe cromosomul 13q.



- **Pleiotropia.** Febra mediteraneeana familială (FMF) este o boală autosomal recesivă comună în regiunea mediteraneeană caracterizată prin febră recurentă și inflamația seroaselor. Boala este determinată de mutații ale genei pentru pirina/marenostrina. O complicație variabilă a acestei boli este asocierea amiloidozei renale ce conduce la insuficiență renală. Unele studii au aratat ca asocierea variabilă a acestei complicații este explicată, cel puțin în parte, de unele variante polimorfice la nivelul genei pentru amiloidul A seric. De asemeni, o genă modificatoare a apariției ileusului meconial în cadrul fibrozei chistice a fost localizată la nivelul cromosomului 19q13.

Deși pe de o parte fenomene precum dominanța incompletă, expresivitatea variabilă sau pleiotropia complică analiza genetică a caracterelor mendeliene, identificarea genelor modificatoare responsabile de asemenea fenomene se poate dovedi sursa unor noi metode de diagnostic, tratament și prevenție a bolilor genetice.

#### a). Caracteristici și criterii de transmitere AR

O genă recesivă își exercită efectul *numai în stare homozigotă (a/a)*, întrucât în stare heterozigotă (*N/a*) boala nu apare deoarece efectul alelei normale (*N*) este suficient pentru realizarea funcției, cu toate că alela mutantă (*a*) produce o reducere a funcției controlată de locusul respectiv. Pentru a se realiza starea homozigotă individul bolnav primește o genă mutantă de la fiecare din părinții săi. Astfel, în cazul afecțiunilor recesive, spre deosebire de cele dominante, *moștenirea se face prin ambii părinți* care, în cea mai mare parte a cazurilor, sunt sănătoși și **purtători** de genă mutantă, deci heterozigoți: *N/a + N/a*. După cum se observă din tabelul 5.7 (poziția 1) în descendența lor rezultă teoretic un raport fenotipic de 3 sănătoși la 1 bolnav; acest raport se verifică însă numai în cazul unor afecțiuni mai frecvente, puțin severe, și în familiile mari sau cumulând datele obținute de la mai multe familii<sup>38</sup>.

**Tabel 5.7. Transmiterea recesivă autosomală a unui caracter patologic.**  
Sănătoși (*N/N ; N/a*) și bolnavi (*a/a*)

Combinajii genotipice parentale	Gameți	Descendenți	
		Genotipuri	Fenotipuri
1. <i>N/a x N/a</i>	$(N + a) \times (N + a)$	$\frac{1}{4} N/N ; \frac{1}{2} N/a$ $\frac{1}{4} a/a$	$\frac{3}{4}$ sănătoși din care $\frac{2}{3}$ purtători $\frac{1}{4}$ bolnavi, indiferent de sex.
2. <i>N/a x N/N</i>	$(N + a) \times (N)$	$\frac{1}{2} N/N ; \frac{1}{2} N/a$	Toți sănătoși, $\frac{1}{2}$ purtători
3. <i>a/a x N/N</i>	$(a) \times (N)$	<i>N/a</i>	Toți sănătoși și purtători
4. <i>a/a x N/a</i>	$(a) \times (N + a)$	$\frac{1}{2} N/a ; \frac{1}{2} a/a ;$	$\frac{1}{2}$ sănătoși și purtători, $\frac{1}{2}$ bolnavi
5. <i>a/a x a/a</i>	$(a) \times (a)$	<i>a/a</i>	Toți bolnavi

Din datele prezentate mai sus se poate formula o regulă importantă a transmiterii autosomal recesive (AR): *doi părinți sănătoși, heterozigoți pentru aceeași pereche de gene alele, pot avea copii (fete și băieți) bolnavi cu o anomalie AR.* De subliniat faptul că ambele sexe sunt afectate în proporții cvasi-egale și pot transmite alela mutantă cu aceeași probabilitate (elemente logice pentru localizarea autosomală a genei).

Deoarece părinții bolnavului sunt sănătoși, în arborele genealogic (figura 5.28) se înregistrează *o discontinuitate a bolii în succesiunea generațiilor.* Bolnavul poate fi singurul membru afectat al familiei<sup>39</sup>; dacă apar și alte cazuri, ele se găsesc frecvent în aceeași fratrie, dând aspectul unei transmiteri *orizontale*.

Riscul unui cuplu de indivizi normali și heterozigoți de a avea un copil bolnav (*a/a*) este de 25% sau  $\frac{1}{4}$  la fiecare sarcină, ca eveniment independent. Ar fi greșit să credem că în familiile cu patru copii este obligatoriu ca

Sănătos (*N/a*)



<sup>38</sup> După adunarea datelor se impune o prelucrare și o corecție statistică pentru a compensa pierderea de informații determinată de fratriile ce provin din căsătorii între heterozigoți și care nu au nici un bolnav; altfel, proporția de homozigoți afectați va fi mai mare de 25%.

<sup>39</sup> Se realizează aspectul unui caz izolat/sporadic dar ar fi o greșală să considerăm că boala nu este ereditară numai pentru că nu sunt alte cazuri în familie.

		gameți		
		N	a	
Sănătos → gameți (N/a)	N	N/N	N/a	
	a	N/a	a/a	25% bolnavi

numai unul să fie afectat, sau mai rău, dacă s-au născut trei copii sănătoși al patrulea va fi bolnav. Riscul de  $\frac{1}{4}$  este valabil la fiecare sarcină; să ne imaginăm o loterie cu patru bile, trei albe și una neagră, din care la fiecare naștere s-ar extrage o bilă; înaintea nașterii următoare „bila se pune la loc” și tragerea se repetă. Uneori pot exista familii cu șansa de a avea 1-4 copii normali, alții se pot naște succesiv doi bolnavi.

În afara combinației a doi heterozigoți, alte încrucișări din care pot rezulta copii bolnavi sunt trecute în tabelul 5.7, în pozițiile 4 și 5. Ocazional, un bolnav (a/a) se poate încrucișa cu un sănătos heterozigot (N/a) și atunci 50% din descendenți ar putea fi afectați; pe arborele genealogic se înregistrează un aspect de **pseudo-dominanță**, boala fiind prezentă în două generații (figura 5.29). În sfârșit, mult mai rar, din *încrucișarea dintre doi bolnavi, homozigoți pentru aceeași mutație (a/a x a/a) vor rezulta numai descendenți bolnavi (a/a)*. Acest tip de uniune „asortativă” se observă în colectivități speciale (deficienți vizuali, surzi ș.a) și pentru boli ce nu afectează capacitatea reproductivă. De la regula enunțată mai sus fac excepție situațiile de heterogenitate genetică în care bolnavii cu afecțiuni asemănătoare clinic au mutații în gene (loci) diferite (figura 5.30); întrucât părinții bolnavi nu sunt homozigoți pentru aceeași mutație descendenții lor vor fi dublu heterozigoți și sănătoși.

În afecțiunile autosomal recesive se observă că printre părinții bolnavului există o mare proporție mai mare de căsătorii între persoane care au cel puțin un strămoș comun (consanguinitate), în special între veri primari.

În concluzie, criteriile majore pentru diagnosticul eredității recesive autosomale la om sunt următoarele:

- marea majoritate a persoanelor afectate sunt urmași ai părinților aparent sănătoși dar heterozigoți; riscul lor de a avea un copil bolnav este  $\frac{1}{4}$ , indiferent de sex;
- dacă bolnavii se căsătoresc cu persoane normale și homozigote toți copiii vor fi sănătoși; se înregistrează astfel aspectul de discontinuitate a bolii în succesiunea generațiilor sau de cazuri izolate;
- dacă un bolnav se căsătorește cu o persoană sănătoasă și heterozigotă, riscul de a avea descendenți bolnavi, fete și băieți, este de 50% (pseudo-dominanță); în acest caz, transmiterea mamă-fiică este posibilă.
- doi părinți bolnavi (homozigoți pentru aceleași gene) nu vor avea copii sănătoși.
- părinții copilului afectat sunt mai frecvent rude, comparativ cu părinții copiilor sănătoși (deci frecvența crescută a consanguinității).

În afara criteriilor enunțate mai sus, bolile AR se caracterizează prin faptul că sunt, în general, anomalii prin lipsă (hipoplazie, hipofuncție, deficit enzimatic etc), deseori mai grave decât cele AD.

#### **b). Consanguinitatea în anomaliile recesive.**

Probabilitatea ca două persoane să fie purtătoare (N/a) ale aceleiași mutații crește dacă persoanele respective sunt înrudite pentru că fiecare poate moșteni gena mutantă de la un strămoș comun; această situație este numită **consanguinitate** și se notează în arborele genealogic printr-o linie dublă.

S-a observat că frecvența consanguinității parentale în bolile AR este invers proporțională cu frecvența genei recesive: *cu cât boala este mai rară, cu atât consanguinitatea la părinți este mai frecventă*. Astfel în cazul unei afecțiuni cu o frecvență de 1:10.000 (albinismul) circa 6% dintre părinții copiilor bolnavi vor fi veri primari, față de 1% cât există în populația generală europeană. Procentul va crește la 16% dacă afecțiunea este de 10 ori mai rară (1:100.000).

Părinții înrudiți posedă un procentaj mai mare de gene identice, comparativ cu populația generală. Acest procent depinde de gradul de înrudire, fiind de 1/8 la verii primari, 1/32 la verii de gradul II ș.a.m.d (tabelul 5.8)

**Tabelul 5.8 Coeficientul de înrudire (r) și consanguinitate (F) în diferite tipuri de încrucișări între rude.**

Tip de încrucișare	Coeficient de înrudire (r)	Coeficient de consanguinitate (F)
Tată –fiică; frate – soră; gemeni dizigoți	1/2	1/4
Unchi – nepoată; demi-frate – demi-soră	1/4	1/8
Veri de gradul I; demi-unchi – demi-nepoată	1/8	1/16
Văr de gradul I – vară de gradul II; demi-veri primari	1/16	1/32
Veri de gradul II	1/32	1/64
Văr gradul II – vară gradul III	1/64	1/128
Veri de gradul III	1/128	1/256

Coeficientul de înrudire (r) este proporția de gene comune (identice) din totalul genelor persoanelor ce au un strămoș comun. Coeficientul de consanguinitate (F) este probabilitatea ca un urmaș să fie homozigot pentru gene ce provin de la părinți, cu un anumit grad de rudenie, de la un strămoș comun.  $F = r/2$ . Cei doi coeficienți se calculează prin metode speciale.

Deoarece părinții înrudiți au un număr mai mare de gene (normale sau anormale) în comun, *consanguinitatea crește riscul de întâlnire a heterozigoților* și favorizează apariția subiecților homozigoți afectați. Astfel, dacă într-o populație frecvența heterozigoților pentru o afecțiune recesivă este 1/50, probabilitatea unei persoane de a avea un copil bolnav căsătorindu-se cu o persoană neînrudită este  $1/50 \times 1/50 \times 1/4 = 1/10.000$ ; dacă s-ar căsători cu vara sa primară atunci riscul nașterii unui copil afectat este  $1/50 \times 1/8 \times 1/4 = 1/1.600$ , deci de circa șase ori mai mare.

Se apreciază că *riscul global* al unui descendent anormal din căsătoria între veri primari este totuși mic (3-5%), aproape dublu față de cel al populației generale (2-3%). Consecințele unui incest (încrucișarea dintre rude de gradul I) sunt însă mult mai dezastruoase: 1/2 - 1/4 din descendenți vor fi anormali (retardul mintal fiind pe locul întâi).

### c). Heterozigoții în anomaliile recesive.

Unul dintre cele mai importante aspecte legate de transmiterea AR îl constituie studiul și depistarea heterozigoților (*N/a*). Ei sunt fenotipic sănătoși și atunci când se căsătoresc cu un alt heterozigot sănătos au un risc de 25% de a avea un copil bolnav. Problema devine „acută” în familiile în care există un individ afectat de o boală recesivă. Probabilitatea ca o persoană să moștenescă în acest caz gena autosomală depinde de gradul înrudirii cu bolnavul (figura 5.31): cu cât este mai apropiat, cu atât riscul este mai mare. Astfel fratele/sora unui bolnav cu o afecțiune recesivă are o probabilitate de 2/3 de a fi heterozigot; aceasta se reduce la 1/3 pentru copilul lor sănătos (nepot al bolnavului)

Întrucât genele recesive se transmit *nemanifeste* din generație în generație, până ce se realizează starea homozigotă (ca și râurile subterane care atunci când afluează țâșnesc la suprafață), există riscul ca oricine să posede astfel de gene și deci să fie heterozigot. Acest risc se poate estima pe baza frecvenței afecțiunii în populație (vezi capitolul 7) și se poate calcula aproximativ după formula:

$$h = 2 \sqrt{\text{frecvența boli;}}$$

deci frecvența heterozigoților este de două ori rădăcina pătrată a frecvenței afecțiunii în populație. De exemplu, dacă fenilcetonuria are o frecvență de 1:10.000, frecvența heterozigoților este de 1/50. Prevalența heterozigoților pentru unele afecțiuni AR mai frecvente este de 1/10 pentru *hemocromatoză* (1:400); 1/25 pentru *fibroza chistică* sau *mucoviscidoză* (1:2.500); 1/30 pentru *surdimutitate* (1:3.600); 1/35 pentru *sindromul adreno-genital* (1:5.000). Se observă că în populație numărul heterozigoților este foarte mare comparativ cu cel al bolnavilor homozigoți recesivi. În aceste condiții posibilitatea întâlnirii a doi heterozigoți este mare; astfel, se estimează că în Europa de Vest 1:625 cupluri este alcătuit din heterozigoți pentru fibroza chistică. Genele recesive morbide sunt deci relativ comune și, pentru că sunt multe afecțiuni recesive este probabil că fiecare dintre noi să purtăm câteva gene anormale în stare heterozigotă.

În anumite populații frecvența bolilor recesive și deci cu atât mai mult a heterozigoților este foarte mare: *sickle mia* în Africa, *beta-talasemia* în Italia și Grecia, *hemocromatoza* și *fibroza*

*chistică/mucoviscidoza* în Europa de Vest și Nord, *nefroza congenitală* în Finlanda, *boala Tay-Sachs* la evreii Ashkenazi (originari din centrul și estul Europei). Explicațiile acestui fenomen (avantajul selectiv al heterozigoților, efectul de fondator, izolarea etnică sau religioasă etc) vor fi discutate în capitolul 7.

Așa cum am mai spus, noțiunile de dominant și recesiv sunt valabile pentru fenotip, pentru caracter, și reprezintă o simplificare a relațiilor moleculare, deoarece ambele alele ale genelor se manifestă întotdeauna la nivel molecular. Acest lucru permite *depistarea heterozigoților*, sănătoși dar purtători, pentru acele afecțiuni la care se cunoaște efectul primar al genei și la care acesta poate fi evidențiat. Ne vom referi pe larg la acest aspect important al profilaxiei bolilor genetice (în capitolul 18.4) dar acum vom reaminti exemplul sicklemiei (capitolul 4.B.1) în care heterozigoții sunt identificați, simplu, prin electroforeza hemoglobinei, care evidențiază HbA și HbS.

#### **d). Heterozigoții compuși.**

Heterogenitatea alelică este un fenomen frecvent în bolile AR: o genă poate suferi mutații alelice diferite. De exemplu, în beta-talasemie s-au identificat numeroase mutații în gena *HBB*; deseori la bolnavi cele două alele ale locilor *HBB* sunt anormale (*a/a*) dar au mutații diferite (*a1/a2*) și aceștia sunt de fapt *heterozigoți compuși* (*a1/a2*). Se pare că în cele mai multe din bolile recesive indivizii afectați sunt în fapt mai curând heterozigoți compuși decât homozigoți adevărați, exceptând evident situațiile în care părinții lor sunt înrudiți și au moștenit *aceeași mutație* de la un strămoș comun sau când în acea populație predomină o anumită mutație, ca urmare a efectului de fondator.

#### **e). Variabilitatea în bolile recesive.**

Bolile recesive prezintă deseori o penetranță completă și o variabilitate clinică redusă. Există însă și excepții: în hemocromatoza (vezi caseta 3.1) de pildă nu toți bolnavii (*a/a*) dezvoltă boala iar femeile sunt relativ protejate datorită pierderilor de fier din cursul menstruației. De asemenea în *mucoviscidoză* bolnavii pot avea o mare variabilitate a distribuției și severității manifestărilor digestive, pulmonare etc (vezi capitolul 11.E.2), explicabilă prin mutații diferite, specifice, ale genei *CFTR*; homozigoții care au mutația F508del prezintă insuficiență pancreatică dar în alte mutații funcția pancreatică este cvasi-normală, fenomenele pulmonare reduse sau se observă o absență congenitală a canalelor deferente.

Mutațiile noi sunt rare în bolile AR și, de regulă, se poate presupune că ambii părinți ai unui copil afectat sunt heterozigoți. Totuși 1% din cazurile de *atrofie musculară spinală* (SMA) tip I (boala Werdnig-Hoffman) copilul afectat moștenește o alelă de la unul din părinți care este heterozigot iar cealaltă alelă provine printr-o mutație germinală nouă de la un părinte ne-purtător; în aceste cazuri riscul de recurență este foarte mic.

Așa cum am precizat mai sus heterogenitatea alelică este frecventă în bolile AR; dar și heterogenitatea de locus se întâlnește în unele afecțiuni AR. Multe din surditățile congenitale sau formele de cecitate recesivă sunt produse de mutații în loci autosomali diferiți.

Vom menționa, în sfârșit, fenomenul de disomie uniparentală prin care un copil afectat poate moșteni ambele copii ale unui cromosom (cu alela mutantă) de la unul din părinți, dar asupra acestui fenomen, rar dar interesant, vom reveni mai târziu.

## 2.4 TRANSMITEREA LEGATĂ DE SEX

Transmiterea legată de sex se referă la ereditatea genelor situate pe cromosomii sexuali. După cum știm deja, cromosomii X și Y au morfologie, gene, roluri și distribuție diferită la cele două sexe. Prima diferență majoră este reprezentată de dimensiunea și numărul redus de gene al cromosomului Y (aproape 2/3 din Yq este reprezentat de ADN înalt repetitiv, inactiv genetic). Marea majoritate a genelor sunt implicate în determinismul sau controlul unor caractere sexuale, specific masculine, și nu au alele omologe pe X. Numai o mică parte din genele cromosomului Y, situate mai ales în regiunile pseudo-autosomale, au alele omologe<sup>40</sup> pe X și pot realiza recombinări în cursul meiozei. Cromosomul X (cu peste 1100 de gene) are gene de sexualizare dar și gene

<sup>40</sup> Genele omologe de pe X și Y pledează pentru originea filogenetică a cromosomilor sexuali dintr-o pereche de autosomi omologi.

nesexuale. O a doua diferență majoră este reprezentată de faptul că genele de pe X se vor găsi la organisme feminine (XX) în doză dublă (homozigote sau heterozigote) în timp ce la bărbați (XY) vor fi în doză unică (hemizigot). Această diferență de dozaj este compensată (aproape complet) prin inactivarea unuia din cei doi cromosomi X de la femeie.

Ținând cont de datele precizate sintetic mai sus – este logic să presupunem că există mai multe modele particulare de transmitere legată de sex:

- transmiterea caracterelor legate de Y;
- transmiterea caracterelor determinate de genele regiunilor pseudo-autosomale;
- transmiterea caracterelor legate de X, recesivă sau dominantă.

#### **a). Transmiterea legată de Y (holandrică)**

Un caracter legat de Y se transmite de la tată, prin cromosomul Y, la toți fiii săi. Se cunosc extrem de puține caractere patologice cu acest mod de transmitere (de exemplu, o formă de *retinită pigmentară* care se transmite de la tată exclusiv la băieți; OMIM 400004). Mutațiile genelor implicate în determinismul și diferențierea sexuală (dintre care cel mai bine cunoscute sunt mutațiile genei *SRY*) produc o inversiune sexuală și/sau sterilitate. În schimb alelele polimorfice ale ADN din cromosomul Y se transmit după modul *holandric* precizat mai sus.

#### **b). Transmiterea caracterelor determinate de gene din regiunile pseudo-autosomale X și Y.**

Pentru a recunoaște un caracter determinat de o genă din această regiune, trebuie studiată ascendența și descendența subiecților de sex masculin. Cei care au moștenit caracterul de la tatăl lor, prin intermediul cromosomului Y, îl vor transmite mai frecvent la fiii lor, în timp ce cei care l-au primit de la mama lor; prin intermediul cromosomului X, îl vor transmite preferențial fetelor lor. Acest mod de ereditate a fost numită *ereditate parțial legată de sex*.

Până în prezent se cunoaște un singur exemplu: *discondrosteoza Leri-Weil*, o displazie scheletică cu statură mică disproporționată și deformarea antebrațului, produsă de mutația genei *SHOX*, genă pseudoautosomală care nu este inactivată, ce codifică un factor de transcripție implicat în reglarea creșterii. În arborele genealogic (figura 5.32) frecvența crescută a bolii la femeile sugerează o transmitere dominantă legată de X dar prezența unei transmiteri tată (II3) → fiu (III-5) exclude o ereditate legată strict de X.

#### **c). Transmiterea legată de X**

Pe cromosomul X au fost localizate peste 1100 de gene din care circa 50% se asociază cu fenotipuri anormale. Ele au o distribuție diferită la cele două sexe și un mod de transmitere particular, ușor de identificat. Luând în discuție o genă mutantă situată pe X sunt posibile cinci genotipuri:  $X^N Y$  și  $X^a Y$  - la bărbat,  $X^N X^N$ ,  $X^N X^a$  și  $X^a X^a$  - la femeie. Mutația genei se exprimă la bărbat (hemizigot) indiferent dacă manifestarea ei fenotipică este dominantă sau recesivă. La femeile heterozigote  $X^N X^a$ , datorită fenomenului de inactivare întâmplătoare a cromosomului X, alela mutantă se exprimă în 50% din celule indiferent dacă mutația produce un fenotip recesiv (cel mai frecvent) sau dominant (rar); deci distincția fenotipică între transmiterea dominantă și recesivă se estompează (prin „*hemizigoție funcțională*”) și este arbitrară, condiționată de proporția femeilor heterozigote care manifestă boala și severitatea ei. În plus, unele mutații legate de X se pot asocia cu inactivarea preferențială a cromosomului  $X^a$  la femeie, fenomen care poate atenua consecințele fenotipice. De aceea mulți geneticieni nu mai clasifică bolile legate de X în recesive legate de X (RLX) și dominante legate de X (DLX). Considerăm însă că această împărțire este utilă deoarece fenotipurile dominante se exprimă constant la heterozigote în timp ce, în mod obișnuit, fenotipurile recesive nu se manifestă.

### 2.5. TRANSMITEREA RECESIVĂ LEGATĂ DE X

Dintre bolile RLX cele mai cunoscute sunt hemofilia, distrofia musculară Duchenne, cecitatea pentru culori, deficiența în G6PD ș.a.

O mutație RLX se manifestă fenotipic la bărbații hemizigoți  $X^a Y$  (frecvent) și la femeile homozigote  $X^a X^a$  (foarte rar); femeile sănătoase pot fi  $X^N X^N$  sau  $X^N X^a$  (purtătoare de genă mutantă sau conductoare). Cu cele cinci genotipuri sunt posibile următoarele combinații (tabelul 5.9) dar în funcție de boală, în practică, se întâlnesc numai o parte dintre acestea:

**Tabel 5.9. Transmiterea recesivă legată de X a unui caracter patologic.**

Sănătoși ( $X^N Y$ ,  $X^N X^N$ ,  $X^N X^a$ ) și bolnavi ( $X^a Y$ ,  $X^a X^a$ )

Combi-nații genotipice parentale	Gameți	Descendenți	
		Genotipuri	Fenotipuri
1. $X^N Y \times X^N X^N$	$(X^N + Y) \times (X^N + X^N)$	$\frac{1}{4} X^a Y$ ; $\frac{1}{4} X^N Y$ , $\frac{1}{4} X^a X^N$ ; $\frac{1}{4} X^N X^N$	Un sfert din copii vor fi bolnavi (aceștia sunt $\frac{1}{2}$ băieți), toate fetele vor fi sănătoase ( $\frac{1}{2}$ purtătoare)
2. $X^a Y \times X^N X^N$	$(X^a + Y) \times (X^N + X^N)$	$X^N Y$ ; $X^a X^N$	Toți copii vor fi sănătoși dar toate fetele vor fi purtătoare
3. $X^a Y \times X^a X^N$	$(X^a + Y) \times (X^a + X^N)$	$\frac{1}{4} X^a Y$ ; $\frac{1}{4} X^N Y$ , $\frac{1}{4} X^a X^a$ ; $\frac{1}{4} X^a X^N$	$\frac{1}{2}$ băieți sunt bolnavi $\frac{1}{2}$ fete sunt bolnave, $\frac{1}{2}$ fete sunt purtătoare
4. $X^N Y \times X^a X^a$	$(X^N + Y) \times (X^a + X^a)$	$X^a Y$ ; $X^N X^a$	Toți băieții bolnavi, toate fetele purtătoare
5. $X^a Y \times X^a X^a$	$(X^a + Y) \times (X^a + X^a)$	$X^a Y$ ; $X^a X^a$	Toți copiii (băieți și fete) bolnavi
6. $X^N Y \times X^N X^N$	$(X^N + Y) \times (X^N + X^N)$	$X^N Y$ ; $X^N X^N$	Toți copiii sănătoși

**a). Criteriile transmiterii recesive legate de X.** În bolile RLX, de obicei, *bolnavi sunt numai bărbații*, care au primit gena mutantă de la femeii sănătoase dar purtătoare (combi-nația 1, tabel 5.9). Deci, *din părinți sănătoși rezultă copii bolnavi (1/4)*, dar aceștia vor fi *numai băieți (1/2)*, care au primit gena anormală de la mamă; fetele vor fi sănătoase ( $\frac{1}{2}$  purtătoare). În arborele genealogic (figura 5.33) se înregistrează o *transmitere oblică, în diagonală, și discontinuă*, de la un bărbat bolnav (bunic, străbunic), prin femeii sănătoase dar purtătoare, la un băiat bolnav.

Dacă bolnavii au capacitate de reproducere (de exemplu, în hemofilie) și se căsătoresc cu o femeie sănătoasă și heterozigotă (combi-nația 2) *nu pot transmite boala băieților* (transmiterea tată → fiu nu este deci posibilă) sau prin băieți la generațiile următoare. În schimb toate fetele vor fi obligatoriu heterozigote, purtătoare.

În cazul unor mutații frecvente și puțin severe ale unor gene de pe X, cum ar fi deficiența în G6PD (în populația Afro-Americană 10% din bărbați au deficiență de G6PD iar 18% din femeii sunt heterozigote) sau daltonismul (8% din bărbați și 1:150 din femeii) este posibil ca bolnavii ( $X^a Y$ ) să se căsătorească cu o femeie heterozigotă (combi-nația 3, tabel 5.9)<sup>41</sup>; în descendența acestui cuplu pot apărea băieți bolnavi (1/2) dar și fete bolnave (1/2). În arborele genealogic (figura 5.34) se observă transmiterea tată → fiu dar alela mutantă a băieților provine...de la mamă. În aceleași afecțiuni sunt uneori posibile și combinațiile 4 și 5 din tabelul 5.9. Se observă faptul că o femeie bolnavă va transmite boala la toți băieții (situație caracteristică transmiterii RLX) iar din doi părinți bolnavi rezultă numai copii bolnavi (situație sugestivă pentru transmiterea recesivă, în general).

În concluzie, criteriile majore pentru transmiterea RLX sunt următoarele:

- bolnavii sunt aproape exclusiv bărbați; ei nu transmit niciodată boala;
- femeile heterozigote sunt de obicei neafectate și pot avea băieți bolnavi, indiferent de tipul de căsătorie.
- gena mutantă se transmite de la bărbați afectați → la femeii sănătoase și purtătoare → și de la acestea la  $\frac{1}{2}$  băieți; deci există o discontinuitate în succesiunea generațiilor, doi părinți sănătoși (mama heterozigotă) putând avea copii bolnavi, dar numai băieți
- nu este posibilă niciodată transmiterea tată → fiu (deoarece tatăl îi dă fiului cromosomul Y). (când se observă o astfel de situație va trebui să ne gândim la o boală AD limitată la sexul masculin; de exemplu, scleroza glomerulară focală, din figura 5.35)

### b). Mutații noi

Multe boli RLX sunt severe și nu permit supraviețuirea până la vârsta reproducerii. Distrofia musculară Duchenne (DMD) este exemplul cel mai elocvent. Alelele mutante se pierd astfel din populație odată cu bolnavul; și totuși prevalența bolii nu se modifică deoarece alte cazuri apar prin mutații noi, din femeii sănătoase și cert nepurtătoare. În DMD circa 1/3 din cazuri apar din cupluri de părinți sănătoși, în care femeia nu este heterozigotă; în hemofilie selecția este doar parțială și numărul de mutații noi este mult mai mic.

<sup>41</sup> Combi-nația  $X^a Y + X^a X^N$  este posibilă, cu o probabilitate de 1:5.000, și în cazul hemofiliei dar se pare că hemofilia în stare heterozigotă este letală la femeii.

### c). Femei afectate de boli recesive legate de X

Bolile recesive legate de X se manifestă aproape exclusiv la sexul masculin. Prezența certă a unei astfel de boli la o persoană de sex feminin are multiple explicații.

- Încrucișarea între un bolnav și o femeie purtătoare (combinația 3, tabel 5.9)(figura 5.33); așa cum am spus această eventualitate, rară, se întâlnește mai ales în bolile RLX frecvente în anumite populații și care sunt mai puțin severe.
- Inactivarea „neechilibrată” a cromosomului X la femeile heterozigote  $X^a/X^N$ , care face ca o porție mai mare de celule să aibă activ  $X^a$ .
- Inactivarea „preferențială” a unui cromosom X anormal structural (isocromosom X sau translocatie X-autosom); acest tip de inactivare reflectă mai probabil o selecție în favoarea celulelor care au  $X^N$  activ și deci nu există în realitate.
- Femei hemizigote pentru X datorită unei monosomii 45,X (sindromul Turner).
- Femei 46,XY în cadrul unor stări intersexuale (vezi capitolul 14.C).
- Mutație nouă (pe cromosomul  $X^N$ ) la femeie purtătoare  $X^a/X^N$ .
- Heterogenitate genetică.

### d). Riscul genetic. Depistarea heterozigotelor pentru gene RLX

Riscul de recurență al bolilor recesive legate de X depinde de genotipul părinților și sexul descendenților. Se poate calcula din tabelul 5.7 dar problema esențială este de a ști dacă o femeie sănătoasă din familia/fratria unui bolnav este sau nu purtătoare. Acest lucru (frecvent în practică pentru distrofia musculară Duchenne) se poate face, pornind de la anamneza familială, pe baza faptului că femeile heterozigote sunt, datorită inactivării unuia din cromosomii X, un mozaic funcțional, cu celule în care este activ  $X^N$  și celule în care este activ  $X^a$  și efectul primar sau secundar al genei mutante se poate identifica la nivel biochimic sau celular. O altă modalitate este analiza directă sau indirectă la nivelul ADN.

## 2.6. TRANSMITEREA DOMINATĂ LEGATĂ DE X.

Bolile DLX sunt mult mai puține decât cele RLX și, cu excepția particulară a sindromului X fragil, ele sunt foarte rare. Exemplul cel mai cunoscut este rahitismul hipofosfatemic (rezistent la vitamina D) în care se produce o eliminare crescută a fosfaților în urină (datorită unei tulburări de reabsorbție renală), statură mică și deformări osoase. Alte afecțiuni DLX sunt: condrodizplazia punctată, incontinența pigmenti, sindromul Goltz, sindromul Rett (despre care se pot obține detalii prin accesarea OMIM)

Așa cum am precizat, o boală legată de X este considerată dominantă dacă se exprimă *regulat* la femeile heterozigote ( $X^A X^n$ ). La bărbați nu se pune problema diferențierii între un caracter dominant sau recesiv legat de X deoarece ei sunt hemizigoți. Bărbații bolnavi ( $X^A Y$ ) vor prezenta însă forme mai grave de boală deoarece la femeile afectate, în marea lor majoritate heterozigote ( $X^A X^n$ ), inactivarea întâmplătoare face ca 50% din celule să aibe cromosomul  $X^n$  activ, fapt ce determină un fenotip mai puțin sever. În unele boli (de exemplu, incontinența pigmenti<sup>42</sup> tipul 2, sindromul Rett) manifestarea este aproape exclusivă la sexul feminin, deoarece boala este letală la feții  $X^A Y$ .

**Tabel 5.10. Transmiterea dominantă legată de X a unui caracter patologic.**

Sănătoși ( $X^n Y, X^n X^n$ ) și bolnavi ( $X^A Y, X^A X^n, X^A X^A$ )

Combinatii genotipice parentale	Gameți	Descendenți	
		Genotipuri	Fenotipuri
1. $X^n Y \times X^A X^n$	$(X^n + Y) \times (X^A + X^n)$	$X^A X^n, X^n X^n$ $X^A Y, X^n Y$	½ fete bonave și ½ fete sănătoase ½ băieți bolnavi și ½ sănătoși
2. $X^A Y \times X^n X^n$	$(X^A + Y) \times (X^n)$	$X^A X^n,$ $X^n Y$	Toate fetele bolnave, Toți băieții sănătoși
3. $X^A Y \times X^A X^n$	$(X^A + Y) \times (X^A + X^n)$	$X^A X^A, X^A X^n$ $X^A Y, X^n Y$	Toate fetele și ½ băieți bolnavi 1/2 băieți sănătoși

<sup>42</sup> Pacientele cu incontinența pigmenti tipul 2 prezintă hiperpigmentări cutanate striate, în vârtejuri, absența dinților, căderea părului și uneori tulburări neurologice sau microcefalie cu retard mental; supraviețuirea bolnavelor se corelează cu inactivarea preferențială a  $X^A$  în marea majoritate a celulelor.

4. $X^nY \times X^AX^A$	$(X^n + Y) \times (X^A)$	$X^AX^n, X^AY$	Toți copiii (băieți și fete) bolnavi
5. $X^AY \times X^AX^A$	$(X^A + Y) \times (X^A)$	$X^AX^A, X^AY$	Toți copiii (băieți și fete) bolnavi
6. $X^nY \times X^nX^n$	$(X^n + Y) \times (X^n)$	$X^nY ; X^nX^n$	Toți copiii sănătoși

Modelul de transmitere în bolile DLX nu diferă esențial de transmiterea AD deoarece femeile au o pereche de cromosomi X ca ori ce altă pereche de autosomi; apar, evident, o serie de particularități determinate de localizarea genei pe cromosomul X (tabelul 5.10)(figura 5.36). Vom regăsi deci *continuitatea* bolii în succesiunea generațiilor, determinată de faptul că orice bolnav are (cel puțin) un părinte bolnav. Fiecare copil al unei femei afectate și heterozigote ( $X^AX^n$ ) are un risc de 50% de a fi bolnav, indiferent de sex (combinația 1 din tabelul 5.10). *Părinții sănătoși vor avea copii sănătoși* (combinația 6). Ceea ce este însă caracteristic transmiterii DLX este faptul că *bărbații bolnavi ( $X^AY$ ) vor avea toate fetele afectate și toți băieții sănătoși* (combinația 2; transmiterea tată → fiu este imposibilă) iar în situația, mai mult teoretică, a doi bolnavi (femeia heterozigotă) (combinația 3) pot rezulta copii sănătoși, dar *numai băieți*. Aceste caracteristici determină o frecvență generală a femeilor bolnave de două ori mai mare ca a bărbaților bolnavi.

### 3. ERIDATEA MONOGENICĂ NON - MENDELIANĂ

Transmiterea caracterelor monogenice, prin modelele sale și raporturile de segregare ale genelor alele este, în general, concordantă cu principiile eredității mendeliene. Au fost, totuși, semnalate o serie de excepții care sunt determinate de mecanisme neobișnuite: mutații instabile, disomie uniparentală, amprentare genomică, mozaicism sau ereditate mitocondrială. Ele sunt discutate în detalii și în alte capitole, dar pentru o viziune unitară a problemei vom face și aici unele referiri, redundanța fiind, în opinia noastră, benefică.

#### 3.1. MUTAȚIILE INSTABILE sau DINAMICE

Se consideră, în general, că alelele mutante ce produc boli monogenice mendeliene se transmit *nemodificate* de la părinți la copii. În anul 1991 au fost descoperite mutațiile prin expansiunea unor repetiții trinucleotidice instabile (vezi capitolul 6.B.1.4) care reprezintă un mecanism genetic nou pentru un grup important de boli (vezi capitolul 11.D).

Au fost identificate mai multe gene ce conțin regiuni cu repetiții trinucleotidice (de exemplu, CGG în *sindromul X fragil*, CTG în *distrofia miotonică* sau CAG în *boala Huntington*). În populația generală, numărul de repetiții variază de la o persoană la alta; când numărul lor depășește o anumită limită, regiunea în care se găsesc devine *instabilă* și are tendința să *crească* în mărime (*premutație*), atunci când este transmisă la descendenți. Expansiunea neobișnuită a repetițiilor transformă premutația în *mutație completă* și produce apariția manifestărilor clinice ale bolii. Deoarece vârsta de debut și severitatea bolii sunt direct proporționale cu mărimea expansiunii, acest fenomen explică fenomenul de *anticipație clinică* observat în acest grup de boli, unde în aceeași familie vârsta debutului clinic scade în generații succesive. În unele afecțiuni, *gravitatea bolii depinde de sexul părintelui* ce transmite gena mutantă; astfel transmiterea maternă pentru distrofia miotonică și sindromul X fragil sau paternă pentru boala Huntington - produc forme mai severe de boală.

#### 3.2. DISOMIA UNIPARENTALĂ

Un alt mecanism neobișnuit implicat în producerea bolilor genetice este disomia uniparentală (DUP), în care ambele copii ale unui anumit cromosom provin numai de la unul din părinți. De obicei DUP se produce prin pierderea unui cromosom de către un zigot care a fost inițial trisomic. În funcție de originea trisomiei (nedisjunție în mieoza I sau în mieoza II) (vezi figura 5.20)și cromosomul pierdut există trei posibilități:

- zigot disomic normal, cu câte un cromosom de la fiecare din părinți;
- zigot cu DUP și doi cromosomi identici de la un părinte (isodisomie);
- zigot cu DUP și doi cromosomi diferiți de la un părinte (heterodisomie).



DUP nu are consecințe clinice prin ea însăși ci prin faptul că isodisomia poate realiza o stare de *homozigoție a unei gene recesive* ce există sub formă heterozigotă numai la unul din părinți. S-au descris cazuri de fibroză chistică în care ambele gene mutante provin de la două copii identice ale cromosomului 7 matern. De asemenea, au fost semnalate cazuri de hemofilie A în care ambii cromosomi X și Y ai unui băiat bolnav provin de la tatăl afectat sau boala se manifestă la o fată homozigotă (prin isodisomia X<sup>a</sup>) născută din părinți X<sup>a</sup>X<sup>N</sup> și X<sup>N</sup>Y.

DUP poate avea efecte patologice atunci când cromosomul implicat conține una sau mai multe *gene amprentate*. De exemplu, în **sindromul Beckwith-Wiedemann** (OMIM 130650) - caracterizat prin gigantism, macroglosie, omfalocel și predispoziție pentru dezvoltarea unor tumori - boala este asociată cu *expresia bialelică* (prin isodisomie) a genei pentru *factorul de creștere similar insulinei tip 2* (IGF2), genă situată pe cromosomul 11p15.5 și exprimată în mod normal<sup>43</sup> numai de pe cromosomul patern (bolnavul are ambii cromosomi 11 de la tată).

### 3.3. AMPRENTAREA PARENTALĂ (GENOMICĂ).

În transmiterea mendeliană se pleacă de la premiza că acțiunea genei este independentă de originea sa maternă sau paternă; când se formează un zigot, genele “par a uita” originea lor parentală. În mod obișnuit o alelă mutantă a unei gene autosomale este transmisă cu o *probabilitate egală* de la unul din părinți, indiferent de sex, la un copil de un sex sau altul. Există însă situații rare în care expresia unei gene mutante și deci a bolii este *diferită în funcție de originea ei*, maternă sau paternă. Această diferență de expresie între alela moștenită de la tată și alela moștenită de la mamă este produsă prin **amprentare parentală** sau **genomică** (vezi capitolul 4.D.1.2). Amprentarea este o formă de inactivare a genei ce produce o expresie monoalelică dar *nu este o mutație*, deoarece este reversibilă.

Amprentarea se produce în gametogeneză, înainte de fecundare, marcând originea maternă sau paternă a a anumitor gene. După concepție expresia genei amprentate este suprimată în anumite țesuturi și se menține ca atare toată viața; excepție fac celulele germinale în care se produce o conversie a amprentării funcție de sex: la bărbat, alelele moștenite de la mamă, cu amprentare maternă, vor fi convertite în gametogeneză și vor fi trecute descendenților cu amprentare paternă.

Amprentarea este un mecanism normal de reglarea genică care nu produce, prin el însăși, o boală ereditară dar poate explica penetranța incompletă sau expresivitatea variabilă a unei afecțiuni monogenice.

De exemplu, tumora de glomus carotidian, transmisă AD, la care subiecții purtători de genă mutantă sunt bolnavi sau sănătoși după cum ei au primit gena de la tată sau de la mamă; deci gena mutantă este *activă* dacă o transmite tatăl sau *inactivă* dacă provine de la mamă.

Amprentarea genomică implică numai un număr mic de gene. Sunt cunoscute mai multe regiuni cromosomice (care conțin peste 40 de gene amprentate) situate pe: *7q matern, 11p patern, 14q matern, 15q matern, 15q patern, etc.* În ciuda numărului relativ mic de gene amprentate, tulburarea modului corect de expresie monoalelică (datorată UPD, deleției cromosomice / genice sau pierderii amprentării) s-a dovedit a avea consecințe serioase în dezvoltarea embrionară, boli genetice și cancer. Cel mai amplu exemplu studiat (vezi capitolul 4.D.1.2) îl reprezintă sindroamele Prader-Willi (SPW) și Angelman (SA) produse, în mod obișnuit (dar nu exclusiv ; vezi tabelul 5.11), de aceeași deleție a cromosomului 15q11-13, dar pe cromosomul de origine paternă (SPW) sau maternă (SA).

**Tabel 5.11. Fenotipurile și cauzele sindroamelor Prader-Willi și Angelman**

	<b>Sindromul Prader - Willi</b>	<b>Sindromul Angelman</b>
Fenotip	Hipotonie neonatală severă, dismorfie facială caracteristică, mâini și picioare mici, talie mică, obezitate cu debut în copilărie, retard mintal, tulburări de comportament	Dismorfie facială caracteristică, talie mică, microcefalie, retard mintal sever, spasticitate și convulsii, lipsa vorbirii și crize de râs.
Deleție 15q11-13	~ 70% cazuri cu deleție pe cromosomul patern	~ 70% cazuri cu deleție pe cromosomul matern
Disomie uniparentală	~ 30% cazuri (maternă)	~ 3-5 % cazuri (paternă)

<sup>43</sup> Alela maternă este represată , prin metilare

Gene incriminate	<i>SNRPN și nedina</i> , ambele cu expresie de pe cromosomul patern.	<i>UBE3A</i> care este exprimată exclusiv matern, la nivel cerebral.
Mutație genică	Neidentificată	7-9 % cazuri
Mutație în centrul de amprentare	1-2 % cazuri	7-9 % cazuri
Alte cauze	Neidentificate	10-20 % cazuri

### 3.4. MOZAICISMUL

Mozaicismul este definit ca prezența la un individ a cel puțin două linii celulare diferite genetic dar derivate dintr-un singur zigot (prin aceasta se deosebește de himeră, formată prin unirea a doi zigoți ce vor forma un singur embrion; vezi 5.C.3).

Mozaicismul prezintă următoarele caracteristici:

- poate implica un cromosom întreg (aneuploidie) sau o singură genă (mutație);
- este un *eveniment postzigotic* care se produce într-o singură celulă;
- o dată ce modificarea genetică a fost generată și nu este letală, ea va fi transmisă celulelor fiice, formându-se o *clonă* celulară anormală;
- procesul se poate produce în perioade diferite ale dezvoltării ontogenetice: în stadiul embrionar, în viața fetală sau postnatal; *momentul de producere* va determina *proporția* relativă a celor două clone și prin aceasta *severitatea* modificărilor fenotipice cauzată de clona anormală.

Nu vom discuta mozaicismul cromosomic, produs de o eroare postzigotică în mitoză (vezi 4.B.2.3) și nici nu vom mai insista asupra mozaicismului funcțional care se întâlnește la femei, prin inactivarea unuia din cei doi cromosomi X. Ne vom referi doar la mutațiile genice produse în celulele somatice, care pot produce un *fenotip segmental* sau neuniform (în „pete”). **Mozaicismul somatic** este o cauză majoră a multor forme de cancer (vezi capitolul 17) dar a fost semnalat și în unele boli monogenice „clasice”, ca de exemplu neurofibromatoza 1 *segmentală* (ce afectează numai o parte a corpului iar părinții pacientului sunt normali) în unele boli legate de X (hemofilia A, distrofia musculară Duchenne, deficiența în ornitin transcarbamilază) sau în unele tulburări de morfogeneză.

Există și un **mozaicism germinal** sau **gonadic** care explică transmiterea unei boli genetice la mai mulți copii de către părinți normali. Mutația se produce în perioada precoce a dezvoltării embrionare (este deci o mutație somatică) în celulele precursorale ale gameților, care efectuează un număr de diviziuni mitotice (câteva sute la embrionul masculin), ceea ce face ca o anumită proporție de gameți să posede mutația. Mozaicismul germinal a fost documentat în circa 6% din formele letale de osteogenesis imperfecta (figura 5.37), la 15% din mamele (nepurtătoare !) copiilor cu distrofie musculară Duchenne sau în unele cazuri de hemofilie A. Posibilitatea mutațiilor germinale face dificilă excluderea completă a riscului de recurență în boli recesive legate de X, la care testele de identificare a stării de purtător la mamă sunt normale, sau în bolile autosomal dominante în care părinții sunt clinic și genetic neafecți dar din fericire acest risc este mic (3-4%).

### 3.5. TRANSMITEREA PE LINIE MATERNĂ

În capitolul 2.C.3 am prezentat structura ADN mitocondrial și am precizat că acesta poate suferi mutații producând o serie de boli degenerative, care sunt *transmise într-un mod specific, de la mamă la toți descendenții; bărbații bolnavi nu transmit boala*. Explicația acestui mod particular de transmitere, pe linie maternă, este reprezentată de faptul că numai ovulul va furniza zigotului citoplasmă și mitocondrii. Bolile produse de mutații în ADNmt vor fi prezentate în capitolul 12.

## **E. EREDITATEA POLIGENICĂ ȘI MULTIFACTORIALĂ**

Numeroase caractere normale și anormale (calitative sau cantitative) sunt prezente la mai mulți indivizi dintr-o familie, desi nu sunt determinate monogenic (tabelul 5.12). Această *agregare familială* poate fi explicată prin faptul că membrii aceleiași familii au un număr mai mare de gene în comun. Dar aceasta nu este singura explicație a unor trăsături comune într-o familie. Nu trebuie

uitat că membrii unei familii trăiesc în aceleași condiții de mediu socio-economic și cultural și nici posibilitatea ca, uneori, o aceeași boală să apară din întâmplare la mai multe persoane din aceeași familie. Totuși, majoritatea caracterelor familiale non-mendeliene sunt determinate de acțiunea combinată a unor factori genetici, reprezentați de mai multe gene nealele (poligenie), și a unor factori de mediu. Deci, *ereditatea lor este complexă, multifactorială*.

O caracteristică primară a bolilor multifactoriale este aceea că indivizii afectați tind să se grupeze în familii (agregare familială). Specialiștii în epidemiologie genetică trebuie să stabilească dacă o agregare familială observată în anumite boli este determinată de factori genetici, să evalueze contribuția lor și în final să identifice locii și alelele implicate în aceste boli multifactoriale.

**Tabelul 5.12. Caractere multifactoriale normale și anormale**

Caractere normale	Caractere anormale
- culoarea pielii și a părului	- despicătura labio-palatină
- culoarea ochilor	- defectele de tub neural
- înălțimea	- malformațiile congenitale de cord
- dermatoglifele	- luxația congenitală de șold
- coeficientul de inteligență	- schizofrenia
- habitusul	- boala coronariană
- fizionomia feței	- diabetul zaharat
- personalitatea individului	- cancerul de sân, cancerul de colon, etc

#### 4.1. STABILIREA NATURII GENETICE A UNUI CHARACTER FAMILIAL NON-MENDELIAN

Stabilirea naturii genetice a unui caracter familial non-mendelian, care ar putea fi un caracter multifactorial, se realizează prin trei metode esențiale: determinarea și măsurarea agregării familiale, studiul gemenilor și studiile de adopție.

##### a). Măsurarea agregării familiale

Cea mai directă metodă pentru evidențierea unui determinism genetic este să stabilim că un anumit *caracter calitativ/boală* este familial, se manifestă la mai mulți membri din familie. Când doi indivizi dintr-o familie au aceeași boală ei se numesc **concordanți** pentru boala respectivă. Când, într-o pereche de indivizi înrudiți, numai unul este afectat și celălalt nu, ei se numesc **discordanți** pentru boala dată. *Gradul de agregare familială* poate fi măsurat prin compararea frecvenței caracterului / bolii la rudele unei persoane afectate (proband) cu frecvența în populația generală. **Rata riscului relativ** ( $\lambda_r$ ) este definită prin raportul dintre prevalența bolii la rudele unei persoane afectate ( $r$ ) și prevalența bolii în populația generală.

$$\lambda_r = \frac{\text{Prevalența bolii la rudele unei persoane afectate "r"}}{\text{Prevalența bolii în populația generală}}$$

Valoarea lui  $\lambda_r$  exprimă nivelul agregării familiale în funcție de riscul recurenței bolii în familie și de prevalența ei în populația generală<sup>44</sup>. Cu cât  $\lambda_r$  este mai mare cu atât agregarea familială este mai pronunțată (tabelul 5.13). O rată  $\lambda_r = 1$  indică faptul că persoana înrudită nu are un risc mai mare decât orice individ din populația generală de a dezvolta boala. Rata riscului relativ se poate măsura pentru diferite clase de înrudire; de exemplu, pentru gemeni MZ, rude de gradul I ( $\lambda_f$  pentru fratrie) etc.

**Tabelul 5.13. Rata de risc relativ ( $\lambda_r$ ) pentru rudele probanzilor cu unele boli familiale și ereditate multifactorială.**

(adaptat după Nussbaum et al, 2001)

Boala	Gradul de înrudire	$\lambda_r$
Autism	Gemeni monoziagoți	2000
	Frați	150

<sup>44</sup> Utilizarea acestui parametru – prevalența în populație – este importantă deoarece o boală frecventă în populație are șanse mai mari să apară prin coincidență la mai mulți membri din familie

Diabet zaharat tip I	Gemeni monoziagoți	80
	Frați	12
Psihoza maniaco-depresivă	Gemeni monoziagoți	60
	Frați	7
Schizofrenia	Gemeni monoziagoți	48
	Frați	12

Este firesc ca incidența unei boli multifactoriale și  $\lambda_r$  să fie concordante cu gradul de rudenie (tabelul 5.14). Dacă există o predipoziție genetică la o boală este firesc ca  $\lambda_r$  să fie mai mare la gemenii monoziagoți (MZ) – cu aceeași ereditate – și apoi să scadă la rudele de gradul I (cu  $\frac{1}{2}$  gene în comun) și, mai mult, la rudele de gradul II (cu  $\frac{1}{4}$  gene în comun).

**Tabelul 5.14. Riscul familial în schizofrenie (modificat după Strachan și Read, 1999)**

Grad de rudenie	Incidență	$\lambda_r$
Copii	12,31 %	15,4
Fratie	8,51 %	10,6
Nepoți, nepoate	2,81 %	3,5
Veri primari	2,91 %	3,6
Unchi, mătușe	2,01 %	2,5

O altă metodă de evaluare a agregării familiale este reprezentată de **studiile caz-control**. În care pacienții cu boală (*cazurile*) sunt comparați (istoric familial, expuneri la factori de mediu, ocupație, poziție geografică, paritate etc) cu indivizi fără boală (*control*) (de exemplu soțiile, ce trăiesc în același mediu). Pentru a determina o posibilă contribuție genetică la agregarea familială a bolii, se compară frecvența bolii în familia cazului cu frecvența ei la rudele lotului control. Studiile caz-control sunt dificile și pasibile la erori de recenzare, alegerea loturilor etc.

În cazul *caracterelor cantitative* ele nu mai pot fi clasificate în „prezente sau absente” ci vor trebui măsurate. În consecință nu se mai poate compara prevalența bolii la rude versus control ci se măsoară *coeficientul de corelație*, adică tendința ca o anumită valoare a măsurătorii paramerului analizat să fie asemănătoare în loturile evaluate

#### **b). Studiile gemenilor**

Pentru evaluarea rolului eredității și mediului la om, gemenii sunt subiecți ideali, adevărate “experimente naturale” (Fr. Crick sugera, cu ironie, că fiecare pereche de gemeni ar trebui...donată științei pentru studiu). Gemenii dizigoți (DZ) permit măsurarea concordanței bolilor la doi indivizi înrudiți care cresc și trăiesc în același mediu dar care sunt diferiți din punct de vedere genetic, proporția de gene comune fiind de 50%. Gemenii monoziagoți (MZ) au genotip identic și pot crește și trăi împreună sau nu. Dacă vor trăi în condiții de mediu diferite acestea vor fi responsabile de diferențele în apariția bolilor în cursul vieții lor.

**Gemenii monoziagoți** provin prin clivajul timpuriu în embriogeneză (în primele 14 zile după concepție<sup>45</sup>) al unui singur zigot. Ei vor avea întotdeauna același sex și vor fi identici din punct de vedere genetic exceptând posibilele mutații somatice post-zigotice (mai frecvent în dezvoltarea celulelor sistemului imun), numărul moleculelor de ADN mitocondrial sau modelul de inactivare a cromosomului X (dacă sunt de sex feminin).

**Gemenii dizigoți** se dezvoltă din două ovule diferite, fiecare dintre ele fertilizate de către un spermatozoid; au același sex sau sexe diferite (în proporții egale) și, din punct de vedere genetic, sunt diferiți sau tot atât de asemănători ca frații obișnuiți, având numai jumătate din alelele lor identice (se mai numesc și gemeni fraterni). Frecvența nașterilor gemelare variază între 0,5 – 2 %. În general se apreciază că 1/3 din toți gemenii sunt MZ iar 2/3 sunt DZ din care 1/2 sunt de același sex, 1/2 sunt de sex diferit.

**Diagnosticul gemelării**, necesar pentru gemenii de același sex, necesită evaluarea atentă a multor caracteristici: aspectul placentei, numărul membranelor amniotice și corionice; morfologia corpului, dermatoglifele; markerii serologici și, cel mai sigur, markerii ADN polimorfici. Toți gemenii dizigoți au doi saci amniotici și doi saci corionici (ei pot fuziona secundar dar circulația fiecărei părți a placentei rămâne separată). Natura membranelor fetale la gemenii MZ depinde de momentul separării. La 75% din MZ există

<sup>45</sup> . O diviziune apărută foarte târziu, după a 14-a zi de la concepție poate da naștere la gemeni uniți (care apar cu o frecvență de 1/50000 de sarcini) cum sunt *siamezii*...numiți astfel în memoria celebrilor Chang și Eng, născuți în 1811 în Thailanda (*Siam*) și uniți prin abdomenul comun.

un singur amnios și un singur corion; restul de 25% au două membrane corionice și nu pot fi deosebiți în acest caz de gemenii DZ. Diagnosticul de gemelitate este pus de baza unor markeri serologici și ADN identici.

**Studiile gemenilor** sunt adesea folosite pentru a distinge trăsăturile multifactoriale de cele monogenice sau de cele cauzate de factori negenetici:

- Deoarece gemenii monoziigoți au toate genele lor comune, ei vor fi 100% concordanți pentru transmiterea tuturor bolilor monogenice. Gemenii dizigoți vor avea o concordanță de 50% pentru trăsăturile dominante monogenice și de 25% pentru cele recesive.
- O concordanță *sub 100%* la gemenii MZ este o dovadă clară că *factori negenetici au un rol în producerea bolii* și că avem de a face mai degrabă cu o trăsătură multifactorială.
- Concordanța trăsăturilor multifactoriale este diferită după tipul de gemelitate. (Tabel 5.15). *Cu cât procentul de concordanță la MZ este mai mare decât la DZ cu atât o componentă genetică a bolii este mai pronunțată.* Această observație este cu atât mai valabilă cu cât boala este manifestă la naștere sau cât mai curând după naștere. Cu cât debutul este mai tardiv, cu atât posibilitatea intervenției unor factori de mediu este mai mare.
- Gemenii MZ *despărțiți la naștere* și crescuți separat permit geneticienilor o bună observație a concordanței îmbolnăvirilor la indivizi identici genetic, crescuți sub influența unor factori de mediu diferiți. Asemenea studii au permis demonstrarea rolului mediului în producerea unor boli psihice cum ar fi: alcoolismul sau abuzul de droguri.

**Tabel 5.15 Concordanța unor trăsături între gemenii monoziigoți și dizigoți (Emery and Rimoin, 1997)**

Caracter	Procentul de concordanță	
	Gemeni monoziigoți	Gemeni dizigoți
Diabet zaharat insulino-independent	100	10
Înălțimea	95	52
Nr. creștelor digitale	95	49
IQ	90	60
Psoriazis	72	15
Epilepsia idiopatică	70	6
Psihoza maniaco-depresivă	67	5
Retard mintal cu IQ < 50	60	3
Schizofrenia	53	15
Diabet zaharat insulino-dependent	50	5
Astmul bronșic	47	24
Luxația cong. de șold	40	3
Despicătura labio-palatină	38	8
Artrita reumatoidă	34	7
Piciorul strâmb	33	3
Hipertensiunea arterială	25	7
Stenoza pilorică	15	2
Cancerul cu aceeași localizare	7	3
Spina bifida	6	3

**Heritabilitatea** (simbolizată prin  $h^2$ ) este o noțiune cantitativă ce măsoară amploarea cu care diferitele alele ale unor loci sunt responsabile de variabilitatea (varianța) unui caracter cantitativ dat, în populație sau printre rudele cu un anumit grad de înrudire: părinți-copii, fratrie, gemeni MZ și DZ. Ulterior conceptul de heritabilitate a fost extins și la caractere calitative pentru a exprima cota de participare a eredității.

Heritabilitatea este estimată prin *gradul de asemănare dintre rude* exprimat în forma unui coeficient de corelație. O soluție alternativă de calcul se bazează pe calcularea ratelor de concordanță la gemenii MZ și DZ; formula de calcul este:

$$h^2 = \frac{\text{Concordanța la MZ} - \text{concordanța la DZ}}{\text{Concordanța la DZ}}$$

Valoarea  $h^2$  variază între 0 – dacă genele nu contribuie la variația fenotipică totală a caracterului – și 1, dacă genele sunt responsabile exclusiv de determinismul aceluia caracter. Deci, cu cât

heritabilitatea este mai mare, cu atât mai mare este contribuția factorilor genetici la realizarea caracterului respectiv (tabel 5.16). De precizat că acest concept teoretic nu dă informații privind numărul de gene implicate sau mecanismul lor de acțiune.

**Tabel 5.16 Estimarea heritabilității în diferite boli**

Boală	Frecvență %	Heritabilitate
Schizofrenie	1,0	85
Astm bronșic	4,0	80
Despicături labiale=palatine	0,1	76
Stenoză pilorică	0,3	75
Spondilită anchilozantă	0,2	70
Picior strâmb	0,1	68
Boală coronariană	3,0	65
Hipertensiune esențială	5,0	62
Luxație congenitală de șold	0,1	60
Anencefalie și spina bifida	0,3	60
Ulcer peptic	4,0	37
Boala congenitală de cord	0,5	35

### Limitele studiilor gemenilor.

Studiul gemenilor este o metodă ideală pentru evaluarea rolului eredității și mediului în producerea unor boli dar a adus puține contribuții majore în genetica umană. Există nu numai limite numerice (puține cupluri disponibile) ci și științifice. Astfel, gemenii MZ nu au exact aceeași expresie a genelor cu toate că ei au genotipul identic: de exemplu, inactivarea întâmplătoare a cromosomilor X după clivarea unui zigot în doi gemeni monoziagoți feminini produce diferențe semnificative în expresia alelelor genelor de pe cromosomul X, în diferite țesuturi. Apoi, expunerea la factorii de mediu nu este întotdeauna identică pentru gemeni, mai ales la vârsta de adult, odată cu părăsirea căminului copilăriei. Mai mult, chiar și intrauterin, mediul nu este absolut identic. Gemenii MZ, mono- sau di-placentari pot avea irigare sangvină placentară diferită, dezvoltare intrauterină diferită și deci greutate la naștere diferită.

### c). Studiile de adopție.

Studiul copiilor adoptați este probabil *cea mai bună metodă* pentru estimarea contribuției factorilor genetici în determinismul bolilor multifactoriale. Studiul constă în compararea ratei unor îmbolnăviri la copiii adoptați ai unor părinți afectați cu rata de îmbolnăvire a unor copii adoptați ai unor părinți ne afectați. De exemplu, copiii adoptați ai unor părinți schizofrenici, fac și ei boala în proporție de 8-10%, în timp ce copiii adoptați ai unor părinți ne afectați, dezvoltă boala numai în proporție de 1%. Dificultățile studiilor de adopție sunt reprezentate de lipsa frecvență a informațiilor despre familia biologică, combinată cu plasamentul selectiv al copiilor adoptați.

De subliniat că atât studiul gemenilor cât și studiul adopțiilor sunt metode limitate care nu pot prin ele însele aduce argumente decisive în ce privește rolul genelor în determinismul trăsăturile multifactoriale și nici nu pot identifica genele specifice ale bolii. Aceste studii servesc numai ca indicii preliminară privind rolul componentelor genetice în producerea bolii.

## 4.2. TEORIILE CARE EXPLICĂ DETERMINISMUL GENETIC AL CARACTERELOR MULTIFACTORIALE

### a). Ereditatea poligenică a caracterelor cantitative cu distribuție continuă (normală sau gaussiană).

Orice caracter fiziologic care poate fi măsurat (tală, greutatea, perimetrul cranian, tensiunea arterială, colesterolul seric, inteligența) este un *caracter cantitativ*. Ereditatea caracterelor cantitative este distinctă de ereditatea monogenică a caracterelor calitative dar poate fi descrisă în termeni mendelieni dacă se acceptă teoria lui Fisher (1918) a **eredității poligenice**. Potrivit acestei teorii:

- un caracter cantitativ este determinat de acțiunea *simultană a mai multor gene nealele* (loci);

- genele au efecte *cantitative, mici și aditive/cumulative* (spre deosebire de cele monogenice a căror efect este important și calitativ);
- genele acționează independent unele de altele, între ele nu există relații de dominanță și recesivitate;
- caracterele cantitative poligenice prezintă în populație o *distribuție normală*, continuă (gaussiană, în formă de clopot) (figura 5.38), spre deosebire de caracterele monogenice a căror distribuție în populație este totdeauna *discontinuuă*;  
Curbele de distribuție normală (gaussiană) se caracterizează prin doi parametri: media (ce determină înălțimea curbei) și depărtarea față de medie (deviația standard - DS); circa 68%, 95% și 99.7% din observații se încadrează în medie  $\pm$  una, două sau trei deviații standard.
- Expresia fenotipică a caracterelor poligenice poate fi **influențată de factorii de mediu**.
- Deoarece rudele au gene în comun, funcțiile lor sunt corelate și mărimea corelației este dependentă de gradul de rudenie.

Efectul aditiv al mai multor gene și distribuția normală a caracterului determinat de acestea se pot demonstra cu câteva exemple clasice: pigmentația pielii, înălțimea, numărul de creste digitale, tensiunea arterială etc. Înainte de a prezenta unele dintre ele vom preciza faptul că folosirea conceptului de distribuție normală a unor caractere morfo-fiziologice cantitative este fundamentală pentru medicina clinică, deoarece permite stabilirea unor standarde normale (de vârstă, sex) pentru caracter și identificarea, prin comparație, a unor valori anormale. Astfel se conturează un grup de **boli multifactoriale definite clinic cantitativ**, care sunt de fapt valori extreme ( $\pm 2$  DS) ale distribuției continue a unui caracter normal: hipostatura, obezitatea, unele forme de retard mintal, hipertensiunea arterială esențială.

### Exemplul 1: Pigmentația pielii

- Caracterul depinde de cantitatea de **melanină**, un pigment de culoare brună-neagră, depozitat sub formă de granule în celulele tegumentului, în fanere, coroidă. Pigmentația pielii variază de la o populație la alta; selecția naturală fixează cea mai favorabilă combinație de gene, în funcție de condițiile de mediu (ex. populația scandinavă din zone cu puține zile însorite are o foarte redusă cantitate de pigment, în timp ce populația de la tropice are, din contră, o mare cantitate de pigment care protejează organismul de radiația solară intensă). Caracterul este determinat de un număr de 2-6 gene.
- În situația cea mai simplă (figura 5.39), presupunem intervenția a 2 perechi de gene alele: **Aa** și **Bb**, din care genele **A** și **B** determină o cantitate de pigment egală cu **1** iar genele **a** și **b** determină o cantitate de pigment egală cu zero. Negrii, homozigoți dominanți (**AA ; BB**) vor avea o cantitate de pigment egală cu **4**, iar albi, homozigoți recesivi (**aa ; bb**), o cantitate de pigment egală cu **0**. Din căsătoria între un alb și un negru, rezultă totdeauna mulatri (**Aa ; Bb**). Din căsătoria între 2 mulatri, pot apărea: negri (N), mulatri închiși (MI), mulatri (M), mulatri deschiși (MD), și albi (A), în proporția 1:4:6:4:1 (tabelul 5.17). În ipoteza în care caracterul ar fi determinat de 3 alele independente, proporția ar fi 1: 6: 15: 20 :15 : 6 : 1, ș.a.m.d.

**Tabelul 5.17 Rezultatul combinațiilor dintre doi mulatri**

Gameți	AB = 2	Ab = 1	aB = 1	ab = 0
AB = 2	AA;BB = 4 N	AA;Bb = 3 MÎ	Aa;BB = 3 MÎ	Aa;Bb = 2 M
Ab = 1	AA;Bb = 3 MÎ	AA;bb = 2 M	Aa;Bb = 2 M	Aa;bb = 1 MD
aB = 1	Aa;BB = 3 MÎ	Aa;Bb = 2 M	aa;BB = 2 M	aa;Bb = 1 MD
ab = 0	Aa;Bb = 2 M	Aa;bb = 1 MD	aa;Bb = 1 MD	aa;bb = 0 A

- Faptul că în prima generație apar numai mulatri, ne-ar putea face să credem că pigmentația este controlată de o singură pereche de gene. Dacă ar fi așa, atunci, în generația a II-a, conform legilor mendeliene, ar trebui să apară un procent egal de albi și negri. Dar raportul observat este diferit, singura explicație plauzibilă fiind aceea că pigmentația este condiționată de 2 sau mai multe gene, având efect aditiv, numărul lor exact nefiind încă cunoscut. Printre genele candidat se numără cele ce codifică receptorii membranari pentru melanocortină și proteina melanosomală P, precum și genele pentru tirozinazele melanogenice TRP1 și TRP2.

- În realizarea culorii pielii intervin însă, în afară de cantitatea de pigment, determinată de un număr mai mare de gene, și alți factori ce țin de individ (sex, vârstă, grosimea tegumentului...), sau de mediu (alimentație, lumina solară...). De aceea determinismul acestui tip de caractere este numit, în mod obișnuit, **poligenic, multifactorial**.

### Exemplul 2: Înălțimea populației

- Reprezentarea grafică a înălțimii populației este o curbă de tip gaussian, caracteristică distribuției continue, normale (figura 5.40). Se poate vedea că față de înălțimea medie de 170 cm., valorile sunt repartizate simetric de o parte și alta a mediei, curba de distribuție luând aspect de clopot. Care este explicația acestei distribuții?
- Presupunem (ne-realist) că înălțimea ar fi determinată de o singură genă cu 2 alele  $A$  și  $a$ . Alela  $A$  tinde să producă indivizi cu talie înaltă, alela  $a$  indivizi cu talie joasă. Dacă nu există o dominanță la acest locus, cele 3 genotipuri posibile ( $AA$ ,  $Aa$ ,  $aa$ ) vor produce 3 fenotipuri: înalt, mediu și scund. Presupunând că frecvența genelor  $A$  și  $a$  în populație este 0,5 pentru fiecare, distribuția, grafic reprezentată, va fi cea din figura 5.41.a.
- Presupunem acum, mai realist, că talia este determinată de doi loci, cel de al doilea de asemenea cu două alele:  $B$  pentru talia înaltă și  $b$  pentru talia scundă. Ele influențează talia exact ca și alelele  $A$  și  $a$ . Acum sunt 9 posibilități genotipice și 5 posibilități fenotipice după cum individul va avea 0, 1, 2, 3 sau 4 alele pentru talia înaltă. Distribuția în populație încă nu este una normală dar este mult mai apropiată de o distribuție normală decât în cazul anterior cu o singură genă. (figura 5.41.b)
- Și, în sfârșit, dacă extindem exemplul la situația în care mai multe gene și factori de mediu influențează înălțimea, fiecare având un efect redus, rezultă mai multe fenotipuri posibile, fiecare puțin diferit de celălalt, iar distribuția în populație dezvoltă o curbă în formă de clopot. (figura 5.41c)

Din exemplele prezentate se poate concluziona că *un fenotip care are o distribuție normală în populația generală poate fi produs de ereditatea poligenică*, implicând acțiunea mai multor gene, cu efecte aditive. Trebuie subliniat faptul că genele individuale care stau la baza unor caractere cantitative poligenice, multifactoriale, se transmit conform principiilor mendeliene ale segregării și asortării independente. Singura deosebire este aceea că ele *acționează împreună* pentru a determina caracterul respectiv.

Pentru efectul aditiv al mai multor gene pledează și **studiul corelațiilor familiale** pentru caractere cantitative. *Corelația* este o măsură statistică a gradului de asociere al unor fenomene variabile sau, mai simplu, o măsură a gradului de asemănare sau de relație între doi parametri. De exemplu, pornind de la faptul că rudele de gradul I au 50% din gene în comun se poate presupune că un caracter este poligenic (talie, inteligență etc) atunci corelația dintre rudele de gradul I, ca de exemplu părinți-copii, frate-frate, ar trebui să fie 0,5. Această premisă teoretică a fost validată de studiile care au arătat o corelație frate-frate apropiată de 0,5 pentru înălțime, QI, număr de crește digitale. Totuși, diferite studii ale unor caractere cantitative au evidențiat „o regresie față de medie”. De exemplu, părinți care sunt înalți sau inteligenți au copii a căror înălțime sau inteligență medie este *mai mică* decât media valorilor parentale; dacă aceste caractere ar fi pur poligenice atunci datele obținute la descendenți ar trebui să se plaseze în jurul mediei valorilor parentale. Or, în realitate, caracterele umane cantitative pot fi influențate de mediu și este de asemenea posibil ca unele gene implicate să nu aibe efecte aditive și să acționeze dominant. Toate acestea sugerează existența altor modele de explicație a eredității multifactoriale.

#### b). Ereditatea poligenică cu prag a caracterelor discontinue.

În genetica medicală multe malformații congenitale și boli comune ale adultului (tabelul 5.12) au o distribuție familială și nu prezintă un model de transmitere monogenică. De aceea, firește, s-a presupus că ele sunt poligenice, multifactoriale, dar – spre deosebire de caracterele cantitative care au o distribuție continuă în populație – ele prezintă o *distribuție discontinuă* (fiind prezente sau absente la o persoană dată, întocmai ca și caracterele monogenice). Pentru a explica producerea acestor caractere multifactoriale discontinue, Falconer (1971) a extins teoria poligenică, postulând existența unei *susceptibilități variabile la boală, cu o distribuție continuă în populație care prezintă însă un prag* care trebuie trecut, depășit, pentru ca boala să se manifeste (figura 5.42). Sub prag, individul este aparent normal; peste prag el poate fi afectat.

*Modelul poligenic cu prag al susceptibilității la boală* presupune că bolnavii au moștenit o combinație „nefericită” de gene de risc. Deoarece rudele lor posedă un număr de gene în comun este logic să presupunem că au și ele o susceptibilitate crescută, un risc mai mare de boală, comparativ cu populația generală; de aceea *bolile respective au un caracter familial*. Astfel, urmărind proporția rudelor afectate în familii cu despicătură labio-palatină (tabelul 5.17) se poate observa că:



- proporția gemenilor monoziгоți afectați este de circa 40%, comparativ cu proporția de 4% pentru gemenii dizigoți;
- proporția pentru indivizii cu copii afectați este identică cu cea pentru frați afectați;
- există o scădere netă a proporției rudelor afectate, în funcție de gradul de rudenie: o scădere de 10 ori de la gemeni monoziгоți la gemeni dizigoți, o scădere de 7 ori de la rude de gradul I la rude de gradul II, o scădere de 2,5 ori de la rudele de gradul II la rudele de gradul III. Deci, frecvența bolii multifactoriale în familie scade cu reducerea gradului de înrudire, ajungând a fi identică cu cea din populația generală

**Tabelul 5.18 - Proporția rudelor afectate în despicătura labio-palatină (Chen, 1988)**

Grad de rudenie	Afectați	Proporția de afectați	Factorul de risc față de populația generală
Gemeni	MZ DZ	~ 40% 4%	
Gradul I	Frați Copii	3,2 - 4,9% 3,0 - 4,3%	40 x
Gradul II	Mătuși și unchi Nepoți și nepoate	0,6 - 0,8% 0,7 - 0,8%	7 x
Gradul III	Veri primari	0,3%	3 x
Neînrudit	Populația generală	0,1%	1 x

Aceste date ne permit să prezentăm **modelul susceptibilității cu prag** (figura 5.42). Conform acestui model, toți factorii care influențează dezvoltarea unor afecțiuni multifactoriale, fie ei genetici sau de mediu, pot fi considerați ca o singură entitate, cunoscută ca **susceptibilitate**. Susceptibilitatea tuturor indivizilor într-o populație formează o variabilă continuă care are o distribuție normală atât în populația generală cât și la rudele individului afectat. Curba de distribuție prezintă însă un prag dincolo de care indivizii au mai multe gene de risc și deci o predispoziție mai mare de boală. Factorii de mediu vor determina uneori *când și cât* de afectați vor fi persoanele cu predispoziție genetică. Boala apare atunci când o persoană cu un număr important de gene de risc (depășește deci pragul de risc), se expune unor condiții defavorabile de mediu, care transformă predispoziția genetică în boală.

*Atingerea și depășirea pragului de risc depinde de numărul de gene de risc pe care o persoană le moștenește de la ambii părinți.* În consecință, în bolile multifactoriale cu predispoziție genetică se observă următoarele **caracteristici**:

- boala are frecvent un *caracter familial*; cu cât afecțiunea este mai rară în populația generală, cu atât boala este mai frecventă printre rude (de exemplu, despicăturile labiale – cu o frecvență în populația generală de 2/1000 au o frecvență de 3% printre rudele de gradul I; despicăturile palatine – 1/1000 – au o frecvență de 5% printre rudele de gradul I)
- indivizii afectați se găsesc *dincolo* de pragul distribuției în populație a susceptibilității determinate genetic, dar *poziția lor exactă nu poate fi definită*; de aceea, pentru cele mai multe boli multifactoriale s-a stabilit un **risc empiric**, bazat pe analiza unui număr mare de familii în care apare un bolnav (în bolile mendeliene riscul este determinat de modelul specific de transmitere ereditară, AD sau AR sau LX).
- părinții bolnavului pot fi sănătoși sau unul dintre ei poate fi bolnav;
- un bolnav are un risc mai mare de a avea copii bolnavi comparativ cu persoanele din populația generală;
- rudele de gradul I ale bolnavului (frați, copii) au un risc mai mare de boală, comparativ cu populația generală; riscul scade însă odată cu scăderea gradului de rudenie (figura 5.43)
- riscul de îmbolnăvire *diferă de la o familie la alta*, funcție de numărul de gene de risc (spre deosebire de transmiterea monogenică în care riscul este constant); în plus, el *poate fi diferit în populații diferite* datorită faptului că frecvențele genelor implicate ca și a factorilor de mediu sunt diferite. De exemplu, riscul empiric pentru defectele de tub neural în SUA este de 2-3%, în timp ce în populația britanică este de 5%.

Aceste caracteristici sunt utile pentru stabilirea naturii multifactoriale ale unor boli în care factori genetici multipli determină o predispoziție la boală iar mediul este cel care transformă vulnerabilitatea în boală. În practică, *diagnosticul de ereditate multifactorială este un diagnostic de exclude*. Trăsăturile clinice ale unei boli multifactoriale nu se deosebesc de obicei de trăsături similare de altă cauză. De exemplu, DLP, singură sau asociată cu alte anomalii este, obișnuit, multifactorială. Dar sunt peste 200 de afecțiuni în care DLP este doar o manifestare în cadrul unui sindrom plurimalformativ specific. Multe din aceste condiții sunt consecința unor anomalii cromosomiale, altele ale unor boli monogenice, iar altele ale unor factori de mediu teratogeni. Uneori este dificil de a distinge o boală poligenică de una monogenică cu penetranță redusă sau expresivitate variabilă.

Deoarece factorii de risc sunt diferiți pentru diferite boli multifactoriale, *riscul empiric de recurență* este și el *specific* fiecărei boli în parte, fiind dependent și de *frecvența bolii în populație*. Riscul de recurență pentru rudele de gradul I, adică frați-surori sau copii, este aproximativ egal cu rădăcina pătrată a incidenței generale în populație. Astfel, pentru *malformațiile congenitale izolate*, care au o incidență în populație de circa 1/1000, dacă doi părinți sănătoși, fără alte antecedente familiale, au un copil afectat, riscul de recurență la sarcinile următoare este de 1 la 32 sau 3%; același risc îl au și descendenții unui bolnav. Pentru bolile multifactoriale ale adultului, care au în populație o prevalență de circa 1/100, riscul de recurență în fratrie și la copiii unui individ afectat este de 10%.

**Riscul la descendenți crește** (peste 5% în malformațiile congenitale izolate) dacă:

- în familie sunt *mai multe persoane afectate* (în bolile monogenice riscul este constant); de exemplu, în cazul despicăturii labiale ± palatine (DLP) riscul de recurență după nașterea unui copil afectat este 4 % iar dacă sunt doi copii afectați riscul crește peste 10 %); prezența unui al doilea bolnav în familie nu modifică *per se* riscul genetic ci indică faptul că familia are o predispoziție genetică mai mare și deci un risc de recurență mai mare
- bolnavul prezintă *o formă mai gravă de boală*<sup>46</sup>; de exemplu, riscul de recurență în DLP unilaterală este de 2,5%, în cea bilaterală riscul este de 6%; Cu cât defectul este mai sever cu atât susceptibilitatea genetică este mai mare;
- dacă *unul din sexe este mai frecvent afectat* (ex. sexul masculin pentru stenoza congenitală de pilor sau sexul feminin pentru luxația de șold), riscul de recurență este mai mare după nașterea unui copil care aparține sexului mai rar afectat, deoarece individul afectat, de sex mai puțin susceptibil, este obișnuit într-o poziție extremă a distribuției de susceptibilitate. Astfel, în stenoza de pilor cu sex-ratio de 5M:1F, dacă tatăl a fost afectat, recurența este de 5,5% la băieți și de 2,4% la fete; dacă mama a fost afectată, riscul este de 19,4% pentru băieți și de 7,3% pentru fete.
- au loc *căsătorii consangvine* și persoanele înrudite au un număr mai mare de gene în comun.

### c). Ereditatea oligogenică sau modelul mixt

Chiar dacă modelul susceptibilității cu prag descris anterior este satisfăcător prin criteriile pe care le oferă, pentru unele boli multifactoriale pot fi și alte explicații. Este posibil ca diferite gene implicate în boală să joace roluri de importanță inegală. În unele cazuri, un caracter poate fi determinat de acțiunea combinată a unei /unor gene de susceptibilitate cu efect major și a unui "fond" multifactorial în care genele adiționale și factorii de mediu au fiecare un mic efect adițional.

Dacă luăm din nou ca exemplu talia, putem presupune că variația în înălțime este determinată de un singur locus (sau **genă majoră**) și o componentă multifactorială. Indivizii cu genotipul **AA** vor tinde spre o talie înaltă, cei cu genotip **aa** spre o talie mică iar cei cu genotip **Aa** spre o talie intermediară. Astfel, cei cu genotip **aa** vor avea variații ale taliei între 130 cm și 170 cm., cei cu genotip **Aa** vor avea variații ale taliei între 150 cm și 190 cm. iar cei cu genotip **AA** vor avea variații ale taliei între 170 cm și 210 cm. (figura 5.44).

O explicație utilă e oferită de dr. Michael Brown de la Universitatea din Texas care face o analogie cu ceea ce el numește "sindromul cucuiului". Dacă s-ar reduce imaginar tocul ușilor de la 200 cm. la 170 cm. am avea de a face cu așa-zisul "sindrom al cucuiului". Boala ar surveni rar în familiile cu înălțime medie dar ar atinge proporții epidemice la familiile înalte. Tocul ușii convertește distribuția continuă a înălțimii în aceste familii în două fenotipuri: cu cucui, cei peste 170 cm. (zona neagră din figura 5.38) și fără cucui, cei sub 170

<sup>46</sup> Cu cât defectul este mai sever cu atât susceptibilitatea genetică este mai mare.

cm. (zona hașurată din figura 5.39). Deci chiar dacă nivelul prag rămâne același, numărul indivizilor cu cui este proporțional mai mare decât cel așteptat doar prin determinismul monogenic și asta datorită faptului că lor li se adaugă cei cu predispoziție genetică prin cumulul mai multor factori (genetici sau de mediu).

Din cauza influenței „fondului” multifactorial, există o substanțială suprapunere ale celor trei genotipuri majore. Distribuția globală a înălțimii, sub formă de clopot, este determinată de superpoziția celor trei distribuții ale fiecărui genotip.

Acest model în care factorii genetici sunt reprezentați de o componentă monogenică (o genă majoră, cu mai multe alele), o componentă poligenică și factori de mediu, se numește **model mixt**. În acest caz distribuția susceptibilității la boală este rezultanta mai multor distribuții gaussiene corespunzând diferitelor genotipuri posibile (3 dacă sunt 2 alele) ale locusului major.

Teoria oligogenică ar reprezenta de fapt o piesă a spectrului complex al determinismului caracterelor umane, ilustrat în figura 5.45, care se plasează în diferite poziții față de cei trei poli: monogenic, poligenic și ecologic. Această teorie deschide o perspectivă optimistă pentru identificarea genelor de predispoziție la boală

### 4.3. IDENTIFICAREA GENELOR IMPLICATE ÎN BOLILE MULTIFACTORIALE

Bolile multifactoriale – fie că este vorba de malformații congenitale sau de boli comune ale adultului – sunt frecvente și au o contribuție majoră la morbiditate și mortalitate. Este deci firesc să se facă eforturi importante pentru a identifica genele care contribuie la etiologia lor, determinând susceptibilitatea la boală. În cazul caracterelor mendeliene, datorită corelației puternice care există între genotip și fenotip, studiile de înlănțuire permit de regulă cartografierea caracterului în interiorul unui interval minim de ordinul a 1cM. Ulterior sunt identificate variațiile de secvență prezente la indivizii afectați în regiunile codante ale genelor candidat și aceasta permite dovedirea corespunzătoare a identității genei implicate. Acest model de lucru nu se aplică însă în cazul caracterelor multifactoriale, în general pentru identificarea genelor implicate fiind necesare patru etape majore de lucru:

#### **(1). Studiile de înlănțuire și asociere.**

Acestea au ca scop stabilirea unei asocieri semnificative a unei anumite regiuni genomice cu caracterul cantitativ respectiv. Cel mai adesea însă, chiar și în cazul unor studii pe colecții mari de familii, intervalul minim nu poate fi restrâns sub dimensiuni de 10-30cM, ceea ce corespunde la om unui fragment de 10-30Mb sau circa 100-300 gene.

- Studiile de asociație compară incidența unui anumit polimorfism la bolnavi cu incidența ei într-un grup control; dacă o alelă specifică a locusului polimorfic are o prezență semnificativ mai mare la indivizii cu boală comparativ cu cei neafecțați atunci se poate presupune că alela respectivă este implicată în patogenia bolii. Astfel s-a putut stabili că alela epsilon 4 a genei apolipoproteinei E poate fi un factor important de risc pentru boala Alzheimer.

Studiile de înlănțuire analizează cotransmisia în familii a unui locus marker și a locusului boală. Aceasta ar aduce dovezi asupra implicării locusului respectiv (sau a altuia situat foarte aproape de el) în procesul de boală. Cel mai frecvent se folosește *analiza de înlănțuire* a unei perechi de membri (frati) ai unei familii care sunt concordanți pentru boală, deci au foarte probabil în comun anumite alele predispozante; se recurge la scanarea genomului (cu ajutorul a sute de markeri ADN polimorfici) pentru a găsi regiuni prezente la ambii membri mai frecvent decât s-ar aștepta; aceasta permite prezumția ca în regiunea respectivă se află un locus implicat în boală.

#### **(2). Cartografierea de finețe.**

Această etapă are ca scop reducerea la maximum posibil a dimensiunii intervalului critic și se realizează prin studii familiale de dezechilibru a înlănțuirii (linkage disequilibrium – LD) sau prin studii caz-control. Asemenea studii permit reducerea intervalului critic la dimensiuni de ordinul a 1 cM.

#### **(3). Analizele secvențelor.**

Analiza secvenței ADN în intervalul minim este necesară pentru identificarea variantelor nucleotidice prezente. În ciuda eforturilor intervalul minim poate conține frecvent câteva gene, fiecare cu numeroase variante nucleotidice, unele la nivelul regiunilor codante, iar altele în regiunile

care le flanchează. Se considera că adeseori caracterele multifactoriale pot fi determinate mai degrabă de variante ale unor secvențe regulatorii decât de variante în secvențele codante. Dacă în cazul regiunilor codante efectele pot fi ușor prevăzute prin simpla corelație cu codul genetic, consecințele unor modificări în regiunile necodante sunt mult mai dificil de interpretat.

(4). Teste funcționale ale variantelor nucleotidice candidate.

Aceasta etapă este complet diferită față de analizele utilizate pentru identificarea caracterelor mendeliene și constă în dovedirea pe cale experimentală a efectului funcțional al variantelor candidat identificate. Aceasta presupune utilizarea unor modele animale sau culturi de celule umane și se bazează pe tehnologia knock-in sau prin analiza efectului pe care îl are introducerea prin inginerie genetică a variantei nucleotidice testate. De multe ori este însă dificilă extrapolarea rezultatelor între specii diferite.

În ciuda dificultăților menționate au fost identificate câteva variante genice implicate în etiologia unor caractere multifactoriale la om. Mai jos sunt descrise câteva dintre cele mai sugestive exemple.

- Astfel, înlănțuirea genetică a **diabetului zaharat tip 1** cu genele complexului major de histocompatibilitate HLA-DR și HLA-DQ a fost stabilită de peste 20 de ani. Există mai multe categorii de dovezi care suportă ferm rolul *alelei DQ-beta* în susceptibilitatea la DZ tip 1: conservarea între specii a aminoacidului din poziția 57; asocierea semnificativă între DQ-beta și DZ tip 1 în diverse populații; faptul că aminoacidul 57 este structura cheie a moleculei DQ-beta. În **diabetul zaharat tip 2** un screening la nivelul întregului genom a permis identificarea unei regiuni de pe cromosomul 2 puternic înlănțuită cu boala. Regiunea a putut fi redusă din fericire la circa 1,7 Mb. În interiorul acestei regiuni au fost identificate multiple polimorfisme mononucleotidice (SNP), iar dintre acestea, haplotipul unei grupări de trei SNP de la nivelul genei pentru *calpacaina-10* (*CAPN10*) s-a dovedit a fi puternic asociat cu DZ tip 2 în mai multe populații.
- Alela E4 a *apolipoproteinei E* (*APOE4*) este asociată într-o manieră doză-dependentă cu susceptibilitatea la **boala Alzheimer**. Aceasta asocieră, împreună cu localizarea proteinei APOE4 la nivelul leziunilor cerebrale și cu rolul proteinei ApoE (de la șoarece) în formarea depozitelor de amiloid susțin cu putere rolul APOE4 în susceptibilitatea la boala Alzheimer.
- Gena *CARD15* (care codifică proteina 15 cu domeniu de recrutare a caspazei) localizată la nivelul cromosomului 16 a fost identificată ca genă de susceptibilitate la **boala Crohn**. În interiorul acestei gene au fost identificate câteva variante frameshift și cu sens greșit care sunt puternic asociate cu boala, deși confirmarea efectului lor prin studii knock-in la șoareci încă lipsește.
- Alte gene implicate în etiologia unor caractere multifactoriale pentru care există dovezi puternice sunt ADAM33 (cromosomul 20, codifică o proteină din familia dezintegrinelor și metaloproteazelor) în **astmul bronșic** sau ACE1 (cromosomul 17, codifică enzima de conversie a angiotensinei 1) în susceptibilitatea la **hipertensiunea arterială esențială**.

#### INTERNET

1. Dicționar de biologie celulară: <http://www.mlab.gla.ac.uk/~julian/Dict.html>
2. Genetică medicală - University of Utah School of Medicine: <http://medgen.genetics.utah.edu>
3. Genetică medicală - <http://www.hslib.washington.edu-helix>
4. Gene amprentate; <http://www.mgu.har.mrc.ac.uk/imprinting>
5. Principii de genetică - Indiana University Biotechnology: <http://biotech.chem.indiana.edu>
6. National Human Genome Research Institut: <http://www.nhgri.nih.gov>
7. Nomenclatura genelor: <http://www.gene.ucl.ac.uk/cgi-bin/nomenclature/searchgenes.pl>
8. NORD: asociația națională pentru boli rare: <http://www.NORD-rdb.com/~orphan>
9. OMIM: <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/omim>

#### Bibliografie specifică selectivă

1. Badano, J.L., Katsanis, N. - *Beyond Mendel: an evolving view of human genetic disease transmission* - Nat. Rev. Genet. 2002;3:779-789.
2. Barlow D.P. - *Gametic imprinting in mammals* - Science 1995;270:1610-1613
3. Barsh G.S. - *The genetics of pigmentation: from fancy genes to complex traits* - Trends Genet., 1996;12:299-305
4. Bernards A., Gusella J.F. - *The importance of genetic mosaicism in human disease* - N.Engl.J.Med., 1994; 331:1447-1449

5. Dynlacht BD – *Regulation of transcription by proteins that control the cell cycle* – Nature, 1997;389:149-152
6. Gao CY, Zelenka PD. – *Cyclins, cyclin-dependent kinases and differentiation* - BioEssay, 1997;19:307-315.
7. Glazier, A.M., Nadeau, J.H., Altman T.J. - *Finding genes that underlie complex traits* - Science, 2002;298:2345-2349.
8. Ghosh S., Collins FS. – *The geneticist's approach to complex disease* – Ann.Rev.Med. 1996;47:333-353
9. Hall JG. – *Twins and twinning* – Am.J.Med.Genet., 1996;61:202-204.
10. Hall JG. – *Genomic imprinting: nature and clinical relevance* – Ann.Rev.Med., 1997; 48:35-44.
11. Hawkes CH. – *Twin studies in medicine-what do they tell us?* – QJ Med. 1997;90:311-321.
12. Hickey RJ; Malkas LH - *Mammalian cell DNA replication* – Crit. Rev.Eukar. Gene Expres. 1997;7:125-157
13. Lander E., Kruglyak L. – *Genetic dissection of complex traits: Guidelines for interpreting and reporting linkage results* – Nat.Genet., 1995;11:241-247
14. Latham KE. – *X chromosome imprinting and inactivation in the early mammalian embryo* - Trends Genet. 1996;12:134-138
15. Lee JT, Jaenisch R – *The (epi)genetic control of mammalian X-chromosome inactivation* - Curr.Opin.Genet.Dev., 1997;7:274-280.
16. Matin, A., Nadeau, J.H. - *Sensitized polygenic trait analysis* - Trends Genet. 2001;17: 727-731.
17. Nadeau J.H. (2001) - *Modifier genes in mice and humans* - Nat. Rev. Genetics, 2: 165-174.
18. Reddy PS, Houssman DE. - *The complex pathology of trinucleotide repeats* – Curr.Opin.Genet.Dev., 1997;9:365-372.
19. Roeder G.S. – *Meiotic chromosomes: it takes two to tango* – Genes & Development, 1997, 11:2600-2621
20. Romeo G., McKusick V.A. – *Phenotypic diversity, allelic series and modifier genes* – Nature Genet 1994;7:451-453
21. Risch N, Merikangas K. – *The future of genetic studies of complex human diseases* – Science 1996;273:1526-1517
22. Tjian R. – *Molecular machines that control genes* - Sci.Amer. 1995; 272:54-61.
23. Zlotogora J. – *Germ line mosaicism* – Hum.Genet., 1998;102:381-386.
24. Wilkie AOM. – *The molecular basis of dominance* – J.Med.Genet., 1994;31:89-98
25. Warburton D. – *Human female meiosis: new insight into an error-prone process* – Am.J.Huma.Genet. 1997; 61:1-4

# CAPITOLUL 6

## VARIABILITATEA GENETICĂ

Genetica este știința eredității și a variabilității. Dacă ereditatea determină *conservarea* informației genetice și deci a similitudinii biologice dintre părinți și copii, variabilitatea creează deosebiriile dintre generații. Dar diferențele fenotipice dintre indivizi pot fi produse fie de modificări ale materialului genetic, fie de factori din mediul înconjurător. Prin **variabilitate genetică** se înțelege ansamblul de fenomene care produc *diferențele genetice* între indivizii unei populații precum și între populații diferite. Datorită acestor diferențe se creează diversitatea, premisă esențială a evoluției.

Consecințele fenotipice ale diferențelor ce pot apărea în secvența ADN la diferiți indivizi au un spectru larg: unele nu au efect fenotipic sau acesta este minim, altele pot produce direct o stare de boală; între aceste două extreme se plasează *variațiile fenotipice normale* determinate genetic ale morfologiei și fiziologiei organismului, ale comportamentului și personalității individului, ale răspunsului său la factorii externi (de la alimente, la agenți cauzatori de boală sau medicamente). Deci bolile genetice sunt numai partea cea mai evidentă, extremă, a variabilității genetice.

### A. SURSELE DE VARIABILITATE

Variabilitatea genetică este produsă prin mutații, recombinări și migrații. Aceste trei fenomene sunt interconectate: mutațiile determină modificări în structura materialului genetic al unui individ și creează fondul genetic caracteristic unei populații; migrațiile unor persoane dintr-o populație în altă populație aduc un potențial genetic nou iar recombinările din gametogeneză și fecundare produc un „amestec” al zestrei genetice parentale într-o combinație nouă, specifică descendentului. Cert este că genomul uman nu este o entitate statică, fixă.

#### 1. MUTAȚIILE

Termenul de mutație a fost folosit pentru prima oară în genetică de către Hugo de Vries, în 1901. Prin **mutație** se înțelege orice modificare în secvența sau aranjarea nucleotidelor din ADN. Aceste modificări sunt nenaturale (accidentale), permanente și ereditare. Dacă interesează ADN genic, ele pot produce o schimbare detectabilă a fenotipului (dar acest lucru nu este obligatoriu). Celula sau organismul ce prezintă o astfel de modificare se numește *mutant*.

În funcție de *mărimea* materialului genetic interesat – genă, cromosom, genom - mutațiile se pot clasifica în trei mari categorii:

- (1) *Mutații genice*, care afectează secvența nucleotidelor unei gene; ele pot interesa întreaga genă sau o parte a ei (rearanjări intragenice) sau numai o pereche sau câteva perechi de nucleotide (mutații punctiforme), formând o variantă alelică a genei normale („de tip sălbatic”); frecvența mutațiilor genice este apreciată la  $10^{-5} - 10^{-6}$  /locus/generație.
- (2) *Mutații cromosomice*, care produc schimbări în structura cromosomilor și deci în ordinea liniară a genelor în cromosomi (remanieri cromosomice: pierderea, câștigul sau

rearanjarea unor segmente); mutațiile cromosomice se produc cu o frecvență de  $10^{-4}$  /diviziune celulară.

- (3) *Mutații genomice („de ploidie”)*, care afectează cantitatea de material genetic și se traduc printr-o modificare a numărului diploid de cromosomi întregi; ele afectează fie 1-2 perechi de cromosomi (aneuploidie), fie toți cromosomii, prin adăugarea a 1-2 seturi haploide (poliploidie). Mutațiile genomice sunt cele mai frecvente mutații la om,  $10^{-2}$  /diviziune celulară.

Ultimele două tipuri de mutații sunt reunite într-un singur grup numit *anomalii cromosomice*.

O altă clasificare a mutațiilor se bazează pe tipul de celule afectate: *germinale* (ce vor forma, în gonade, celule sexuale) sau *somatice*. În cazul, **mutațiilor germinale**, se pot produce gameți anormali care (în cazul în care individul este fertil), după fecundare, *transmit* mutația la generația următoare, rezultând un individ ale cărui celule vor fi toate mutante; mutațiile germinale sunt deci ereditare. În al doilea caz, cel al **mutațiilor somatice**, descendenții unei celule mutante vor forma o clonă celulară anormală, prezentă în anumite țesuturi, rezultând un *mozaicism somatic*; mutațiile somatice nu pot fi transmise generațiilor viitoare.

În funcție de cauză, mutațiile pot fi clasificate în spontane și induse. **Mutațiile spontane** sunt cele mai numeroase și se produc prin erori de copiere în cursul replicării ADN. Deși funcția de autocorecție a ADN polimerazelor reduce semnificativ numărul de erori, mărimea enormă a genomului uman face ca la orice replicare a celor 3 miliarde de nucleotide să apară erori ( $10^{-10}$ ). **Mutațiile induse** sunt determinate de agresiunea unor substanțe chimice exogene, a radiațiilor ionizante sau a metaboliților reactivi. Urmările acestor atacuri genotoxice sunt reduse prin intervenția unor sisteme eficiente de supraveghere, alarmă și reparare; dovada nedorită a eficacității lor este adusă de mutațiile genelor implicate în aceste procese ce cresc semnificativ rata mutațiilor, producând - cel mai - adesea cancer.

Consecințele fenotipice ale mutațiilor formează un spectru foarte larg.

- Cele mai multe mutații germinale (produse în regiunile necodante ale ADN) nu au un efect fenotipic, sunt *mutații neutre*. Ele generează variantele alelice ce alcătuiesc *polimorfismul ADN*, dacă un locus are mai mult de o variantă (alelă) ce se întâlnește în populație cu o frecvență mai mare de 1% (ce face ca producerea ei întâmplătoare să fie improbabilă). *Heterozigoția medie* a ADN genomic la om a fost apreciată la 0,001 – 0,004 (adică 1:250 – 1:1000 pb diferă prin secvențele alelice). De notat că unele gene, și în special genele HLA, au un polimorfism înalt.
- Uneori mutațiile noi pot avea *efecte benefice*, producând o mai bună adaptare la mediu și/sau o rezistență mai mare la agresiunile ecologice sau o creștere a „aptitudinilor reproductive” („fitness”). Avantajul selectiv al heterozigoților (Na), purtători ai unei gene mutante, se poate înscrie în această categorie (vezi capitolul 7). Cert este că mutațiile reprezintă „*combustibilul brut care conduce evoluția*”.
- Deseori mutațiile pot fi *patogene*, producând o modificare fenotipică evidentă (letală, subletală, morbidă) sau crescând susceptibilitatea la boală.

Până acum ne-am referit la mutațiile germinale, care sunt ereditare. Deși *mutațiile somatice* nu se transmit la descendenți, nu înseamnă că medical nu sunt importante. Evoluția de la zigot la adult necesită circa  $10^{15}$  diviziuni celulare; la o frecvență medie de  $10^{-10}$  erori de replicare per diviziune se produc în genomul fiecărei celule somatice mii de mutații. Efectul lor va depinde de natura mutației, localizarea și țesutul implicat; ele vor produce clonele anormale implicate în cancer, afectări degenerative sau „îmbătrânire” precoce.

Consecințele patologice ale mutațiilor, germinale și somatice, ne permit să afirmăm că *mutațiile sunt cauza principală de boală la om*.

## 2. RECOMBINĂRILE GENETICE

Prin recombinație genetică înțelegem producerea unor *combinații genetice noi*

(recombinanți), prin rearanjarea (reasortarea, redistribuția) materialului genetic cuprins în două unități genetice diferite.

Recombinarea genetică este un proces natural și reprezintă „*una din cheile mecanismelor prin care se formează noi indivizi ce vor fi apoi testați, prin selecție naturală, în marea schemă a evoluției biologice*” (Wetzel, 1980).

Procesul de recombinare necesită o asociere intimă și apoi o interacțiune între două unități genetice diferite; această „condiție” permite, între altele, diferențierea dintre recombinările genetice și mutații. În funcție de mărimea unităților implicate în replicare – genom, cromosom, genă – se pot deosebi mai multe tipuri de recombinare.

## 2.1 RECOMBINAREA GENOMICĂ.

Recombinarea genomică se realizează în cadrul procesului sexual, prin asortarea genomurilor din gameții care unesc, pentru a forma zigotul. Reproducerea sexuată asigură nu numai continuitatea și păstrarea genelor și caracterelor de la părinți la copii, dar și creșterea variabilității urmașilor. Când se unesc doi gameți proveniți de la indivizi neînrușiți, diferiți genetic, descendenții vor prezenta o vitalitate sporită, calități noi, o adaptabilitate mai bună și o fertilitate crescută. Această vigoare hibridă sau **heterozis** este consecința heterozigotismului care se creează la descendenți. În cazul încrucișării între indivizi apropiați sau înrușiți (consanguinitate), gradul de heterogenitate se reduce și crește fenomenul de omogenizare genetică (vezi capitolul 5.D.3). Deci recombinarea genomică este o importantă sursă de variabilitate, cu condiția ca genomurile care se combină să fie cât mai diferite.

## 2.2 RECOMBINAREA CROMOSOMICĂ

Recombinarea cromosomică se produce în cursul gametogenezei între cromosomii omologi (cu origine diferită) prin fenomenele specifice meiozei I (vezi capitolul 5.C.1.c). Ea poate avea loc între cromosomi „întregi” (recombinare intercromosomică) sau între „părți” din cromosomi (recombinare intracromosomică).

### a. Recombinarea intercromosomică

Recombinarea intercromosomică se produce în cursul anafazei I, atunci când cromosomii ce formează o pereche de omologi se separă și apoi se dirijează spre celulele fiice independent de alte perechi de omologi. Prin această *asortare independentă* se formează  $2^{23}$  tipuri de gameți, deci peste 8,4 milioane de gameți diferiți, la fiecare din cele două sexe. (această cifră este valabilă pentru situația în care cromosomii se deosebesc printr-o singură genă). După fecundare pot rezulta teoretic  $2^{46}$  combinații, valoare ce depășește de opt mii de ori populația actuală a globului pământesc. Să nu uităm însă că fiecare cromosom are mai multe gene; de aceea se poate afirma că fiecare persoană are o structură genetică unică și nerepetabilă. Asortarea independentă a cromosomilor omologi explică a doua lege a lui Mendel, referitoare la *combinarea liberă a "factorilor ereditari"* (genelor) și distribuția diferită a unor caractere, normale sau anormale, la descendenți (vezi capitolul 5.D.1).

### b. Recombinarea intracromosomică (“omologă”)

Variațiile genotipice individuale produse prin recombinarea intercromosomică sunt amplificate prin *schimbul reciproc și egal de gene* dintre cromosomii omologi care se produce prin crossing-over, în profaza I (vezi capitolele 3.A.2; 5.C.1 și caseta 6.1). Prin această recombinare intracromosomică sau omologă cromosomii omologi, care inițial erau diferiți ca origine, suferă o recombinare a genelor parentale.

## 2.3 RECOMBINAREA INTRAGENICĂ

Recombinarea intragenică se produce printr-un crossing-over egal între două gene alele și produce o **genă** hibridă sau o **fuziune genică**, ce conține un fragment terminal dintr-o alelă și restul de secvență din cealaltă alelă (figura 6.1). Recombinarea intragenică poate produce și fenomenul de *conversie genică*, la care ne vom referi ulterior.



## CASETA 6.1

### Mecanismul recombinării intracromosomice

*Procesul de recombinarea intracromosomică, o sursă majoră de diversitate genetică, are loc printr-un mecanism molecular care este doar parțial înțeles, dar asemănător cu cel al recombinării omologe responsabile de repararea rupturilor ADN bicatenare (vezi figura 6.23).*

*Înainte de inițierea procesului de crossing-over este necesară împerecherea cromosomilor omologi. Acest mecanism, care aduce în imediata vecinătate secvențele ADN ce vor fi schimbate în cadrul crossing-over, pare a fi reglat independent de recombinarea propriu-zisă. Procesul de recombinarea este inițiat prin producerea în profaza meiozei a unor rupturi ADN bicatenare în câteva puncte de-a lungul fiecăruia din cele patru cromatide de către endonucleaza SPO11, proteina înrudită cu topoizomerazele II. SPO11 formează o legătura fosfodiester între un aminoacid tirozina și nucleotidul din poziția 5' de la nivelul punctului de ruptură. Aceste puncte de ruptură par a nu apare întâmplător de-a lungul cromosomilor ci mai frecvent în regiunile promotor ale genelor și preferential în regiunile cromosomice bogate în perechi de baze GC. Consecințele defectelor SPO11 au fost evidențiate pe modele animale și constau în alterarea formării chiasmaterelor și aneuploidie masivă cu imposibilitatea formării unor gameți funcționali.*

*Ulterior are loc îndepărtarea SPO11 și procesarea capetelor rupte sub acțiunea 5' – 3' exonucleazică a unui complex proteic format cel puțin din proteinele RAD50 și MRE11. Aceasta conduce la formarea unor capete protruzive 3', monocatenare, situate de fiecare parte a unei rupturi. Unul dintre aceste capete protruzive 3' va invade apoi o cromatida a cromosomului omolog și același proces va fi realizat de către capatul protruziv 3' opus pentru cealaltă cromatidă a cromosomului omolog. Acest proces este controlat de către proteinele DMCI și RAD51. Urmează un proces de reparare a dublei joncțiuni tip Holliday formate cu participarea unor ADN polimeraze și ADN ligaze.*

*Etapa finală a acestui proces este rezoluția joncțiunilor Holliday care este esențială pentru separarea cromosomilor patern și matern și evidențierea recombinanților. Aceasta etapă presupune intervenția unor rezolvaze încă neidentificate.*

## 3. MIGRAȚIILE

Prin migrații se înțelege *transferul de gene* prin deplasarea unui grup de indivizi dintr-o populație în altă populație genetic diferită. Prin imigrare se produce astfel o introducere a unor gene noi în populația gazdă. Asupra acestui mecanism ne vom referi pe larg în capitolul următor, Genetica populațiilor, dar vom preciza aici că migrațiile au reprezentat și în specia umană o sursă importantă de variații ereditare.

## B. MUTAȚIILE GENICE

Mutațiile sunt definite ca modificări permanente și ereditare în secvența nucleotidelor sau aranjarea ADN. Prin aceste modificări se produc *variante alelice* ale secvenței de ADN (genă sau secvență extragenică). Unele dintre aceste variante nu au efect fenotipic sau acesta este mi nim; alte variante alelice, produse prin mutație, pot fi implicate direct în etiologia unor boli.

Introducerea metodelor de analiză a ADN a permis, în ultimii 20 de ani, realizarea unor progrese remarcabile în identificarea și studiul mutațiilor răspunzătoare de producerea unor boli monogenice. S-a putut defini astfel *spectrul mutațiilor* pentru aceste boli, atât calitativ (tipurile și pozițiile mutațiilor, precum și efectul lor asupra funcției genei) cât și cantitativ (analiza frecvenței mutațiilor în diferite populații sau *epidemiologia moleculară*). Consecințele au fost multiple și pot fi grupate în trei categorii:

- Cunoașterea teoretică mai precisă a diversității mecanismelor mutaționale ce operează la om și descoperirea unor mecanisme noi (transpoziții, inversii, expansiuni de repetiții trinucleotidice);

- Înțelegerea mai precisă a mecanismelor patogenice ale unor boli (pierderea totală sau parțială a funcției proteinelor, modificarea sau achiziția unor proprietăți noi ale proteinelor codificate de genele mutante);
- Ameliorarea calității și eficienței diagnosticului în numeroase boli monogenice, precum și a sfatului genetic și diagnosticului prenatal.

## 1. TIPURI ȘI MECANISME DE PRODUCERE ALE MUTAȚIILOR GENICE

Mutațiile care afectează regiuni mici din genom pot fi împărțite în două mari clase:

- modificări ale unei *secvențe unice* de ADN sau **mutații simple**; acestea sunt de obicei *microleziuni*, interesând unul sau câteva nucleotide;
- modificări ce implică *schimburi* între două secvențe alelice/nealelice de ADN sau **recombinări genice aberante**; ele generează macroleziuni (mari deleții, inserții, duplicații, inversii mari, fuziuni de gene) interesând o parte din genă sau chiar întreaga genă

În funcție de modificarea produsă în secvența de nucleotide a ADN se pot deosebi trei mari categorii de mutații (figura 6.2):

- **substituții nucleotidice** – ce implică de regulă *înlocuirea* unei singure perechi de baze; mai rar pot fi înlocuite simultan mai multe nucleotide grupate, rezultând o formă de conversie genică;
- **deleții** – eliminarea (pierderea) unuia sau mai multor nucleotide din secvența genei, mai rar părți din genă (exoni) sau întreaga genă;
- **inserții** – introducerea (adiția) unuia sau mai multor nucleotide în structura genei; rar se pot produce inserții largi (prin transpoziție), amplificarea (expansiunea) unor secvențe repetitive trinucleotidice sau duplicația genei.

Majoritatea mutațiilor sunt modificări *stabile/fixe* ale secvenței ADN. Recent s-a descris o clasă nouă de mutații numită *mutații instabile sau dinamice* în care anumite repetiții trinucleotidice suferă modificări (de obicei expansiuni) atunci când sunt transmise în succesiunea generațiilor.

În funcție de tipul secvențelor din structura genei care sunt afectate, mutațiile pot interesa *secvențele codante* (exonii) sau *necodante* (intronii, secvențele reglatoare), cu efecte variate asupra expresiei informației ereditare și implicit asupra sintezei de proteine (alterarea structurii sau cantității).

Descrierea diferitelor tipuri de mutații se bazează pe o nomenclatură specifică, stabilită de grupuri de experți, prezentată în caseta 6.2..

### CASETA 6.2

#### Nomenclatura mutațiilor

*Nomenclatura mutațiilor a fost stabilită de către Genome Database Nomenclature Committee și poate fi accesată la adresa <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/>. Mutațiile pot fi descrise în două modalități: prin efectul lor sau prin descrierea secvenței modificării.*

*Nomenclatura pe baza efectului alelei mutante este folosită mai ales la organisme de laborator. O alelă nulă sau amorfă nu produce nici-un efect; o alelă hipomorfă produce o cantitate sau o activitate redusă a produsului genei; o alelă hipermorfă determină o cantitate sau activitate crescută de produs; o alelă neomorfă este o alelă cu activitate sau produs nou; o alelă antimorfă este o alelă a cărei activitate sau produs antagonizează activitatea produsului normal.*

*Nomenclatura pentru descrierea mutației este amplă (vezi Antonarakis et al.,1998). Vom prezenta aici câteva repere.*

**Substituțiile de amino acizi.** Reziduurile de aminoacizi (desemnați prin codul de trei litere sau cel cu o singură literă<sup>1</sup>; vezi tabelul 4.2) sunt numărate începând cu metionina (corespunzătoare codonului inițiator) considerată numărul 1. Astfel mutația cu sens greșit în codonul 6 al genei pentru  $\beta$ -globină și substituția acidului glutamic cu valina ce produce sicklemlia se scrie: Glu6Val sau E6V. O mutație non sens ce înlocuiește glutamina din poziția 39 a  $\beta$ -globinei cu un „codon stop”, producând o formă trunchiată a  $\beta$ -globinei și determinând  $\beta^0$ -talasemia, se scrie Gln39X sau Q39X

**Substituțiile nucleotidice.** În descriere se va scrie mai întâi baza originală, numărul nucleotidului cu această bază, simbolul mai mare (>) și apoi noul nucleotid din poziția respectivă. Numărul nucleotidului se calculează de la primul nucleotid A din codonul inițiator (start) ATG care este +1 (nucleotidul precedent este -1; nu există nucleotid 0). Dacă este necesar se va folosi **g.** și **c.** pentru a indica o secvență de ADN genomic sau ADN complementar.

De exemplu, o mutație cu sens greșit se poate scrie G1444>A (uneori se mai scrie 1444G>A)

Pentru modificări în introni, se va specifica numărul intronului (desemnat cu inițialele IVS de la „intervening sequence”), numărul nucleotidului (+1, +2) începând cu situsul donor 5' sau invers (-1, -2) de la situsul 3' acceptor. D ex., IVS33+2T>A reprezintă o mutație în intronul 33 în situsul donor, în care T este înlocuită cu A.

**Delețiile și inserțiile.** Delețiile mici sunt indicate prin termenul „del” scris după numerele nucleotidelor delete; de ex., 1524-1527del sau 1524-1527delAGTA – deleția a 4 nucleotide (AGTA). Pentru a preciza modificarea aminoacizilor atunci se scrie mai întâi simbolul lor. De ex., F508del semnifică deleția fenilalaninei în poziția 508 (această modificare frecventă în mucoviscidoză s-a scris inițial  $\Delta$ F508, semnul delta semnificând deleție). Inserțiile mici sunt desemnate similar cu termenul „ins” după cele două nucleotide între care se produce inserția, urmat de nucleotidele inserate. De ex., 1277-1278insTATC denotă inserția a patru baze între nucleotidele 1277 și 1278, o cauză comună a bolii Tay-Sachs

## 1.1 SUBSTITUȚIA UNUI NUCLEOTID

Înlocuirea unui singur nucleotid (și deci a unei perechi de baze în ADN bicatenar) este o **mutație punctiformă** și reprezintă cel mai frecvent tip de mutație întâlnită la om. Astfel, din circa 130 de variante anormale ale hemoglobinei umane, 120 sunt produse prin substituții.

### a). Tranziții și transversii.

Se deosebesc două tipuri de substituții: **tranzițiile** care reprezintă înlocuirea unei baze pirimidinice (T sau C) sau purinice (A sau G) cu o bază de același tip și **transversiile** în care o bază pirimidinică (T sau C) este înlocuită de o bază purinică (A sau G) și *vice versa*. Teoretic, presupunând că substituția se face la întâmplare, transversiiile ar trebui să fie de două ori mai frecvente decât tranzițiile, deoarece orice bază poate suferi două transversii dar numai o singură tranziție (figura 6.3). În realitate, tranzițiile sunt mai frecvente ca transversiiile; excesul de tranziții este determinat probabil de acțiunea combinată a ADN polimerazei (ce poate încorpora eronat în procesul de replicare mai frecvent o bază *de același tip*) și acțiunii sistemelor de corecție (care recunosc mai ușor o încorporare de tipul transversiiei, ce antrenează o modificare mai importantă a diametrului moleculei de ADN, decât tranziția).

Printre tranziții, cele ce interesează dinucleotidul CpG (sau 5'-CG-3') sunt mai frecvente decât celelalte dinucleotide (TpG sau CpA), reprezentând cam o treime din toate substituțiile. Acest dinucleotid CpG se găsește mai ales în regiunile reglatoare ale transcripției (promotor), sub forma unor **insule CpG**, iar C situată în poziția 5' față de G este frecvent metilată. În plus, citozina suferă deseori o dezaminare spontană transformându-se în uracil, un component anormal al ADN care este ușor recunoscut și îndepărtat prin mecanismele de corecție. Dacă dezaminarea interesează metil-citozina, aceasta este transformată în timină, o

<sup>1</sup> Codul cu o literă: A-alanina, C-cisteina, D-acidul aspartic, E.acidul glutamic, F-fenilalanina, G-lizina, H-histidina, I-isoleucina, K-lizina, M-metionina, N-asparagina, P-prolina, Q-glutamina, R-arginina, S-serina, T-treonina, V-valina, W-triptofanul, Y-tirozina; X-semnifică un codon stop.

bază normală din structura ADN; în acest caz eroarea nu va fi ușor de recunoscut și corectat, producând o tranziție C→T sau G→A în funcție de catena ADN implicată (figura 6.4). Dinucleotidul CpG constituie deci „*un punct fierbinte*” de producere a mutațiilor în genomul uman; într-adevăr tranzițiile în acest dinucleotid au fost găsite, în diferite boli, de 10-20 ori mai frecvent comparativ cu alte dinucleotide<sup>2</sup> și circa 30% din toate substituțiile unui singur nucleotid sunt de acest tip.

#### b). Efectele substituției asupra informației genetice.

Efectele substituției unui nucleotid depind de localizarea intragenică a mutației: secvențe codante, secvențe intragenice necodante și secvențe reglatoare (vezi capitolul 3.B.1).

În regiunile codante (exoni) substituția se poate face într-un codon sens sau nonsens și modifică codonul respectiv, putând să-i schimbe semnificația (figura 6.5).

(1) Substituția într-un *codon sens* poate produce:

- Un *codon sens sinonim*, care semnifică același aminoacid; mutația este fără efect asupra polipeptidului codificat de genă (care va rămâne nemodificat), este neutră din punct de vedere fenotipic și evolutiv, și se numește **mutație silențioasă** (mută) sau **mutație sinonimă**;
- Un *alt codon sens* care semnifică un aminoacid *diferit*; acest tip de mutații *nesinonime*, care alterează „sensul” unui codon, se numesc **mutații cu sens greșit** („*missens*”). Ele se împart în două grupe:
  - substituții *conservative*, când este înlocuit un aminoacid cu altul care este chimic și funcțional *similar*, (face parte din aceeași grupă; de ex., lizina și arginina sunt aminoacizi bazici); adesea, efectul acestei substituții asupra funcției proteinei este minim (ambii aminoacizi au funcții similare);
  - substituții *neconservative*, când este înlocuit un aminoacid cu altul care este chimic și funcțional *diferit*; acest tip de mutații este frecvent (50%) în patologia genetică la om.
- Un *codon nonsens sau stop prematur*, care nu semnifică nici-un aminoacid; se formează un ARNm mai scurt și, dacă acesta este stabil, o proteină „trunchiată” (de obicei instabilă și degradabilă<sup>3</sup>); mutațiile nonsens constituie aproximativ 12% din toate mutațiile ce produc boli la om.

(2) Substituția într-un codon *nonsens* poate produce:

- Un codon sens care semnifică un aminoacid; deci codonul stop este anulat, transcripția continuă până la următorul codon stop și se formează un ARNm mai lung, care va codifica o proteină anormal de lungă.
- Rareori rezultă un *alt codon stop* (UAA→UAG) și mutația este fără efect asupra proteinei.

#### c). Consecințele substituției în raport cu localizarea intragenică

Efectele substituției unui nucleotid depind de localizarea intragenică a mutației: secvențe codante, secvențe intragenice necodante și secvențe reglatoare (figura 6.6).

(1) *Secvențele codante* sunt afectate în marea majoritate a mutațiilor patogene. Predomină substituțiile nucleotidice *nesinonime*, în special mutațiile cu sens greșit, care modifică:

- stabilitatea proteinei, localizarea intracelulară, maturarea proteinei, asamblarea ei în structuri multimerice,
- interacțiunile cu liganzii sau alte proteine,
- situsul funcțional pentru activitatea enzimatică etc).

Totuși, foarte rar, o substituție sinonimă (de obicei neutră) poate cauza un efect patogen prin *activarea unui situs criptic de decupare/matisare* (asemănător celor din introni) care va determina excluderea unei părți a exonului din ARNm. Remarcăm, de asemenea, că unii exoni pot avea în zonele cu dinucleotide CpG o rată mare de mutații.

(2) *Secvențele necodante intragenice*, și în special intronii, pot fi sediul unor mutații (în circa 10-15% din mutațiile patogene). Astfel, alterarea (prin substituție) a situsurilor de decupare

<sup>2</sup> În unele boli, din motive neclare, această probabilitate crește considerabil; de ex. în acondroplazie mutația CpG din gena pentru FGFR3 este de cel puțin 100 de ori mai frecventă decât cea interesând alte dinucleotide.

<sup>3</sup> Efectul depinde de poziția codonului stop, la începutul genei mai grav decât în regiunea terminală a genei.

a intronilor (în engleză - *splice site mutations*) – situsul donor (5'-GT) sau acceptor (AG-3') – face ca excizia să se producă la următorul exon și, ca atare, în ARNm matur se va încorpora o parte sau întregul intron sau va lipsi un exon (în engleză - *exon skipping*), în funcție de situsul afectat. Ambele situații au consecințe importante asupra expresiei genei (ARNm instabil; polipeptid nefuncțional). Ocazional au fost descrise mutații patogenice și în secvențele 5'UTR (hemofilia B Leyden) sau 3'UTR, transcrise dar netranslate, din primul și ultimul exon; ele pot modifica rata sintezei proteice.

(3) *Secvențele reglatoare* pot suferi mutații care, evident, modifică rata transcripției (dacă afectează elementele promotorului și interacțiunea lor cu factorii de transcripție) sau stabilitatea moleculei de ARNm formate (când afectează situsul de poliadenilare din regiunea 3') și deci cantitatea de proteină sintetizată; astfel de mutații se întâlnesc în talasemii.

#### **d). Mecanismele posibile de producere a substituțiilor**

Substituțiile nucleotidice pot fi produse fie spontan, prin erori în procesul normal de replicare a ADN, fie prin leziuni provocate în ADN de factori mutageni (chimici sau fizici).

- *Erorile de replicare* ale ADN apar prin împerecherea greșită a nucleotidelor (vezi 5.A.3.6). Ele sunt îndepărtate rapid prin procesul de corecție fie de către ADN polimeraza  $\delta$ , fie prin alte mecanisme de reparare; în final, rămân puține erori de replicare, aproximativ o mutație nouă la fiecare diviziune celulară.
- Mutațiile pot apărea și prin procese chimice spontane de *depurare*, *dezaminare*, *demetilare* sau după expunerea la mutageni chimici sau fizici (radiații ionizante sau ultraviolete).

## 1.2 DELEȚII ȘI INSERTII MICI

Un al doilea tip major de mutații este reprezentat de către delețiile sau inserțiile a unul sau mai multe nucleotide; ele reprezintă circa un sfert din toate mutațiile responsabile de producerea bolilor genetice la om.

- Dacă delețiile sau inserțiile sunt un multiplu de trei nucleotide se produce lipsa sau adăugarea unor aminoacizi în proteină. Un exemplu interesant este cel al mutației  $\Delta F508$  (sau F508 del, după nomenclatura actuală), ce produce aproape 70% din cazurile de fibroză chistică la Europeni; prin deleția a trei perechi de nucleotide din gena CF rezultă pierderea fenilalaninei (F) din poziția 508 a proteinei CFTR (vezi capitolul 11.B.4).
- Atunci când numărul nucleotidelor deletate sau inserate nu este un multiplu de trei se produce o *decalare (defazare) a cadrului de lectură al genei*, de la locul în care s-a produs deleția sau inserția (figura 6.7); să ne reamintim că citirea informației genetice se face continuu, în grupe de trei nucleotide sau codoni adiacenți, formați prin simpla grupare câte trei (vezi 4.B.3.a). Acest tip de mutații (în engleză *frameshift mutations*), produc frecvent un codon stop în *aval* de locul deleției/inserției, rezultând o proteină trunchiată.

Delețiile și inserțiile câtorva nucleotide survin cel mai adesea la nivelul unor secvențe scurte repetate în tandem, printr-un mecanism de *glisare sau derapare replicativă* (în engleză *slipped strand mispairing*), determinat de împerecherea decalată a acestor secvențe repetate. Așa cum se observă în figura 6.8, secvențele repetate din catena nou sintetizată (de ex., CAG CAG...), se pot alinia greșit (glisează înainte sau înapoi) față de secvențele repetitive complementare corespunzătoare ale catenei ADN matriță (de ex., GTC GTC...). În funcție de direcția de glisare se produc în catena nou sintetizată inserții (prin glisarea spre înapoi) sau deleții (prin glisare spre înainte). Acest fenomen de glisare replicativă se produce frecvent în cazul microsateliților sau minisateliților determinând polimorfismul cunoscut al acestor secvențe repetate în tandem de un număr variabil de ori (VNTR). El ar putea fi la originea expansiunii repetițiilor trinucleotidice (vezi secțiunea 1.4). Unele gene implicate în etiologia unor boli (gena CF - pentru CFTR implicat în fibroza chistică; gena FIX - pentru factorul IX implicat în hemofilia B; gena APC - pentru polipomatoza adenomatoasă de colon, ș.a) posedă în secvența codantă o serie de repetiții în tandem ale unui număr mic de nucleotide (figura

6.9), ce pot fi implicate în fenomenul derapării replicativ, producând deleția sau inserția unității repetitive, fapt ce va genera decalarea cadrului de lectură (o mutație *frameshift*).

### 1.3. REMANIERI GENICE ABERANTE

Remanierile genice aberante se realizează prin schimburi între secvențe de ADN identice sau cvasi-identice, alelice sau nealelice și generează deleții și inserții mari, duplicații, inversiuni și conversii genice. Comparativ cu alte tipuri de mutații descrise mai înainte, remanierile genice sunt mai rar întâlnite în etiopatogenia bolilor genetice dar relativ frecvente în anumite boli. De ex., 90% din cazurile de *amiotrofii spinale infantile* și 60% din cazurile de miopatie Duchenne sunt produse prin deleții genice importante.

#### **a). Recombinări genice prin recombinare omologă nealelică (inegală sau ectopică).**

Mecanismul principal al remanierilor genice este *recombinarea omologă nealelică (RON)(sau ectopică)* între secvențe identice sau cvasi-identice situate (în câteva exemplare) în amplasări diferite ale cromosomilor (figura 6.10). Ea se produce de obicei în profaza meiozei I atunci când cei doi cromosomi omologi se împerechează greșit (prin secvențele lor identice) – RON meiotică (intercromosomică) - sau, mai rar, în mitoză, prin schimb fie între cromosomii omologi, fie între cromatidele surori – RON somatică (intracromosomică sau intracromatidiană). Această recombinare (intermoleculară) poate duce fie la un schimb reciproc (CO) *inegal* (figura 6.11) prin care se modifică *ambele* cromatide (deleție sau duplicație „în oglindă”; inversie), fie la o *conversie genică* care este un transfer *unidirecțional* de informație și se modifică numai una dintre cromatide. Poate exista și o recombinare intracromatidiană, între secvențe omologe situate pe aceeași cromatidă. Aceste situații sunt ilustrate prin mai multe exemple.

- *Regiunea ce cuprinde gena țintă este duplicată în tandem.* Astfel, genele  $\alpha 1$  și  $\alpha 2$  ce codifică lanțurile de alfa-globină ale hemoglobinei sunt produse printr-o duplicație recentă; împerecherea greșită  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  (figura 6.12) va genera, prin CO inegal, deleția sau duplicația unei gene  $\alpha$ . Aceeași situație se întâlnește și pentru gena SMN (de la *survival motor neuron*), duplicată în regiunea 5q11.2-13.3; prin CO inegal se produce deleția exonilor 7 și/sau 8 a genei, ceea ce generează *amiotrofia spinală infantilă*.
- *Conversia genică este produsă prin schimburi nereciproce (unidirecționale)*, de mărime variabilă (de la câteva pb la câteva kb) între gene vecine, foarte asemănătoare dar neidentice. Ele se pot împerechea greșit și atunci una din gene - *donor* (desori o pseudogenă, inactivată prin mutații) - rămâne neschimbată iar cealaltă – *acceptor* - este modificată primind o parte din secvențele donorului (figura 6.13). Exemplul cel mai tipic privește genele codante pentru 21-hidroxilază, CYP21A și CYP21B, situate pe brațul scurt al cromosomului 6 în regiune HLA (vezi figura 3.3.c); numai gena CYP21B este funcțională, cealaltă genă - CYP21A - este o pseudogenă care a acumulat numeroase mutații inactivatoare. Circa 75% din cazurile de hiperplazie congenitală de suprarenală prin deficiență de 21-hidroxilază sunt consecința mutațiilor ce apar în gena CYP21B ca urmare a conversiei genice între pseudogena CYP21A și gena funcțională CYP21B; restul cazurilor sunt produse prin deleția genei CYP21B prin CO inegal (figura 6.14). Mecanismul de conversie genică pare implicat în generarea polimorfismului extrem al genelor complexului HLA.
- *Regiunea ce cuprinde gena țintă este flancată/ încadrată de secvențe repetitive scurte, identice*, care prin împerechere greșită și CO inegal vor genera deleția sau duplicația genei (figura 6.15). De ex., gena pentru proteina mielinei, PMP22, se află într-o regiune de 1,5Mb flancată de secvențe identice de circa 30Kb (vezi figura 5.18 și capitolul 5.C.1.3). După CO inegal se produce duplicația și deleția genei PMP22 care va genera două neuropatii ereditare diferite: boala Charcot-Marie-Tooth 1A și, respectiv neuropatia ereditară cu pareze induse de presiune (HNPP).

- *Repetițiile dispersate nealelice* (de tip *Alu*) predispun la aliniere greșită, CO inegal și producerea de deleții/duplicații; acest mecanism a fost identificat în gena receptorului pentru LDL, gena NF1, gena factorului IX al coagulării și altele.
- *Pe același cromosom, în interiorul sau vecinătatea genei țintă se găsesc secvențe identice*; prin recombinare intracromosomică (deci intramoleculară) între două copii se poate produce deleție sau inversii a unei mari părți din genă. De ex., în intronul 22 al genei pentru factorul VIII al coagulării (Xp28) se află o mică secvență nucleotidică care se mai găsește repetată, dar cu orientare opusă, de cel puțin două ori la extremitatea telomerică a genei (figura 6.16); prin recombinare între secvența intronică și una din secvențele omologe se produce o inversie a primilor 22 de exoni ai genei FVIII; această mutație recurentă produce circa 50% din cazurile severe de hemofilie A. Același fenomen se întâlnește în boala Hunter, o mucopolizaharidoză legată de X.

Toate cazurile descrise mai sus fac parte din **bolile genomice** care sunt produse prin *recombinarea omologă nealelică* între regiuni specifice din genom, cu duplicații sau cu un număr mic de repetiții identice sau foarte asemănătoare. Aceasta pare să fie un mecanism frecvent ( $10^{-4}$ ) și important de producere a unui nou tip de boli, numit *boli genomice* (Lupski, 1998) (vezi Casetă 6.3); ele sunt determinate de „*arhitectura*” specifică a genomului uman și prin aceasta se deosebesc de bolile monogenice convenționale, produse prin mutații specifice într-o genă (de obicei consecința unor erori de replicare și/sau reparare). În funcție de *mărimea* segmentului genomic implicat și de numărul de gene localizate în segmentul remaniat – deleția și/sau duplicația rezultată prin recombinare aberantă (intercromosomică, intracromosomică sau intracromatidiană; (figura 6.17)- poate produce: o boală mendeliană (tabelul 6.1), un sindrom al genelor contigue sau o aberație cromosomică a unui braț întreg.

**Tabelul 6.1. Bolile genomice Mendeleene**

(adaptat după Stankiewicz și Lupski, 2002)

Boală	Cod OMIM	Mod de transmitere	Poziție cromosomică	Genă	Tip de rearanjament
Sindrom Bartter tip III	601 678	AD	1p36	CLCNKA/B	deleție
Boală Gaucher	230 800	AR	1q21	GBA	deleție
Nefronoftizie juvenilă familială	256 100	AR	2q13	NPHP1	deleție
Distrofie musculară facio-scapulo-humerală	158 900	AD	4q35	FRG1?	deleție
Atrofia musculară spinală	253 300	AR	5q13.2	SMN	inversie/ duplicație
Hiperplazia corticosuprarenală congenitală tip III (prin deficit de 21 hidroxilază)	201 910	AR	6q21.3	CYP21	deleție
Aldosteronism cu răspuns la tratament cu glucocorticoizi (GRA)	103 900	AD	8q21	CYP11B1/2	duplicație
$\beta$ -talasemie	141 900	AR	11p15.5	$\beta$ -globină	deleție
$\alpha$ -talasemie	141 800	AR	16p13.3	$\alpha$ -globină	deleție
Boala polichistică renală tip 1 (ADPKD)	601 313	AD	16p13.3	PKD1	
Boala Charcot-Marie-Tooth (CMTA1)	118 220	AD	17p12	PMP22	duplicație
Neuropatia ereditară cu sensibilitate la pareze presionale (HNPP)	162 500	AD	17p12	PMP22	deleție
Neurofibromatoza tip 1 (NF1)	162 200	AD	17q11.2	NF1	deleție
Nanism hipofizar	262 400	AR	17q23.3	GH1	deleție
Deficit farmacogenetic al CYP2D6	124 030	AR	22q13.1	CYP2D6	deleție/ duplicație
Ihtioză	308 100	LX	Xp22.32	STS	deleție
Dicromatopsie pentru vederea colorată roșu/verde	303 800	LX	Xq28	RCP și GCP	deleție
<i>Incontinentia pigmenti</i>	308 300	LX	Xq28	NEMO	deleție
Hemofilia	306 700	LX	Xq28	F8	inversie
Distrofia musculară Emery-Dreifuss (EMD)	310 300	LX	Xq28	Emerină și FLN1	deleție/ duplicație/ inversie

Sindromul Hunter (mucopolizaharidoza tip III)	309 900	LX	Xq28	IDS	inversie/deleție
---	---------	----	------	-----	------------------

### b). Remanieri genice prin recombinare neomologă sau nelegitimă

Remanierile genice se pot produce și prin evenimente de recombinare neomologă sau nelegitimă între secvențe care nu prezintă sau au o foarte mică omologie de secvență. Este cazul celor mai multe deleții ale genei ce codifică distrofina. Nu se cunosc precis mecanismele moleculare ale recombinării nelegitime. Se crede că anumite elemente din structura genelor ar putea fi „puncte fierbinți” pentru aceste recombinări: secvențele alternante de purine-pirimidine, regiunile MAR (de la *matrix-associated region*) bogate în nucleotide A/T, situsurile de clivare ale topoisomerazelor, secvențele în palindrom etc.

#### CASETA 6.3

#### Boli genomice

*Bolile genomice sunt afecțiuni care rezultă prin rearanjarea ADN din genomul uman, datorită recombinării dintre regiuni distincte omologe dar nealele („paraloge”) (Lubski, 1998); aceste rearanjamente determină pierderea sau duplicația unei gene (sau unor gene). Bolile genomice sunt deci consecința arhitecturii speciale a unor regiuni din cromosom (sau cromosomi) spre deosebire de bolile monogenice convenționale, produse prin mutații specifice într-o genă (datorită erorilor de replicare și/sau reparare).*

*Rearanjările se produc prin recombinare omologă nealelică între regiuni specifice, de ~10-400 Kb, cu secvențe identice sau asemănătoare. Acestea sunt frecvent duplicații segmentare („dupliconi”) sau secvențe cu un număr mic de repetiții identice, localizate preferențial în anumite segmente ale cromosomilor, frecvent la centromer sau telomere (estimări recente arată că ~5-10% din genomul uman este duplicat). Datorită omologiei lor, secvențele respective se împerechează greșit și determină prin recombinare omologă meiotică (intercromosomică) sau mitotică (intracromosomică: schimb între cromatidele surori sau intracromatidiană) (figura 6.10) rearanjări cromosomice sau cromatidiene (deleții, duplicații, inversii, disruptii genice).*

*Recombinarea omologă nealelică mediată de secvențe repetitive mici este un fenomen frecvent ( $10^4$ ) și un mecanism major de producere a bolilor genetice. În funcție de mărimea segmentului implicat (figura 6.17) și de numărul de gene localizate în segmentul remaniat se pot produce: boli mendeliene (numeroase cazuri de: neurofibromatoza 1, nefronoftizia juvenilă familială, incontinența pigmenti s.a.) (tabelul 6.1); sindroame cu microdeleții (sdr. Williams, sdr. DiGeorge/Velocardiofacial etc); aberații cromosomice mari (inversii, isocromosomi X de braț lung, cromosomi supranumerari bisatelitici etc).*

*Folosirea unor metode noi de analiză (hibridizarea genomică comparativă – CGH - de înaltă rezoluție, microcipuri cu BAC de genom uman) va duce probabil la descoperirea unor noi boli prin rearanjamente genomice submicroscopice.*

#### 1.4. EXPANSIUNEA INSTABILĂ A REPETIȚIILOR TRINUCLEOTIDICE

După anul 1991 s-au descoperit peste 10 boli genetice produse prin **mutații instabile** sau **dinamice** ale unor *repetiții trinucleotidice*<sup>4</sup>; trei dintre acestea sunt relativ frecvente: retardul mintal cu X fragil (FRAXA), distrofia miotonică (sau boala Steinert) și boala (coreea) Huntington (tabel 6.2). Aceste afecțiuni se caracterizează prin *expansiunea instabilă* a unui segment de ADN ce conține o repetiție de trei nucleotide (CAG, CTG, CGG sau GAA), dispuse în tandem (deci adiacente); aceste repetiții se pot găsi în exoni, la capetele 5' sau 3' ale genei, sau în introni. Pe măsură ce gena trece de la o generație la alta, numărul de repetiții trinucleotidice crește progresiv, suferă o expansiune, și când depășește un *anumit prag critic* produce anomalii în expresia genei sau funcția proteinei codificată de genă.

<sup>4</sup> S-a stabilit prin convenție (1993) că nomenclatura tripletelor repetitive să se facă în ordinea alfabetică a bazelor azotate și în direcția 5'→3'.



**Tabelul 6.2. Exemple reprezentative de boli prin repetiții trinucleotidice**

Boala	Localizarea genei	Mod de transmisie	Repetiție	Localizarea repetiției	Număr de repetiții			Efect parental
					Alela normală	Pre-mutație	Mutație completă	
<b>Sindromul X fragil (FRAXA) (1:4000)</b>	Xq27.3	DLX (anticipație)	CGG	5'UT	< 60	60-200	> 200	matern
<b>Distrofia miotonică (1:8000)</b>	19q13.3	AD (anticipație)	CTG	3'UT	< 30	50-80	> 80	matern
<b>Ataxia Friedreich (1:50.000)</b>	9q13	AR	GAA	Intron 1	< 25	36 -100	> 100	matern
<b>Boala Huntington (1:12.000)</b>	4p16.3	AD (anticipație)	CAG	Regiune codantă	< 36	?	> 35	patern

Identificarea acestui mecanism mutațional nou a fost o surpriză deoarece:

- se deosebește fundamental de restul mutațiilor, *permanente și stabile* care, o dată produse, acestea se transmit nemodificate în succesiunea generațiilor și sunt prezente la toți bolnavii dintr-o familie;
- inițial se credea că acest tip de mutații dinamice nu se găsesc decât la om; ulterior au fost identificate și la alte specii, dar mult mai rar;

Genomul uman conține numeroase *secvențe repetitive* care ocupă poziții cromosomiale fixe (loci) și a căror complexitate variază de la gene integrale (de ex., genele pentru ARN ribosomal) la tracturi formate prin repetarea unuia sau câtorva nucleotide (*microsateliți*). Printre cele mai simple și mai frecvente sunt repetițiile unor mononucleotide SNP (de la *single nucleotid polimorfism*), repetițiile dinucleotidelor AC, repetițiile unor trinucleotide sau, mai rar, a unor secvențe mai lungi – repetate succesiv, în tandem. Funcțiile repetițiilor simple sunt încă neelucidate dar foarte probabil ele nu sunt “inerte” funcțional; Numărul de repetiții variază de la un individ la altul, ceea ce face ca secvența respectivă să fie *polimorfică* în populație. Aceste secvențe repetate sunt în general *stabile*, fiind transmise identic la generațiile următoare și putând servi atunci ca marker genetic.

– În unele cazuri, o repetiție trinucleotidică moderat amplificată (probabil prin CO inegal) poate produce boală dar repetiția este *perfect stabilă* și se transmite fără modificări de mărime în mai multe generații; de ex. o expansiune trinucleotidică stabilă în gena *HOXD13* produce o polisindactilie.

– În alte cazuri, numărul de repetiții trinucleotidice al secvenței poate să crească în succesiunea generațiilor, realizând o *expansiune progresivă* sau brutală a secvenței repetate, care este numită *instabilă*. În aceste cazuri, dacă secvența se găsește în interiorul sau vecinătatea unei gene, se produce o alterare a expresiei genei ce conține secvența și deci o stare de boală.

– În afara expansiunii repetițiilor trinucleotidice instabile există foarte probabil și expansiuni ale altor tipuri de repetiții. Astfel, o expansiune a unei repetiții de 12 nucleotide în gena *cistatin B* produce epilepsia mioclonică progresivă.

La bolile prin repetiții trinucleotidice ne vom referi în detaliu în capitolul 11.D dar aici vom preciza că modul lor de transmitere prezintă două caracteristici neobișnuite: există o creștere a riscului de apariție a bolii sau a severității și precocității manifestărilor clinice în succesiunea generațiilor (*anticipație*); formele cele mai severe se transmit de preferință printr-unul din părinți (“*efect parental*”).

*Expansiunea instabilă a repetițiilor trinucleotidice* este un mecanism nou și neașteptat, care ridică în discuție trei întrebări majore:

- cum se produce boala prin aceste expansiuni?
- care este mecanismul instabilității și expansiunii?
- cum au apărut aceste mutații în populațiile umane și, mai ales, cum au putut să se mențină la un nivel atât de ridicat?

#### **a. Mecanismul de producere a bolii prin expansiuni trinucleotidice.**

Caracteristica definitorie a mutațiilor dinamice o constituie **instabilitatea** lor, exprimată cel mai adesea prin creșterea numărului de copii trinucleotidice<sup>5</sup>. Instabilitatea devine manifestă cu ocazia diviziunilor pe care le realizează celula purtătoare, fie în timpul transmiterii de la părinți la descendenți (instabilitate intergenerațională sau “*instabilitate meiotică*”), fie prin mitoză, producând variații de mărime în țesuturile unui individ afectat (mozaicism somatic sau “*instabilitate mitotică*”). Instabilitatea se exprimă clinic sub formă de boală când este depășit un anumit *prag critic* de repetări. Sub pragul critic variațiile numărului de repetiții trinucleotidice generează polimorfisme ADN *benigne*. O nouă traversare a meiozei, de această dată în gonadele bolnavilor, se soldează – cel mai frecvent – cu expansiuni adiționale care, în generația următoare, vor imprima o simptomatologie mai severă și vor precipita debutul clinic, la o vârstă mai precoce. Acest fenomen, denumit **anticipație**, caracterizează aproape toate bolile prin repetiții trinucleotidice descrise până în prezent, dar se manifestă și în alte afecțiuni cu mecanism patogenic neclar.

*Intensitatea de manifestare a bolii* la descendenți este proporțională cu *dimensiunile* secvenței amplificate și depinde uneori de *sexul părintelui* prin care se face transmiterea: în sindromul X fragil și distrofia miotonică boala este mai gravă dacă transmiterea se face de către mamă, în timp ce în boala Huntington gravitatea formei clinice este mai mare când boala este transmisă de către tată. Mecanismul acestui “*efect parental*” este necunoscut.

Genele ce conțin expansiuni trinucleotidice instabile se împart în două clase majore:

(1). Gene care prezintă expansiuni *foarte mari* ale unor repetiții (CGG, CCG, CTG, GAA), localizate în secvențele *necodante* ale genei – în promotor, regiunile 5’ și 3’ transcrise dar netranslate sau în introni (tabelul 6.2, primele trei exemple). Expansiunea lor masivă *blochează transcripția* genei și produce *pierderea funcției genei*.

Alelele normale și stabile au de obicei 5-50 repetiții; alelele cu mărime intermediară - între 25-200 repetiții - sunt nepatogene (atenție: pragul critic este destul de mare) dar foarte instabile. Creșterea treptată a numărului de repetiții accentuează instabilitatea și realizează, în apropierea pragului critic, o **premutație**. Purtătorii de premutații sunt fenotipic normali dar vor avea descendenți afectați deoarece în celulele lor germinale se produce o expansiune bruscă a premutației care, prin depășirea pragului critic de repetiții, devine **mutație completă**.

(2). Gene ce prezintă o expansiune *moderată* a tripletului CAG (ce codifică glutamina) în secvențele *codante* (tabelul 6.2, exemplul patru); această expansiune nu modifică transcripția și translația dar alterează structura și *funcția proteinei* codificate (generând o secvență poliglutaminică anormală). Alelele normale și stabile au 10-30 repetiții, ele devin (ocasional) patogene la un *prag critic foarte îngust*<sup>6</sup> și determină o *alterare specifică a anumitor neuroni*<sup>7</sup>. Cu cât repetiția este mai mare cu atât boala debutează la o vârstă mai precoce. Acest mod de acțiune - după cum se vede diferit de primul grup - rămâne enigmatic.

Prezența unui mecanism unic de mutație (sau predominant) face ca identificarea mutației prin analiza ADN să fie cel mai bun mijloc de diagnostic exact a fiecăreia dintre bolile prin expansiunea repetițiilor trinucleotidice.

#### **b. Mecanismul expansiunii repetițiilor trinucleotidice.**

Mecanismul expansiunii nu se cunoaște exact dar probabil este *identice* la toate tipurile de repetiții trinucleotidice. Cel mai probabil expansiunea se produce prin fenomenul de *glisare sau derapare replicativă* (descriș mai sus; figura 6.8), determinat de alinierea greșită și împerecherea decalată a repetițiilor trinucleotidice. O dovadă: repetițiile „înterupte” prin introducerea unui triplet diferit (de ex., CAT în repetiția CAG) sunt stabile comparativ cu

<sup>5</sup> Repetițiile instabile sunt totdeauna modificate când sunt transmise de la părinți la copii. Se produc și expansiuni și regresii (contractii) dar, pentru motive neclare, predomină expansiunile.

<sup>6</sup> Imediat sub prag repetiția este nepatogenă, imediat peste prag ea produce boală.

<sup>7</sup> Unii autori consideră că tractul poliglutaminic din produsul genei determină agregarea proteinei în anumite celule, pe care le omorâ; alții cred că regiunea poliglutaminică ar interfera activitatea enzimei glicolitice *gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza* determinând o reducere masivă a producției de energie din glucoză; stresul metabolic este sever în neuroni, care obțin energie *numai* din glucoză.

repetițiile „omogene”. S-a sugerat că regiunile cu repetiții trinucleotidice pot forma, dincolo de un anumit prag de lungime, structuri spațiale anormale ale ADN (în „ac de păr” sau „triplu helix”) care perturbă replicarea și favorizează derapajul replicativ.

Există o serie de dovezi care susțin rolul fragmentelor Okazaki în expansiunea repetițiilor trinucleotidice. Unele repetiții trinucleotidice (precum CCG în *sindromul X fragil* sau CAG în *distrofia miotonică*) prezintă o distribuție bimodală a instabilității, cu o graniță între modificările minore și cele majore ale numărului repetițiilor trinucleotidice care este aproximativ egală cu dimensiunea unui fragment Okazaki. De asemenea, structurile secundare CAG/CTG și repetițiile CGG pot inhiba activitatea endonucleazei FEN1 implicată în procesarea fragmentelor Okazaki. Drojdiile mutante pentru Rad27 (echivalentul FEN1) prezintă tendința spre instabilitatea numărului secvențelor repetitive.

Mecanismul de glisare replicativă ar trebui să producă și *contractii* – prin deleții - alături de expansiuni (vezi figura 6.8) dar acest fenomen este rar și deloc instabil; nu se știe încă de ce se produc cu predilecție mai ales expansiuni. De asemenea nu se știe dacă modificările repetițiilor trinucleotidice la transmiterea intergenerații se produc în gametogeneză, la fecundarea sau în primele diviziuni din embriogeneză. În sfârșit, trebuie spus că glisarea replicativă a fost implicată și în fenomenul de *instabilitate a microsateliților* din anumite cancere dar bolile prin repetiții trinucleotidice nu se asociază cu un defect din repararea ADN și nici cu o incidență crescută a neoplaziilor.

Există și date care contrazic rolul replicării ADN în expansiunea repetițiilor trinucleotidice. Astfel, au fost identificate modele animale pentru boala Huntington la care se constată o creștere marcată a numărului repetițiilor CAG la nivelul neuronilor din striatum. Acești neuroni nu mai suferă diviziuni celulare, ceea ce arată că expansiunea repetițiilor trinucleotidice a apărut independent de replicare.

### **c. Originea mutațiilor prin expansiunea repetițiilor trinucleotidice.**

Se pune firesc întrebarea: cum s-au putut menține la un nivel de frecvență populațională ridicat două dintre bolile prin repetiții trinucleotidice – sindromul X fragil (transmitere legată de X) și distrofia miotonică (DM) (transmitere autosomal dominantă) – care reduc firesc eficacitatea reproductivă (*fitness*)? Un răspuns „imediat” ar fi: o producție foarte mare de mutații noi. Dar, neașteptat, s-a descoperit că în cele două boli există *un dezechilibru de înlănțuire*<sup>8</sup> între markeri polimorfici apropiați de genă, sugerând astfel un *efect de fondator!* Analiza locusului DM relevă că 10% din populație are *o alelă normală lungă* (cu 20-30 CTG) ce constituie *rezervorul* mutațiilor recurente, evoluând în mai multe generații spre „lungimea patologică”. Aceste alele lungi normale au apărut printr-un eveniment ancestral unic, fapt ce explică dezechilibrul de înlănțuire observat pentru alelele patologice. Date asemănătoare se cunosc și despre coreea Huntington: alelele patologice provin de la un tată sănătos, purtător al unei alele lungi normale (30-35 repetiții)

## 1.5 MECANISME RARE

- Genomul uman conține un număr mare de secvențe repetate *dispersate*, în special secvențe scurte (300 pb) de tip *Alu*, din familia SINE, sau secvențe mai lungi (3-7 kb) din familia LINE, derivate din retrotransposoni (vezi capitolul 2.C.2.2). Unele secvențe pot fi active și sunt capabile de transpoziție prin ARN intermediar, inserându-se aleatoriu în genom; dacă inserția se face în exoni, atunci se întrerupe secvența ce codifică o proteină; dacă inserția se face în introni poate fi afectată matisarea lor. Astfel, s-au descris cazuri de hemofilie A, distrofie musculară Duchenne, polipoză de colon produse prin inserția unei repetiții LINE 1 sau de neurofibromatoză 1 cauzate de inserția unui element transpozabil activ *Alu*. Mecanismul de mutageneză inserțională pare, din fericire, puțin activ la om.
- Rearanjările cromosomice, de tipul translocațiilor reciproce echilibrate, care au punctul de ruptură în interiorul unei gene, pot produce inactivarea ei. Acest mecanism este foarte rar dar important pentru localizarea foarte precisă și apoi clonarea genei implicate.

<sup>8</sup> Existența dezechilibrului de înlănțuire exclude posibilitatea ca expansiunile trinucleotidice să rezulte prin mecanisme de recombinare.

## 2. CONSECINȚELE GENOTIPICE ȘI FENOTIPICE ALE MUTAȚIILOR GENICE

Consecințele mutațiilor genice asupra genotipului și expresiei sale fenotipice sunt complexe și dependente de factori multipli. Analiza este dificilă, datorită volumului mare de informații, iar prezentarea lor nu poate fi decât sintetică și schematică.

### 2.1. MUTAȚII ÎN GENOMUL NUCLEAR ȘI MITOCONDRIAL

Cele mai multe mutații genice afectează *genomul nuclear* și, din acesta, ADN extragenic, care reprezintă imensa majoritate a genomului. Se produce astfel un foarte amplu *polimorfism al ADN*, care însă nu are consecințe fenotipice. În felul acesta marea majoritate a mutațiilor nu au consecințe asupra individului și se poate spune că „soluția imensității ADN extragenic, necodant” este benefică pentru evoluție. Din fericire, aceasta nu este unica „soluție de protecție” din natură: să ne amintim de existența ADN necodant din structura genelor, precum și de mutațiile sinonime („silențioase”) sau de cele conservative (vezi secțiunea B.1.1). Practic, numai anumite alterări în structura și expresia genică vor fi implicate în producerea unor boli, dar despre acestea vom discuta în secțiunea următoare.

*Genomul mitochondrial* reprezintă doar circa 1/200.000 din mărimea genomului nuclear. ADNmt se găsește în mii de copii în fiecare celulă somatică; dacă se produce o mutație într-o singură moleculă de ADNmt se poate presupune că șansa „fixării” ei va fi foarte mică și deci rata mutațiilor mitochondriale cu efect patogen va fi foarte joasă. Totuși, frecvența bolilor mitochondriale este suficient de mare pentru a considera genomul mitochondrial ca o țintă preferată („un punct fierbinte”) a mutațiilor. Acest paradox se poate explica prin:

- procentajul foarte mare al regiunilor codante din ADNmt (93% vs 3% în genomul nuclear);
- rata foarte înaltă a mutațiilor la nivelul ADNmt, supus unui „bombardament” continuu de către speciile reactive de oxigen ( produse de catena respiratorie din mitocondrii) și neprotejat de către histone; ADNmt suferă mai multe runde de replicare decât ADN cromosomic iar sistemele de reparare a leziunilor ADNmt sunt reduse și puțin eficiente;
- rata foarte mare de fixare a mutațiilor în ADNmt

Deci rata mutațiilor în ADNmt este foarte mare datorită combinației dintre instabilitatea crescută a ADNmt și rata înaltă de fixare a mutațiilor.

### 2.2 CONSECINȚELE MUTAȚIILOR ASUPRA INFORMAȚIEI ȘI EXPRESIEI GENICE.

Consecințele genotipice ale mutațiilor genice depind în principal de *tipul și localizarea mutațiilor* în structura genei.

#### **a). Efectul tipului de mutație.**

Efectul tipului de mutație – microleziuni (substituții, deleții și inserții nucleotidice mici) sau macroleziuni / remanieri genice (deleții, duplicații, inserții, inversii etc) – asupra informației genice a fost discutat în secțiunea anterioară. Fără a reveni, vom reaminti că substituțiile se produc cel mai frecvent în secvențele codante determinând, prin mutații nesinonime, modificări ale secvenței de aminoacizi ale proteinelor iar delețiile și inserțiile mici (non-multiplu de trei) produc decalarea cadrului de lectură și o proteină complet anormală. Remanierile genice importante determină o perturbare a expresiei genice afectând transcripția, procesarea ARNm, translația sau stabilitatea proteinelor.

#### **b). Efectul localizării intragenice a mutației.**

Orice componentă din structura genei (vezi 3.B.1) poate fi afectată de mutații (figura 6.6). În funcție de localizarea intragenică vom deosebi trei categorii principale de mutații:

- *mutații în regiunile codante* – determină sinteza unei proteine cu o structură anormală a cărei funcție va fi de obicei redusă sau abolită, mai rar crescută sau modificată, diferită de funcția inițială;
- *mutații care afectează matisarea ARNm precursor sau stabilitatea ARNm matur* – produc, în funcție de mecanism, fie o proteină anormală, fie o modificare a cantității de proteină normală sintetizată;
- *mutații care afectează dozajul genic (deleții, duplicații) sau reglarea procesului de transcripție* – determină scăderea sau creșterea sintezei proteice, mai rar o expresie inadecvată ca timp și spațiu.

În esență, mutațiile – în diferite regiuni din structura genei – produc fie o modificare a structurii proteinei, fie o perturbare a diferitelor etape ale expresiei genice (la nivelul transcripției, procesării și maturării ARNm precursor, al translației sau stabilității proteinei).

(1). *Transcripția*. Mutațiile pot afecta transcripția alterând elemente diferite necesare reglării acestui proces.

- Secvențele regiunii promotor (de ex. a genei codante pentru  $\beta$ -globină) pot fi modificate de mutații diverse care vor altera legarea factorilor de transcripție; în acest context vom sublinia că există și mutații ale genelor ce codifică factori de transcripție, deseori letale sau producând anomalii de dezvoltare;
- Secvențele 5'UTR sau 3'UTR, transcrise dar netranslate, din primul și ultimul exon al genei, pot suferi mutații ce modifică rata sintezei proteice. Au fost descrise mutații ale secvenței 5'UTR în gena pentru factorul IX ce produce hemofilia B Leyden și în gena FMR1 care determină sindromul X-fragil sau ale secvenței 3'UTR în gena DM ce produce boala Steinert.

(2). *Maturarea ARN premesager în ARNm*. Mutațiile pot afecta matisarea și poliadenilarea ARNm precursor (vezi capitolul 4.B.2.b).

- Alterarea (prin substituție) a situsurilor de decupare a intronilor<sup>9</sup> – situsul donor (5'-GT) sau acceptor (AG-3') – face ca excizia să se producă la următorul exon și astfel se va încorpora în ARNm matur o parte sau întregul intron sau va lipsi un exon<sup>10</sup> (în funcție de situsul afectat). Ambele situații au consecințe importante asupra expresiei genei (ARNm instabil; polipeptid nefuncțional).
- Activarea, prin mutație, a unui situs criptic de decupare (dintr-un exon sau intron) va antrena o competiție cu situsurile normale în cursul procesului de maturare a ARNm; aceste mutații pot produce o proteină trunchiată cu activitate funcțională nulă sau foarte redusă (în funcție de exonul afectat) sau vor bloca transcripția (când se produc în introni)

(3). *Translația ARNm în proteină*.

- Mutațiile codonului inițiator, mutațiile cu decalarea cadrului de lectură (*frameshift*) sau mutațiile non-sens determină de regulă absența formării proteinei codificată de gena ce a fost modificată sau producerea unei proteine trunchiate.
- Mutațiile cu sens greșit modifică semnificația unui codon și consecințele lor sunt variabile după natura schimbării și amplasarea în proteină a aminoacidului modificat. Mutațiile *nesinonime* pot afecta stabilitatea proteinei, localizarea intracelulară, maturarea proteinei, asamblarea ei în structuri multimerice, interacțiunile cu liganzii sau alte proteine, situsul funcțional pentru activitatea enzimatică etc). Mutațiile *sinonime* (sau neutre) sunt însă fără efect (exceptând situațiile de activare a unui situs criptic de matisare).
- Mutațiile în codonul terminator vor duce la încorporarea adițională de aminoacizi în proteină, care va deveni instabilă.

### 2.3. EFECTUL FENOTIPIC AL MUTAȚIILOR PATOGENE

<sup>9</sup> În engleză se numesc *splice site mutations*.

<sup>10</sup> În engleză se numește *exon skipping*

Alterând funcția unei proteine, mutațiile pot avea consecințe patologice majore, fiind astăzi unanim recunoscute ca o cauză importantă de boală sau predispoziție la îmbolnăvire.

Efectul fenotipic al mutațiilor patogene depinde de mai mulți factori:

- efectul mutațiilor asupra funcției proteinei; în esență este vorba de *pierderea și câștigul* de funcție, dar aceste aspecte sunt mai complexe și vor fi nuanțate și detaliate mai jos;
- tipul și funcția proteinei: enzimă, proteină structurală, receptor membranar, canal ionic etc;
- gradul în care fenotipul anormal va fi exprimat la heterozigoți; în bolile recesive prezența unei alele normale la heterozigoții *N/a* poate fi suficientă pentru menținerea unei stări normale; în unele boli dominante heterozigoții *A/n* au un fenotip mai puțin modificat comparativ cu homozigoții *A/A*;
- gradul în care expresia genei mutante va fi influențată de alte *gene modificatoare* care generează un fond genetic diferit la persoane diferite;
- natura celulelor (germinale sau somatice) și proporția de celule (în mozaicurile somatice) care au gena mutantă; mutațiile moștenite de la părinți, prin gameți, sunt prezente în toate celulele unui individ; mutațiile somatice vor avea efecte dependente de momentul ontogenetic în care se produc și, în consecință, de proporția celulelor ce formează clona anormală;
- originea parentală a mutațiilor, în cazul genelor cu *amprentare parentală*.

Asupra unora din acești factori, ce influențează în esență ereditatea monogenică, ne-am referit în capitolul anterior și vom reveni cu detalii și exemple în capitolul 11.A. Considerăm totuși utile pentru înțelegerea efectelor mutațiilor câteva precizări sintetice despre *efectul mutațiilor asupra funcției proteinei*.

Mutațiile patogene, cauzatoare de boală, pot avea – în funcție de tipul și mecanismul de acțiune – patru tipuri de efecte asupra funcției proteinei codificată de gena care a suferit mutația.

- (1) **Pierderea funcției.** Numeroase tipuri de mutații pot produce o pierdere totală sau parțială a activității normale a genei și deci a expresiei proteinei. Aceste mutații sunt la originea majorității bolilor cu transmitere recesivă, care se manifestă la homozigoți sau heterozigoți compuși (ambele gene alele sunt modificate); ele se pot găsi și în unele boli cu transmitere dominantă prin *haploinsuficiență*, cum ar fi hipercolesterolemia familială, în care formele heterozigote sunt mult mai puțin severe decât cele homozigote; totuși pierderea a 50% din activitatea genei este suficientă pentru producerea bolii.
- (2) **Câștigul de funcție.** Mutațiile asociate cu un câștig de funcție a proteinei sunt mult mai rare; ele pot acționa fie prin creșterea nivelului de expresie a proteinei (de exemplu, prin creșterea dozajului genic), fie prin creșterea abilității proteinei de a-și efectua funcția normală proteinei (de exemplu, activarea permanentă a unui receptor, în absența ligandului).
- (3) **Achiziția unor proprietăți noi de către proteina mutantă**, prin mecanisme diverse:
  - modificarea proprietăților structurale ale proteinei ce tind să polimerizeze sau să se agreghe (mutații ale genei  $\beta$ -globinei în sicklemie sau mutații ale genelor asociate cu amiloidoza);
  - achiziția unei funcții noi (variantele  $\alpha$ 1-antitripsină Pittsburg nu mai acționează ca o anti-elastază ci ca un puternic inhibitor al factorilor de coagulare);
  - producția unei proteine toxice (gena ce codifică precursorul peptidului pentru  $\beta$ -amiloid și produce forme precoce de boală Alzheimer);
  - participarea polipeptidului mutant la formarea unor complexe multimerice, alături de proteine normale, face ca întregul complex să fie anormal sau nefuncțional; acest efect a fost numit “dominant negativ” (de exemplu, genele *COL1A1* sau *COL1A2* ale collagenului).
- (4) **Expresia inadecvată a genei** fie ca timp (*expresie heterocronică*), fie ca loc (*expresie ectopică*), fie ambele. În această categorie se încadrează *persistența ereditară a*

*hemoglobinei fetale* sau expresia inadecvată a *oncogenelor*, în celule în care aceste gene nu sunt normal exprimate.

#### 2.4. CORELAȚII DINTRE GENOTIP ȘI FENOTIP

Studiul mutațiilor patogene, cauzatoare de boală, a dus la o mai bună înțelegere a relațiilor dintre genotip și fenotip în bolile genetice. Desigur, relația clasică „o genă → un caracter (boală)” ce stă la baza eredității monogenice rămâne valabilă pentru multe boli dar aceasta nu este singura corelație posibilă între genotip și fenotip. Cu riscul de a reveni asupra unor aspecte discutate, dar pentru a asigura o înțelegere completă a problemei, vom preciza aceste posibile corelații.

**O genă → o boală.** Multe afecțiuni monogenice sunt produse de mutația unei anumite gene. Totul pare simplu și clar. În realitate, posibilitățile actuale de analiză a genei și, implicit, de identificare a mutațiilor au arătat că lucrurile nu sunt simple iar problema corelației genotip-fenotip este destul de complexă. În unele boli (sicklemie, acondroplazie, boala Huntington, ș.a) mutația este unică, deoarece produce maladia printr-o modificare funcțională foarte precisă a proteinei sau a expresiei genei. În alte afecțiuni o anumită mutație este preponderentă, datorită unui „punct fierbinte” din structura genei ce determină recurența mutației (inversia în hemofilia A, deleția în amiotrofia spinală, expansiunea trinucleotidică în sindromul X-fragil etc). În numeroasele boli produse prin pierderea funcției unei proteine heterogenitatea mutațiilor din genă este aproape regula (de exemplu, mai mult de 130 de mutații în  $\beta$ -talasemie și peste 600 în fibroza chistică). Spectrul mutațiilor reflectă sensibilitatea genei la diferite mecanisme mutaționale iar corelația dintre anumite mutații și anumite manifestări clinice rămâne a fi definită în viitor.

**O genă → mai multe boli.** Există numeroase exemple care demonstrează că mutații produse într-o singură genă determină boli distincte, diferite. După un studiu a lui Pearson (1996) pe 750 de gene indexate în OMIM, 100 produceau prin mutații mai multe boli (2-7) diferite (în total 248). Cităm câteva exemple:

- mutațiile genei pentru *beta-globină* (pe cromosomul 11pter) produc sickleimia (AR),  $\beta$ -talasemia (AR), methemoglobinopatia (AD) și o hemoglobina instabilă (AD);
- mutații în gena *RET* (11q12) (ce codifică un receptor tirozinkinazic, implicat în migrarea celulelor din creasta neurală) produc boala Hirschprung și trei forme de cancer ereditar al glandelor tiroidă și suprarenală (neoplaziile endocrine multiple *MEN2A* și *MEN2B* precum și *cancer medular tiroidian*); un al treilea grup de mutații în gena *RET* produc ambele boli la același individ;
- gena *LICAM* (pe cromosomul Xq28) prezintă mutații în hidrocefalia prin stenoza apeductului Sylvius, sindromul MASA (*mental retardation, aphasia, shuffling gait, adducted thumbs* = retard mintal, afazie, mers "târșâit" - spastic și adducția policelor) și paraplegia spastică 1;
- gena *COL1A2* este implicată în patru forme diferite clinic de osteogenesis imperfecta și sindromul Ehlers-Danlos tipul VII B;
- mutațiile genei *FGFR2* (*receptorul factorului de creștere fibroblastică 2*) produc trei sindroame diferite cu craniostenoză, numite Crouzon, Pfeiffer și Jackson-Wiess.

**Mai multe gene → o boală.** Este vorba de *heterogenitatea nonalelică*, de locus, în care mutații în gene diferite se manifestă fenotipic identic sau foarte asemănător; în capitolul 4.A.5 și tabelul 4.1 am discutat mai multe exemple, precum și importanța practică a acestui fenomen relativ frecvent.

Vom mai adăuga un exemplu ilustrativ: **boala Hirschprung** („*megacolonul congenital*”) – caracterizată prin dezvoltare insuficientă a ganglionilor colonici, care produce secundar hipomotilitatea și distensia colonului, constipație severă cronică – se poate prezenta fie ca o formă izolată, fie ca o componentă a unor sindroame plurimalformative (sindromul Down, sindromul Waardenburg). Formele izolate au fost considerate mult timp ca fiind un exemplu de ereditate multifactorială. Studii recente au arătat că cel puțin jumătate din cazurile familiale și 20% din cazurile sporadice de boală Hirschprung sunt determinate de o

mutație într-una din următoarele cinci gene diferite: gena RET („*Rearranged during Transfection*”), care codifică un receptor pentru tirozin-kinaze, ligandul său GDNF, gena pentru receptorul B al endotelinelor (*EDNBR*), gena pentru *endotelina 3* (*EDN3*) și gena pentru enzima de conversie a endotelinei (*ECE1*). Vom mai adăuga faptul că în sindromul Waardenburg (pete hipopigmentate ale pielii sau meșă albă frontală, surditate neurosensorială, megacolon congenital) intervine o genă ce codifică factorul de transcripție *SOX10*.

**Ereditatea digenică: două gene pentru un fenotip.** Boala apare prin mutații concomitente în două gene nealele; de exemplu, o formă de *retinită pigmentară* este produsă numai dacă se produc concomitent mutații în gena *RDS* (pe cromosomul 6p) și în gena *ROM* (pe cromosomul 11q).

**O mutație → nu determină totdeauna același fenotip.** Fenotipul produs de o mutație poate fi influențat de acțiunea altor gene (de exemplu o aceeași mutație – C342R – în gena *FGFR2* poate produce sindromul Crouzon sau sindromul Pfeiffer) sau de factori de mediu (de exemplu, mutația în gena *PAH* poate produce prin deficiența fenilalanin hidroxilazei fenilcetonuria cu retard mintal sever, sau rămâne fără efect dacă bolnavii sunt depistați la naștere și primesc o dietă fără fenilalanină).

**Mutații în aceeași genă → forme dominante sau recesive ale bolii.** Deficiența în factorul von Willebrand este o tulburare a coagulării sângelui relativ frecventă (vezi capitolul 11.E) Unele mutații (deleții, nonsens, frameshift) în gena *VWF* (pe cromosomul 12p) produc o formă de boală cu transmitere recesiv autosomală iar alte mutații (mai ales substituții cu sens greșit) determină forme dominante

### 3. CAUZELE ȘI FRECVENȚA MUTAȚIILOR GENICE

Mutațiile genice se pot produce spontan, natural, cel mai frecvent prin erori accidentale în cursul replicării, sau pot fi induse de agenți exogeni sau endogeni, numiți mutageni. Aceste cauze – spontane sau induse – generează multiple și frecvente leziuni ale ADN, care au un potențial nociv major asupra informației ereditare.

O clasificare simplă a diverselor tipuri de leziuni ale ADN permite gruparea lor în trei mari categorii:

- Alterări ale bazelor purinice sau pirimidinice: dezaminări spontane, metilări, aditii variate, substituții sau pierderea lor și crearea de situsuri abazice ;
- Formarea de punți intra- sau intercatenare (prin agenți intercalanți);
- Rupturi simple, monocatenare, și bicatenare

Din fericire există în organism mecanisme de reparare eficace care reduc substanțial efectul defavorabil al mutațiilor.

#### 3.1. MUTAȚII SPONTANE

Schematic, se pot deosebi două mecanisme de generare a mutațiilor spontane

(1). Cea mai importantă sursă de leziuni ADN o reprezintă însuși *procesul de replicare*. În cursul replicării semiconservative (vezi 5.A.3.2) fiecare catenă a ADN „parental” servește ca matriță pentru sinteza unei noi catene; acest proces, efectuat de polimeraze, implică recunoașterea unei baze din catena matriță și adăugarea complementară a unui nucleotid la capătul 3' al catenei ce se sintetizează. ADN polimeraza  $\delta$  catalizează împerecherea corectă a A cu T și G cu C, făcând rareori erori. Și totuși, datorită unui fenomen de *tautomerie* (ce implică deplasarea unui atom de hidrogen din nucleotid), acestea pot forma structuri alternative care fac ca bazele să se împerecheze greșit (“*mismatch*”). ADN polimerazele corectează în mare măsură aceste erori. Acestea sunt mai rare în cazul ADN polimerazei delta, principala polimeraza implicată în replicarea ADN, dar relativ frecvente în cazul altor polimeraze. Pe ansamblu, erorile care rezultă în urma procesului de replicare au o frecvență de aproximativ 50.000/genom/zi. Dar organismul uman posedă alte sisteme de reparare care determină ca rata erorilor de împerechere apărute în cursul unei runde de replicare să fie extrem de redusă, de circa o încorporare greșită la  $10^9 - 10^{10}$  nucleotide.

(2). Există leziuni care pot să apară spontan, în *condiții fiziologice*, în absența replicării. De



exemplu, hidroliza reziduurilor nucleotidice poate să conducă la *situsuri abazice*; apariția lor poate fi favorizată de temperaturi crescute și acidifierea mediului celular. *Dezaminarea spontană* a citozinei, adeninei, guaninei sau 5-metilcitozinei poate conduce la formarea uracilului, hipoxantinei, xantinei și, respectiv, timinei.

### 3.2. MUTAȚIILE INDUSE

Mutațiile induse sunt determinate de agenți mutageni externi sau interni, fizici sau chimici.

(1). *Factorii de mediu extern* precum radiațiile ultraviolete (UV) – componentă a radiației solare, radiațiile ionizante și numeroși agenți chimici genotoxici pot cauza diverse alterări în structura ADN (tabelul 6.3) care, lăsate nereparate, pot conduce la apariția mutațiilor. Pe primul loc ca frecvență în această categorie se află radiațiile ultraviolete, ce produc dimeri pirimidinici. Din punctul de vedere al consecințelor, fumul de țigară este însă cel mai important agent mutagen exogen, acesta fiind responsabil de producerea mai multor decese prin cancer decât orice alt agent exogen cunoscut. Hidrocarburi policiclice se găsesc însă și în produșii de combustie; lor li se adaugă agenți alchilanți/metilanți ce poluează atmosfera, gudroanele de ulei, medicamente antitumorale, diverse minerale sau metale. Radiațiile ionizante (X, gama) induc în special rupturi mono- sau bicatenare ale ADN. La om, radiațiile ionizante - din surse naturale, profesionale, medicale sau accidentale - au probabil consecințe genetice mici (casetă 6.4) (datorită eficacității mecanismelor de reparare a leziunilor) reprezentate cel mai adesea sub formă de mutații recesive, care se vor manifesta numai dacă se întâlnesc doi heterozigoți cu o mutație identică. Organismele internaționale au definit o limită arbitrară de siguranță - mai mică decât cea care ar produce un efect semnificativ asupra frecvenței mutațiilor dăunătoare din populație - recomandând ca expunerea profesională să nu depășească 50 mSv pe an .

#### CASETA 6.4

##### **Radiațiile ionizante**

*Radiațiile ionizante includ unde electromagnetice cu lungime de undă foarte mică (razele gama și razele-X) precum și particule cu energie înaltă (particule alfa, beta și neutroni). Razele-X, razele gama și neutronii au mare putere de pătrundere comparativ cu particulele alfa și beta (numai câțiva milimetri). Cantitatea de radiații primită pe țesut iradiat se numește doză de radiații și este măsurată în doză absorbită de radiații sau rad (radiation absorbed dose). Oamenii pot fi expuși la un amestec de radiații și atunci se folosește o unitate convențională rem (roentgen equivalent for man) pentru a măsura orice radiație în termeni de raze-X. Un rem de radiație este acea doză absorbită care produce într-un țesut dat același efect biologic ca 1 rad de raze-X. Un milirem (mmrem) este a mia parte dintr-un rem. 100 rem este echivalent cu 1 sievert (Sv) iar 100 razi este echivalent cu 1 gray (Gy); pentru practică, sievert și gray sunt aproximativ egale.*

*Potrivit unei concepții mai vechi, bazată pe studii experimentale, orice iradiere produce mutații (nu există prag sub care iradierea să nu aibe efect), numărul de mutații produse de radiații crește proporțional cu doza, efectele genetice sunt cumulative. Studii recente par să infirme conceptul lipsei de prag, relevând că dozele mici stimulează activitatea mecanismelor reparării ADN.*

*Sursele de radiații la care este expus omul sunt naturale (radiații cosmice, materiale radioactive) și artificiale (radiologie diagnostică sau terapeutică, expunere profesională, expunere accidentală) iar doza medie de radiații primită pe gonade, din diferite surse, este apreciată (Clarke și Southwood, 1989) la 2,4 mSv pe an și 72 mSv pentru 30 de ani (perioada reproductivă)<sup>11</sup>.*

*La om efectele genetice ale radiațiilor sunt greu de studiat deoarece ele nu sunt manifeste la generația expusă ci numai la generațiile următoare și aceasta în funcție de tipul de mutație: dominant, recesiv sau legat de X. Studiile ample efectuate de către Neel și Schull la supraviețuitorii bombardamentelor atomice din Japonia au arătat că nu există diferențe semnificative ale nou-născuților morți, malformațiilor congenitale, deceselor neonatale, sex ratio (pentru mutații letale*

<sup>11</sup> După alte evaluări, o persoană ce trăiește într-o țară dezvoltată primește circa 6-7 remi (1/3 din surse medicale) iar „doza de dublare” (valoarea de iradiere dincolo de care proporția mutațiilor se dublează) este de 30-80 remi per generație.

legate de X), cancere înainte de vârsta de 20 de ani - la urmașii părinților expuși (la o doză de 30-60 remi) comparativ cu descendenții unui lot martor neexpus la radiații atomice. Rezultate similare au fost obținute și prin analiza efectelor iradierii medicale. În ceea ce privește iradierea profesională, mai ales în centralele nucleare, s-a descris o creștere semnificativă a numărului de copii cu leucemie din tați ce lucrează în aceste unități, posibil prin inducerea de mutații în celulele lor germinale. Alte cercetări nu au reușit, totuși, să ateste efectele leucemogene ale iradierii paterne. Și datele privind iradierea accidentală sunt contradictorii. Un studiu al persoanelor expuse la radiații după accidentul de la centrala nucleară de la Cernobîl indică o creștere de două ori a ratei mutațiilor germinale. Dar este dificil să se compare aceste date cu rezultatele studiilor Japoneze deoarece tipul de radiații este oarecum diferit, lotul de la Cernobîl este mic (79 de familii) iar grupul martor era din populația britanică. În concluzie, încercările de a demonstra că radiațiile produc alterări genetice la om nu au fost foarte convingătoare. Aceasta nu înseamnă că radiațiile ionizante nu au consecințe genetice ci numai ca acestea sunt probabil mici (mecanismele de reparare a leziunilor sunt destul de eficiente) și cel mai adesea sub formă de mutații recesive, care se vor manifesta numai dacă se întâlnesc doi heterozigoți cu o mutație identică.

Organismele internaționale au definit o doză permisivă de radiații. Aceasta este o limită arbitrară de siguranță și este foarte probabil mai mică decât cea care ar produce un efect semnificativ asupra frecvenței mutațiilor dăunătoare din populație. S-a recomandat ca expunerea profesională să nu depășească 50 mSv pe an, dar unele țări au scăzut această doză la 15 mSv. Pentru a avea o imagine clară asupra acestei doze (prin comparație cu iradierea medicală sau cosmică) trebuie spus că 1 mSv este echivalentul dozei primite la 50 de radiografii toracice și în 100 de zboruri de la București la Paris. Cu toate acestea, este obligatoriu să se evite orice expunere neneesară la radiații, în special pe gonade sau asupra fătului, și să se asigure obligatoriu o protecție maximă.

(2). Alte leziuni sunt produse de către diferite *agresiuni endogene* cum ar fi speciile reactive de oxigen (2-20.000 leziuni/genom/zi), o serie de molecule reactive mici (precum S-adenozil metionina: 600 leziuni/genom/zi) și mai ales produșii de peroxidare ai lipidelor (malondialdehida, acroleina și crotonaldehida care sunt metabolizate rapid către epoxizi și pot genera apoi alterări ale bazelor ADN). Organismul posedă un sistem antioxidant (superoxid dismutaza, catalaza, glutatation peroxidaza etc.) care încearcă să minimizeze aceste efecte. Atunci când capacitatea acestui sistem este depășită, acești agenți induc modificări ale bazelor ADN și rupturi monocatenare prin alterarea deoxiribozelor.

**Tabelul 6.3 Tipuri de leziuni ADN și agenții etiologici ai acestora**

Tipul de leziune ADN	Agentul etiologic
Erori de împerechere	Erori ale replicării
Situsuri abazice	Erori ale replicării, spontan
Deaminări	Spontan
Alchilări	Agenți metilanți (S-adenozil metionina)
Baze oxidate sau hidroxilate	UV-A, radicali ai oxigenului, radiații X, produși ai peroxidării lipidelor
Dimeri pirimidinici	UV-B (> 320 nm)
Adiția unor radicali chimici	Carcinogeni (atmosferici, alimentari, fum de țigară), citostatice
Legături încrucișate intracatenare sau cu proteinele	Carcinogeni, citostatice
Legături încrucișate intercatenare	Mitomicina C, cisplatinul
Rupturi monocatenare	Radiații X, inhibitori ai topoizomerazei I, radicali ai oxigenului
Rupturi bicatenare	Radiații gama, inhibitori ai topoizomerazei II

### 3.3. FRECVENȚA MUTAȚIILOR GENICE.

Rata mutațiilor unei gene se exprimă de obicei ca număr de mutații noi per locus per generație și se evaluează prin determinarea incidenței unor cazuri sporadice, noi, a unor boli autosomal dominante (cu penetranță completă) sau recesive legate de X, care au o expresie clinică ușor de recunoscut (de exemplu, acondroplazia, aniridia, hemofilia, distrofia musculară Duchenne ș.a). Determinările pentru diferite afecțiuni au dat valori ale ratelor

mutațiilor germinale cuprinse între  $10^{-4}$  și  $10^{-7}$  mutații per locus / per generație, cu o frecvență medie de  $1 \times 10^{-6}$ . Aceasta înseamnă că cel puțin una din 20 de persoane a primit de la unul din părinți o genă mutantă nouă.

Mutațiile noi se pot produce în spermatogeneză sau ovogeneză, în cursul diviziunilor mitotice sau meiotice ale celulelor germinale. Există însă diferențe importante între cele două sexe privind  *timpul de producere și numărul de diviziuni celulare pe care le suferă celulele sexuale*.

În ovogeneză, fiecare gamet este rezultatul a 22 de diviziuni mitotice și unei diviziuni meiotice (23 de diviziuni) ce se produc în cursul vieții fetale; după cum știm deja (vezi capitolul 5.C.2) meioza I se oprește înainte de naștere, rămâne astfel „suspendată” un timp îndelungat și este reluată numai după ovulație. Cu cât ovocitele rămân mai multă vreme în meioza I (și deci vârsta reproductivă maternă este mai mare) cu atât mai mult crește riscul nedisjunției meiotice. În spermatogeneză, producția de gameți se face până la vârste avansate și fiecare spermatozoid rezultă, în medie, după 200 de diviziuni iar acest număr crește cu vârsta. Explicație: spermatogoniile sușă se formează până la pubertate, prin circa 30 de mitoze; apoi sunt necesare 5 diviziuni pentru fiecare ciclu de spermiogeneză, care durează 16 zile (deci 23 cicluri pe an); numărul de diviziuni pentru formarea unui spermatozoid se calculează după formula următoare:  $30 + 23n + 5$ , în care  $n =$  vârsta în ani - 15 (vârsta pubertății). La o frecvență de  $10^{-10}$  erori de replicare per genom per diviziune fiecare spermatozoid al adultului va conține câteva sute de mutații noi produse prin acest mecanism. Deși marea lor majoritate nu vor avea efecte fenotipice aparente se estimează că o mică proporție de spermatozoizi (circa 1 din 10) vor avea o mutație patogenă.

Rezultă, logic, că frecvența neomutațiilor paterne produse prin erori de replicare a ADN ar trebui să fie mai mare decât a neomutațiilor materne și să crească odată cu vârsta tatălui, fapt observat în anumite boli, ca *neurofibromatoza, acondroplazia sau hemofilia B* (la bunicul matern al bolnavului). Acest fenomen este amplificat de faptul că metilarea citozinei în dimerul CpG este mai frecventă în celulele germinale masculine, determinând transversiiile de tip C→T sau G→A.

Astfel, mutațiile FGFR2 (receptorul factorului de creștere fibroblastică de tip 2) – responsabile de *sindromul Apert* (o craniostenoză asociată cu polisindactilie) – sunt toate de origine paternă. Mai mult, unele remanieri genice (inversia genei ce codifică factorul VII al coagulării sau deleția/duplicația genei PMP22, discutate mai sus) se produc, din motive necunoscute, exclusiv în celulele germinale masculine.

Diferențele de sex în producerea unor mutații se observă pregnant și în unele boli prin expansiunea repetițiilor trinucleotidice. Astfel, expansiunea amplă a repetiției CAG, ce produce formele juvenile de boală Huntington, este în general de origine paternă. Dar expansiunea masivă a repetiției CGG în sindromul X fragil se produce aproape întotdeauna în timpul gametogenezei feminine. Aceste diferențe pot exprima nu numai diferențele fundamentale dintre ovogeneză și spermatogeneză ci și o selecție contra gameților ce poartă expansiunea repetiției.

Multe mutații se produc, firesc, și în *celulele somatice* care efectuează un număr mare de replicări și diviziuni. Un organism uman adult are circa  $10^{14}$  celule derivate din zigot prin  $10^{15}$  diviziuni celulare; la o frecvență de  $10^{-10}$  erori de replicare per genom și per diviziune rezultă mii de mutații noi în genomul fiecărei celule. Dar consecințele lor fenotipice depind de natura mutației, gena alterată și țesutul implicat. Ele se întâlnesc frecvent în procesul de cancerogeneză și constituie, foarte probabil, una din cauzele heterogenității expresiei clinice a unor boli ereditare. Mozaicurile somatice ar putea produce boli genetice numai dacă se produc precoce, în cursul dezvoltării embrionare. Cert este că mutațiile somatice (non germinale) nu se transmit generațiilor viitoare.

#### 4. MECANISMELE REPARĂRII LEZIUNILOR ADN.

Genomul uman suferă numeroase și variate leziuni – spontane sau induse de agenți externi sau interni. Totuși rata mutațiilor este menținută la un nivel scăzut prin intervenția unor *sisteme de recunoaștere a leziunilor ADN și reparare enzimatică*, care realizează fie o restituție fidelă a structurii inițiale fie o reparare parțială, cu defect. Acțiunea acestor sisteme este corelată cu mecanismele care coordonează progresia prin ciclul celular, tolerarea unor leziuni sau apoptoza. Nici unul dintre mecanismele de reparare ale ADN nu are o eficiență

absolută dar, în general, performanța lor este ridicată. Existența unor boli umane asociate cu *defecte în repararea ADN*, multe din ele având o creștere a susceptibilității la cancer, demonstrează importanța acestui proces de “control al calității ADN”.

#### 4.1. MECANISMELE DE REPARARE ALE ADN NUCLEAR.

##### **a). Repararea erorilor de împerechere din cursul replicării ADN.**

În momentul în care cele două catene ADN sunt separate, nucleotidele activate se aranjează "spontan" și pe bază de complementaritate pe întreaga porțiune a matriței de ADN astfel expusă. Stoichiometria reacției de poziționare pe bază de complementaritate permite împerecheri greșite (în special G-T) cu o probabilitate de 1 la 10.000. În plus, replicarea secvențelor repetitive ale ADN se însoțește relativ frecvent de fenomenul de “alunecare (glisare)” (*slippage*) a ADN-polimerazei, ceea ce conduce la formarea unor bucle de către una din catene cu alungirea (inserție) sau scurtarea (deleția) secvenței repetitive (vezi figura 6.8). Rata mutațiilor este, însă, mult mai mică datorită intervenției unor mecanisme care asigură fidelitatea replicării și păstrarea informației ereditare.

Un prim mecanism implică ADN polimerazele care nu catalizează încorporarea pasivă a oricărui nucleotid care este deja legat prin punți de hidrogen la catena matriță, ci discriminează activ împotriva unor împerecheri greșite, acestea producând distorsiuni a dublului-helix ADN. *Distorsiunile acționează ca semnal pentru îndepărtare bazei inserate greșit*. Mecanismul crește acuratețea replicării de aproximativ 100 de ori, reducând rata așteptată a erorilor de la  $10^{-4}$  la aproximativ  $10^{-6}$ .

Un alt mecanism major răspunzător pentru acuratețea replicării ADN este activitatea de *autocorecție* (sau editare de la *proofreading*) a ADN polimerazelor. Ca un veritabil "editor", ADN polimerazele *verifică dacă ultimul nucleotid* plasat la capătul 3'OH al catenei de ADN este "scris corect", deci dacă nu există o greșeală de împerechere. În cazul unei astfel de erori ele pot să-l excizeze (datorită capacității exonucleazice 3' – 5' pe care o posedă) și să-l înlocuiască cu nucleotidul corespunzător. O astfel de activitate, demonstrată pentru ADN polimerazele delta și epsilon, permite creșterea acurateții replicării ADN de circa 100-1000 ori.

În sfârșit, puținele erori de împerechere care apar totuși în ciuda intervenției mecanismelor mai sus amintite vor fi ținta unor mecanisme de **reparare a erorilor de împerechere** (MMR de la *mismatch repair*) ce intervin după replicare.

**Sistemul MMR** a fost descris inițial la *E.coli* cu fenotipul *mutator (mut)*, ce determină o creștere a ratei mutațiilor spontane pentru toți locii din genomul bacteriei. Sistemul implică intervenția unor proteine speciale (proteine mutator): *Mut S*, *Mut L* și *Mut H* – ce formează așa numitul sistem de reparare “direcționat metil”. Denumirea derivă de la mecanismul de *identificarea a catenei* care conține nucleotidul împerecheat greșit. Această funcție pare a fi asigurată de diferența în statusul de metilare care există între catena nou sintetizată (nemetilată)<sup>12</sup> și catena matriță (metilată). În esență, împerecherea greșită produce o *distorsiune* a catenei nou sintetizate, nemetilată, *recunoscută* de proteina *Mut S* care se fixează la catenă și „recrutează” proteinele *Mut L* (care stabilizează complexul), *Mut H* (cu acțiune endonucleazică) și o helicază (*Mut U*, care desface duplexul ADN). *Mut H* va *cliva* catena de ADN și fragmentul de circa 100 pb va fi *îndepărtat* de o exonuclează. Golul rezultat va fi *reparat* de către ADN polimeraza, folosind secvența de baze a matriței. Pasul final este realizarea *legăturii* fosfodiester de către ADN ligază.

La om au fost identificate genele care codifică proteinele *MSH 2*, *MSH3* și *GTBP* (sau *MSH6*) – omologe cu *Mut S* – precum și proteinele *MLH1*, *PMS1* și *PMS2* – omologe cu *Mut L*. Nucleotidele împerecheate greșit sunt identificate prin intermediul a două complexe: *MSH2/MSH6* (*GTBP*) care recunosc în special erorile de împerechere și *MSH2/MSH3* care

<sup>12</sup> Metilarea este un proces postreplicativ și catena nou sintetizată nu este imediat metilată.

recunosc preferențial micile inserții/deleții. După recunoașterea erorii de împerechere, intervin complexe heterodimerice MLH1/PMS2 și MLH1/PMS1 ce interacționează cu complexe legate anterior (figura 6.18). În continuare, procesul de reparare presupune secționarea și degradarea exonucleazică a unui fragment ADN cu o lungime de peste 1-2 kb (ce conține erorile de replicare), urmată de refacerea secvenței normale. Pentru aceste acțiuni, mecanismul de reparare utilizează o serie de factori comuni altor sisteme de reparare (ADN-polimeraza  $\delta$ , RPA, PCNA, factorul de replicare C (RFC), exonucleaza 1, FEN1 și exonucleazele asociate ADN-polimerazelor  $\delta$  și  $\epsilon$ ).

Mutațiile genelor implicate în calea MMR au drept consecință o boală genetică, relativ frecventă, numită *cancerul colorectal nonpolipozic ereditar* (HNPCC), responsabilă de apariția a circa 5% din toate cazurile de cancer colorectal; boala se asociază un risc relativ crescut pentru dezvoltarea unor neoplazii maligne cu alte localizări.

Există câteva caracteristici ale neoplasmelor colorectale care apar în cadrul HNPCC: 70% sunt localizate proximal de flexura splenică, există un exces de cancere mucinoase sau cu infiltrație limfocitară iar evoluția pare a fi mai bună. Markerul principal al celulelor cu HNPCC este *instabilitatea microsateliților* (secvențe di-, tri- sau tetranucleotidice înalt repetitive, dispersate în genom). Circa 60-70% din cazurile de HNPCC sunt determinate de mutații ale genelor MLH1 și MSH2; un număr redus de cazuri sunt asociate cu mutații ale genelor PMS1, PMS2 și MSH6.

### b). Repararea bazelor modificate sau alterate după replicare

În afara erorilor ce se produc în timpul replicării, o altă sursă de mutații este modificarea chimică sau alterarea bazelor azotate după replicare. Leziunile ADN produse de agenți endogeni sunt îndepărtate de obicei prin mecanismul de *excizie a bazelor* (BER) modificate și mai rar prin *reparare directă* monoenzimatică (MGMT). Agenții mutageni exogeni care produc distorsiunea dublului helix prin legături încrucișate intra- sau intercatenare; aceste alterări sunt îndepărtate prin *excizia nucleotidelor* (NER).

Mecanismele BER, NER și chiar a MMR sunt variante ale unui mecanism general de **reparare prin excizie-resinteză**, ce diferă prin ținta lor, modul de recunoaștere a leziunii și moleculele efectoare. Acest mecanism se realizează în mai multe etape (figura 6.19):

- recunoașterea situsului lezat (bază sau nucleotid), prin acțiunea unor *enzime specifice*;
- desfacerea dublului helix, de către o *helicază*;
- excizia fragmentului de ADN alterat și a unui segment învecinat leziunii, prin intervenția unor endonucleaze;
- îndepărtarea și degradarea fragmentului, de către *exonucleaze*;
- resinteza componentelor breșei/lacunei (folosind ca matriță catena de ADN complementară) prin acțiunea unor *ADN polimeraze*;
- realizarea, de către o *ADN ligază*, a legăturii fosfodiester între fragmentul de ADN neosintetizat și capetele libere ale catenei de ADN.

(1). **Repararea prin excizia bazei** (*base excision repair- BER*). O bază modificată chimic (frecvent prin dezaminare spontană) este *îndepărtată* prin intermediul unor *ADN-glicozilaze*<sup>13</sup> care clivează legătura glicozil dintre baza azotată și deoxiriboză. Se creează astfel un *situs abazic* care este recunoscut de către *endonucleaza APE1* (apurinic/ apyrimidinic endonuclease 1), enzimă cu rol cheie în calea de reparare BER la om; această enzimă clivează catena ADN pe flancul 5' al situsului abazic. Apoi intervine *polimeraza  $\beta$*  (figura 6.20) care îndepărtează reziduul 5'-deoxiribozo-fosfat (dRp), inseră nucleotidul corespunzător catenei matriță și recrutează complexul *ligază 3 – XRCC1*, care va reface continuitatea catenei.

În unele cazuri reziduul 5'-deoxiribozofosfat rezistă la acțiunea polimerazei  $\beta$ , fiind necesară o cale alternativă, cu intervenția polimerazei  $\delta$  și îndepărtarea a 2 – 13 nucleotide ("long-patch BER"). În această cale alternativă, minoră la om, intervine și PCNA (antigenul nuclear al celulelor proliferante) și nucleaza FEN1 care împiedică formarea unor structuri secundare de către porțiunile ADN monocatenare apărute intermediar. Continuitatea catenei va fi restabilită de această dată de către ligaza 1.

(2). **Repararea directă monoenzimatică** (MGMT). Prin intervenția unor cataboliți celulari reactivi se formează O<sup>6</sup>-metilguanina. În acest caz se produce o reparare directă, prin

<sup>13</sup> Cea mai abundentă dintre ADN-glicozilaze este *uracil ADN-glicozilaza* (UNG) care produce îndepărtarea reziduurilor de uracil ce rezultă prin dezaminarea citozinei.

intervenția enzimei *metilguanin metil transferaza* (MGMT); aceasta transferă gruparea metil de la nivelul O<sup>6</sup>-metilguaninei pe un reziduu propriu de cisteină (figura 6.21) formând 5-metilcisteina, o moleculă foarte stabilă, care inactivează enzima. Repararea sacrifică în întregime o moleculă proteică pentru fiecare leziune corectată. De aceea, acest mecanism de reparare este foarte rapid saturat atunci când organismul este supus unor agenți alchilanți exogeni.

**(3). Repararea prin excizia nucleotidelor** (*nucleotid excision repair – NER*). Calea de reparare NER este utilizată pentru corectarea a diferite tipuri de leziuni ADN asociate cu *distorsiunea* structurii dublu-helicoidale, precum dimerii de pirimidină produși de radiațiile UV sau modificările chimice determinate de benzpiren, aflatoxină și cisplatin. Acest sistem de reparare este complex și implică un număr mare de proteine și gene.

Aceste gene au fost identificate la pacienți cu diferite mutații ce produc trei afecțiuni rare: *xeroderma pigmentosum* (XP), *sindromul Cockayne* (CS) și o formă cu fotosensibilitate a *trichotiodistrofiei* (TTD). Trăsătura comună este sensibilitatea foarte accentuată la expunerea solară ca urmare a reparării deficitare a leziunilor ADN induse de radiațiile UV; în schimb, celelalte manifestări clinice sunt extrem de diferite. Pacienții cu **XP** prezintă o creștere foarte accentuată, de peste 2000 de ori, a riscului pentru apariția unui cancer cutanat și, în multe cazuri, o neurodegenerare accelerată. Pacienții cu **CS** prezintă anomalii neurologice degenerative progresive foarte severe și manifestări de îmbătrânire precoce. **TTD** este caracterizată prin aspectul fragil al părului și unghiilor, precum și unele trăsături prezente și în CS. Heterogenitatea clinică este consecință heterogenității genetice. Pentru XP sunt identificate 7 gene (XPA – XPG). În cazul CS sunt implicate 5 gene: CSA, CSB și alele specifice ale XPB, XPD și XPG. TTD varianta cu fotosensibilitate este determinată de mutația a 3 gene: din nou XPB și XPD, precum și TTD.

Mecanismul prin care este *recunoscută leziunea ADN* este o problemă încă mult discutată. În prima etapă intervine un complex specific (XPC-hHR23B) care recunoaște distorsiunea ADN produsă de agenții mutageni și *localizează* catena lezată. A doua etapă implică întreruperea activității helicazelor (XPB și XPD din structura TFIIH) și, în cazul particular al leziunilor induse de radiațiile UV, fixarea la acest nivel a unui factor specific (UV-DDB, alcătuit din subunitățile p125 și p48). Următoarea etapă în calea NER este formarea la nivelul leziunii a unui macroagregat proteic necesar pentru *incizia duală a catenei* care conține leziunea. După *îndepărtarea* unui fragment de 24-32 de nucleotide care conține leziunea, are loc *resinteza ADN*, prin intermediul ADN polimerazei  $\delta$  sau  $\epsilon$ , și *legarea capetelor*, prin intermediul ligazei 1 (figura 6.22).

Modelul descris mai sus este utilizat pentru repararea ADN-ului netranscris, majoritar în genom. În cazul special al genelor transcrise, leziunile care împiedică activitatea de elongare realizată de ARN polimeraza II în cursul transcripției sunt reparate printr-un sistem cuplat cu transcripția (*transcription-coupled repair – TCR*). Corectarea este realizată de 5-10 ori mai rapid, cu participarea acelorași factori utilizați pentru ADN-ul netranscris (cu excepția XPC). Semnalul de recunoaștere a leziunii este blocarea progresiei ARN polimerazei II. În plus, intervin și proteinele CSA și CSB (implicate în sindromul Cockayne), care au rolul de a cupla activitatea ARN polimerazei II cu mecanismul de reparare.

### c). Repararea rupturilor ADN

Rupturile monocatenare ale ADN sunt produse de speciile reactive de oxigen și reparate prin intermediul enzimelor responsabile de ultimele etape ale mecanismului BER.

Rupturile bicatenare ale ADN, mai rare decât cele monocatenare, pot apărea fie spontan (în cursul replicării, recombinării meiotice sau recombinării somatice VDJ, ce are loc în sinteza imunoglobulinelor), fie ca urmare a expunerii la radiațiile ionizante. Repararea rupturilor bicatenare este un proces complex care se realizează în mai multe etape. Prima etapă constă în *sesizarea* prezenței unei rupturi ADN bicatenare, prin intervenția probabilă a unui complex multiproteic numit BASC (*BRCA1-associated genome surveillance complex*)<sup>14</sup>. Următoarea etapă este una de *semnalizare*, care implică activitatea a două kinaze înrudite: ATM și ATR. Acestea produc *activarea* unor proteine importante pentru repararea propriuzisă (NBS1 sau BRCA1) sau blocarea ciclului celular, la nivelul punctului de control G2/M (prin intermediul proteinelor MDM2 și P53). După aceste etape comune, celula alege unul din mecanismele alternative de reparare: recombinare omologă sau unirea neomologă a capetelor.

<sup>14</sup> Complexul BASC conține proteinele BRCA1, ATM, complexul NBS1-MRE11-RAD50, proteinele MSH2/MSH6 și MLH1 care intervin și în calea MMR și helicaza BLM.

- **Recombinarea omologă** (*homologous recombination* – HR) este mecanismul cel mai frecvent utilizat la om și este un mecanism de reparare precis, care utilizează pentru reparare o catenă de ADN intactă de pe cromatida soră sau de pe cromosomul omolog;
 

Recombinarea omologă debutează prin procesarea inițială a capetelor rupte de către complexul NBS1-MRE11-RAD50 (activat de către proteina ATM) care va conduce la formarea unor capete 3' monocatenare (figura 6.23). RAD52 se atașează la capetele monocatenare astfel formate și le protejează. Apoi, ADN-ul intact de la nivelul cromatidei soră sau a cromosomului omolog este utilizat ca matriță pentru a înlocui informația genetică în cursul procesului nucleolitic. În final intervine o etapă de ligare care completează acest mecanism de reparare a ADN.
- **Unirea neomologă a capetelor** (*non-homologous end-joining* – NHEJ) un mecanism predispus la erori (mici inserții sau deleții), în care capetele rupte ale ADN sunt unite fără nici o omologie, ori cu ajutorul unor secvențe omologe scurte (< 10 pb).
 

Unirea neomologă a capetelor rupte debutează prin legarea heterodimerului KU70/KU80 la nivelul capetelor ADN care activează apoi o proteină kinază ADN-dependență. Intervine, de asemenea, complexul NBS1-MRE11-RAD50 care are atât activitate enzimatică cât și structurală. Una dintre activitățile importante ale proteinei NBS pe această cale este activarea recombinazelor RAG1 și RAG2 (care intervin în procesul de recombinare VDJ din cursul sintezei imunoglobulinelor). Complexul XRCC4/ligază 4 este necesar pentru unirea capetelor rupte. Repararea poate fi în acest caz fie precisă, fie cu pierderea sau adăugarea unor nucleotide ceea ce conduce la o mutație.

Mutațiile genelor care codifică proteine ce intervin în repararea rupturilor ADN pot determina numeroase boli: ataxia telangiectazia, sindromul Nijmegen, sindromul Bloom, anemia Fanconi, cancerul de sân ereditar. Majoritatea lor implică mutații ale proteinelor ce intervin în calea HR și au transmitere recesivă, deși există și exemple de boli cu transmitere dominantă.
- *Ataxia telangiectazia* (AT) este o afecțiune rară (circa 1 la 100.000 locuitori), care se manifestă clinic prin ataxie (datorită unei degenerări neuronale progresive), prezența telangiectaziilor vizibile în special la nivelul conjunctivei bulbare, radiosensibilitate, imunodeficiență și un risc crescut pentru apariția cancerelor, mai ales a limfoamelor. Heterozigoții (circa 1% din populație) au un risc crescut pentru cancerul de sân. Boala este determinată de mutația genei ATM (cromosomul 11q22) care codifică o proteină kinază ce activează numeroase proteine implicate în căile de reparare ale rupturilor ADN sau în punctul de control G2/M a ciclului celular.
- *Cancerul de sân ereditar* este una dintre cele mai frecvente boli genetice (circa 1 la 800 de indivizi) caracterizată printr-un risc crescut de apariție a unui neoplasm mamar (36-85%), precum și pentru cancerul de ovar (16-60%). Debutul bolii este adeseori precoce și uneori bilateral. Au fost identificate două gene: BRCA1 (17q21) și BRCA2 (13q12) ce codifică proteine care interacționează cu RAD51 în calea de reparare HR a rupturilor ADN bicatenare (13).

#### 4.2. REPARAREA LEZIUNILOR LA NIVELUL ADN MITOCONDRIAL.

Absența histonelor cu rol protector și mediul foarte bogat în specii reactive de oxigen rezultate în cursul sintezei ATP fac ca ADN-ul mitocondrial să fie mult mai susceptibil la anumite tipuri de leziuni comparativ cu ADN-ul nuclear. În prezent se cunoaște că la nivelul acestor organe funcționează unele mecanisme de reparare prezente și la nivel nuclear, în timp ce altele sunt absente. Astfel, mitocondriile prezintă capacitatea de reparare a O<sup>6</sup> metilguaninei prin intermediul enzimei MGMT. De asemenea, au fost identificate numeroase componente care intervin în mecanismul BER, precum unele ADN glicozilaze, endonucleaza APE1 etc. În schimb, mecanismul NER este absent. Rata mutațiilor care persistă în urma intervenției acestor mecanisme de reparare este considerată a fi de 10 ori mai mare decât în cazul genomului nuclear și aceasta contribuie la procesul de îmbătrânire și la apariția unor boli degenerative.

#### 4.3. TOLERAREA LEZIUNILOR ADN

În punctele de control ale ciclului celular sunt declanșate mecanismele care blochează progresia celulelor cu leziuni ale ADN pentru a permite repararea lor înainte replicării. Dar aceasta viziune este o suprasimplificare deoarece în prezent devine tot mai clar faptul că, în anumite condiții (de exemplu, „saturarea” mecanismelor de replicare datorită leziunilor prea

numeroase) celulele pot tolera unele dintre leziunile ADN, fără a le corecta. Când ajung în dreptul leziunii catenei matriță, ADN polimerazele sunt confruntate cu următoarea alternativă:

- inseră la întâmplare un nucleotid și depășesc astfel „punctul critic”, replicând restul ADN din replicon; celula supraviețuiește dar leziunea ADN persistă; efectul va depinde de localizarea leziunii în genom;
- lasă o breșă în catena nou sintetizată și reiau replicarea în aval de locul leziunii; lacuna produsă poate fi uneori rezolvată ulterior (prin intervenția unui sistem enzimatic de recombinare postreplicativă).

Prin ambele alternative se poate corecta leziunea sau se produce o reparare infidelă, cu defect.

## C. ANOMALIILE CROMOSOMICE

Anomaliile cromosomice pot fi definite ca fiind modificări produse de o alterare vizibilă a cromosomilor. Evidențierea acestor modificări depinde de tehnica de studiu folosită. Dacă rezoluția maximă a metodelor tradiționale este de circa 4 megabaze, tehnicile de citogenetică moleculară permit observarea unor leziuni cu mult mai mici, ceea ce face dificilă delimitarea clară între anomaliile cromosomice și mutațiile genice masive (macroleziuni). În aceste condiții, anomaliile cromosomice se definesc ca modificări genetice produse prin *mecanisme cromosomice specifice*: segregarea anormală a cromosomilor în meioză sau mitoză, recombinare intercromosomică aberantă sau reparare greșită a rupturilor cromosomice.

Cele mai multe dintre anomaliile cromosomice produc un dezechilibru genetic care determină anomaliile fenotipice diverse (întârziere de creștere și dezvoltare, anomaliile congenitale multiple, retard mintal, tulburări de sexualizare și reproducere, unele forme de cancer, ș.a) și cu gravitate diferită. Dacă la aceste consecințe clinice variate și semnificative, prezente în numeroase specialități medicale, adăugăm și frecvența mare a anomaliilor cromosomice ( $\geq 8\%$  din sarcinile recunoscute clinic, 0,7-1% nou născuții vii) atunci obținem argumente solide pentru a aprecia ca patologia cromosomică este o problemă majoră de sănătate publică.

### 1. TIPURILE ȘI MECANISMELE DE PRODUCERE ALE ANOMALIILOR CROMOSOMICE.

#### 1.1 CLASIFICAREA ANOMALIILOR CROMOSOMICE

Anomaliile cromosomice pot fi clasificate în raport cu mai multe criterii (tabelul 6.4).

După momentul producerii lor, anomaliile cromosomice se împart în: **anomaliile constituționale și anomaliile dobândite**. Anomaliile constituționale sunt prezente la naștere și au originea în cursul gametogenezei unuia dintre părinți sau în primele etape ale embriogenezei. Anomaliile dobândite apar ulterior în cursul vieții, sub forma unor clone celulare anormale.

**Tabelul 6.4 Clasificarea anomaliilor cromosomice**

Criteria	Tip de anomalie
momentul apariției	constituționale dobândite
modul de afectare al materialului genetic	numerice - poliploidii - aneuploidii structurale - echilibrate - neechilibrate disomii



	uniparentale
numărul de celule afectate	omogene în mozaic
tipul de cromosom afectat	autosomale gonosomale
tipul de celule afectate	somatice germinale

În raport cu modul de afectare al materialului cromosomic anomaliile pot fi împărțite în: **numerice, structurale și funcționale.**

- **Anomaliile cromosomice numerice** sunt modificări ale numărului de cromosomi în raport cu numărul normal diploid de  $2n = 46$  de cromosomi. Anomaliile numerice se clasifică în: *poliploidii și aneuploidii*. Poliploidii reprezintă prezența în plus a unuia sau mai multor seturi haploide complete de cromosomi. Aneuploidii se caracterizează prin prezența în plus sau absența unuia sau mai multor cromosomi.
- **Anomaliile cromosomice structurale** se caracterizează prin modificarea structurii normale a cromosomilor. Ele se împart, în raport cu efectul fenotipic, în: *anomalii echilibrate și anomalii neechilibrate*. Anomaliile cromosomice structurale echilibrate (translocații și inversii) sunt caracterizate printr-o modificare a poziției unuia sau mai multor segmente cromosomice, fără afectarea cantității totale de material genetic și, implicit, fără afectarea fenotipului (în marea majoritate a cazurilor). Anomaliile cromosomice structurale neechilibrate (deleții, duplicații, cromosomi inelari, cromosomi dicentrici și isocromosomi) sunt caracterizate prin prezența suplimentară (trisomie parțială) sau absența (monosomie parțială) unor părți din cromosom sau asocierea dintre surplusul și lipsa unuia sau mai multor segmente cromosomice.
- **Anomaliile cromosomice funcționale** sunt reprezentate de *disomia uniparentală*, caracterizată prin prezența la același individ a unei perechi de cromosomi ce provine de la același genitor.

În raport cu numărul de celule afectate, anomaliile cromosomice pot fi împărțite în: **omogene și în mozaic**. Anomaliile omogene se caracterizează prin prezența anomaliilor în toate celulele individului afectat. Anomaliile în mozaic sunt caracterizate de prezența a două sau mai multe linii celulare care diferă prin numărul de cromosomi, dar derivă din același zigot.

În funcție de tipul de cromosom afectat, anomaliile cromosomice se clasifică în: **anomalii autosomale** (sunt interesați unul sau mai mulți autosomi) **anomalii gonosomale** (anomalia implică cromosomii X sau Y) și **anomalii mixte** (când sunt implicați cel puțin un autosom și un gonosom).

În raport cu tipul celulei afectate, anomaliile cromosomice se clasifică în: **anomalii somatice** (modifică fenotipul individului afectat) și **anomalii germinale** (anomalia nu modifică fenotipul pacientului, dar se poate transmite prin gameți la descendenți).

Pentru nomenclatura tuturor acestor tipuri de anomalii cromosomice se folosește un sistem standardizat, elaborat de participanții la diferite conferințe internaționale (ISCN<sup>15</sup>, Paris, 1995; vezi tabelul 2.6 și capitoul 2.D.3.3).

## 1.2. ANOMALIILE CROMOSOMICE NUMERICE

Numărul de cromosomi al speciei umane este de 46. Celulele somatice normale sunt *diploide* ( $2n=46$  cromosomi) în timp ce celulele sexuale mature normale – ovulul și spermatozoidul – sunt *haploide* ( $n=23$  cromosomi). Anomaliile numărului de cromosomi se împart în două categorii: poliploidii și aneuploidii; acestea pot fi omogene sau în mozaic<sup>16</sup>.

<sup>15</sup> ISCN-(*International System of Chromosomal Nomenclature*) – Sistemul Internațional de Nomenclatură a Cromosomilor

<sup>16</sup> Unii autori împart anomaliile de număr în poliploidii, aneuploidii și mixoploidii (mozaicuri și himere).

Este util de precizat că orice multiplu *exact* a lui  $n$  este numit **euploidie**; constituția cromosomică euploidă ( $n$ ,  $2n$ ,  $3n$ ,  $4n$ ) nu este obligatoriu normală. Termenul de **aneuploidie** se referă la orice situație în care numărul de cromosomi *nu este euploid*, fie că un cromosom este în plus sau lipsește

### a). Poliploidiiile

Poliploidiiile se caracterizează prin prezența în plus a unuia sau mai multor seturi haploide ( $n=23$ ) de cromosomi. Singurele poliploidii identificate la om sunt: **triploidia** ( $3n=69$  cromosomi) și **tetraploidia** ( $4n=92$  cromosomi). Cauza cea mai frecventă a triploidiei este *dispermia* (fecundarea unui ovul de către doi spermatozoizi; mai rar, triploidia poate rezulta prin fertilizarea unui gamet normal ( $n$ ) de către un gamet diploid ( $2n$ ): spermatozoid (diandrie) sau ovul (diginie). Tetraploidia se produce de obicei printr-o eroare în prima diviziune a zigotului: ADN a fost replicat și cantitatea totală devine  $4C$ , dar nu are loc diviziunea.

Poliploidiiile se caracterizează prin modificări importante ale cantității de material genetic, care produc modificări majore ale fenotipului, de obicei cu efect letal; acest fapt determină pierderea foarte precoce, în primele săptămâni de sarcină, a produsului de concepție poliploid. Astfel, triploidiiile se întâlnesc la 1-3% din sarcinile recunoscute clinic dar marea majoritate a embrionilor sunt eliminați (15-20% din avorturile spontane cu anomalii cromosomice); triploidia (de obicei sub formă de mozaic  $3n/2n$ ) se găsește numai la 1 din 10.000 de nou-născuții vii, care, evident, nu supraviețuiesc.

Deși poliploidiiile omogene au efecte foarte grave, în unele țesuturi umane pot fi întâlnite în mod normal celule poliploide. Astfel, în ficat celulele implicate în regenerarea hepatică sunt tetraploide, în timp ce în măduva osoasă hematogenă există megacariociote octaploide sau chiar cu 16 seturi haploide de cromosomi.

### b). Aneuploidiiile

Aneuploidia reprezintă o anomalie cromosomică<sup>17</sup> produsă fie prin pierderea unui cromosom (*monosomie*), fie prin prezența în exces a unui cromosom (*trisomie*), mai rar a doi cromosomi (*tetrasomie*); ele pot interesa autosomii sau cromosomii sexuali.

- *Monosomiile* sunt anomalii caracterizate prin prezența într-o celulă somatică a unui singur cromosom, în locul unei perechi de cromosomi ( $2n-1$ ). Monosomiile autosomale au fost descrise numai la embrioni și, fără excepție, monosomiile autosomale complete sunt letale. Singura monosomie compatibilă cu viața la om este monosomia X.
- *Trisomiile* se caracterizează prin prezența într-o celulă somatică a trei exemplare ale aceluiași cromosom, în locul perechii normale de cromosomi omologi ( $2n+1$ ). La specia umană majoritatea trisomiilor complete sunt letale, ducând la avorturi spontane precoce. Singurele excepții sunt trisomiile autosomale: 21, 18, 13, 8 (dar numai în mozaic), și cele gonosomale (XXX, XXY și XYY).
- În cazul anomaliilor gonosomilor sunt posibile și *tetrasomii* (48,XXXX, 48,XXYY, 48,XXXY) sau chiar *pentasomii* (49,XXXXX, 49,XXXXXY). Au fost descrise însă tetrasomii parțiale: 9p, 12p, 18p, 21q

*Aneuploidiiile omogene* sunt consecința unor erori produse în cursul meiozei: nedisjuncția cromosomică în meioza I, nedisjuncția cromatidiană în meioza II și întârzierea (pierdere) anafazică (vezi capitolul 5.C.3.1.b). *Nedisjuncția în meioză* produce gameți anormali – cu 24 de cromosomi (disomici) sau cu 22 de cromosomi (nulisomici) – care după unirea cu un gamet normal formează zigoți trisomici sau nulisomici (vezi figura 5.20). Despre nedisjuncție am discutat pe larg în capitolul 5.C.1.3 (vezi și caseta 5.3); vom reaminti numai că nedisjuncția meiotică este frecventă (circa 8% din toate sarcinile recunoscute clinic) și se produce mai ales în ovogeneză, în special în meioza I. Totuși, nedisjuncția meiotică paternă este frecventă (70%) în monosomia X și 100% în trisomia XYY. *Întârzierea anafazică* este un accident care se poate produce în anafazele ambelor meioze (mai frecvent în anafaza II) și constă în blocarea migrării sau reducerea vitezei de migrare a unui cromosom (cromatidă)

<sup>17</sup> Celulele normale sunt *disomice* pentru fiecare autosom și cromosomul X la femeie.

urmată de pierderea sa din nucleu. Rezultă gameți nulisomici, care prin fertilizare cu gameți normali vor produce zigoti cu monosomie.

*Aneuploidiile în mozaic* sunt de obicei consecința unor erori ale mitozei: nedisjuncția cromatidiană (care va determina mozaicuri cromosomice de tipul 47/45 sau 47/46/45) și întârzierea anafazică (produce mozaicuri 46/45 dar numai la cromosomii sexuali - 46,XX/45,X sau 46,XY/45,X - deoarece implicarea unui alt cromosom duce la apariția de celule monosomice neviabile. Un alt posibil mecanism pentru formarea mozaicurilor cromosomice numerice îl reprezintă “corecția sau salvarea” unei trisomii omogene la zigot. Deoarece, trisomiile sunt anomalii grave, organismul încearcă corectarea acestora prin pierderea cromosomului suplimentar. În condițiile în care acest mecanism acționează doar în unele celule, va rezulta un mozaic de tipul  $2n+1/2n$  (47/46)<sup>18</sup>.

De multe ori, în aceste cazuri, **mozaicul este limitat la nivelul placentei** (*confined placental mosaicism*) embrionul fiind normal. De regulă un astfel de mozaic este consecința unui mecanism de salvare al unei trisomii inițiale și poate conduce la apariția unei disomii uniparentale (vezi secțiunea 1.4). Într-o astfel de situație, este foarte dificilă alegerea unei opțiuni referitoare la finalizarea sarcinii, deoarece pe de o parte prezența unei placentă anormale determină tulburări ale creșterii embrionare și fetale, iar pe de altă parte există riscul ca viitorul copil să prezinte o formă de disomie uniparentală.

### 1.3. ANOMALIILE CROMOSOMICE STRUCTURALE

Anomaliile cromosomice de structură (numite și „mutații cromosomice”) se produc, în mod clasic, prin ruperea cromosomilor și reunirea anormală a capetelor cromosomilor ruși.

În condiții experimentale – prin tratarea celulelor umane în cultură cu agenți „clastogeni” (radiații ionizante sau unele substanțe chimice) – s-a stabilit că ruperea unui cromosom produce două capete instabile, deoarece nu au telomere. Mecanismele de reparare asigură de obicei reunirea corectă a capetelor rupte și refacerea integrității cromosomice („*restituțio ad integrum*”). Totuși, când se produc mai multe rupturi – în unul, doi sau mai mulți cromosomi – se poate produce o *reunire incorectă* a capetelor rupte și rezultă *cromosomi „derivativi”*, cu o structură anormală. Ei pot fi stabili în condițiile în care au un centromer și telomere, structuri ce le asigură segregarea/ transmiterea lor în cursul diviziunii celulare. În schimb, cromosomii derivativi *acentrici, dicentrici sau fără telomere* se caracterizează printr-o instabilitate crescută și se vor pierde în timpul diviziunii.

Cele mai multe anomalii structurale spontane, din celulele germinale sau somatice, se produc însă foarte probabil prin erori de recombinare.

Recombinarea meiotică este precedată de sinapsa cromosomilor omologi, ce implică împerecherea unor secvențe identice sau foarte asemănătoare de ADN repetitiv din structura lor; împerecherea *incorectă* generează, prin crossing over *inegal*, deleția sau duplicația unor segmente cromosomice. De asemenea, se poate produce o sinapsă între regiuni identice din cromosomi neomologi, care poate să determine o recombinare accidentală și producerea unui transfer de segmente între acești cromosomi (o translocație). Recombinarea omologă nealelică sau ectopică se poate produce și în celulele somatice, între cromatidele unui cromosom sau între cromosomi omologi (vezi secțiunea 6.B.1.3)

În funcție de numărul de cromosomi implicați și de numărul de rupturi se produc (prin reparare greșită sau recombinare între cromosomi neomologi) mai multe tipuri de anomalii structurale stabile, sistematizate în tabelul 6.5; la acestea se adaugă un tip special reprezentat de isocromosomi.

**Tabelul 6.5 Anomalii structurale stabile produse prin repararea greșită a rupturilor cromosomice sau erori de recombinare.**

(după Strachan și Read, 1999)

	Un cromosom implicat	Doi cromosomi implicați
O ruptură	Deleție terminală	—
Două rupturi	Deleție interstițială Cromosom inelar Duplicație sau deleție prin schimb inegal	Translocație reciprocă Translocație Robertsoniană Duplicație sau deleție

<sup>18</sup> Efectul fenotipic al unui astfel de mozaic poate fi mai grav în condițiile în care prin pierderea cromosomului suplimentar rezultă o disomie uniparentală, iar cromosomul respectiv are loci amprentați genetic (vezi capitolul 5.C și 5.D)

	între cromatidele surori Inversie	prin recombinare inegală
Trei rupturi	Rearanjări cromosomice variate (de ex., inversie cu deleție; inserție intracromosomică)	Inserție intracromosomică (directă sau inversată)

În funcție de consecințele fenotipice pe care le produc, anomaliile de structură ale cromosomilor se împart în:

- *anomalii echilibrate* când nu se produce pierdere sau câștig de material cromosomic (translocății reciproce echilibrate, inversii) iar fenotipul este, de regulă, normal;
- *anomalii neechilibrate* atunci când există plus sau minus de material cromosomic (deleții, cromosomi inelari, duplicații) care produce un fenotip anormal.

#### a). Anomaliile structurale ce implică un singur cromosom.

##### (1). Delețiile

Delețiile (*del*) sunt anomalii cromosomice structurale neechilibrate, caracterizate prin pierderea unui fragment cromosomic.

- În funcție de localizarea segmentului pierdut, delețiile pot fi *terminale* și *interstițiale*.
  - Clasic, delețiile terminale rezultă prin ruperea unui cromosom într-un punct, urmată de pierderea fragmentului terminal acentric și formarea unui nou telomer la capătul rupt. Delețiile interstițiale sunt produse prin ruperea unui cromosom în două puncte, situate pe același braț, urmată de pierderea fragmentului interstițial și reunirea fragmentelor restante (figura 6.24).
  - În prezent, se consideră că marea majoritate a delețiilor sunt interstițiale iar mecanismul cel mai frecvent de producere îl reprezintă *recombinarea omologă nealelică* intracromosomică sau intercromosomică, mediată de o împerechere greșită a cromosomilor, datorită unor secvențe repetitive identice sau foarte asemănătoare dar nealele (figura 6.24). Delețiile se mai pot produce prin segregarea meiotică a cromosomilor cu translocății echilibrate, inserții sau inversii (vezi secțiunile următoare).
- Din punct de vedere al dimensiunilor, delețiile se împart în *deleții microscopice* ( $\geq 5Mb$ ) – vizibile prin marcaj cromosomic, de preferință a celui de înaltă rezoluție – și *deleții submicroscopice*, e evidențiate prin folosirea tehnicilor de citogenetică moleculară (FISH), cu sonde pentru regiunea presupusă a fi absentă din cariotipul individului.

În practică, cele mai frecvente deleții sunt descrise în brațele scurte ale cromosomilor 4 (sindromul Wolf Hirschhorn), 5 (sindromul *cri du chat*), 11, și 18, precum și în brațele lungi ale cromosomilor 7, 11, 13, 15, 18, 21 și 22; de asemenea pot fi implicați în deleții și cromosomii X și Y. Delețiile autosomale microscopice au o incidență de 1 la 7000 nou născuți vii. Cea mai frecventă deleție, de obicei submicroscopică, este *del 22q11* (sindromul DiGeorge-Velocardiofacial) cu o incidență de 1 : 2000.

Toate delețiile produc o **monosomie parțială** (*haploinsuficiență*) pentru genele localizate în regiunea cromosomică absentă. Viabilitatea produsului de concepție cu deleție depinde de dimensiunea fragmentului absent. În general, se consideră că o monosomie parțială ce depășește 2% din lungimea unui set haploid de cromosomi este incompatibilă cu supraviețuirea. Delețiile submicroscopice sau microdelețiile produc **sindroame ale genelor contigue**, în care manifestările fenotipice sunt determinate de pierderea mai multor gene învecinate. Principalele sindroame cromosomice cu deleții sau microdeleții sunt prezentate în capitolul 10.

##### (2). Cromosomii inelari

Cromosomii inelari (*r*), sunt cromosomi anormali, caracterizați printr-o conformație circulară. Mecanismul de producere al acestei anomalii constă în ruperea unui cromosom în două puncte localizate pe brațe diferite, urmată de pierderea fragmentelor acentrice (terminale) și unirea capetelor fragmentului centric (figura 6.25). Practic se realizează o deleție / o monosomie parțială a unor segmente terminale din brațele cromosomului.

Cromosomii inelari întâmpină dificultăți de segregare în cursul mitozei, fiind caracterizați printr-o mare instabilitate. Datorită acestei particularități frecvența cromosomilor inelari este redusă. În practica medicală au fost descrise cazuri cu: r(X), r(21), r(18), r(22) și r(15).

### (3). Duplicațiile

Duplicațiile (*dup*) sunt anomalii cromosomice structurale neechilibrate, caracterizate prin prezența pe unul dintre cromosomi a unui segment în dublu exemplar. Consecința genotipică o reprezintă apariția unei trisomii parțiale pentru segmentul cromosomic duplicat.

Majoritatea duplicațiilor sunt rezultatul unui *crossing-over inegal* între cromosomii omologi în cursul pahitenului, favorizat de prezența unor secvențe de ADN repetitiv sau de similitudinea între secvențele unor gene (figura 6.26). Alte surse de trisomii parțiale sunt recombinarea intracromosomică la nivelul unei inversii și segregarea cromosomilor în meioza I în cazul unor translocării echilibrate.

Cele mai frecvente duplicații sunt: *dup12q*, care produce sindromul Pallister și *dup17q* care determină boala Charcot – Marie – Tooth (vezi 6.B.1.3).

### (4). Inversiile

Inversiile (*inv*) rezultă prin ruperea cromosomului în două puncte, urmată de rotirea fragmentului intermediar cu  $180^0$  și reunirea fragmentelor. În funcție de localizarea punctelor de ruptură, inversiile se clasifică în:

- *paracentrice* – dacă cele două puncte de ruptură sunt situate pe același braț, iar fragmentul rotit nu conține centromerul (figura 6.27.a);
- *pericentrice* – dacă cele două puncte de ruptură sunt situate pe brațe diferite, iar fragmentul rotit conține centromerul (figura 6.27.b); pot produce modificarea morfologiei cromosomului.

Inversiile sunt anomalii cromosomice echilibrate, care nu produc, de regulă, modificări fenotipice<sup>19</sup>, deoarece nu determină modificări ale cantității de material genetic, ci doar *repoziționarea* unor gene în cromosom. Excepțiile apar când unul din punctele de ruptură este localizat în interiorul unei gene, ducând la modificarea distanței dintre porțiunea centrală și cea reglatoare a unei gene sau la disrupția secvenței codante.

În schimb, inversiile pot produce *tulburări reproductive* (sterilitate, avorturi spontane, nașterea unor copii plurimalformați) determinate de recombinarea intracromosomică în regiunea cu inversie. Datorită faptului că genele nu mai sunt poziționate normal, sinapsa între cromosomii omologi nu se poate face corect (“genă la genă”) decât dacă cromatida cu inversie formează o buclă la nivelul inversiei (figura 6.28). Producerea unui *crossing-over* la acest nivel poate produce gameți neechilibrați; tipul de anomalie cromosomică depinde de tipul de inversie.

- În cazul inversiilor paracentrice, gameții anormali pot avea un cromosom dicentric sau un cromosom acentric (figura 6.28.a); ambii sunt instabili, iar supraviețuirea unui embrion cu astfel de anomalii este improbabilă. De aceea un cuplu în care unul dintre membri este purtător al unei inversii paracentrice va avea doar copii sănătoși (normali sau purtători de inversie) și un număr mare de avorturi spontane repetate.
- În cazul inversiilor pericentrice, gameții anormali pot avea cromosomi cu duplicația (trisomie parțială) și deleția (monosomie parțială) segmentelor cromosomice distale de inversie (figura 6.28.b);

Circa una la 1000 de persoane din populația generală poartă o inversie și are un risc de 5-10% – în funcție de mărimea și poziția inversiei, precum și de cromosomul implicat – de a avea un descendent cu cariotip anormal.

### (5). Isocromosomii

Isocromosomii (*i*) sunt cromosomi anormali, simetrici, caracterizați prin prezența în dublu exemplar a unuia dintre brațe (trisomie parțială) și absența (monosomie parțială) celui alt braț. (figura 6.29); pot fi deci isocromosomi de braț scurt sau de braț lung.

Mecanismul clasic de formare a isocromosomilor implică o eroare mitotică - clivarea transversală a centromerului – care determină formarea unui cromosom alcătuit numai din

<sup>19</sup> Inversia pericentrică a cromosomului 9 – *inv(9)(p11q12)* – este considerată o variantă fenotipică normală.

brațe scurte și a unuia constituit numai din brațe lungi. Totuși, acest mecanism a fost rareori dovedit. Un mecanism mult mai probabil este reprezentat de apariția unui schimb inegal de material cromosomic între cromosomii omologi (cromatidele surori) la extremitatea proximală a brațelor, adiacent centromerului. În acest mod rezultă de fapt un cromosom dicentric, dar prin metodele citogenetice clasice este imposibilă vizualizarea ambelor centromere, localizate foarte apropiat unul de celălalt.

Cel mai frecvent isocromosom este i(Xq) identificat la unele paciente cu sindrom Turner. Mai rar au fost depistați isocromosomi ai unor autosomi – i(18p), i(12p), i(21q).

### **(6). Cromosomii marker**

Pe preparatele cromosomice se observă ocazional cromosomi foarte mici, a căror origine este dificil de stabilit, numiți cromosomi „marker”. Frecvent ei sunt prezenți sub formă de mozaic cromosomic, reprezentând un *extra-cromosom sau cromosom* supranumerar față de cariotipul normal sau anormal de bază. Cromosomii marker pot conține secvențele pericentromerice ale unui cromosom (mai frecvent 15 sau X) sau pot fi mici cromosomi inelari. Cea mai dificilă problemă este identificarea unui cromosom marker supranumerar în anlizile prenatale (1:2500); din cauza originii diferite – dificil de stabilit prin tehnicile uzuale – riscul unor anomalii fetale asociate poate varia de la foarte mic, la foarte mare.

## **b). Anomaliile structurale ce implică doi cromosomi.**

### **(1). Translocațiile**

Translocațiile se caracterizează prin transferul de segmente cromosomice între doi cromosomi, de obicei neomologi. Pot fi trei tipuri majore: *translocații reciproce*, *translocații prin fuziune centrică (Robertsoniene)* și *inserții*

#### **Translocațiile reciproce**

Translocațiile reciproce (*t*) se produc prin ruperea (în cursul interfazei) a doi cromosomi neomologi, fiecare în câte un punct, urmată de schimbul reciproc al fragmentelor acentrice și realipirea fragmentelor rupte, cu formarea a doi cromosomi derivativi (figura 6.30.a).

Incidența translocațiilor reciproce în populația generală este de aproximativ 1:400 de indivizi. Frecvența acestor anomalii este mai mare la bărbații cu sterilitate primară și la cuplurile cu avorturi spontane recurente. De regulă, translocațiile reciproce sunt specifice unei anumite familii. O translocație relativ frecventă este însă aceea dintre brațele lungi ale cromosomilor 11 și 22.

Purtătorii de translocații reciproce echilibrate au de obicei un fenotip normal, deoarece anomalia nu modifică cantitatea totală de material genetic. În schimb, pot apărea tulburări de reproducere, determinate de modul particular de sinapsă și de segregare a cromosomilor derivativi, cu translocația de segmente, în cursul meiozei I. Translocațiile reciproce pot determina blocarea spermatogenezei și sterilitate; femeile purtătoare pot avea o fertilitate redusă. Atunci când gametogeneza este posibilă se pot forma gameți normali și anormali, funcție de modul de segregare (figura 6.30.b și c).

În cursul meiozei I, datorită translocației reciproce, cromosomii omologi formează o sinapsă specială, numită *cvadivalent*, cu aspect de cruce (figura 6.30.b). La nivelul acestei structuri se produce alinierea regiunilor omologe ale cromosomilor implicați în translocație. În cursul anafazei I, când se produce segregarea cromosomilor omologi, cromosomii cvadivalentului pot urma trei căi de segregare: 2:2; 3:1; 4:0 – diferite prin numărul cromosomilor ce se distribuie celulelor fiice. Ultimele două căi, complet dezechilibrate, sunt foarte rare și conduc la gameți cu anomalii genetice majore, incompatibili pentru reproducere. Segregarea 2:2 se poate face în trei moduri (figura 6.30.c): *altern*, *adiacent-1* și *adiacent-2*.

- În cazul *segregării alterne*, cromosomii normali migrează la un pol al fusului de diviziune, la celălalt pol deplasându-se cromosomii cu translocație. Astfel, rezultă gameți echilibrați genetic, prin a căror fecundare se formează, fie zigoți normali, fie zigoți purtători ai translocației echilibrate.
- În *segregarea adiacentă-1* centromerii neomologi segregă împreună, în timp ce în *segregarea adiacentă-2* se produce o segregare asociată a centromerilor omologi. În ambele tipuri de segregare rezultă gameți anormali (cu disomie și nulisomie parțială), care prin fecundare vor conduce la zigoți ce asociază trisomia parțială a unuia dintre cromosomi cu monosomia parțială a celuiilalt cromosom.

În translocațiile reciproce echilibrate riscul teoretic de apariție a unor descendenți anormali (cu trisomie sau monosomie parțială) este ridicat - 50% - dar riscul practic de apariție a unor copii cu anomalii cromosomice neechilibrate este de 1-10%, dependent de tipul translocației, deoarece majoritatea embrionilor neechilibrați sunt neviabili.

### **Translocațiile robertsoniene**

Translocațiile Robertsoniene (*rob*) implică doi cromosomi acrocentrici (exceptând cromosomul Y), omologi sau neomologi. Aceștia se rup la nivelul centromerelor sau pe brațele scurte, foarte aproape de centromer, brațele lungi fuzionează și formează un cromosom derivativ, monocentric sau pseudodicentric, iar brațele scurte se pierd (figura 6.31). Ca urmare, numărul de cromosomi se reduce la 45; deoarece brațele scurte ale celor cinci perechi de acrocentrici au copii multiple ale genelor pentru ARN ribosomal, pierderea brațelor scurte a doi acrocentrici nu va fi nocivă (rămân un număr suficient de copii pe cromosomii acrocentrici normali) iar fenotipul va fi normal,

Incidența globală a translocațiilor Robertsoniene în populație este de aproximativ 1/1000 de indivizi, cele mai frecvente fiind translocațiile dintre cromosomii 13 și 14 – rob(13q14q) – și între cromosomii 21 și 14 – rob(21q14q); afectând aproximativ 1/1300 de persoane, rob(13q14q) este cea mai frecventă anomalie structurală la om.

Translocațiile Robertsoniene, deși nu afectează fenotipul, pot produce gameți și descendenți anormali. Riscul de apariție a unor descendenți anormali este diferit în funcție de tipul cromosomilor implicați în translocație (omologi sau neomologi) și de sexul părintelui purtător.

- În cazul unei translocații între cromosomi neomologi, de exemplu între cromosomii 14 și 21, se pot forma 6 tipuri de gameți (figura 6.31.c.); prin fecundarea lor cu gameți normali rezultă șase tipuri de zigoti: normal, echilibrat cu translocație Robertsoniană, cu trisomie 14, cu monosomie 14, cu trisomie 21, cu monosomie 21. Zigotii monosomici și cu trisomie 14 dau embrioni neviabili, eliminați prin avorturi spontane. În această situație, riscul teoretic de apariție al unui copil cu trisomia 21 (sindrom Down) este de 33%; riscul real este mai mic (deoarece o parte din embrionii cu trisomie 21 sunt eliminați prin avort spontan) și depinde de sexul purtătorului: în cazul femeilor riscul este de 10%, în timp ce la bărbați riscul este de 1-3%, deoarece anomalia blochează de obicei spermatogeneza.
- O situație specială se întâlnește în cazul purtătorilor unei translocații Robertsoniene între cromosomi omologi, de exemplu, între doi cromosomi 21; ei formează gameți cu disomie 21 și cu nulisomie 21 care, după fecundare cu un gamet normal, vor forma zigoti cu trisomie 21 sau cu monosomie 21 (neviabili). Acest caz constituie una din puținele situații în care riscul de recurență al unei afecțiuni genetice este de 100%.

### **Insertiile**

Insertiile (*ins*) sunt translocații nereciproce, care implică transferul unui fragment cromosomic de pe un cromosom pe un cromosom neomolog. Mecanismul de apariție al anomaliilor constă în ruperea a doi cromosomi neomologi, dar necesită trei puncte de ruptură, două pe un cromosom și unul pe celălalt cromosom; fragmentul liber al cromosomului cu două rupturi este transferat și inserat (în poziție normală sau inversat) la nivelul punctului de ruptură al celui de-al doilea cromosom (figura 6.32). Datorită acestei particularități, insertiile sunt anomalii cromosomice relativ rare.

În cazul insertiilor, anomalia nu modifică fenotipul purtătorului, dar poate conduce la tulburări de reproducere, datorite malsegării cromosomilor derivativi în cursul meiozei I. Un individ purtător al unei translocații cu inserție poate avea copii normali, copii purtători ai anomaliilor echilibrate, copii cu monosomie parțială și copii cu trisomie parțială.

## **(2). Cromosomii dicentrici**

Cromosomii dicentrici (*dic*) se formează printr-o translocație neechilibrată, cu ruperea în câte un punct a doi cromosomi, urmată de unirea fragmentelor centrice într-un cromosom derivativ și pierderea fragmentelor acentrice. Numărul de cromosomi din celulă se reduce de la 46 la 45 (figura 6.33). De obicei, cromosomii dicentrici sunt instabili în cursul mitozei<sup>20</sup>;

<sup>20</sup> Prezența ambelor centromere rămase active determină anomalii de atașare la fibrele fusului de diviziune și dificultăți de segregare în cursul diviziunii, ceea ce conduce la dispariția frecventă a lor.

menținerea lor pe parcursul a mai multor generații celulare se face prin inactivarea unuia dintre centromere (pseudodicentrici).

#### 1.4. DISOMIILE UNIPARENTALE

Disomiile uniparentale sunt *anomalii cromosomice funcționale*, caracterizate prin prezența unei perechi de cromosomi moștenite de la același genitor (vezi și capitolul 5.C.3.2).

Mecanismul de producere a disomiilor uniparentale implică procese de *corectare* (“*salvare*”) a unor aneuploidii omogene, existente în primele etape ale embriogenezei. În cazul corectării unei monosomii, aceasta poate fi “salvată” prin duplicarea cromosomului implicat, rezultând obligatoriu o disomie uniparentală. În cazul prezenței unei trisomii, corecția constă în *eliminarea* unuia dintre cei trei cromosomi omologi; în funcție de originea trisomiei (nedisjuncție în mieoza I sau în mieoza II) (vezi figura 5.20) și de cromosomul pierdut există trei posibilități:

- zigot disomic normal, cu câte un cromosom de la fiecare din părinți;
- zigot cu doi cromosomi identici de la un părinte (isodisomie);
- zigot cu doi cromosomi diferiți de la un părinte (heterodisomie).

Disomia uniparentală poate avea efecte patologice atunci când realizează o stare de homozigoție a unei gene recesive sau când cromosomul implicat conține gene amprentate (vezi capitolul 4.D.1.2.b)

Genomurile parentale nu sunt echivalente funcțional. La nivelul anumitor loci se exprimă fenotipic, fie alela de origine maternă, fie cea de origine paternă (cea de a doua alelă fiind inactivă). Amprentarea genomică (parentală) este stabilită în cursul spermatogenezei sau ovogenezei și constă în marcarea specifică a anumitor gene localizate pe unii cromosomi. Procesul are două etape: ștergerea amprentării moștenite de la părinți și introducerea noii amprentări caracteristice sexului individului respectiv (vezi figura 4.22). Zigotul rezultat în urma fertilizării gameților va moșteni astfel două genomuri parentale marcate specific și diferite funcțional. Marcarea acestor gene, de regulă implicate în embriogeneză, constă fie în inactivarea prin metilare a uneia dintre alele (maternă sau paternă) fie în modificarea regiunii reglatoare a uneia dintre alele.

Un exemplu de corectare a unei trisomii 15 este prezentat în figura 6.34. În cazul trisomiei 15 de origine paternă, prin pierderea cromosomului 15 de origine maternă se va naște un copil cu sindrom Angelman. În cazul trisomiei 15 de origine maternă, prin pierderea cromosomului 15 de origine paternă se va naște un copil cu sindrom Prader-Willi.

Teoretic, pot exista disomii uniparentale pentru toți cromosomii umani. Până la ora actuală au fost identificate 23 de disomii uniparentale, dintre care următoarele au implicații patologice: 15q paternă (*sindrom Angelman*), 15q maternă (*sindrom Prader-Willi*), 11p paternă (*sindrom Beckwith-Wiedemann*), 6 paternă (*diabetul zaharat tranzitoriu al nou-născutului*), 7 maternă (*sindrom Silver – Russell*).

#### 1.5. ANOMALIILE CROMOSOMICE DOBÂNDITE

Anomaliile cromosomice dobândite se pot produce în celulele somatice, după naștere, sub acțiunea unor agenți mutageni sau spontan, în anumite sindroame de instabilitate cromosomică sau în tumori și leucemii.

Diferiți **agenți mutageni**, substanțe chimice sau radiațiile ionizante, pot determina rupturi cromatidiene (în G2) sau cromosomice (în G1) și uneori cromosomi inelari, dicentrici, deleții sau translocații; frecvența lor este proporțională cu intensitatea expunerii și eficiența mecanismelor de reparare.

Mai multe sindroame ereditare monogenice (sindromul Bloom, anemia Fanconi, Ataxia-telangiectazia, sindromul Nijmegen, sindromul ICF, sindromul Roberts, Xeroderma pigmentosum) se caracterizează prin **instabilitatea cromosomică**. Bolnavii cu aceste afecțiuni prezintă, în culturi celulare (limfocite) de scurtă durată, un procentaj anormal de mare de rupturi cromosomice sau cromatidiene, schimburi de fragmente și figuri triradiale sau cvadriradiale (ce atestă un crossing over somatic) sau alte defecte (instabilitate centromerică,



separarea regiunilor de heterocromatină etc); de subliniat faptul că aceste modificări nu sunt clonale. Natura modificării cromosomice și defectul molecular (în replicarea sau repararea ADN) care stă la baza ei sunt diferite în fiecare afecțiune. Majoritatea acestor sindroame au un risc crescut de cancerizare.

**Celulele maligne** pot prezenta diferite anomalii cromosomice care nu există în țesuturile neimplicate în procesul tumoral. Anomaliile cromosomice în tumori și leucemii se pot clasifica în manifestări citologice ale amplificării genomice, anomalii clonale (care au adesea un caracter neîntâmplător) și anomalii secundare.

- Amplificările genomice se pot manifesta citologic fie prin cromosomi „*double minutes*” – cromosomi minusculi, ce apar dedublați în metafază – fie prin segmente cromosomice colorate omogen (*HSR- homogeneously staining region*) sau anormal (*ABR- abnormal banded region*). Aceste modificări corespund unor segmente cromosomice în care anumite gene (oncogene) sunt multiplicabile considerabil.
- Anomaliile clonale sunt mai frecvente în anumite tipuri de neoplazii, fiind mai mult sau mai puțin specifice; de exemplu,  $t(15;17)(q22;q12)$  în leucemia acută cu promielocite sau deleția 13q14 în retinoblastom. Dar specificitatea lor nu este absolută; de exemplu, translocația  $t(9;22)(q34;q11)$ , ce corespunde cromosomului Philadelphia, era considerată specifică leucemiei mieloide cronice dar a fost descrisă și în anumite leucemii acute. Cert este faptul că diferite tipuri de anomalii structurale, caracteristice unor neoplazii, produc o serie de modificări moleculare (dereglarea expresiei unor oncogene, formarea unor gene hibride, pierderea unor gene supresoare de tumori) implicate în etiopatogenia tumorală (vezi capitolul 17).
- Anomaliile secundare (de număr și/sau structură) apar în stadiile mai tardive și invazive ale dezvoltării tumorale. Ele sugerează faptul că un element important al progresiei cancerului este alterarea unor gene implicate în menținerea integrității și stabilității cromosomilor și în asigurarea segregării lor mitotice corecte.

## 2. CONSECINȚELE FENOTIPICE ALE ANOMALIILOR CROMOSOMICE

În funcție de consecințele fenotipice, anomalii cromosomice se pot împărți în două mari categorii:

- *anomalii neechilibrate* – în care de regulă se produce un plus sau un minus de material cromosomic și fenotipul este *anormal*;
  - *anomalii echilibrate* – fără modificări cantitative de material genetic și cu fenotip normal.
- În prima categorie se încadrează, firește, toate anomaliiile numerice (poliploidiiile, trisomiile, monosomiile) și o parte din anomaliiile de structură, cele neechilibrate (delețiile, cromosomii inelari, duplicațiile, isocromosomii), în care se produc trisomii (foarte rar tetrasomii) sau monosomii parțiale. În a doua categorie se includ translocațiile reciproce echilibrate, inversiile și inserțiile, care nu modifică cantitatea de material cromosomic. Această clasificare este relativă deoarece:
- în translocațiile Robertsoniene se pierd totuși porțiuni din brațele scurte ale cromosomilor acrocentrici implicați, dar fenotipul rămâne normal întrucât segmentele pierdute conțin gene pentru ARN ribosomal (care se găsesc în cantitate suficientă pe brațele scurte ale celorlalți acrocentrici);
  - uneori translocațiile și inversiile pot produce un fenotip anormal dacă punctele de ruptură alterează secvențele codante sau reglatoare ale unor gene sau plasează unele gene într-o regiune cu heterocromatină inactivă;
  - disomiile uniparentale nu modifică cantitatea de material genetic dar pot determina, prin mecanismele precizate, un fenotip anormal.

### 2.1 CONSECINȚELE ANOMALIILOR CROMOSOMICE NEECHILIBRATE

Anomaliile cromosomice de număr sau structură neechilibrate sunt modificări *cantitative* ale materialului genetic, „*anomalii de dozaj genic*” întrucât informația genetică din cromosomii supranumerari sau modificați structural este *calitativ normală*. Pentru aceasta pledează faptul că indivizii fertili cu anomalii cromosomice numerice (de exemplu, femeii cu trisomie 21 sau cu trisomie X) pot avea descendenți normali. Fenotipul anormal este consecința unui exces (+ 50%) sau a unei lipse (-50%) de gene normale.

Dezechilibrul genetic, indiferent de tip, determină o serie de „*semne comune*” (Opitz, 1981): tulburări de creștere prenatală și postnatală, dismorfie facială și frecvent anomalii congenitale majore multiple, displazii, dermatoglife anormale, alterări ale structurii și funcției SNC (întârziere în dezvoltarea psiho-motorie), tulburări ale funcției gonadale. Cunoașterea lor poate orienta un diagnostic spre categoria „boli cromosomice”.

Gravitatea afectării fenotipice depinde de mai mulți factori.

(1). *Mărimea dezechilibrului genetic*. Poliploidii, trisomiile cromosomilor mari și monosomiile autosomale sunt letale iar gravitatea trisomiilor autosomale viabile este proporțională cu mărimea cromosomului ( $\text{tri } 13 > \text{tri } 18 > \text{tri } 21$ ).

(2). *Tipul de anomalie*.

- Monosomiile sunt mai grave decât trisomiile și sunt letale pentru toți autosomii precum și în cazul majorității monosomiilor X (sunt autori care consideră că cele mai multe din pacientele cu cariotip 45,X prezintă de fapt o monosomie X în mozaic 46,XX/45,X dar că linia normală lipsește în limfocite)
- Aneuploidile cromosomilor sexuali sunt mai puțin grave decât cele autosomale, datorită inactivării parțiale a cromosomilor X suplimentari.

(3). *Conținutul genic și cantitatea de eucromatină / heterocromatină a cromosomului implicat*. În acest context, se explică de ce trisomia 21 este mai puțin gravă decât trisomia 22 – ambii cromosomi fiind apropiați ca mărime, precum și *semnele specifice și gravitatea diferită* a unor trisomii parțiale pentru segmente identice ca dimensiune. Anomaliile ce interesează benzile R (pozitive) alcătuite din eucromatină sunt mai grave decât cele ce interesează benzile G (pozitive), bogate în heterocromatină.

(4) *Numărul celulelor afectate*. Aneuploidii omogene sunt mai grave decât cele reprezentate de mozaicuri de celule anormale și normale. Reamintim (vezi 5.B.2.3 și 5.D.3.) că efectele fenotipice ale mozaicurilor cromosomice depind de:

- momentul ontogenetic în care se produc (apariție precoce – gravitate mai mare);
- distribuția clonelor în diferite țesuturi (vezi *mozaicism limitat la placentă*; mozaicurile germinale sau clonele celulare ce produc cancer);
- tipul cromosomului implicat (mozaicurile gonosomale sunt mai puțin grave decât cele autosomale).

## 2.2 CONSECINȚELE ANOMALIILOR CROMOSOMICE ECHILIBRATE

Așa cum am precizat mai sus, cu câteva excepții, anomaliile cromosomice echilibrate – translocațiile reciproce, inversiile și inserțiile – determină un fenotip normal. Ele pot avea însă consecințe reproductive serioase (vezi și capitolul 10.A):

- blocarea gametogenezei datorită sinapsei neobișnuite între cromosomii omologi, determinată de prezența anomaliei structurale;
- producerea de gameți anormali (figurile 6.28, 6.30 și 6.31) care, după fecundare, determină formarea de embrioni cu monosomii și/sau trisomii parțiale (complete în cazul translocațiilor Robertsoniene); frecvent dezechilibrul cromosomic este important și acești embrioni se elimină ca avorturi spontane.

S-a stabilit că la 3- 6% din cuplurile sterile sau cu avorturi spontane repetate unul sau altul din membrii cuplului prezintă o anomalie cromosomică echilibrată. În acest context să reamintim că una din 400 de persoane aparent sănătoase din populație are o translocație, 1: 1000 – o translocație Robertsoniană și 1 : 1250 prezintă o inversie; deci, cel puțin 4 : 1000 de

persoane sunt purtătoare de anomalii cromosomice echilibrate ce pot da tulburări de reproducere majore.

### 3. FRECVENȚA ȘI CAUZELE ANOMALIILOR CROMOSOMICE

Frecvența anomaliilor cromosomice la om este foarte mare comparativ cu alte specii. Deși estimările efectuate pe diferite categorii de celule și fenotipuri umane – de la gameți, la nou născuți și adulți (tabelul 6.6) – sunt dependente de metode și loturi, iar datele actuale sunt foarte probabil *subevaluări* ale fenomenului real, se poate conchide – fără rezerve – că anomaliile cromosomice reprezintă o cauză importantă de morbiditate și mortalitate.

**Tabelul 6.6 Frecvențele aproximative ale anomaliilor cromosomice în diferite populații**  
(excluzând delețiile detectate prin FISH)

Populație	Frecvența anomaliilor (%)
<b>Spermatozoizi</b> (bărbați normali și fertili)	≥ 10 (?)
<b>Ovule</b> (femei normale și fertile)	≥ 10 (?)
<b>Toți zigoții</b>	10 – 30
<b>Embrioni</b> în stadiul preimplantator (studii de fertilizare in vitro)	20 – 25
<b>Sarcini</b> recunoscute clinic (5 – 28 spt)	≥ 8
<b>Avorturi spontane:</b>	
Sarcini nerecunoscute clinic (≤ 4 spt)	90 (?)
Sarcini 5 – 8 spt	60
Sarcini 9 – 12 spt	12 – 32
Toate sarcinile recunoscute clinic (5–28spt)	≥ 30 – 35
<b>Nou născuți morți</b> (≥ 28 spt)	5 – 6
<b>Nou născuți vii</b>	0.5 – 1
<b>Decese neonatale și la sugari</b>	5 – 7
<b>Pacienți cu malformații congenitale</b>	4 – 8
<b>Pacienți cu malformații cardiace</b>	13
<b>Retard mintal</b> (excluzând X fragil)	3 – 35
QI ≤ 20	3 – 10
QI = 20 – 49	12 – 35
QI = 50 – 69	3
<b>Alte tulburări de dezvoltare neuropsihică</b>	1 – 3 (?)
<b>Sindromul X fragil</b>	0.4
<b>Hermafroditism adevărat</b>	25
<b>Bărbați - defecte în diferențierea sexuală</b>	≤ 25
<b>Femei - tulburări de dezvoltare pubertară</b>	≤ 27
<b>Deficiență ovariană primară</b>	65
<b>Bărbați sterili</b>	2 – 15
<b>Cupluri cu ≥ 3 avorturi spontane</b>	2 – 5

Surse: Hooket, 1992; Jacobs, 1992; Hassold et al, 1996; Eichenlaub-Ritter, 1996; Gardner și Southerland, 1996; Chandley, 1997; Garber et al, 1997; Hsu, 1998; Mange, 1999

Anomaliile cromosomice au fost detectate la:

- circa 10% din gameți, la persoane – bărbați și femei – normale și fertile;
- 3% din feteșii de 10 săptămâni și 2% din cei de 15-16 săptămâni;
- 50 - 60% din avorturile spontane precoce (15-25% din toate sarcinile);
- 10 % din nou născuți morți (1% din toate sarcinile);
- 0,7 – 1 % din nou-născuți vii (> 1:120);
- 2% din sarcinile femeilor cu vârsta mai mare de 35 de ani în momentul concepției.

Incidența diferitelor tipuri de anomalii cromosomice la nou născuții vii este prezentată în tabelul 6.7. Se observă că *anomaliile neechilibrate*, numerice și structurale la un loc,

reprezintă aproape jumătate din totalul anomaliilor cromosomice și, deci, numai *1 la 250 de nou născuți au un fenotip anormal* produs de un dezechilibru cromosomic. Față de alte studii epidemiologice mai vechi, surprinde frecvența mai mare a anomaliilor structurale (5 % din nou născuți și 60 % din toate anomaliile cromosomice) și în mod deosebit a anomaliilor echilibrate 4,30 % sau 1 la 232 nou născuți vii; acest fapt este firesc (anomaliile numerice produc mai frecvent un dezechilibru grav, letal) și reflectă indiscutabil sporirea calității metodelor de analiză citogenetică. Cert este că datele cuprinse în **tabelele 6.6 și 6.7** sunt subestimări ale valorilor reale deoarece nu includ sindroamele cu microdeleții identificabile prin FISH; numai sindromul velo-cardio-facial (del 22q11) are o frecvență sub 1:1000 nn fiind probabil a doua anomalie cromosomică ca frecvență, după sindromul Down.

**Tabelul 6.7 Incidența anomaliilor cromosomice la nou-născuți**  
(Hook, 1992)

Tipuri de anomalii	Frecvență ‰
<b>Triploidii</b>	<b>0,02</b>
<b>Trisomii autosomale</b>	<b>1,40</b>
Trisomie 13	0,08
Trisomie 18	0,15
Trisomie 21	1,20
<b>Aneuploidii gonosomale la băieți</b>	<b>2,75</b>
47,XXY	1,00
47,XYY	1,00
altele	0,75
<b>Aneuploidii gonosomale la fete</b>	<b>1,80</b>
45,X și 45,X/46,XX	0,30
47,XXX	1,10
altele	0,37
<b>Anomalii structurale echilibrate</b>	<b>4,30</b> (1/232)
Translocații reciproce	2,50
Translocații Robertsoniene	1,00
Inversii	0,80
<b>Anomalii structurale neechilibrate</b>	<b>0,70</b>
<b>Anomalii cromosomice neechilibrate</b> (numerice și structurale)	<b>4,00</b> (1/250)
<b>TOTAL anomalii cromosomice</b>	<b>8,30</b> (1/120)

Datele actuale despre frecvența anomaliilor cromosomice reprezintă un motiv în plus pentru a studia cauzele și mecanismele patogenice cu scopul de a identifica posibile intervenții profilactice. Din păcate, în acest domeniu nu s-au înregistrat elemente noi. Este cert doar faptul că etiopatogenia anomaliilor numerice diferă de cea a anomaliilor structurale.

*Cauzele aneuploidiilor* produse prin erori de distribuție (nedisjunctie, pierdere anafazică) sunt încă neelucidate. Singura certitudine este asocierea dintre vârsta maternă crescută în momentul concepției și incidența mare a trisomiilor la copii. Cel mai clar efect al vârstei materne a fost dovedit în sindromul Down (trisomia 21) dar efecte similare au fost identificate și în cazul trisomiilor 13 și 18. În locul graficelor și tabelor care ilustrează în literatura de efectul vârstei materne asupra frecvenței nașterilor cu trisomii autosomale, preferăm să subliniem că *riscul de nedisjunctie* este:

- 1 la 1000 pentru femeile gravide în vârstă de  $\leq 25$  de ani;
- 1 la 100 la vârsta de 37 de ani;
- 1 la 10 la vârsta de 45 de ani

La aceste date mai adăugăm faptul că 92% din cazurile de trisomie 21 (cea mai frecventă boală cromosomică) sunt produse prin nedisjunctie maternă în meioza I. Efectul vârstei materne, ca factor predispozant la nedisjunctie, este sigur și - foarte probabil - vârsta se corelează cu

particularitățile meiozei materne<sup>21</sup>, care (printre altele) blochează ovocitele timp de câteva decade în profaza meiozei I („ovulele au vârsta femeii”). Studiile de genetică moleculară au permis formularea a trei ipoteze despre cauzele primare ale nedisjuncției, corelată cu vârsta maternă:

- sinapsa prelungită între cromosomii omologi în meioza I (datorită recombinărilor intracromosomice localizate exclusiv centromeric sau telomeric) „trage” ambii cromosomi în aceeași celulă fiică;
- separarea precoce a cromatidelor surori (în M II) ca o consecință, probabilă, a reducerii ratei recombinărilor intracromosomice;
- anomalii ale fusului de diviziune.

Nedisjuncția are probabil și alte cauze decât vârsta maternă reproductivă avansată, deoarece numai 25% din cazurile de sindrom Down se nasc din femei peste 35 de ani. În ciuda cercetărilor intense, nu există nici-o dovadă științifică care să susțină rolul posibil al unor factori externi (infecții virale, radiații, medicamente, hormoni, contraceptive, cafea sau fumat, reducerea frecvenței raporturilor sexuale etc. De asemenea, la om este foarte probabil că nu intervin factori genetici (mutații ale unor gene ce controlează disjuncția). Totuși nu trebuie să uităm că la alte specii nedisjuncția este sub control genetic iar la om diferiți cromosomi au rate diferite de trisomie în avorturile spontane (de exemplu, trisomia 16 reprezintă o treime din aceste avorturi). Oricum, controlul genetic al meiozei este încă departe de a fi elucidat

*Cauzele anomaliilor cromosomice de structura* par la prima vedere mai clare deoarece mecanismul lor clasic de producere implică ruperea cromosomilor și reunirea anormală a capetelor cromosomilor ruși. Deci agenții ce rup cromosomii (numiți și „clastogeni”) sunt cauzele primare ale anomaliilor structurale. În realitate, se acumulează continuu dovezi care arată ca intervenția clastogenilor este minimă iar cele mai multe anomalii structurale, din celulele germinale sau somatice, se produc spontan foarte probabil prin erori de recombinare, fie prin recombinarea omologă nealelică sau ectopică (împerecherea *incorectă* a omologilor produce un crossing over *inegal*) fie prin recombinare neomologă (sinapsă între regiuni identice din cromosomi neomologi). În aceste condiții, structura particulară a genomului uman pare a fi sursa principală a erorilor de recombinare și deci a anomaliilor structurale.

Revenim astfel la prima idee a acestei secțiuni; chiar dacă 95 % din producții de concepție anormale sunt eliminate ca avorturi spontane, *rata anomaliilor cromosomice la nou născuții vii (> 1:120) este mai mare decât la alte specii*. De ce ? Nu există explicații clare pentru această situație; exceptând efectul vârstei materne, se poate spune că nu există, foarte probabil, factori genetici și de mediu care să fie implicați semnificativ în producerea anomaliilor cromosomice. Poate că frecvența lor ridicată reprezintă „prețul pe care îl plătim pentru ceea ce am ajuns”, pentru evoluția noastră la *Homo sapiens sapiens*, evoluție care a generat anumite particularități structurale și funcționale ale genomului uman. „*Cert este că medicii și publicul trebuie să se obișnuiască cu ideea că un anumit grad al perturbării reproducerii umane prin anomalii cromosomice este...normal, iar eliminarea unui fetus anormal cromosomic este o selecție naturală...binevenită*” (Dorothy Warburton, 1997).

#### D. POLIMORFISMELE GENETICE

Două genomuri umane alese la întâmplare sunt identice între ele în proporție de 99,9%. Restul de 0,1% conține variante genetice sau versiuni diferite (*alele*) ale unei secvențe de ADN, situată într-o anumită poziție (*locus*) din cromosomi, și care ar rezultat în urma unor mutații. Când anumite variante genetice – alele – sunt frecvente și se găsesc la mai mult de 1 % din populația generală, atunci ele se constituie ca **polimorfisme genetice**. În contrast, alelele cu o frecvență mai mică decât 1% sunt numite, prin convenție, **variante rare**. Aceste denumiri au fost alese pentru a permite diferențierea lor de *mutații*, termen care implică *per se*

<sup>21</sup> S-a discutat și reducerea competenței „imunologice” dintre mamă și făt odată cu creșterea vârstei materne, fapt ce ar permite supraviețuirea embrionilor trisomici; lipsesc probe pentru această ipoteză.

un efect negativ asupra proteinei și, respectiv, asupra caracterului fenotipic corespunzător, deși mecanismul de producere este similar. În prezent există tendința unificării tuturor acestor termeni sub denumirea largă de **variante genetice**.

Polimorfismele genetice sunt responsabile pentru cea mai mare parte din diversitatea și individualitatea fenotipică observată în cadrul speciei umane. Aceste variații genetice pot fi localizate oriunde în genom, atât în interiorul genelor, cât și în regiunile intergenice. Evident, numai acele polimorfisme existente la nivelul genelor au potențialul de a asocia modificări fenotipice. De aceea, primele polimorfisme genetice au fost identificate indirect, prin studiul variațiilor existente la nivelul proteinelor codificate. Ulterior a devenit însă clar că acest fenomen este mult mai amplu, deoarece toate polimorfismele rezultă, în ultimă analiză, prin modificări în secvența ADN. Dincolo de interesul teoretic, mai ales în studiile de genetică populațională (vezi capitolul 7), identificarea sistematică a polimorfismelor umane s-a dovedit a avea numeroase aplicații practice; vom menționa doar utilizarea lor

- în transfuzii sanguine și transplantate,
- identificarea de persoane,
- stabilirea paternității,
- diagnosticul genotipic indirect prin folosirea unor markeri genetici.

## 1. POLIMORFISME PROTEICE

Primele informații privind diversitatea genetică dintre indivizii umani au fost obținute prin studiul variantelor proteice existente în populație. Primele polimorfisme au fost identificate încă de la începutul secolului trecut prin analiza așa-numitelor antigene de grup sanguin, precum cele din sistemele ABO și Rh. Ulterior au fost evidențiate și alte polimorfisme antigenice, prin studiul unor sisteme mai rare de grup sanguin (MNSs, Lutheran, Lewis, Xg etc) și, mai recent, a sistemului HLA, considerat cel mai polimorfic sistem genetic uman (vezi capitolul 16). Prin studiul mobilității electroforetice, activității enzimatică și a diferitelor proprietăți fizico-chimice s-a evidențiat polimorfismul unor proteine serice (haptoglobina, transferina, alfa-1-antitripsina, imunoglobulinele, ceruloplasmina etc), al unor enzime eritrocitare (fosfatza acidă-1, G6PD, esteraza D, fosfoglucomutaze), serice (colinesteraza-1, TGP, etc), tisulare (alcool dehidrogenaza, acetil-transferaza hepatică, etc)

A devenit astăzi clar că doi indivizi aleși la întâmplare din populația generală pot prezenta diferențe structurale la nivelul a circa 20% din totalul proteinelor. Cu cât indivizii sunt mai îndepărtați din punct de vedere genetic (grupuri etnice diferite), cu atât gradul de diversitate este mai pronunțat. Toate sistemele genetice polimorfice se găsesc în populație în mai multe variante; un individ posedă însă numai o anumită variantă dintr-un sistem. Datorită numărului mare de sisteme polimorfice (>30) și de variante în fiecare sistem, se pot realiza un număr imens de combinații și fiecare individ posedă o combinație specifică de variante, este un unicat biologic. Se poate presupune firesc faptul că fiecare persoană de pe această planetă (exceptând gemenii monoziгоți) are o structură genetică unică. Aceste date au demonstrat fără echivoc conceptul de "*individualitate chimică*" emis de către Sir Archibald Garrod cu un secol în urmă. Înțelegerea individualității genetice și biologice este piatra fundamentală a abordării genetice în medicina practică, exprimată prin dictonul: "*nu există boli ci numai bolnavi*".

Având în vedere valoarea istorică cât și valoarea practică deosebită, vom prezenta, succint, în continuare câteva elemente care stau la baza diversității sistemelor de grup sanguin ABO și Rh și a proteinei serice alfa<sub>1</sub>-antitripsină.

### 1.1. POLIMORFISMUL SISTEMULUI DE GRUP SANGUIN ABO

Sistemul de grup sanguin ABO a fost descris pentru prima dată de către Landsteiner în 1900 iar premiul Nobel pe care l-a primit se justifică prin rolul major pe care îl are sistemul ABO în transfuziile de sânge și transplanturile de organe.

Landsteiner a descris patru "tipuri" de sânge la om determinate de prezența pe suprafața eritrocitelor a antigenelor A și B și a anticorpilor corespunzători anti-A și anti-B în ser. Există patru fenotipuri majore: O, A, B și AB: tipul A este caracterizat prin prezența antigenelor A și a anticorpilor anti-B, tipul B prin prezența antigenelor B și a anticorpilor anti-A, tipul AB prin prezența ambelor antigene și absența celor doi anticorpi, iar tipul O prin absența antigenelor și prezența celor doi anticorpi. Datorită acestui tip de corelație între antigene și anticorpi, transfuziile de sânge se recomandă a se efectua numai izogrup.

Bazele moleculare ale sistemului de grup ABO au început a fi înțelese relativ recent. Antigenele de grup ABO sunt de fapt molecule de glicoproteine care sunt atașate la suprafața eritocitară. Ceea ce determina diferența dintre antigene este nu componenta proteică, care este relativ identică, ci o serie de grupări glucidice atașate (vezi capitolul 4.B.5. și figura 4.11). Prima etapă în formarea acestor antigene este rezultatul intervenției unei enzime numită *fucozil transferaza* (codificată de gena *FUT1* localizată pe cromosomul 19) care determină adăugarea unor grupări de fucoză la miezul proteic. Rezultatul acestei etape este formarea antigenului H. Etapa a doua este catalizată de enzima *glicozil transferaza* (codificată de gena *ABO* de pe cromosomul 9) care prezintă în populația generală două variante alelice majore, codominante, A și B și o variantă recesivă, O. Varianta alelică A determină adăugarea la antigenul H a unui rest de N-acetilgalactozamină, cu formarea antigenului A, în timp ce varianta alelică B are afinitate mai crescută pentru adăugarea unui rest de D-galactoză, ceea ce transformă antigenul H în antigen B. La persoanele de grup sanguin O glicozil transferaza nu este funcțională și, ca urmare, eritrocitele vor prezenta pe suprafața lor antigene H.

Au fost identificate și persoane care prezintă mutația homozigotă a genei *FUT1*. Acești indivizi nu sunt capabili să realizeze prima etapă în formarea antigenelor de grup ABO și, ca urmare, indiferent că din punct de vedere genetic prezintă sau nu alele A și/sau B ale glicozil transferazei, ele nu vor putea conduce la formarea antigenelor A și B (fenotip Bombay). Acești indivizi prezintă în ser anticorpi anti-A și anti-B și, ca urmare, din punct de vedere serologic nu pot fi diferențiați de indivizii cu grup O. Analiza genetică a indivizilor cu grup Bombay a evidențiat aspectul omogen, cu prezența aceleiași mutații punctiforme T725G care inactivează *FUT1*, asociată cu deleția genei învecinate *FUT2* care este responsabilă de secreția antigenelor de grup sanguin în salivă (caracterul secretor).

Odata cu clonarea genei glicozil transferazei a putut fi analizat substratul molecular al diferențelor care există între alelele A, B și O. Între secvența alelelor A și B există o diferență de patru nucleotide care produc modificări de secvență a aminoacizilor ce modifică specificitatea glicozil transferazei codificată de gena *ABO*. Alela O are deleția unei perechi de baze care produce o mutație cu schimbarea cadrului de lectură ce suspendă activitatea transferazei mutante. Deci micile modificări genetice conduc la substituția unor aminoacizi din structura enzimei, care vor determina modificarea afinității pentru resturile glucidice. În fapt au fost evidențiate numeroase subgrupuri sanguine precum A2, Ax sau B3 determinate de asemenea de diferențe genetice la nivelul regiunilor codante și producerea a peste 70 de alele. Se adaugă și variații genetice la nivelul regiunilor reglatorii 5' și 3' precum și numeroase variații genetice la nivelul intronilor.

## 1.2. POLIMORFISMUL SISTEMULUI DE GRUP SANGUIN Rh

Denumirea sistemului Rh provine de la maimuțele Rhesus care au fost utilizate în experimentele ce au dus la descoperirea sistemului de către Diamond și Blackfan în 1932. Sistemul Rh este important pentru rolul său în transfuziile de sânge și în boala hemolitică a noului născut. Din punct de vedere fenotipic populația generală este împărțită în două categorii majore: indivizi Rh pozitivi care exprimă pe suprafața eritrocitelor antigenul RhD (aproximativ 85% din populația caucaziană) și indivizi Rh negativi care nu exprimă acest antigen (15%). Spre deosebire de sistemul ABO indivizii Rh negativi nu prezintă spontan anticorpi anti RhD în ser. În schimb, acești anticorpi se pot dezvolta ca urmare a contactului cu sângele Rh pozitiv care determină imunizarea indivizilor respectivi. Acest proces are o

semnificație deosebită în cazul transfuziilor de sânge și în cazul bolii hemolitice a nou-născutului.

Boala hemolitică a nou-născutului este o afecțiune care poate apărea la copii Rh pozitivi născuți din mame Rh negative. În mod normal, în cursul sarcinii, mici cantități de sânge fetal pot traversa bariera placentară determinând imunizarea mamei Rh negative. Anticorpii materni necesită un interval de timp pentru formare, astfel încât, de regulă, prima sarcina decurge fără probleme. Atunci când mama a fost imunizată anterior primei sarcini, sau în cursul unei a doua sarcini cu feți Rh pozitivi, anticorpii anti RhD de la mamă pot traversa bariera placentară către făt, în special spre sfârșitul sarcinii, determinând hemoliza eritrocitelor fetale. Rezultatul este icterul pronunțat și, în formele severe, insuficiența cardiacă congestivă. Afecțiunea poate fi prevenită în prezent prin administrarea la femeile Rh negative de imunoglobuline împotriva anticorpilor anti-RhD după fiecare sarcină cu făt Rh pozitiv.

Studiile de genetică au evidențiat faptul că sistemul Rh este unul dintre cele mai polimorfice sisteme de grup sanguin, cu peste 45 de antigene independente. Există trei gene majore care sunt implicate în producerea acestui sistem: gena *RHD* ce codifică proteina RhD (purtaătoare a antigenului RhD) și gena *RHCE* care codifică proteina RhCcEe (purtaătoare a antigenelor C sau c și E sau e) sunt localizate pe brațul scurt al cromosomului 1, în timp ce gena *RHAG* (*Rh associated glycoprotein*) este localizată pe cromosomul 6p. Proteinele Rh poartă antigenele Rh, dar sunt exprimate pe suprafața eritrocitelor numai dacă proteina RhAG este de asemeni prezentă. La toate acestea se adaugă și o serie de proteine Rh accesorii și toate împreună formează "complexul Rh". Indivizii Rh pozitivi prezintă antigenul major al acestui sistem, RhD. Indivizii Rh negativi prezintă de regulă o deleție a întregii gene RHD. În schimb, diferențele care există între alelele C și c, respectiv E și e sunt rezultatul unor polimorfisme mononucleotidice care conduc la substituția unor aminoacizi în structura proteinei RhCcEe.

### 1.3 POLIMORFISMUL ALFA<sub>1</sub> –ANTITRIPSINEI.

Alfa1-antitripsina este o proteină serică importantă cu acțiune inhibitorie asupra unor enzime proteolitice specifice cum sunt: tripsina, chimotripsina sau elastaza pancreatică. Ținta sa principală este elastaza leucocitară, enzimă care în lipsa inactivării de către alfa1-antitripsină, distruge proteinele țesutului conjunctiv pulmonar, în special elastina, determinând dezorganizarea alveolelor pulmonare. Deficiența în alfa1-antitripsină produce o formă severă de emfizem pulmonar (boală pulmonară cronică obstructivă), cu debut precoce.

Locusul genei care codifică alfa1-antitripsina, cunoscut sub numele de PI (protease inhibitor) este situat la nivelul cromosomului 14 și prezintă un înalt polimorfism. Unele variante alelice sunt mai frecvente în populație (10-75%), altele mai rare. Cele mai frecvente alele (M1, M2, M3) codifică variante proteice diferite structural dar cu funcție normală. Alte alele rare (Z și S) specifică variante proteice cu activitate inhibitorie proteazică semnificativ redusă, ceea ce duce la apariția unor manifestări clinice.

Principala semnificație medicală a polimorfismului alfa1-antitripsinei este legată de alelele care determină o deficiență în sinteza și activitatea acestei proteine. Cea mai importantă dintre acestea este alela Z, având o frecvență de 1-2% în populație. Indivizii cu genotip Z/Z prezintă o concentrație plasmatică mult mai redusă (circa 15%) și un risc crescut de boală pulmonară obstructivă, instalată la adultul tânăr, astm bronșic, ciroză hepatică<sup>22</sup>. Deficiența alfa1-antitripsinei prezintă frecvențe diferite în populație, de la aproximativ 1/2000 - 1/8000 în populația caucaziană la frecvențe mult mai reduse în populația de culoare și la asiatici. Și alte variante genotipice, cum ar fi statusul heterozigot pentru alelele S sau Z pot avea semnificație clinică, determinand predispoziție pentru afectare pulmonară mai ales la fumători.

## 2. POLIMORFISME ADN

<sup>22</sup> Mecanismul afectării hepatice, diferit de afectarea pulmonară, implică agregarea și stocarea proteinei Z în reticulul endoplasmic, datorită structurii sale modificate



Dupa cum am precizat anterior, analiza la nivel proteic permite identificarea numai a unei minorități a polimorfismelor genetice și anume a acelor care determină modificarea secvenței aminoacizilor. Însă în interiorul genelor există “variații genetice sinonime”, care nu pot fi identificate pe baza modificărilor fenotipice. În plus, variații de secvență nucleotidică a unor segmente/regiuni de ADN există și în regiunile intergenice iar frecvența acestor polimorfisme intergenice o depășește de regulă pe cea din interiorul genelor, deoarece în acest caz nu există nici o presiune de selecție. Există mai multe tipuri de polimorfisme ADN. Cea mai simplă formă este reprezentată de polimorfismele mononucleotidice (SNP – *single nucleotide polymorphism*). Acestea li se adaugă polimorfismele existente la nivelul unor repetiții nucleotidice simple (de la unul până la șase nucleotide) care intră în componența *microsateliților* sau polimorfismele prezente la nivelul *minisateliților*. Toate aceste tipuri de variații în secvența ADN se corelează cu polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție

## 2.1 POLIMORFISMUL LUNGIMII FRAGMENTELOR DE RESTRICȚIE

Enzimele de restricție (vezi capitolul 3.C.1.1) recunosc o secvență nucleotidică specifică și secționează ADN la acest nivel. Clivarea moleculei de ADN cu o anumită enzimă de restricție “fragmentează” ADN într-un număr definit de fragmente, de o anumită lungime, corespunzătoare distanței dintre două situsuri de restricție. Modificările de secvență nucleotidică care vor produce *abolirea* unui situs de restricție, *crearea* unui situs nou sau schimbarea “distanței” dintre două situsuri (prin deleție sau inserție nucleotidică) vor modifica lungimea fragmentelor de restricție (acestea sunt evidențiate prin Southern blot, după hibridarea cu o sondă corespunzătoare unei părți din fragmentul respectiv, vezi 3.C.3.1) (figura 6.35). Aceste variații ale ADN au fost numite polimorfisme ale lungimii fragmentelor de restricție – **RFLPs** (de la *restriction fragment length polymorphisms*; se pronunță “*reflips*”). Fragmentele de lungimi diferite constituie *alele codominante* ale locusului ADN respectiv. În practică, RFLPs se folosesc în diagnosticul genotipic indirect deoarece anumite alele ale unui locus marker se pot transmite strâns înlănțuite cu o alelă mutantă (vezi capitolul 9).

## 2.2 POLIMORFISMELE MONONUCLEOTIDICE (SNP)

SNP reprezintă forma cea mai frecventă a polimorfismelor ADN (în medie 1 la 1000 baze, dar frecvența poate fi mai înaltă în anumite regiuni precum insulele CpG – 1 la 100 sau mai redusă în interiorul unor gene – 1 la 2500 baze). SNP situate în regiunile intergenice sau cele sinonime din cadrul genelor nu sunt supuse selecției naturale. Pe de altă parte, modificările nonsinonime pot fi supuse unor asemenea efecte, iar persistența lor în populație poate reflecta o serie de avantaje selective și poate explica o bună parte din diversitatea fenotipică existentă în populația umană. Având în vedere acest fapt s-au depus eforturi considerabile pentru cartografierea și caracterizarea acestor polimorfisme.

In anul 2001 o serie de organizații publice și private precum Celera Genomics, Incyte Genomics, Sanger Institute și Washington University au inițiat un proiect comun de realizare a unei hărți a acestor SNP la nivelul întregului genom. La aceasta s-au adăugat eforturile International SNP Map Working Group (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) care au condus la identificarea până în prezent a cira 3 milioane SNP.

Există numeroase metode de identificare a SNP. Cu valoare istorică se poate menționa tehnica RFLP care permite evidențierea efectului indirect pe care asemenea SNP îl pot avea asupra unor situsuri de restricție ale enzimei utilizate (aparitia sau anularea unor situsuri de restricție determină lungimi diferite ale fragmentelor ADN în urma digestiei ADN genomic cu o enzimă de restricție). Utilizarea enzimelor de restricție permite însă acoperirea unei mici părți (sub 5%) din întreaga secvență a ADN uman și, de aceea, a fost necesară dezvoltarea unor tehnici noi, precum electroforeza în gel cu gradient denaturant (DGGE), analiza heteroduplexurilor, microcipuri și secvențializarea.

Studiul SNP este utilizat în prezent în câteva direcții majore:

- Localizarea genelor de susceptibilitate pentru caracterele multifactoriale (vezi tabelul 6.8) bazată pe studii de dezechilibru ale înlănțuirii și studii de asociere a haplotipurilor (vezi capitolul 3.D).

**Tabelul 6.8 Exemple de boli asociate cu unele SNP**

Boala	Gena	Proteina codificata
Astmul bronsic	EDN1 NOS1	Endotelina 1 Nitric oxid sintetaza 1
Aritmiile cardiace	KCNQ1	Proteina canal de potasiu
Artrita idiopatică	MIF	Factorul de inhibare a macrofagelor
Cancerul pulmonar	MMP1	Metaloproteinaza matriceala 1
Ciroza biliară	MBL	Proteina de legare a manozei
Diabetul zaharat tip II	STX1A	Sintaxina 1A
Hipertensiunea arterială	TAF1	Inhibitorul fibrinolizei activat de trombina
Lupusul eritematos sistemic	PRL	Prolactina
Migrena	INSR	Receptorul insulenic

- Farmacogenetica care încearcă sa individualizeze tratamentul fiecărui pacient în funcție de individualitatea sa genetică. Un rol major în aceste studii îl are în special identificarea și înțelegerea efectelor pe care asemenea SNP le au asupra modularii activității enzimelor implicate în metabolizarea medicamentelor.
- Cercetarile privind evoluția speciei umane din punct de vedere biologic (similitudinea cu alte specii) și istoric (migrația populațiilor).

### 2.3 POLIMORFISMELE MICROSATELIȚILOR ȘI MINISATELIȚILOR ADN

Aceste polimorfisme ADN au fost prezentate deja în capitolul 2.C.

**Minisateliții** (numiți și VNTR – *variable number of tandem repeat*) sunt reprezentați de multiple copii (ale unei secvențe de 10-100 nucleotide, numită *minisatelit*) care sunt dispuse în tandem, între două situsuri de restricție. Unii minisateliți sunt extrem de polimorfici, putând prezenta în populația generală câteva zeci de alele, diferite prin numărul de repetiții și deci mărimea fragmentului de restricție în care se află minisatelitul.

Deoarece *secvența de bază* (“miezul”) a unui minisatelit poate fi adeseori destul de asemănătoare la nivelul a numeroși loci, aceasta a permis dezvoltarea unor tehnici care fac posibilă analiza simultană a mai multor loci folosind o singură sondă. Se realizează un model de distribuție caracteristic unei anumite persoane, cunoscut sub numele de **amprenta ADN** (*DNA fingerprinting*). În principiu ADN genomic este supus digestiei cu o enzima de restricție după care este utilizată metoda Southern blot în care un fragment minisatelitic este utilizat drept sondă (vezi figura 6.35).

**Microsateliții** reprezintă secvențe repetitive simple, cele mai frecvente forme fiind repetițiile dinucleotidice, trinucleotidice și tetranucleotidice care apar în medie cu o frecvență de 1 la fiecare 10 kb. Microsateliții umani au un grad crescut de polimorfism, cu circa 10 alele diferite per locus în populație, ceea ce face ca gradul de heterozigotitate pentru majoritatea acestora să depășească 80%. Această caracteristică a permis utilizarea lor în alcătuirea primelor hărți genomice. De asemenea înlănțuirea genetică a unor microsateliți cu o anumită genă este utilizată pentru diagnosticul indirect al purtătorilor unor mutații cauzatoare ale unor boli genetice.

### 2.4. APLICAȚIILE PRACTICE MEDICALE A POLIMORFISMELOR ADN

Polimorfismele genetice sunt amplu folosite în toate cercetările de genetică medicală deoarece permit diferențierea diferitelor alele ale unei gene sau a diferitelor segmente de ADN genomic. Calitatea de markeri genetici a fost utilizată pentru cartografierea genică prin analize

de înlănțuire, diagnosticul prenatal sau presimptomatic al unor boli genetice, depistarea heterozigoților purtători de gene recesive, identificarea persoanelor cu risc crescut sau scăzut pentru anumite boli comune ale adultului, tipare tisulară pentru transplante de organe, teste de paternitate, identificare persoanelor.

#### INTERNET

1. Anomaliile cromosomice constituționale: <http://www.pathology.washington.edu:80/Cytogallery>
2. Bază de date privind cromosomii umani: <http://www.kumc.edu/gec/geneinfo.html>
3. Bază de date pentru mutațiile umane: HUGO database: <http://www.ariel.ucl.ac.uk>  
Institute of Medical Genetics in Cardiff: <http://www.archive.uwcm.ac.uk>.
4. Citogenetică moleculară: <http://bioserver.uniba.it/fish/Cytogenetics/welcome.html>
5. Genetică medicală - <http://www.hslib.washington.edu-helix>
6. Genetică medicală - University of Utah School of Medicine: <http://medgen.genetics.utah.edu>
7. Gene amprentate; <http://www.mgu.har.mrc.ac.uk/imprinting>
8. National Human Genome Research Institut: <http://www.nhgri.nih.gov>.
9. Nomenclatura mutațiilor: <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/>
10. Nomenclatura genelor: <http://www.gene.ucl.ac.uk/cgi-bin/nomenclature/searchgenes.pl>
11. Polimorfismele SNP: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>
12. Structura normală și anomaliile cromosomice: <http://www.tokyo-med.ac.jp>

#### Bibliografie specifică selectivă

1. Antonarakis S.E. – *Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations*-Hum.Mutat. 1998;11:1-3
2. Avent N.D., Reid M.E - *The Rh blood group system* – Blood, 2000;95: 375-387.
3. den Dunnen, J.T. and Antonarakis, S.E.- *Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion* - Hum. Mut. 2000;15:7-12.
4. D'Andrea A.D., Grompe M. - *The Fanconi anaemia/BRCA pathway* - Nat Rev Cancer, 2003, 3:23-34.
5. Bishop A. J.R., Schiestl R.H. - *Homologous recombination as a mechanism for genome rearrangements: environmental and genetic effects* - Hum. Mol. Genet., 2000;9:2427-2434
6. Dasika G. K. et al. - *DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis* - Oncogene, 1999;18:7883-7899
7. Engel E. – *Uniparental disomy, genomic imprinting and a case for new genetics* – Ann.Genet, 1997;40:24-34
8. Haber J. E. - *Partners and pathways: repairing a double-strand break* - Trends Genet., 2000;16:259-264.
9. Harfe B. D., Jinks-Robertson S. - *DNA mismatch repair and genetic instability* - Annu. Rev. Genet., 2000;34:359-399
10. Hendrickson E.A. - *Cell-Cycle Regulation of Mammalian DNA Double-Strand-Break Repair* - Am.J.Hum.Genet 1997;61:795-800.
11. Hoeijmakers J.H. - *Genome maintenance mechanisms for preventing cancer* - Nature, 2001;411:366-374.
12. Inoue, K. and Lupski, J.R. - *Molecular mechanisms for genomic disorders* - Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2002;3:199-242.
13. Jeffrey A.J. – *DNA typing: approaches and applications* – J.Foresnic Sci.Soc. 1993;33:204-211
14. Kazanian H.H, Moran J.V. - *The impact of L1 retrotransposons on the human genome* - Nature Gen. 1998; 19:19-23
15. Khanna K. K. - *Cancer Risk and the ATM Gene: a Continuing Debate* - J. Natl. Cancer Inst., 2000;92: 795-802
16. Latchman D.S. - *Transcription-factor mutations and disease* - N.Engl.J.Med 1996; 334:28-33.
17. Ledbetter DH, Ballabio A. – *Molecular Cytogenetics of contiguous gene syndrome* – in Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) – *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, 7th ed, McGraw-Kill, 1995, New York, pp811-839
18. Lindahl T., Wood R. D. - *Quality Control by DNA Repair* - Science, 1999;286:1997-2005
19. Lupski JR. – *Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits* – Trends Genet. 1998;14:417-422
20. Minnick D.T., Kunkel T.A. – *DNA synthesis errors, mutators and cancer* - Cancer Survey, 1996;28: 3-20.
21. Peltomaki P. – *Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer* – Hum.Mol.Genet., 2001;10:735-740

22. Petes T.D. - *Meiotic recombination: hot spots and cold spots* - Nat. Rev. Genetics, 2001;2: 360-369
23. Petronczki M, Simos MF, Nasmyth K- *Un menage a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis* - Cell, 2003;112: 423-440
24. Preston J.R. - *Aneuploidy in germ cells: disruption of chromosome mover components* - Env.Mol.Mutagenesis 1996;28:176-181
25. Richards, R.I. - *Dynamic mutations: a decade of unstable expanded repeats in human genetic disease*- Hum. Mol. Genet. 2001;10: 2187-2194.
26. Roeder G.S.- *Meiotic chromosomes: it takes two to tango* - Genes Dev., 1997;11: 2600-2621
27. Sancar A. - *DNA Repair in humans* - Annu.Rev. Genetics, 1995;29:69-105.
28. Shastry B.S. - *SNP alleles in human disease and evolution* - J. Hum. Genet., 2002;47: 561-566.
29. Vidau M. - *Mécanismes et conséquences des mutations génétiques* - Rev Prat. 1997; 47:146-154.
30. Zhou B. B. S., Elledge S. J. - *The DNA damage response: putting checkpoints in perspective* - Nature, 2000;408:433-439
31. Wang DG, Fan J, Siao C et al - *Large-scale identification, mapping and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome* - Science, 1998;280:1077-1082
32. Weaver D.T. - *Regulation and repair of double-strand DNA breaks* - Critical Rev.Eukar.Gene Expression , 1996, 6:345-375
33. Wheeler J. M. D., Bodmer W. F., Mortensen N.J. - *DNA mismatch repair genes and colorectal cancer* - Gut, 2000;47:148-153
34. Yip S.P. - *Sequence variation at the human ABO locus* - Ann. Hum. Genet., 2002;66:1-27.
35. Youssoufian, H. and Pyeritz, R.E. - *Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in humans* - Nat. Rev. Genet. 2002;3: 748-758.

## CAPITOLUL 7

# GENETICA POPULAȚIILOR

Genetica medicală se preocupă nu numai de stabilirea unui diagnostic corect al bolii unui pacient, dar și de evaluarea riscului de recurență a afecțiunii la rudele sale. În această acțiune, specifică geneticii medicale, trebuie luate în considerare atât frecvența genelor mutante cât și genotipurile persoanelor din populația generală care se căsătoresc cu membrii familiei bolnavului. Prin urmare, în genetica medicală, la evaluarea unui pacient, se va ține cont atât de familie sa cât și de populația căreia îi aparține.

## A. FRECVENȚA GENELOR ȘI GENOTIPURILOR ÎNTR-O POPULAȚIE

### 1. DEFINIȚIA ȘI OBIECTIVELE GENETICII POPULAȚIILOR

Prin **populație** se înțelege un grup (o comunitate) de indivizi cu o constelație comună de gene, care trăiesc în același habitat și se împerechează la întâmplare (în panmixie), fără selecția partenerilor de sex opus, pentru a produce descendenți.

Fiecare organism primește de la părinții săi, prin genele gameților, informațiile necesare pentru formarea și dezvoltarea sa. În acest mod, membrii unei populații umane moștenesc și transmit gene asemănătoare. Totalitatea genelor existente la un moment dat în populație alcătuiesc constelația sau **fondul comun de gene** ("*gene pool*" în limba engleză). Indivizii reprezintă "*asocieri temporare și specifice (unice) ale unor gene*" din constelația de gene caracteristică populației. Din acest punct de vedere populația biologică este mai curând "*o populație de gene*" decât un grup de indivizi; populațiile pot fi deci descrise în termeni de frecvență a diferitelor gene alele și genotipuri, care generează anumite fenotipuri.

De exemplu, în populația britanică frecvența relativă a genotipurilor grupului sanguin MN este următoarea:  $M/M - 28\%$ ,  $NN - 22\%$  și  $M/N - 50\%$ .

Grupele și subgrupele populaționale se deosebesc unele de altele prin constelația specifică (fondul) de gene, determinată de frecvențele diferite ale alelelor multor loci.

Exemplele sunt numeroase dar deocamdată vom menționa doar câteva:

- în sistemul polialelic al grupului sanguin ABO, alela B predomină în populația asiatică și frecvența ei scade de la est spre vest; alela A predomină în vestul Europei, iar alela O în populația africană;
- sicklema este frecventă în Africa, mucoviscidoza predomină în populația albă din Europa și SUA, deficiența în aldehyd dehidrogenază 1 este comună în populația asiatică; boala Tay Sachs are o frecvență ridicată la grupurile de evrei Ashkenazi; coroideremia este comună în Finlanda; distrofia miotonică în Quebec, etc.

În populație, genele formează numeroase combinații care interacționează și se influențează reciproc. Între gene se stabilesc relații alelice și nonalelice care fac ca ansamblul lor să fie integrat (coadaptat). Acest fapt conferă constelației genice a populației o *puternică coeziune*. Împerecherea întâmplătoare (panmictică) a indivizilor din populație produce un schimb permanent de gene, care, printr-o continuă recombinare și segregare meiotică, generează la descendenți o heterozigoție perpetuă și masivă. Această mare bogăție genotipică determină în populație o *intensă variabilitate genetică*. Ea explică unicitatea genetică a fiecărei persoane și

vigurozitatea, adaptabilitatea și vitalitatea populației. Exceptând parțial omul, la celelalte specii individul are un rol neînsemnat în evoluție; rolul decisiv revine populației aceasta reprezentând unitatea majoră a evoluției. Populația biologică este deci o populație de gene, o unitate de reproducere panmictică și o unitate de evoluție.

**Genetica populațiilor umane** studiază frecvența genelor și proporțiile relative ale diferitelor genotipuri în interiorul unei populații, precum și factorii care mențin sau modifică frecvența lor de la o generație la alta. Evaluarea acestor parametri este utilă pentru:

- definirea structurii genetice caracteristice populației respective, prin frecvența specifică a unor gene mutante și boli genetice; existența unor alele mutante specifice unei populații are importanță pentru înțelegerea originii bolilor genetice și furnizează informații utile pentru diagnosticul bolii în populațiile cu risc crescut;
- sfatul genetic, prin cunoașterea frecvenței diferitelor genotipuri în populație; de exemplu, evaluarea incidenței heterozigoților sănătoși purtători ai unei gene recesive ( $N_a$ ) și calcularea riscului de apariție în descendență a unor copii afectați ( $aa$ );
- aprecierea necesităților medico-socio-economice prin evaluarea frecvenței genotipurilor anormale în populație; de exemplu, evaluarea rentabilității programelor de depistare genetică într-o anumită populație.

Genetica populațiilor are multe elemente comune cu epidemiologia care studiază interrelațiile dintre factorii genetici și de mediu, determinante ale frecvenței și distribuției bolilor în colectivitățile umane. Cele două domenii formează împreună **epidemiologia genetică** care se ocupă îndeosebi de bolile multifactoriale, frecvente în viața adultului.

## 2. LEGEA HARDY-WEINBERG

Conceptul cel mai important în genetica populațiilor este legea descrisă în 1908 de către Hardy și Weinberg. Această lege explică de ce într-o populație vastă, în interiorul căreia uniunile (împerecherile) sunt aleatorii (la întâmplare sau panmictice), *frecvențele alelice nu variază* de la o generație la alta.

Datorită raporturilor de dominanță și recesivitate care se stabilesc între genele alele ar fi de așteptat ca frecvența fenotipurilor dominante să fie mai mare și să crească pe seama celor recesive. Astfel, în medie, 3/4 din descendenții a doi heterozigoți ( $A_n + A_n$ ) vor manifesta caracterul dominant și numai 1/4 vor avea caracterul recesiv. În realitate, în populațiile mari și panmictice aceste fenomene nu se observă și populația este în stare de echilibru deoarece proporția relativă a diferitelor genotipuri rămâne *constantă (stabilă)* de la o generație la alta.

Pentru a demonstra legea Hardy și Weinberg presupunem că un anumit locus autosomal "A" are două gene alele "A" și "a". Dacă notăm cu "p" frecvența genei "A" și cu "q" frecvența genei "a" atunci suma totală a alelelor locusului A într-o populație dată este  $p + q = 100\%$ . Deoarece frecvențele alelice sunt exprimate de obicei ca o fracție a unității, relația se poate scrie și  $p + q = 1$ .

Cele două gene alele "A" și "a" vor alcătui trei genotipuri: AA, Aa și aa. Indivizii din populație posedă unul din aceste genotipuri. Ei vor produce gameți ce conțin numai gena "A" sau "a". Gameții purtători ai acestor gene vor fi în aceeași proporție – p și q – ca și frecvențele alelice în populație. Prin unirea aleatorie (independentă de genotip și de fenotip) a indivizilor și deci a gameților masculini și feminini ce conțin fie gena "A" fie gena "a" (cu frecvențele p și q) rezultă în descendență (F1) indivizi cu unul din următoarele trei genotipuri posibile: AA, Aa, aa (tabelul 7.1). Frecvențele acestor genotipuri va fi  $p^2$ ,  $2pq$  și  $q^2$  fiind o extensie a binomului  $(p+q)^2$ , iar suma frecvențelor lor egală cu 1. O populație în care distribuția genotipurilor este binomială se află în *echilibru genetic*.

**Tabel 7.1. Frecvența genotipurilor realizată de alelele A și a ale locusului autosomal A.**

		Gameți masculini	
		A (p)	a (q)
Gameți feminini	A (p)	AA (p <sup>2</sup> )	Aa (pq)
	a (q)	Aa (pq)	aa (q <sup>2</sup> )
Frecvența totală a genotipurilor la descendenți = p <sup>2</sup> + 2pq + q <sup>2</sup> = (p + q) <sup>2</sup> = 1			

În generația următoare, fiecare din cele trei genotipuri paterne se poate asocia cu fiecare din cele trei genotipuri materne (tabelul 7.2). Genotipurile ce rezultă la descendenți din fiecare uniune precum și frecvența lor este prezentată în tabelul 7.3. Din aceste încrucișări rezultă descendenți cu genotipurile AA, Aa și aa. Frecvențele lor (calculate pe baza datelor din tabelul 7.3) sunt p<sup>2</sup>, 2pq și q<sup>2</sup>.

**Tabel 7.2. Frecvența diferitelor încrucișări parentale**

		Genotipuri paterne		
		AA (p <sup>2</sup> )	Aa (2pq)	aa (q <sup>2</sup> )
Geno- tipuri materne	AA (p <sup>2</sup> )	AA x AA (p <sup>4</sup> )	AA x Aa (2p <sup>3</sup> q)	AA x aa (p <sup>2</sup> q <sup>2</sup> )
	Aa (2pq)	Aa x AA (2p <sup>3</sup> q)	Aa x Aa (4p <sup>2</sup> q <sup>2</sup> )	Aa x aa (2pq <sup>3</sup> )
	aa (q <sup>2</sup> )	aa x AA (p <sup>2</sup> q <sup>2</sup> )	aa x Aa (2pq <sup>3</sup> )	aa x aa (q <sup>4</sup> )

**Tabelul 7.3. Frecvența diferitelor genotipuri la descendenți**

Încrucișări parentale		Descendenți		
Tipuri	Frecvență	AA	Aa	aa
AA x AA	p <sup>4</sup>	p <sup>4</sup>	-	-
AA x Aa	4p <sup>3</sup> q	2p <sup>3</sup> q	2p <sup>3</sup> q	-
AA x aa	2p <sup>2</sup> q <sup>2</sup>	-	2p <sup>2</sup> q <sup>2</sup>	-
Aa x Aa	4p <sup>2</sup> q <sup>2</sup>	p <sup>2</sup> q <sup>2</sup>	2p <sup>2</sup> q <sup>2</sup>	p <sup>2</sup> q <sup>2</sup>
Aa x aa	4pq <sup>3</sup>	-	2pq <sup>3</sup>	2pq <sup>3</sup>
aa x aa	q <sup>4</sup>	-	-	q <sup>4</sup>
Total descen- denți	AA = p <sup>4</sup> + 2p <sup>3</sup> q + p <sup>2</sup> q <sup>2</sup> = p <sup>2</sup> (p <sup>2</sup> + 2pq + q <sup>2</sup> ) = p <sup>2</sup> (p + q) <sup>2</sup> = p <sup>2</sup> (1) <sup>2</sup> = p <sup>2</sup>			
	Aa = 2p <sup>3</sup> q + 2p <sup>2</sup> q <sup>2</sup> + 2p <sup>2</sup> q <sup>2</sup> + 2pq <sup>3</sup> = 2pq(p <sup>2</sup> + 2pq + q <sup>2</sup> ) = 2pq(p + q) <sup>2</sup> = 2pq(1) <sup>2</sup> = 2pq			

$$aa = p^2q^2 + 2pq^3 + q^4 = q^2(p^2 + 2pq + q^2) = q^2(p + q)^2 = q^2(1)^2 = q^2$$

Se observă că frecvența fiecărui genotip (AA, Aa, aa) în generația a doua (F2) este aceeași ( $p^2$ ,  $2pq$ ,  $q^2$ ) ca și în prima generație; la fel se întâmplă și cu frecvențele genelor alele, deoarece  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ , deci  $(p + q)^2 = 1$  sau  $p + q = 1$ .

Pe baza datelor prezentate mai sus se poate enunța legea Hardy-Weinberg: *"într-o populație panmictică cu efectiv nelimitat, frecvențele inițiale p și q ale alelelor A și a se mențin constante din generație în generație; acest lucru este valabil și pentru frecvența genotipurilor AA, Aa, aa care vor fi în proporție de  $p^2 : 2pq : q^2$ . O astfel de populație, cu frecvențe genice stabile, este în stare de echilibru"*.

Din demonstrația și enunțul legii se remarcă faptul că Hardy și Weinberg au explicat baza frecvenței constante a genelor ca o aplicație a teoremei binomiale  $(p + q)^n$ , unde  $p$  și  $q$  sunt probabilitățile de producere a două evenimente alternative (cele două gene alele), iar  $n$  numărul alelelor pentru un locus dat<sup>1</sup>.

O populație care demonstrează relațiile/caracteristicile de bază ale legii Hardy-Weinberg este considerată a fi în echilibru Hardy-Weinberg. Acest echilibru a fost clar demonstrat mai sus pentru un locus autosomal bialelic. Pentru un locus legat de X situația este puțin diferită în sensul că echilibrul nu se realizează după prima generație de încrucișări întâmplătoare; el este obținut, într-o manieră oscilatorie, după un număr de generații întrucât transmiterea ereditară diferă la bărbați și femei (bărbații moștenesc unicul X de la mamele lor și îl transmit fiicelor; cromosomii XX de la femei provin însă de la ambii părinți). Când se realizează echilibrul genic, el este menținut în generațiile următoare. În aceste condiții, frecvența genică este aceeași la ambele sexe, frecvența bărbaților afectați (hemizigoți  $X^aY$ ) este egală cu aceea a genei alele mutante ( $X^a$ ) în timp ce frecvențele genotipice la femei (XX) sunt la fel ca și în cazul unui locus autosomal.

Legea Hardy-Weinberg este valabilă numai în anumite condiții:

- populațiile sunt mari;
- încrucișările au loc la întâmplare și nu există căsătorii preferențiale sau consanguine;
- nu se produc mutații ale locusului analizat sau rata mutațiilor este constantă (alelele mutante pierdute prin deces sunt înlocuite prin mutații noi);
- nu există selecție față de un anumit fenotip; toate genotipurile unui locus au o viabilitate și o fertilitate egală;
- nu se produc migrații care să modifice structura genetică a populației.

Așa cum vom vedea, aceste condiții nu sunt totdeauna realizate în toate populațiile umane dar amploarea factorilor ce intervin este limitată, modificările frecvenței genelor sunt echilibrate fie la nivelul inițial, fie la un nou nivel. Astfel legea Hardy-Weinberg rămâne relativ valabilă și poate fi aplicată în practica geneticii medicale, pentru a estima frecvențele alelice.

### 3. APLICAȚIILE MEDICALE ALE LEGII HARDY-WEINBERG

#### 3.1. OBȚINEREA UNOR DATE DESPRE FRECVENȚA GENICĂ UTILE PENTRU REALIZAREA SFATULUI GENETIC

În realizarea sfatului genetic și deci pentru calcularea riscului genetic este util să cunoaștem genotipul unei persoane, în funcție de datele sale familiale și, în special, de gradul de rudenie cu un bolnav cu o afecțiune genetică, precum și frecvența genotipurilor corespunzătoare în populația din care provine partenerul de cuplu a persoanei respective, calculate conform legii Hardy-Weinberg.

##### **a. Boli autosomal dominante**

În afecțiunile autosomal dominante frecvența ( $q^2$ ) a homozigoților (AA) este foarte mică

<sup>1</sup> În cazul unor alele multiple frecvențele genice și genotipice pot fi calculate prin adăugarea unui/unor noi termen(i) la ecuația binomială  $(p + q)^2$ . De ex. frecvențele genice și genotipice pentru cele trei alele ale locusului de grup sanguin ABO se vor calcula pe baza formulei  $(p + q + r)^2$ .



comparativ cu frecvența ( $2pq$ ) a heterozigoților afectați (tabelul 7.5.); în aceste condiții frecvența  $q$  a genei mutante dominante ( $A$ ) este extrem de mică față de frecvența ( $p$ ) a genei normale ( $n$ ). De exemplu, în hipercolesterolemia familială frecvența bolnavilor homozigoți ( $q^2$ ) este 1 : 1.000.000, iar a celor heterozigoți ( $2pq$ ) este 1 : 500. Frecvența ( $q$ ) a genei mutante este 1 : 1.000 sau 0.001 iar frecvența ( $p$ ) a genei normale este  $p = 1 - q = 0,999$ , deci aproximativ egală cu 1.

Pentru practica medicală se poate conchide că aproape orice pacient cu o boală autosomal dominantă este heterozigot (bolnavii homozigoți pot fi excluși din calcul) și deci *frecvența bolii este aproximativ egală cu frecvența heterozigoților*. În acest caz, frecvența genei mutante dominante este jumătate din frecvența bolnavilor heterozigoți ( $2pq$  sau  $2q$  deoarece  $p=1$ ).

#### **b. Boli autosomal recesive**

Cunoscând frecvența ( $q^2$ ) a bolnavilor ( $aa$ ) se pot calcula frecvențele ( $q$ ) genei mutante recesive  $q = (\text{frecvența bolnavilor})^{1/2}$ , frecvența ( $p$ ) genei normale și frecvența heterozigoților ( $2pq$ ). De exemplu, frecvența ( $q^2$ ) a bolnavilor cu mucoviscidoză în Europa este de circa 1/2500; rezultă că frecvența ( $q$ ) genei mutante recesive ( $a$ ) este  $q = (1/2500)^{1/2} = 1/50 = 0,02$ . Frecvența alelei normale ( $N$ ) este  $p = 1 - q = 1 - 1/50 = 49/50 = 0,98$ . Frecvența heterozigoților ( $2pq$ ) este egală cu  $2 \times 49/50 \times 1/50 = 1/25$ , deci 4% din populație. Acest lucru are o importanță deosebită pentru sfatul genetic acordat persoanelor din familia unui bolnav cu mucoviscidoză. Pentru afecțiunile autosomale recesive rare ( $q^2 < 1/10000$ ) frecvența genei normale este  $p = 1$  iar frecvența heterozigoților este aproximativ egală cu  $2q$ , deci de două ori frecvența genei mutante. De exemplu, în cazul fenilcetonuriei frecvența bolnavilor este de 1/10000 iar frecvența heterozigoților =  $2 (1/10000)^{1/2} = 2 \times 1/100 = 1/50$  sau 2% . Din ambele exemple prezentate mai sus se poate remarca faptul că *deși bolnavii homozioți sunt rari, heterozigoții sunt numeroși*. Deoarece numărul bolilor recesive este mare (circa 1500) foarte probabil că toți oamenii poartă, în stare heterozigotă, câteva gene anormale; totuși, probabilitatea ca aceste gene recesive să ajungă împreună la homozigoți este redusă.

#### **c. Boli legate de X**

Apresiasi frecvenței alelice pentru genele situate pe cromosomul X diferă de modul determinării frecvențelor alelice pentru gene autosomale deoarece în cazul bolilor legate de X bărbații (XY) sunt hemizigoți.

Pentru bolile recesive, bărbații pot avea numai două genotipuri posibile -  $X^N Y$  și  $X^a Y$  - spre deosebire de femei (XX) care pot avea trei genotipuri  $X^N X^N$ ,  $X^N X^a$  și  $X^a X^a$ . Frecvența ( $q$ ) a genei mutante recesive ( $a$ ) situată pe X este egală cu frecvența bolii la bărbați; frecvența ( $p$ ) a genei normale (N) este mult mai mare decât  $q$ , iar pentru afecțiunile foarte rare ( $q =$  foarte mic)  $p$  va fi aproape egal cu 1. Incidența celor două alele  $N$  și  $a$  este aceeași la ambele sexe. De aici rezultă că *frecvența afecțiunilor recesive legate de X este mai mare la bărbați ( $q$ ) decât la femei ( $q^2$ )* iar frecvența femeilor heterozigote ( $X^N X^a$ ) va fi  $2pq$ , dublul frecvenței bărbaților afectați ( $2q$ ), deci mult mai mare ca a femeilor afectate, homozigote ( $q^2$ ). De exemplu, în cazul cecității pentru culorile roșu-verde (produsă de mutații ale genelor pentru pigmentul vizual situate pe cromosomul X) frecvența bărbaților afectați este 8% deci frecvența genei mutante  $q = 0,08$  iar a genei normale  $p = 0,92$ . Incidența femeilor afectate ( $q^2$ ) este foarte mică  $(0,08)^2 = 0,0064$ , deci sub 1% dar frecvența femeilor heterozigote ( $X^N X^a$ ) =  $2 pq = 2(0,92)(0,08) = 0,147$ , în jur de 15%

În cazul afecțiunilor dominante legate de X (de exemplu, rahitismul rezistent la vitamina D sau hipofosfatemie) situația este inversă; frecvența bolii va fi de două ori mai mare la femei decât la bărbați.

### 3.2 . EVALUAREA RENTABILITĂȚII UNOR PROGRAME DE DEPISTAJ GENIC

Introducerea unor programe de depistare a unor boli genetice la nou-născuți este dependentă, printre altele, de frecvența bolii în populație. De exemplu, frecvența ( $q^2$ ) a bolii Tay-Sachs la evreii Ashkenazi este de circa 1/3600; deci frecvența genei mutante ( $q$ ) este 1/60 iar a

heterozigoților ( $2pq$ ) de circa  $1/30$ . Frecvența cuplurilor heterozigote ( $Aa \times Aa$ ) care au riscul nașterii unui copil afectat, este  $2pq \times 2pq$  deci aproximativ  $1/900$ . Dacă se presupune că fiecare astfel de cuplu va avea copii, depistarea bolii ar interesa 1800 cupluri pentru a evita nașterea unui copil afectat. În populația generală non-Ashkenazi frecvența bolii Tay-Sachs este de  $1/360000$ , deci  $q = 1/600$ , iar frecvența ( $2pq$ ) heterozigoților  $1/300$ . În aceste condiții depistarea ar trebui să intereseze 180000 de cupluri pentru a descoperi un copil bolnav. Rezultă, evident, că limitarea depistarea la populația de evrei Ashkenazi este mult mai rentabilă decât în populația generală.

## B. FACTORI CARE INFLUENȚEAZĂ FRECVENȚA GENICĂ ȘI GENOTIPICĂ

Echilibrul genic postulat de legea Hardy-Weinberg se realizează în anumite condiții speciale. Legea nu este valabilă decât în populațiile mari, panmictice (în care încrucișările sunt aleatorii), în care nu există mutații sau migrații iar selecția nu acționează pentru sau împotriva unui anumit genotip. Aceste criterii sunt îndeplinite pentru caracterele umane normale (grupe sanguine, serice, enzimatic, tisulare) determinate de gene "neutre". Totuși, în bolile genetice condițiile precizate nu sunt totdeauna realizate și o serie de factori, la care ne vom referi imediat, pot modifica frecvențele genice și genotipice în anumite populații umane. Dar amploarea factorilor ce intervin este *limitată*, modificările frecvenței genelor sunt *echilibrate* fie la nivelul inițial, fie la un nou nivel. Astfel legea Hardy-Weinberg rămâne relativ *valabilă* și poate fi aplicată în practica geneticii medicale, pentru a estima frecvențele alelice.

### 1. UNIUNILE (ÎNCRUCIȘĂRILE) NEÎNTÂMPLĂTOARE

#### a. Stratificare populației și încrucișările asortative

În majoritatea populațiilor umane, uniunile (căsătoriile) sunt rareori aleatorii. Ele sunt de obicei orientate, în sensul că membrii unei subpopulații - definită pe criterii rasiale, etnice, religioase sau altele - se unesc mai frecvent cu alți membri ai aceleiași populații. Acest lucru este firesc deoarece multe populații sunt *stratificate* fiind alcătuite din mai multe subgrupe cu un "profil genic" caracteristic. Uneori ele formează adevărate "izolate", populații mici în care membrii lor nu se vor uni (încrucișa) înafara grupului.

La acest fenomen de stratificare a populației se adaugă *încrucișarea asortativă* sau preferențială, care constă în alegerea partenerului pe baza anumitor criterii. Ea este de obicei "pozitivă", adică oamenii tind să-și aleagă un partener care să le semene (de exemplu prin culoarea pielii, limbaj, statură, inteligență, aptitudini, etc.). Uneori există tendința alegerii partenerilor cu *probleme medicale asemănătoare*, de exemplu surditate congenitală, cecitate, nanism. În toate situațiile în care selecția partenerului este preferențială și deci restrictivă la membrii aceluiasi subgrup, iar atributele comune se află sub control genetic, se produce la descendenți o *creștere a frecvenței genotipurilor homozigote* pentru anumite gene și o reducere corespunzătoare a frecvenței heterozigoților.

#### b. Încrucișările consanguine

Un aspect particular al uniunilor nonaleatorii îl reprezintă *încrucișările consanguine*. Frecvența lor a scăzut în ultimele decenii, fiind mai dese în anumite subgrupe populaționale. Doi indivizi sunt considerați consanguini dacă au cel puțin un strămoș comun până la a treia generație de ascendenți (stră-străbunic). Ei vor avea mai multe gene în comun decât indivizii neînrușiți. Ca și în situațiile enunțate mai sus se produce o *creștere a posibilităților de întâlnire a doi heterozigoți* pentru aceeași genă și deci o amplificare la descendenți a proporției homozigoților bolnavi cu afecțiuni recesive severe, boli poligenice/multifactoriale sau malformații congenitale. *Riscul nașterii unui copil homozigot pentru o alelă recesivă rară este proporțional cu gradul de înrudire* (vezi capitolul 5.D.2.3). Pentru verii primari riscul unui urmaș anormal fizic sau mintal

este aproape dublu față de riscul unui cuplu neînrudit din populația generală (1/30 față de 1/50); la verii de gradul II riscul se reduce iar la celelalte grade de înrudire, mai îndepărtate, el este practic neglijabil (exceptând situațiile în care în fiecare din familiile înrudite există un bolnav cu o afecțiune identică).

## 2. MUTAȚIILE

Mutațiile determină o modificare sau o pierdere a funcției unei gene, ducând la apariția unor caracteristici noi – utile, neutre sau defavorabile. Mutațiile favorabile au jucat un rol important în lunga evoluție biologică a omului, care a atins un maxim greu de depășit. Marea majoritate a mutațiilor noi sunt în prezent *defavorabile* și tind să rupă echilibrul genic din populație.

Amploarea efectului defavorabil al unei mutații se poate aprecia prin consecințele sale asupra "*capacității biologice de supraviețuire și reproducere*" (în limba engleză *fitness*) sau "*indicelui de fertilitate*" al individului. El reprezintă principalul (după alții, unicul) factor care determină dacă o genă mutantă este "pierdută" imediat, supraviețuiește câteva generații sau devine o alelă predominantă. O mutație poate fi *letală* atunci când nu se transmite la generația următoare deoarece afectează supraviețuirea sau reproducerea (produce moarte sau sterilitate). Exemple: osteogenesis imperfecta tipul 2 (boala oaselor de "sticlă"), sindromul Apert (acrocefalosindactilie), displazia tanatoforică etc. Mutațiile *subletale* reduc rata de reproducere; de exemplu, în acondroplazie (o formă de nanism cu membre scurte) indicele de fertilitate este 0,20.

Mutațiile se produc continuu, în toate genele, și efectele lor defavorabile realizează în ansamblu "*povara genetică*" sau reducerea cumulată a capacității reproductive de către toate mutațiile produse la toți indivizii unei populații. Mutațiile dominante sau recesive legate de X se exprimă la heterozigoți și, respectiv, hemizigoți. În schimb, mutațiile recesive, destul de frecvente, nu se manifestă la heterozigoți. În acest caz, povara genetică se poate măsura prin creșterea ratei deceselor printre urmașii căsătoriilor consanguine (care, așa cum am precizat, favorizează întâlnirea a doi heterozigoți pentru aceeași genă și creșterea proporției descendenților homozigoți). S-a calculat că fiecare persoană normală poartă (posedă) în stare heterozigotă trei până la cinci gene recesive, letale la homozigoți; ele diferă însă ca tip de la o persoană la alta.

Efectul negativ al mutațiilor asupra echilibrului genic din populație este totuși redus pentru cel puțin două motive majore:

- Majoritatea genelor umane au o rată de mutație relativ mică, de ordinul  $10^{-6}$  la  $10^{-5}$  per locus/gamet/generație;
  - Excepție fac două boli genetice cu rată mare de mutație, de ordinul  $10^{-4}$ . Acestea sunt neurofibromatoza tip 1 (NF1) și miopia Duchenne (DMD); în primul caz nu se cunoaște explicația exactă a fenomenului dar în DMD rata înaltă a mutațiilor se explică prin talia foarte mare a genei (>2000Kb) care o face mai vulnerabilă la acțiunea agenților mutageni.
- Efectul mutațiilor este influențat și în mare măsură *contrabalansat de selecție*, păstrându-se astfel un echilibru genic. Menținerea unei frecvențe genice constante se realizează prin înlocuirea genelor anormale, pierdute prin deces sau sterilitate într-o generație, prin mutații noi în generația următoare. Cu cât indicele de fertilitate este mai mic cu atât proporția pacienților la care boala se produce prin neomutații este mai mare; așa se întâmplă în distrofia musculară Duchenne sau în acondroplazie; în schimb, în coreea Huntington, la care debutul simptomatologiei clinice este tardiv și fertilitatea cvasinormală, neomutațiile joacă un rol minor în ansamblul cazurilor cu această boală.

## 3. SELECȚIA

Selecția este unul din factorii importanți care intervin în modificarea frecvenței genelor în

populație. Ea poate fi *naturală*, independentă de acțiunea omului, sau *artificială*, consecința intervenției sale active.

Selecția naturală reprezintă acțiunea factorilor de mediu asupra fenotipurilor determinate de mutații noi, pe care le sortează, favorizând fenotipurile utile (cu capacitate de adaptare ridicată) pentru individ, populație și specie. Genotipurile dezavantajoase sunt *selectate negativ* (eliminate) și contribuie cu foarte puține gene la fondul generației următoare: genotipurile avantajoase sunt *selectate pozitiv* (menținute) și contribuie cu un număr mare de gene la generația următoare. Astfel, selecția stabilește *cota relativă de gene* prin care indivizii cu genotipuri diferite contribuie la fondul comun de gene al populației în funcție de viabilitatea și fertilitatea lor. Prin aceasta, selecția este un factor important în modificarea frecvenței genelor în populație.

Selecția naturală nu trebuie înțeleasă ca "o luptă pentru existență" sau "o supraviețuire a celor mai apti" – așa cum era interpretată de către darwiniști. Selecția naturală este o problemă de "reproducere diferențiată" (supraviețuirea celor mai apti pentru a lăsa urmași). Genotipurile noi realizate prin mutații nu au aceeași viabilitate și fecunditate. "*Aptitudinea biologică de supraviețuire și reproducere a indivizilor*" (în engleză - *fitness*) este diferită pentru fiecare genotip; selecția favorizează indivizii cu cea mai ridicată capacitate de reproducere și elimină variațiile care slăbesc/anulează potențialul reproductiv. *Selecția naturală acționează deci prin diminuarea sau creșterea aptitudinii biologice reproductive (fitness) a indivizilor cu mutații.*

**Indicele de fertilitate** (f) măsoară aptitudinea reproductivă a unui individ și deci contribuția sa la fondul genetic al generației următoare; valoarea lui "f" poate oscila între zero (alelă genetic letală, în sensul că anulează fertilitatea, chiar dacă modificarea fenotipică nu este letală) și 1 (indicele de fertilitate al alelei normale). Trebuie să subliniem că indicele de fertilitate este parametrul cel mai util în compararea diferitelor genotipuri într-o populație dar el este valabil în contextul unui mediu particular în care există o diferență de "fitness".

Există, schematic, patru moduri de acțiune a selecției naturale:

- contra mutațiilor dominante autosomale,
- contra homoziгоților (sau hemizigotilor) recesivi,
- contra heterozigotilor,
- în favoarea heterozigotilor.

Primele trei tipuri duc la o incapacitate în transmiterea genei, prin reducerea duratei de supraviețuire și/sau infertilitate. Indicele de fertilitate scade, uneori până la zero. Al patrulea tip de acțiune a selecției naturale favorizează heterozigoții comparativ cu ambele tipuri de homoziгоți. Frecvențele actuale ale alelelor mutante sunt rezultatul echilibrului între "pierdere" prin selecție și "câștig" prin mutații noi ± avantajul selectiv al heterozigotilor

### **(1). Selecția contra mutațiilor dominante autosomale.**

O genă dominantă defavorabilă este supusă direct selecției, deoarece ea se manifestă fenotipic la heterozigoți ca și la homoziгоți. Selecția acționează rapid și transmiterea mutației la generațiile următoare depinde de aptitudinile de supraviețuire și reproducere ale indivizilor ce au mutația. Unele boli autosomal dominante (de exemplu, osteogenesis imperfecta tipul 2; acrocefalosindactilia Apert; diaplazia tanatoforică) sunt *letale* au "un fitness" zero, și se produc numai prin mutații noi. Alte boli dominante sunt *subletale* și au o rată de reproducere redusă; de ex, în acondroplazie indicele de fertilitate este 0.20 deci numai 20% din genele pentru acondroplazie trec de la o generație la alta. Restul de 80% gene mutante, necesare menținerii constante a frecvenței acondroplaziei în populație, provin prin mutații noi.

### **(2). Selecția contra mutațiilor recesive defavorabile.**

În acest caz selecția este mai puțin eficientă și foarte lentă deoarece numai o mică proporție a acestor gene sunt prezente și manifestă la homoziгоți; marea lor majoritate sunt "ascunse" la heterozigoți, care au un indice de fertilitate normal. În cazul mutațiilor recesive ale genelor situate pe cromosomul X selecția se face contra bărbaților hemizigoți. În unele boli letale, de exemplu, distrofia musculară Duchenne, bărbații bolnavi nu se reproduc și numai genele prezente la femeile purtătoare sunt transmise generației următoare. Astfel 1/3 din toate genele

mutante sunt pierdute în fiecare generație și, pentru a se păstra frecvența constantă a bolii ele vor fi înlocuite prin mutații noi. În alte boli mai puțin severe, de exemplu hemofilia, o parte dintre bărbații afectați se pot reproduce și proporția cazurilor de hemofilie care rezultă prin mutații noi este de obicei 15% .

**(3) Selecția contra heterozigoților.** În cazul sistemului de grup sanguin Rh la femeile Rh negative (*dd*) se realizează o selecție contra feților Rh pozitivi, heterozigoți (*Dd*) care dezvoltă boala hemolitică a noului născut. Dar, incompatibilitatea materno-fetală poate fi în prezent prevenită prin administrarea globulinei imune anti-Rh; în felul acesta selecția contra heterozigoților nu va mai avea loc și, în timp, va crește incidența alelei recesive Rh-negative.

**(4) Selecția în favoarea heterozigoților.** În anumite condiții de mediu heterozigoții pentru anumite boli au un avantaj selectiv față de ambele tipuri de genotipuri homozigote. Aceasta va determina o creștere a frecvenței unei gene, care reduce sever supraviețuirea și reproducerea la homozigoții recesivi (*aa*). Exemplul clasic de avantaj selectiv este rezistența la malarie a heterozigoților pentru sicklemie (dreponocitoză). În regiunile în care malarie este endemică (de exemplu Africa de Vest) homozigoții normali sunt vulnerabili la infestare și vor avea o fertilitate mai redusă comparativ cu heterozigoții, în eritrocitele cărora nu se pot dezvolta protozoarele parazite din genul Plasmodium (introduse în organism prin înțepăturile țânțarilor Anopheles). În consecință, frecvența genei mutante pentru HbS crește în timp, în aceste regiuni. Protecția heterozigoților contra malariei reprezintă o explicație plauzibilă și pentru frecvențele crescute ale altor gene mutante în anumite regiuni: hemoglobina C, talasemie, deficiență în G6PD. Frecvența crescută a mucoviscidozei în populația europeană poate fi datorată unui avantaj selectiv al heterozigoților (incomplet elucidat). Situația în care selecția operează în două direcții diferite – eliminând genele nocive prin efectul negativ asupra homozigoților (*aa*) dar avantajând heterozigoții (*Na*) – se numește *polimorfism echilibrat* deoarece menține constant raportul dintre genele alele de-a lungul generațiilor.

Numeroase mutații în regiunile codante ale unor gene sau modificări în secvența nucleotidică a ADN din regiunile necodante sunt "neutre" din punct de vedere al efectului lor fenotipic. Asupra lor nu acționează – favorabil sau defavorabil – selecția. Și totuși ele s-au fixat în populație, în absența selecției, prin procese genetice "întâmplătoare". Kimura (1978) a formulat "teoria neutrală a selecției", în esența ei nedarwiniană; ea nu contestă importanța selecției dar consideră că aceasta nu reprezintă singurul element care hotărăște soarta mutațiilor.

## 4. POPULAȚIILE REDUSE

### a. Deriva genetică întâmplătoare

Pentru motive diferite (geografice, religioase, politice) un subgrup restrâns dintr-o populație se poate izola fizic și/sau social de restul populației formând un izolat genetic. În populațiile mici se poate produce un fenomen care modifică echilibrul Hardy-Weinberg: el este numit **deriva genetică** întâmplătoare. Spre deosebire de populațiile mari, în care *variații în numărul copiilor* produși de indivizi cu genotipuri diferite nu influențează semnificativ frecvența genelor, în populațiile mici asemenea variații pot modifica, uneori considerabil, această frecvență. Dacă într-o astfel de populație, gena "A" este mai frecventă ca alela ei "a" și, din întâmplare, indii cu gena "a" nu au copii sau nu o transmit la descendenți, atunci, după câteva generații, gena "a" va dispărea iar gena "A" se va fixa mai puternic, deci se va produce o modificare considerabilă în frecvența genică. Astfel s-ar putea explica frecvența crescută a unor grupe sanguine și boli genetice în anumite populații mici, dar deseori este greu de acceptat că deriva genetică este unica cauză a fenomenului.

### b. Efectul de fondator

O altă explicație a incidenței mari a unor afecțiuni genetice în anumite populații este "*efectul de fondator*". Dacă membrii fondatori ai unui subgrup poartă, din întâmplare, o genă mutantă recesivă rară, prin încrucișările ulterioare în cadrul subgrupeii populaționale respective se produce o homozigotare frecventă și o creștere a frecvenței homozigoților și deci a incidenței

bolii produsă de gena mutantă. Se cunosc mai multe exemple: frecvența crescută a bolii Huntington în regiunea Lacului Maracaibo din Venezuela, a tirozinemiei în Canada franceză sau a porfiriei variegata în Africa de Sud.

Ultimul exemplu este foarte sugestiv pentru efectul de fondator. Populația albă afrikaner din Africa de Sud a rezultat dintr-un grup mic de imigranți, în special din Olanda, venit în secolul XVII; creșterea numerică a fost explozivă generând circa un milion de indivizi din populația actuală. Unul din membrii fondatori a prezentat porfiriea variegata, o boală autosomal dominantă caracterizată prin fotosensibilitate și fenomene neuroviscerale. Prin încrucișare preferențială frecvența bolnavilor este astăzi de 3/1000, foarte mare comparativ cu cea din Olanda sau alte țări ale lumii.

O acțiune combinată a derivei genetice și efectului de fondator s-a înregistrat în Finlanda, unde populația a fost mult timp izolată genetic, geografic, lingvistic și cultural. La acest fenomen inițial s-a adăugat în ultimile secole o expansiune populațională (de la circa 400000 la aproape 5 milioane). Acestea par să fie explicațiile posibile ale frecvenței crescute în Finlanda a circa 20 de boli genetice, rare în alte zone ale lumii (sindromul nefrotic congenital, aspartil-glicozaminuria, coroideremia etc.).

În finalul acestei prezentări vom sublinia că specificitatea etnică a unor mutații are implicații deosebite în aplicarea tehnicilor ADN de diagnostic molecular al bolilor ereditare în anumite populații, precum și faptul că mobilitatea relativă a populațiilor actuale va reduce considerabil deriva genetică în viitor.

## 5. MIGRAȚIILE ȘI FLUXUL GENIC

Migrațiile unui grup etnic/populație dintr-o zonă geografică în alta și încrucișările/căsătoriile mixte cu populația indigenă (cu o structură genetică diferită) pot modifica frecvențele alelice în cele două populații. Se produce fenomenul de **flux genic** definit ca o difuziune lentă a genelor dincolo de barierele rasiale. Procesul implică populații mari și o modificare gradată în frecvențele genice (deosebindu-se net de deriva genetică care produce variații întâmplătoare în populații mici). În urma imigrării, constelația genică a populației gazdă se îmbogățește.

O dovadă convingătoare a fluxului genic este scăderea gradată a frecvenței grupului sanguin B de la 25-30% în Estul Asiei la 6-8% în populațiile Europei de Vest; ea se datorează în mare măsură migrațiilor istorice de la Est spre Vest ale grupurilor asiatice (în care a apărut prin mutație alela B a locusului ABO) și amestecului lor cu populațiile europene (care inițial nu aveau probabil această genă). Un alt exemplu: s-a observat că frecvența unei alele mutante specifice ce produce fenilcetonuria este mare în populația de origine celtică (1/4500 în Irlanda) și scade în alte populații din nordul și sudul Europei, reflectând migrația geografică a celților.

Gena *CCR5* codifică un receptor al citokinelor care servește ca punct de intrare în celule a virusului imunodeficienței umane (HIV) ce produce SIDA. Printr-o deleție de 32 pb în această genă se produce o alelă (*CCR5del*) care codifică o proteină nefuncțională; indivizii homozigoți pentru alela *CCR5del* nu exprimă receptorul pe suprafața celulelor și, în consecință, sunt rezistenți la infecția cu HIV. Frecvența alelei *CCR5del* scade de la aproximativ 10% în Nord-Vestul Europei la câteva procente în Asia și India, fiind virtual absentă în Africa; aceasta sugerează că mutația a apărut în populația din Nord-Vestul Europei și a difuzat spre Sud-Est. Epidemia de SIDA este prea recentă pentru a afecta frecvența genică; probabil au intervenit alte fenomene: deriva genetică, fluxul genic sau acțiunea altui factor selectiv (poate o altă boală infecțioasă, cum ar fi ciuma bubonică)

În general, se apreciază că 70-80% din totalul genelor noi dintr-o populație sunt gene "imigrate". De aceea, migrația este considerată o sursă importantă de variații ereditare.

## 6. EFECTELE ACȚIUNILOR DISGENICE ȘI EUGENICE ASUPRA FRECVENȚELOR GENICE

### a. Eufenia

Eficiența selecției naturale poate fi influențată prin intervenția activă igienico-medicală a omului ("selecție artificială"). Ansamblul acțiunilor medicale asupra fenotipului care urmăresc reducerea efectelor expresiei unor gene mutante defavorabile este numit *eufenie*. Astfel se poate realiza o modificare a frecvenței genelor prin:

- scăderea vârstei reproductive a părinților, care ar putea reduce numărul subiecților cu anomalii cromosomice născuți din femei de peste 35-40 de ani sau al copiilor cu boli prin mutații genice când tatăl a depășit vârsta de 40 de ani;
- diminuarea legăturilor consanguine, în special când în familie există bolnavi cu afecțiuni recesive;
- limitarea acceptată a reproducerii la persoanele cu risc genetic crescut sau folosirea diagnosticului prenatal și a avortului selectiv; aceste acțiuni reduc posibilitatea transmiterii în generația următoare a bolilor autosomale dominante și recesive legate de X; în contrast, restricția reproducerii nu va avea efecte asupra incidenței bolilor autosomale recesive;
- tratamentul medical al bolnavilor cu boli genetice (de exemplu, fenilcetonuria, hipotiroidia) sau multifactoriale (de exemplu diabet zaharat, diferite malformații congenitale izolate, etc) cu "fitness" nul sau scăzut.

Primele trei categorii de măsuri determină o diminuare a frecvenței genelor anormale; în schimb, tratamentul medical al bolnavilor cu genopatii, care altădată erau excluși natural de la reproducere sau aveau o reproducere dificilă și limitată, crește "aptitudinile lor reproductive" și determină, în timp, o creștere a frecvenței genelor morbide implicate, care altădată erau eliminate. Acest efect de relaxare a selecției este valabil pentru bolile autosomale dominante și legate de X. S-a calculat însă că efectul disgenic al măsurilor genetice și medicale actuale este relativ scăzut.

### **b. Eugenia.**

În contextul selecției "artificiale" este important să discutăm și problema eugeniei. Termenul, introdus de Francis Galton (1883) semnifică îmbunătățirea populațiilor umane prin încrucișări selective, preferențiale. Eugenia este de fapt controlul opțiunilor reproductive ale individului în beneficiul societății / pentru a realiza un scop social. Se poate deosebi o *eugenie negativă* care limitează/interzice reproducerea unor persoane cu caractere defavorabile (de exemplu, indivizi cu handicap fizic, senzorial, psihic) și *eugenie pozitivă* care urmărește propagarea unor caractere remarcabile prin încrucișare selectivă (de exemplu, inteligența, în cadrul proiectului aberant de inseminare artificială cu gameții... laureaților Premiilor Nobel sau, mai recent, *clonarea reproductivă*).

Politica eugenică a devenit populară și a fost implementată în America de Nord și Europa, în primele decenii ale secolului 20, datorită largii acceptări a rasismului și darwinismului social în concepțiile păturii conducătoare ale timpului. Eugenia a fost folosită ca suport "științific" pentru: politica restrictivă de emigrare, legile prohibitive ale căsătoriilor pe baza rasei și uneori a handicapului, legile de sterilizare ale unor persoane cu defecte genetice severe sau pentru exterminarea evreilor și altor minorități etnice de către nașiști. Aceste acțiuni discriminatorii au creat ulterior o benefică "reacție adversă" față de eugenie.

Ideile eugenice negative sau pozitive, ferite de exagerări socio-politice, sunt seducătoare. Se pune firesc întrebarea: sunt justificate științific, pot fi acceptate etic? Cunoștințele actuale din genetica medicală nu aduc un suport științific cât de cât consistent programelor eugenice.

- În cazul *eugeniei negative* ne vom referi doar la afecțiunile recesive. Frecvența mare a heterozigoților arată inconsistența măsurilor preconizate de cei care își propun să "amelioreze" specia umană împiedicând de la procreare bolnavii cu afecțiuni genetice recesive. Aceste măsuri ar suprima un număr foarte mic de gene în raport cu cele transmise de heterozigoți.
- În cazul *eugeniei pozitive* există rezerve științifice serioase: este greu de stabilit ce caractere ereditare sunt benefice; genele "pozitive" ale unor oameni dotați se manifestă într-o anumită configurație genică particulară, deseori unică și deci greu de reprodus la descendenți; formarea gameților presupune un amplu proces întâmplător de recombinare a genelor parentale; încrucișarea selectivă reduce diversitatea și limitează astfel capacitățile de adaptare la modificările mediului.

La aceste date genetice, ce contravin eugeniei se adaugă și conceptele bioeticii, căci în fond orice program eugenic reprezintă *pierderea libertății personale* prin subjugarea intereselor individului pentru interesele unei societăți viitoare. Așa cum vom vedea în capitolul 20, dilemele etice ale genetica sunt mai numeroase dar în rezolvarea lor *primează de obicei libertatea de opțiune a individului*. Și totuși există câteva probleme "fierbinți" iar în contextul discuției eugeniei trebuie să remarcăm faptul că diagnosticul prenatal, care prin perfecționarea și simplificarea tehnicilor se extinde treptat la un număr tot mai mare de femei gravide, este în fond o modalitate de selecție a embrionilor și de "eradicare" a unor boli prin eliminarea pur și simplu a fetoșilor afectați. Suntem confrunțați cu o nouă dilemă: "*to kill or not to kill - that is a question*". Or, misiunea medicilor este de a îngriji înainte de a fi judecători.

## C. ORIGINEA ȘI EVOLUȚIA POPULAȚIILOR UMANE

Originea și evoluția speciei umane este unul dintre subiectele cele mai larg dezbătute în decursul timpului de către diferite categorii de specialiști care, într-un efort comun, au încercat să înțeleagă și să reconstituie pas cu pas procesul complex al devenirii speciei umane. În această acțiune, tehnologiile geneticii moleculare au deschis recent noi posibilități de abordare a procesului de evoluție a omului modern. Antropologia moleculară a furnizat deja numeroase informații despre evoluția omului, legăturile sale cu celelalte specii de primat, asemănările dintre oamenii străvechi și cei actuali, migrațiile populațiilor ancestrale sau relațiile dintre populațiile umane actuale. Datele obținute sunt foarte prețioase dar, totuși, insuficiente pentru a rezolva fără echivoc multiplele și complexe probleme ale originii și evoluției speciei umane.

Înainte de a prezenta „scenariul” devenirii omului modern, *Homo sapiens sapiens*, vom preciza că trăsăturile sale morfo-funcționale l-au plasat în clasificările zoologice în ordinul primat, subordinul Antropoide, familia Hominide – fiind înrudit printr-un strămoș comun cu maimuțele antropoide africane, din familia Pongide, și mai ales cu cimpanzeul („vărul nostru din...Africa”).

### 1. DOVEZILE PALEOANTROPOLOGIEI.

În opinia paleoantropologilor, evoluția omului a fost marcată de patru evenimente cheie: trecerea la viața terestră, locomoția bipedă, encefalizarea și civilizația (cultura). Fiecare dintre aceste evenimente a determinat o serie de noi adaptări morfo-funcționale și comportamentale care au orientat evoluția spre omul modern.

Reconstituirea procesului de evoluție a omului s-a făcut pe baza *studiului fosilelor* scoase la lumină din rocile epocilor geologice. Datarea fosilelor, analiza comparativă a caracterelor anatomice și distribuția lor geografică au permis paleoantropologilor alcătuirea unei schițe a evoluției omului (figura 7.1), care este – în mod firesc – și incompletă și provizorie.

Strămoșul comun din care au descins maimuțele antropoide și hominidele a trăit în Africa în urmă cu circa 8 milioane de ani. Separarea celor două linii evolutive s-a produs acum 6 milioane de ani. Primele forme considerate a se fi înscris pe linia umanizării (deci cele mai vechi) aparțin genului *Australopithecus* și cuprind un grup de specii care au trăit în Africa, acum 4 milioane de ani.

Australopitecii se caracterizau printr-o capacitate craniană de 400–500 cc, comparabilă cu cea a cimpanzeului, dar spre deosebire de acesta aveau mers biped. Cel mai mediatizat australopitec este *A.afarensis*, reprezentat de „Lucy”, o fosilă descoperită în 1974 la Afar, în Etiopia și datată cu o vechime de 3,2 milioane de ani<sup>2</sup>.

<sup>2</sup> Cea mai veche fosilă bipedă descoperită recent (1995), în Keya, are o vechime de 4 milioane de ani.



O ramură a australopitecilor, a evoluat acum 2 milioane de ani spre reprezentanții *genului Homo* - strămoșii noștri direcți. Urmează o succesiune de specii – *H. habilis*, *H. erectus*, *H. sapiens* – caracterizate prin creșterea progresivă a creierului, graiul articulat, folosirea mai amplă a mâinilor pentru construirea de unelte din piatră, folosirea focului, organizarea socială.

- Primul reprezentant al genului *Homo* este considerat *Homo habilis* (omul îndemânat), primul producător de unelte; era gracil, biped, similar australopitecilor în multe privințe, dar cu o capacitate craniană mai mare între 500 și 800 cc<sup>3</sup> și cu o față mai puțin prognată.
- *Homo erectus* reunește sub această denumire numeroase fosile care au trăit acum 1,8 milioane – 300.000 de ani în urmă și care au fost descoperite în diferite zone geografice (Java, China și Africa). *H. erectus* avea o talie similară omului modern, mers biped, schelet robust, capacitate craniană între 780 – 1225 cc iar morfologia mâinii era asemănătoare cu cea a omului modern; folosea graiul articulat, trăia în colectivități organizate social, producea și utiliza unelte de piatră, folosea focul. *H. erectus* ocupa teritorii ale Africii tropicale și prin migrații s-a extins în Eurasia
- *H. sapiens arhaic* (omul inteligent arhaic) a apărut cu 500.000 de ani în urmă. Prezenta caractere asemănătoare cu *H. erectus* dar scheletul era mai puțin robust, craniul mai rotunjit, capacitatea craniană de circa 1300 cc, mărimea dinților diminuată. O ramură de evoluție închisă a lui *H. sapiens* a fost *H. sapiens neanderthalensis* care a trăit între 230.000 și 30.000 de ani în urmă. Avea o constituție robustă, capacitate craniană de circa 1450 cc, aparat vocal similar morfologic cu al omului modern. Trăia în colectivități, se adăpostea în peșteri, producea unelte mai sofisticate, folosea focul și își confecționa îmbrăcăminte din pieile animalelor pe care le vâna.

*Homo sapiens sapiens* (omul modern) a apărut în urmă cu 120.000 de ani. Fosilele descoperite evidențiază trăsături anatomice similare omului actual.

Talia lor era între 160 și 180 cm, scheletul gracil, capacitatea craniană în medie 1.600 cc (encefal mărit, neocortex și ganglioni bazali dezvoltati), fruntea înaltă, arcadele sprâncenare slab dezvoltate, pilozitatea redusă. Totuși, fața era ușor prognată, bărbia proeminentă, dinții relativ mari. Reprezentanții lui *H. sapiens sapiens* erau larg răspândiți, pe teritorii cu condiții de viață diverse.

Deși prezentau trăsăturile anatomice ale omului modern, primii reprezentanți ai lui *H. sapiens sapiens* nu aveau comportamentul acestuia. Reconstituirea modului lor de viață arată că au devenit moderni comportamental mai târziu, acum aproximativ 50.000 de ani, când probabil a avut loc o „mutație” al cărui efect a fost mărirea plasticității creierului, dezvoltarea capacității de a prelucra informații, de a combina și recombina activități diferite.

Au căpătat abilitatea de a produce unelte și arme mult mai sofisticate folosind ca materie primă oase și coarne de animale, construiau adăposturi permanente, își confecționau îmbrăcăminte, gravau și sculptau în scop decorativ, produceau obiecte de podoabă, aveau activități artistice, și-au dezvoltat limbajul. Creșterea numerică a populațiilor a determinat apariția competiției și a inovației, a impuls schimbării ale regimului alimentar bazat mai mult pe carne și pește, a influențat migrațiile (cauzate și de schimbările climatice).

Printre formele „primitive” ale omului modern este inclus și *omul de Cro-Magnon* considerat a fi primul reprezentant al lui *H. sapiens sapiens* în Europa (acum 40.000 de ani).

Una dintre problemele controversate ale apariției *omului modern* este originea sa geografică. Există două ipoteze (figura 7.2):

- Ipoteza multiregională consideră că *H. Erectus* a părăsit Africa acum 1,5 milioane de ani și a evoluat către *H. sapiens* într-un timp îndelungat (circa un milion de ani) în zone geografice diferite precum Africa, Europa și Asia, independent și simultan, formând populații regionale distincte care prezintă diferențieri morfologice locale. Această ipoteză are din ce în ce mai puțini adepți.
- Ipoteza uniregională („Out of Africa”) – sau a înlocuirii africane – arată că *H. sapiens* a apărut doar în Africa, mai târziu, în urmă cu circa 100.000 de ani, și s-a răspândit în mai multe valuri migratorii spre Asia, Europa, Australia și America înlocuind complet populațiile de supraviețuitori ai lui *H. erectus* existente în acele zone (care nu au contribuit la formarea omului modern).

Vom preciza în încheiere că scenariul paleoantropologilor privind evoluția omului (figura 7.1) reflectă o imagine incompletă a trecutului său preistoric. Sunt încă multe

<sup>3</sup> În 2001, în Georgia, a fost descoperit scheletul fosilei *H. georgicus* cu o vechime de 1,8 milioane de ani, cu trăsături intermediare între *H. habilis* și *H. erectus*.

necunoscute: locul de origine a omului modern, momentul exact al migrațiilor populaționale din Africa, încrucișarea migratorilor cu speciile locale sau înlocuirea completă a acestora.

## 2. DOVEZILE GENETICE ALE EVOLUȚIEI

Tehnologiile geneticii moleculare au permis extragerea ADN-ului din fragmentele osoase ale unor fosile, analiza secvenței de nucleotide și compararea cu secvențele ADN ale speciilor actuale. Evaluarea diferențelor dintre secvențele ADN ale unor specii diferite indică gradul lor de înrudire genetică și momentul scindării dintr-un strămoș comun; cu cât secvențele ADN sunt mai asemănătoare, cu atât speciile respective s-au separat mai recent.. Astfel, geneticienii pot reconstitui trecutul preistoric al omului modern folosind modalitățile specifice ale antropologiei moleculare.

### a. Studiul genetic al primatelor

Studiul genetic al primatelor are un obiectiv dublu: stabilirea gradului de înrudire genetică dintre specii și construirea unui arbore filogenetic; descifrarea mecanismelor genetice implicate în evoluție și speciație.

*Studiul citogenetic comparativ* al cromosomilor la om ( $2n=46$ ) și la speciile actuale din familia Pongidae (cimпанzeul, gorila și urangutanul) ( $2n=48$ ) a oferit informații prețioase despre evoluția cariotipului. Principala modificare, esențială pentru evoluția speciei umane, a fost o *fuziune telomerică* a doi cromosomi de la primate, prin care s-a format cromosomul 2 uman (absent la celelalte specii de antropomorfe) și s-a redus numărul de cromosomi de la 48 la 46 (figura 7.3). Alte modificări sunt reprezentate de câteva inversii pericentrice și paracentrice; în rest modelul de distribuție a benzilor cromosomice este asemănător

*Studiul secvențelor nucleotidice* la om și maimuțele antropomorfe relevă că cel mai apropiat de om este cimпанzeul iar separarea celor două specii dintr-un strămoș comun s-a făcut acum 5,5 milioane de ani. Mărimea genomului și numărul total de gene sunt aproape identice, există o conservare puternică a sinteniei (gene înlănțuite) iar secvențele de ADN codant analizate au o identitate cuprinsă între 98% și 100%. De asemenea, analiza diferitelor tipuri de ADN necodant relevă o similitudine a secvenței de circa 98%. Există însă și diferențe genetice produse prin unele mici duplicații subgenomice (care au dus la duplicația unor gene și exoni sau la duplicația unor secvențe ADN non-codante) și unele mutații genice.

W.Enard et. al. (2002) au identificat prima genă, denumită FOXP2 (Forkhead Box P2), cu un rol cheie în dezvoltarea limbajului articular al omului. Oamenii cu mutații ale acestei gene au dificultăți severe de vorbire. Compararea genei FOXP2 umane cu variantele ei de la cimпанzeu, gorilă, urangutan și șoarece a relevat identitatea secvențelor lor cu excepția a două modificări cheie ale genei umane. Efectul acestor schimbări ar consta în abilitatea omului de a face mișcări fine ale gurii și laringelui, și astfel, să dezvolte limbajul articular. Este prima dovadă genetică a faptului că vorbirea articulară este întâlnită doar la om. Varianta umană a acestei gene a apărut acum 200 000 de ani și a permis predecesorilor omului modern să comunice informații de la o generație la alta. Autorii consideră că graiul articular a jucat un rol important în migrațiile populaționale.

În concluzie, mecanismele care au orientat evoluția primatelor și au realizat divergența între om și cimпанzeu au fost unele modificări cromosomice și/sau mutații ale genelor implicate în controlul gametogenezei și al reglării stadiilor timpurii ale dezvoltării embrionare care au contribuit la inițierea desprinderii din populația ancestrală comună. Populațiile care s-au scindat, și-au schimbat treptat constituția genetică, diferențele genetice dintre ele s-au extins, au apărut trăsături morfofuncționale distincte, s-au izolat reproductiv și au devenit specii noi.

### b. Studiul genetic al fosilelor omului modern

În majoritatea cazurilor ADN-ul formelor fosile nu poate fi prelucrat: fie fosilele depășesc vârsta limită (peste 100 000 de ani) pentru asemenea analize, fie s-au păstrat în condiții improprie. Totuși, în ciuda acestor limite, au fost posibile studii la fosile ce aparțineau omului de Neanderthal și omului de Cro-Magnon.

- Studiul secvenței ADNmt a unor neanderthalieni fosili și compararea sa cu secvențele ADNmt ale omului actual și cimpanzeului a confirmat ipoteza că neanderthalienii nu ar putea fi predecesorii direcți ai omului. Ei au început separarea din linia genetică a umanizării cu aproximativ 500 000 – 700 000 de ani în urmă și au avut o evoluție distinctă. Pe baza faptului că ADNmt al neanderthalienilor nu mai poate fi găsit astăzi la nici una dintre speciile actuale, s-a mai sugerat că neanderthalienii sunt o specie extinsă și nici nu s-au încrucișat cu populațiile predecesorilor omului actual, deși au fost contemporani.
- Examinarea ADN-ului nuclear al reprezentanților omului de Cro-Magnon din Europa (ce a trăit în urmă cu circa 40.000 de ani) a relevat similitudinea secvențelor sale, uneori identitatea, cu ADN-ul europenilor actuali.

### c. Studiile ADN la populațiile umane

Analiza comparativă a ADN la populațiile umane actuale poate da informații privind trecutul nostru evolutiv și migrațiile populaționale.

S-au studiat secvențe (markeri) ADN pentru diferiți loci autosomali dar în mod special markeri pentru ADN mitocondrial sau pentru regiunea non-recombinantă a cromosomului Y. ADNmt se transmite pe linie maternă și nu se recombina în timpul meiozei; cromosomul Y se transmite pe linie paternă și, exceptând regiunile PAR, nu se recombina în meioză. Deci, în aceste cazuri diversitatea genetică este generată numai de mutații. Dacă se consideră că rata mutației este constantă în decursul timpului și se corelează cu mărimea populației, atunci se pot trasa în timp „originea și călătoriile” rudelor noastre ancestrale.

S-au testat comparativ ADNmt provenite de la numeroase persoane din întreaga lume. Cu ajutorul unui computer s-a construit un arbore filogenetic ale cărei ramificații reprezentau relațiile dintre tipurile de ADNmt testate. Plecând de la numărul minim de diferențe observate între probe, s-au găsit strămoși comuni și, mergând înapoi, s-a ajuns în final la un singur strămoș comun al tuturor populațiilor actuale, o femeie, „Eva ancestrală”. Calculele bazate pe numărul de mutații au stabilit că ipotetica Eva a trăit în Africa, acum 140.000 – 200.000 de ani. Analiza ramificațiilor acestui arbore (*Female Genetic Tree*) a evidențiat existența a două ramuri fundamentale: una africană, întâlnită numai în Africa, și alta care-i include atât pe africani, cât și pe non-africani (figura 7.4).

Rezultatele studiilor asupra variației cromozomului Y susțin datele analizelor ADNmt. S-a construit un arbore filogenetic (*Male Genetic Tree*) care arată că africanii și non-africanii au un strămoș comun, un „tată fondator”, numit Adam. Ipoteticul Adam a trăit în Africa, aproximativ în aceeași perioadă cu „Eva ancestrală”. Aceasta nu înseamnă că în perioada respectivă existau numai „Adam și Eva” ci că ADN-ul altor persoane ce trăiau concomitent cu ei în același areal nu s-a transmis la populațiile actuale. Nu trebuie uitat că în genomul omului actual există și alte gene, ceea ce nu exclude ca acestea să provină de la contemporanii lui „Adam și ai Evei.”

Adevărata semnificație a datelor furnizate de analiza ADNmt și a cromozomului Y constă în aceea că plasează relativ recent (acum 100.000 sau 50.000 de ani) momentul migrațiilor populaționale din Africa și aduce argumente pentru ipoteza unicentrică („*out of Africa*”) a originii omului (vezi figura 7.2). Teoria evoluției prezice că populațiile de origine, mai vechi, vor avea o diversitate mai mare decât populațiile derivate, mai recente. Or, datele obținute prin studiile ADN au arătat că diversitatea genetică a populațiilor africane actuale este mult mai mare comparativ cu populațiile non-africane.

Populațiile africane preistorice au avut efective mari de indivizi, au acumulat un număr mare de mutații, și-au diversificat genofondul și au evoluat local. Populațiile non-africane actuale au apărut dintr-un grup sau grupuri mici de indivizi migratori. Diversitatea lor genetică mai redusă comparativ cu a africanilor s-ar datora faptului că inițial, populațiile migratoare au avut efective mici, iar timpul de evoluție a fost scurt.

Totuși, datele respective nu au reușit să ofere un model exact al migrațiilor. Unii evoluționiști cred că a fost o singură migrație a populației africane de „Adami și Eve” din Africa spre celelalte continente, acum 50.000 de ani. Alții consideră că au fost mai multe valuri migratorii: indivizi ai populației ancestrale, formată din „Adami și Eve”, au început să

migreze, în grupuri mici, spre Asia de sud, posibil, și spre Australia, acum 100.000 de ani (concordă cu opinia paleoantropologilor). Acesta este considerat primul val migrator și corespunde primei ramificații a arborilor filogenetici alcătuiți pe baza variațiilor ADNmt și a cromozomului Y. Un alt val migrator – poate cel mai important – a părăsit Africa în urmă cu circa 45.000 de ani și s-au stabilit în Asia Centrală unde condițiile de mediu au permis membrilor acesteia să se reproducă rapid. Cu 35.000 – 40.000 de ani în urmă, grupuri mici din Asia Centrală s-au îndreptat spre Europa unde au întâlnit populațiile de neanderthalieni. Acum circa 20.000 de ani, grupuri mici de indivizi din Asia Centrală au migrat prin strâmtoarea Bering, spre America de Nord. Din acest motiv se afirmă că „Africa este leagănul omenirii, iar Asia Centrală pepiniera ei” (Figura 7.5).

#### CASETA 7.1

#### Au existat Adam și Eva?

Analizele comparative ale ADNmt (transmis de femei) și ADN cromosomului Y (transmis de bărbați) de la persoane din multiple populații umane actuale au permis construirea unor arbori filogenetici ipotetici care arată că fiecare din aceste molecule provin, în ultimă analiză, de la un strămoș comun – denumit firesc Eva și, respectiv Adam – care au trăit acum circa 200.000 de ani, în Africa.

Interpretarea curentă a acestor date nu implică faptul că în perioada respectivă au existat *numai* „Adam și Eva”; multe alte persoane trăiau concomitent cu ei, în același areal, dar ADN-ul acestora (mai exact ADNmt și ADN Y) nu s-a transmis la populațiile actuale. Probabil că alte gene autosomale din genomul omului actual provin de la contemporanii „lui Adam și ai Evei”, dar acest lucru trebuie dovedit.

Există însă și alte opinii care susțin descendența dintr-un cuplu unic sau poate mai multe, dar asemănătoare ca structura cromosomică; ele formează în esență *teoria cromosomică a originii umane*. Potrivit acestei teorii speciația este consecința unei remanieri cromosomice echilibrate întîmplătoare, compatibilă cu reproducerea. Un individ purtător al remanierii (deci heterozigot) o poate transmite la urmași; apoi printr-o uniune incestuoasă, de tip tată fiică sau frate-soră, se realizează un descendent homozigot normal; astfel apare primul reprezentant al unei noi specii. Speciația începe cu o pereche de indivizi ce au remanieri cromosomice identice. Un argument indirect pentru această teorie îl reprezintă faptul că maimuțele antropomorfe au 48 de cromosomi iar numărul de 46 de cromosomi de la om rezultă prin fuziunea telomerică a doi cromosomi de la primate. Rolul remanierilor cromosomice în evoluție nu poate fi negat dar nici absolutizat.

Teoria cromosomică a originii umane este total diferită de *teoria populaționistă*, baza evoluționismului modern. Potrivit acesteia, formarea de noi specii se face în felul următor: o specie se scindează în mai multe populații și fiecare populație – separată geografic și izolată reproductiv de celelalte populații – evoluează independent, acumulând mutații favorabile, pe care selecția le fixează. Dar teoria are incertitudini: izolarea geografică este mai mult o supoziție decît o realitate; speciația presupune un număr suficient de mare de mutații genice favorabile. Teoretic este mai puțin probabil ca în numărul relativ mic de generații a evoluției umane să fi apărut mutațiile necesare transformării maimuței în om; în aceeași perioadă bacteriile au rămas bacterii și șoarecii au rămas șoareci. Nu trebuie însă să uităm că omul are o ereditate biologică și una culturală, fiecare cu legile ei. Evoluția umană a fost condiționată de procese complicate culturale sau negnetice, adevărate resorturi ale supraviețuirii, ce au generat independența față de capriciile mediului ambiant. Nici o altă specie nu a mai creat vreodată o unealtă sau a utilizat focul. Fără cultură am fi rămas o specie care și-ar mai căuta încă rosturile. Cultura este un atribut uman, ea ne-a separat de restul animalelor. Iar cultura i-a inventat pe Adam și Eva

Pentru că suntem europeni, prin poziția geografică, istorie și tradiții, ar fi interesant de adăugat unele amănunte despre populațiile europene. Analiza ADNmt (Richards et al, 2000) și a cromozomului Y (Semino et al, 2000) arată că Europa a fost populată de reprezentanții omului modern mai târziu decât Africa, *aproximativ acum 45.000 de ani*. Majoritatea ADN al populațiilor europene actuale provine de la *omul de Cro-Magnon* din ultima perioadă a *Paleoliticului superior*. O mică parte din ADN-ul europenilor actuali provine de la omul de Cro-Magnon timpuriu și 10-25% din ADN-ul europenilor pare să provină de la oamenii moderni din Orientul Mijlociu și Apropiat, din perioada Neoliticului (acum 10 000 de ani), când aceștia începuseră să practice agricultura. Compoziția genetică a populației europene actuale sugerează că în urma migrațiilor ulterioare, din Orientul Apropiat, populațiile locale nu au fost înlocuite, ci s-a produs doar un amestec de gene.

Cu toate progresele înregistrate în ultimii ani, nu avem încă imaginea completă a evoluției, de la început și până la sfârșit. Datele genetice nu sunt suficiente pentru a înțelege „de ce omul este om și cimpanzeul este cimpanzeu”, în condițiile în care diferența genetică este atât de mică, iar implicațiile ei sunt atât de mari.

### 3. "RASELE" UMANE

Toate ființele umane care trăiesc în prezent aparțin unei singure specii, *Homo sapiens sapiens*, deoarece din încrucișările lor rezultă de regulă descendenți fertili. Este adevărat că specia noastră este neomogenă, politipică și polimorfă, putându-se identifica mai multe grupuri populaționale. Delimitarea lor, a fost realizată în trecut, de antropologia clasică, pe criterii morfologice deosebindu-se trei grupe populaționale mari denumite rase: caucazienii (albi), negrii și asiatici - fiecare cu numeroase subgrupuri diferite. În spiritul geneticii actuale rasele sunt definite, în general, ca fiind grupuri populaționale mari care *au un fond comun de gene*, diferite de la un grup la altul. Deși frecvențele unor alele variază de la o populație la alta, s-a dovedit că frecvențelor genice nu au o distribuție superpozabilă delimitării clasice (morfologice) a raselor. Între membrii aceluiași grup rasial pot exista diferențe mai mari decât între principalele rase. De fapt, *analiza genetică spulberă conceptul de rase umane distincte* dovedind faptul că distribuția geografică și populațională a unor caractere genetice nu depinde de culoarea pielii, forma capului sau a corpului, etc. Se naște o nouă paradigmă: "toți suntem diferiți, fiecare din noi este unic". La specia umană este inaplicabil conceptul de rasă biologică de la alte specii. El trebuie înlocuit cu noțiunea de populație.

Studiul variației genetice a populațiilor actuale a relevat faptul că *între oameni există mai multe asemănări decât deosebiri*. Altfel spus, *diversitatea genetică umană este limitată*. Afirmatia este susținută de rezultatele unui număr foarte mare de studii (folosind peste 10.000 de markeri genetici polimorfici), efectuate în ultimul deceniu, în cadrul Proiectului Diversității Genomice Umane (Human Genome Diversity Project), inițiat în 1996. Datele obținute (tabelul 7.4) au permis formularea unor concluzii:

- diversitatea genetică individuală în cadrul unei populații naturale depășește cu mult diferențele genetice dintre populații;
- cea mai mare diversitate genetică o prezintă populațiile africane, ceea ce dovedește că acestea au cea mai mare vechime; populațiile non-africane s-au separat relativ recent din ramura africană (acum 50.000 de ani);
- diversitatea genetică umană (atât cea nucleară, cât și cea mitocondrială) este mai redusă comparativ cu cea observată printre primat și alte specii animale.

**Tabelul 7.4 Comparația diversității genetice și lingvistice a populațiilor umane continentale**  
(modificat după D.Nettle, 2001)

Continent	ADN mt	Cromosom Y	Microsateliți	Limbi vorbite	Timp (ani)
-----------	--------	------------	---------------	---------------	------------

Africa	76,7	88	80,7	2011	130 000
Asia	36,7	78	68,5	2165	60 000
Europa	24,7	74	73,0	225	40 000
Oceania	41,8	72	63,6	1302	60 000
America	36,2	56	58,8	1000	15 000

Diversitatea genetică limitată a populațiilor umane actuale a fost explicată prin  *timpul scurt de evoluție*, evenimetele demografice și  *schimburile genice* constante produse de migrația populațiilor. Se crede că populațiile umane sunt genetic similare pentru că au origine recentă și nu au avut timp suficient pentru a-și dezvolta diferențele genetice. *Efectivul numeric al unei populații* este important pentru dezvoltarea diversității genetice. În cursul evoluției umane, la un moment dat, a avut loc reducerea severă a numărului de indivizi din populația predecesoare omului modern (efect „*bottleneck*”), urmată de o expansiune numerică a acesteia. Momentul este plasat acum circa 45.000 de ani, atunci când o ramură a populației de oameni moderni timpurii a migrat din Africa către Eurasia, generând populațiile non-africane. Cu unele excepții, populațiile umane nu au fost niciodată izolate, migrațiile favorizând răspândirea genelor în cadrul populațiilor.

Se pune totuși firesc întrebarea: cum au apărut diferențele morfologice dintre populațiile umane? Baza genetică a diferențelor genetice dintre populații ("rase") și subpopulații este mutația iar mecanismele care determină aceste diferențe sunt:  *selecția mutațiilor* favorabile în funcție de mediu;  *fixarea întâmplătoare* a unor mutații neutre sau chiar defavorabile;  *izolarea reproductivă* relativă între grupurile populaționale (prin bariere geografice). Acum circa o sută de mii de ani (în cursul unei perioade de glaciație) continentul Euroasiatic, pe care s-au dezvoltat așezări umane mici și dispersate, a fost divizat în trei regiuni distincte, separate de zonele muntoase acoperite de gheață ale Munților Himalaya și Altai. S-au creat bariere fizice care au întrerupt comunicațiile și încrucișările; în aceste regiuni, geografic și deci genetic diferite una de alta, a apărut tendința de diversificare a speciei, de formarea a raselor, prin mecanisme selective specifice. În cele trei regiuni populațiile au evoluat diferit determinând predominanța albilor în vest, a asiaticilor (mongolilor) în est și a negrilor în sud. Ulterior fiecare grup s-a subdivizat în numeroase subpopulații distincte, numite adesea grupuri etnice, cu caracteristicile proprii ale frecvenței unor gene normale sau morbide. Evoluția de formare a raselor a fost însă stopată, iar după părerea unor specialiști oprită, prin procesele de omogenizare ale speciei (determinate de mobilitatea oamenilor) și progresele socio-culturale. S-a produs și se produce un amestec tot mai intens ale diferitelor grupuri care determină unificarea și omogenizarea lor treptată determinând caracterul unitar al umanității.

"Toate grupele umane, fie că este vorba de rase, în sens tradițional, sau de populație/națiuni în sens actual, au un fond genetic comun care le conferă aceleași capacități de dezvoltare intelectuală și de progres social. Realizarea lor depinde de condițiile istorice și sociale ale fiecărui popor, ale fiecărei populații" (N. Botnariuc). Evident orice concepție de inegalitate biologică implicată în evaluarea capacității evoluției și dezvoltării diferitelor grupuri umane este neștiințifică și rasistă.

#### INTERNET

1. *Oameni fosili*: <http://www.neanderthal-modern.com/genetic3.html>
2. *Evoluția omului*: <http://www.talkorigins/faqs/homs/species.html>
3. *Genetica populațiilor*: <http://www.infobiogen.fr>

#### Bibliografie specifică selectivă

1. Barbujani G, Magagni A, Minch E, Cavalli-Sforza L.L - *An apportionment of human DNA diversity* – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997;94: 4516-4519.
2. Gagneux P, Wills C, Gerloff U et al. – *Mitochondrial sequences show diverse evolutionary histories of African hominoides* – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999;96: 5077-5082.
3. Gibbons A - *Which of our genes make us human?* - Science, 1998; 281:1432-1434
4. Griffiths A, Gelbart W, Miller J, Lewontin R - *La génétique des populations et l'évolution*- in *Analyse génétique moderne*, Ed. DeBoeck Université, 2001, pg. 537-544

5. Harry M - *Histoire évolutive des hominines* - Structure génétique des populations in Génétique moléculaire et évolutive, Ed. Maloine, 2001
6. Hertl D - *Diversité phénotypique et variabilité génétique* - in Génétique des populations, Ed. Médecine-Sciences, Flammarion, 1994, pg. 5-20
7. Jorde LB, Bamshad M, Rogers AR. – *Using mitochondrial and nuclear DNA markers to reconstruct human evolution* – BioEssay, 1998;20:126-136

## CAPITOLUL 8

# ROLUL FACTORILOR GENETICI ÎN PRODUCEREA BOLILOR

## A. INTERACȚIUNEA DINTRE EREDITATE ȘI MEDIU ÎN PRODUCEREA BOLILOR

### 1. STAREA DE SĂNĂTATE ȘI BOALĂ

Sănătatea și boala sunt greu de definit iar explicațiile acestor „stări de viață” sunt complexe; nu există încă, iar după unii probabil nu va exista niciodată, o teorie generală care să le explice. După OMS, sănătatea este „*starea de bine și confort fizic și psiho-social, în absența unei boli sau infirmități manifeste clinic*”. Într-o accepțiune mai generală, sănătatea reprezintă o relație armonioasă între structurile și funcțiile organismului uman. Acest fapt implică „un echilibru” și „o menținere constantă” a acestora, în condițiile fluctuante ale mediului, deci o adaptare flexibilă și permanentă. Capacitatea organismelor vii de a-și *menține*, prin procese de autoreglare neuro-endocrină complexă, o serie de caracteristici fiziologice *stabile*, îndeosebi la nivelul mediului intern, a fost denumită *homeostazie*. Conținutul noțiunii de homeostazie a evoluat în timp, s-a îmbogățit (în prezent se vorbește de o reglare programată și una adaptativă) și a căpătat mai multe fațete: pornind de la homeostazia fiziologică (concept introdus de Claude Bernard și dezvoltată de Cannon și Handerson), homeostazia imunologică și apoi homeostazia genetică, s-a ajuns la homeostazia dezvoltării și, mai recent, homeostazia socială și culturală. Cert este că homeostazia este acum un concept mult mai larg și, evident, un termen de referință pentru noțiunile de sănătate și boală.

Orice alterare majoră a structurii și/sau funcției normale a organismului, provocată de cauze exogene sau endogene, reprezintă o stare patologică sau o boală. Modificările structurale pot fi consecința unor tulburări de formare (plan greșit sau defecte de execuție) sau a unor leziuni/distrugerii, prenatale sau postnatale, a unor structuri normal formate. În caz de boală, perturbările funcționale implică depășirea echilibrelor homeostazice (fiziologice, metabolice, imunologice etc).

Deși variate prin cauze (etiologie), mecanisme de producere (patogenie) și manifestări clinice (semne și simptome, obiective și subiective), bolile prezintă anumite caracteristici comune:

- *Cauzalitatea*; nu există boală fără cauză (chiar dacă aceasta nu este totdeauna evidentă, cunoscută). Agenții cauzali sau factorii de boală – determinanți și favorizanți – pot fi exogeni (biologici, chimici, fizici, psihologici, socio-economici) sau endogeni (genetici). În funcție de numărul factorilor etiologici determinanți se pot deosebi boli monofactoriale (genetice sau ecologice) și multifactoriale (produse de acțiunea combinată, în proporții diferite, a factorilor de mediu și a factorilor genetici).



- *Existența unor reacții de răspuns ale organismului la agresiune*, nespecifice sau specifice, generale și/sau locale (uneori celulare). Aceste reacții se sistematizează în „*mecanisme patogenice*” de boală, ce pot fi: informaționale, neuro-endocrine, patochimice, energetice
- *Limitarea capacității de adaptare* a organismului la mediul extern sau socio-cultural; se realizează astfel „o incapacitate”, temporară sau definitivă.

## 2. CONCEPȚII DESPRE BOALĂ

În decursul timpului s-au confruntat două concepții polare despre boală: una *esențialistă* (promovată de William Osler) și alta *nominală* (susținută de Archibald Garrod, care a introdus conceptele de individualitate biochimică și de susceptibilitate individuală). Aceste două alternative au influențat profund *gândirea medicală* și evoluția medicinei.

### a. Concepția esențialistă

- Fiecare boală este o entitate specifică. Ea apare întâmplător (ca „*un simplu fapt de viață*”, ca „*o eroare biologică*”) la o persoană anterior sănătoasă; are o cauză specifică și se exprimă într-o formă relativ *constantă*, asemănătoare, la diferiți bolnavi. Bolile infecțioase și, paradoxal, bolile monogenice corespund perfect acestui „model”
- Bolnavul este considerat „*o mașină stricată*”, pe care medicul trebuie s-o repare. Or, toate mașinile sunt făcute „*după un proiect unic*” deci sunt relativ identice; nu interesează „*cine*” este bolnavul (poate fi „*oricine*”) și, evident, de ce s-a îmbolnăvit.
- Medicul are două obiective (misiuni) principale – diagnosticul și tratamentul bolii – ce derivă din întrebările: ce are bolnavul? și cum trebuie tratat? Mentalitatea sa este eminentemente inginerească: „*ce pană are mașina și cum s-o repar*”. Tratamentul este direcționat spre boală și nu spre pacient, care nu este important în decizia terapeutică; deci tratamentul este relativ identic la toți bolnavii. Este o crudă ironie faptul că medicina, o profesie atât de devotată îngrijirii indivizilor, le acordă, în această perspectivă de abordare, atât de puțină atenție.

### b. Concepția nominală

- Descrie boala nu ca pe o entitate ci ca o *rezultantă* a interacțiunii (nepotrivirii sau incongruenței) dintre individualitatea (unicitatea) biologică a pacientului (înțeleasă ca o anumită structură genetică și o experiență de viață particulară) și agenții cauzali, din mediu. Originea bolii are rădăcini în natura umanității și istoria genetică și ecologică a fiecărui individ (deci în susceptibilitatea lui specifică la boală, denumită mult timp *constituție sau teren*). Devine astfel evident că „*NU există boli ci numai bolnavi!*”. Eventualele similitudini de manifestare la bolnavi diferiți se datorează fondului comun de gene. Bolile multifactoriale, ce formează de fapt o mare parte a patologiei umane, corespund perfect acestui „prototip”; să nu uităm însă că apariția și evoluția multor afecțiuni „ecologice” sunt influențate de structura genetică a fiecărui individ (ce determină rezistența sau vulnerabilitatea la agresiune) și nici că expresivitatea variabilă a bolilor genetice poate fi determinată de mediu.
- În concepția „nominală” individul bolnav este pe primul plan, el fiind de fapt un ansamblu unic de gene, cu o anumită „istorie” (părinți, familie), cu o anumită evoluție în timp, cu „o experiență” unică de viață (trăită într-o serie succesivă de medii specifice lui); el este, în momentul îmbolnăvirii, „*o persoană mai puțin adaptată la un anumit mediu*”, un om vulnerabil.
- Medicul trebuie, evident, să pună un diagnostic și să trateze. Dar, în contextul individualității bolnavului, el trebuie să răspundă și la întrebările, fundamentale în esența lor, „de ce *acest* pacient (și nu altul) a făcut *această* boală (și nu alta), „ce tratament este corespunzător *acestui* bolnav, individualității sale specifice”?

Cele două concepții despre boală prezintă deosebiri fundamentale și este logic să ne întrebăm care dintre ele este valabilă pentru medicina actuală și, prin extensie, pentru învățământul medical.

Este evident că prima, *concepția esențialistă* (Osleriană), bazată pe fapte și acțiuni, a dominat medicina secolului 20 și în mare măsură persistă și astăzi, deoarece – chiar dacă ignoră individualitatea pacientului – ea a stat și stă la baza practicii medicale și învățământului „la patul bolnavului”. Boala este „un puzzle” pe care medicul trebuie să-l rezolve, mobilizându-și simțurile, cunoștințele de patologie și experiența. Pe medic îl interesează mai mult „faptele” (cum să practice medicina) și nu „ideile”.

Caracterul tipologic al concepției esențialiste a dus la clasificarea bolilor în funcție de etiologie, organ, vârstă, sex – fapt ce a determinat organizarea actuală a serviciilor medicale. Dezvoltarea tehnologiilor de diagnostic și a metodelor de tratament a crescut eficiența dar și costurile medicale. Relațiile dintre medic și pacient au pierdut din umanism, întrucât tehnologia care se interpune între medic și bolnav distorsionează modul în care fiecare îl vede pe celălalt. Prevenția rămâne la periferia interesului medicului iar volumul enorm de date acumulate în ultimul timp – o povară pentru orice minte cuprinzătoare – a dus la fragmentarea medicinei în subspecialități, fără a se găsi o soluție logică de a le ține împreună. Educația medicală pare să sufere o eroziune permanentă prin neadaptarea la evoluția rapidă a medicinei moleculare și lipsa unei strategii, bazată pe o ierarhie de cunoștințe și pe dezvoltarea unei gândiri medicale.

*Concepția nominală* (Garrodiană) se bazează pe concepte, principii și idei care, în esență, ne învață cum să *gândim* în medicină. Înlocuind metafora „mașinii stricate” cu o concepție etiopatogenică bazată pe individualitatea biologică, socială și istorică, precum și pe homeostazia biologică complexă (genetică, ontogenetică, funcțională, imună, socio-culturală) – această concepție dezvoltă predicția și prevenția (elementele cheie ale „medicinei omului sănătos”), umanismul și bioetica.

Există suficiente argumente să optăm în medicina actuală pentru concepția nominală, fundamentată prin dezvoltarea geneticii, care a demonstrat unicitatea și diversitatea noastră precum și existența unei „homeostazii moleculare”. Dar credem că drumul este lung. Chiar dacă genetica a devenit „o parolă de acces” la medicina secolului 21, există motive să credem că genetica umană a fost mai curând „adaptată” la gândirea medicală existentă decât a contribuit la schimbarea ei. Fiind rezonabili este poate bine să spunem că adevărul este, ca de obicei, la mijloc și că poate cea mai bună atitudine pentru medicul de astăzi este să aplice idealul concepției esențialiste în domeniul practicii curente și pe cel al concepției nominale în gândirea medicală. În acest context, abordarea genetică a devenit o nouă dimensiune în relația medic-pacient.

## B. ECOGENETICA ȘI FARMACOGENETICA

**Ecogenetica** este partea geneticii medicale care studiază variațiile individuale determinate genetic la acțiunea unor factori din mediu (Brewer, 1971). Aceste variații produc diferențe de răspuns ale organismului uman la anumiți agenți ecologici și deci vulnerabilități diferite la agresiune. Unele persoane vor fi mai susceptibile la îmbolnăvire iar altele mai rezistente. Substratul genetic al acestei variabilități este reprezentat în primul rând de polimorfismul genetic al unor loci care prezintă diferite variante alelice (la mai mult de 1% din populație), unele dintre ele asociindu-se cu un risc crescut de boală. Mai rar, variațiile individuale sunt determinate de anumite mutații genice sau de intervenția unui sistem poligenic, cu o distribuție continuă cu prag.

În decursul timpului au fost evidențiate multiple variații individuale la agresiunile externe, identificându-se diferite boli produse prin acțiunea combinată a unei susceptibilități genetice și a unei expuneri specifice la anumiți factori din mediu. Tabelul 8.1 sintetizează datele existente pentru cele mai cunoscute „boli ecogenetice”. Cea mai dezvoltată parte a ecogeneticii actuale o reprezintă **farmacogenetica** care studiază variațiile individuale determinate genetic la acțiunea unor medicamente (vezi secțiunea următoare). De asemenea, studiul susceptibilității la anumite infecții capătă o nouă dimensiune.

**Tabelul 8.1 Variații genetice în susceptibilitatea la agenții din mediu**

<b>Agenți din mediu</b>	<b>Susceptibilitatea genetică</b>	<b>Afecțiuni</b>
Infecții	Răspuns imunitar redus	Diferite boli infecțioase Diabet zaharat ? Spondilită?
<b>Anumite componente din alimentație:</b> - Lapte (lactoză) - Fructoză - Gluten - Grăsimi - Acid folic  - Sare - Suplimente de fier - Oxalați - Boabe de fava	- deficiență în lactază - deficiență în fructoz-1-fosfat aldolază - sensibilitate la gluten - hipercolesterolemie - creșterea homocisteinei în sânge datorită polimorfismului MTHFR și deficiență în folați - deficiență în folați; polimorfismul receptorilor de folați sau a MTHFR - deficiențe ale pompei Na-K - hemocromatoză - hiperoxalurie - deficiență în G6PD	intoleranța la lactoză intoleranță la fructoză boala celiacă boală coronariană boală coronariană  defecte de tub neural  hipertensiune arterială încărcare hepatică calculi renali anemie hemolitică (favism)
<b>Alcoolul</b>	- alcooldehidrogenază atipică	alcoolism
<b>Diferite substanțe chimice</b> - hidrocarburi policiclice (fum de țigară) - amine industriale - pesticide	- inducția de aril-hidrocarbon-hidroxilază  - acetilatori lenți - polimorfismul paraoxonazei	Cancer pulmonar  Cancer de vezică Accidente după expunerea la organofosforate
<b>Unele medicamente</b>	- polimorfisme enzimatice	„accidente farmacogenetice” (vezi textul)
<b>Pulberi ± fum țigară</b>	- deficiență în $\alpha$ 1-antitripsină	Emfizem pulmonar (BPOC)
<b>Alergeni</b>	- atopie	Astm bronșic
<b>Radiații ultraviolete</b>	- scăderea/lipsa melaninei - deficiența enzimelor de reparare a ADN	Cancer cutanat Xeroderma pigmentosum, cancer cutanat

## 1. ECOGENETICA

Înainte de a prezenta câteva dintre domeniile ecogenetice este util de precizat că stabilirea unor biomarkeri corelați cu susceptibilitatea sau rezistența la anumite agresii din mediu are o valoare practică deosebită, pentru profilaxia îmbolnăvirilor. Spre deosebire de măsurile de prevenție clasică, care se adresează unui grup din populație, identificarea persoanelor cu risc de îmbolnăvire – prin cercetarea unor markeri genetici – reprezintă o profilaxie „individualizată”, personalizată, ce ar putea fi mult mai eficientă. În acest context, se apreciază că aria ecogeneticii va crește în importanță în viitor, prin cercetarea corelației dintre polimorfismele ADN și riscurile pentru bolile comune ale adultului, ce implică și o expunere a organismului la agenți de mediu (în special cancer).

### 1.1. ECOGENETICA INFECȚIILOR

Infecțiile sunt considerate ca prototip de boli ecologice și acest lucru este, în mare parte, adevărat. Dar, din cele mai vechi timpuri s-a observat că vulnerabilitatea la anumite infecții este diferită la persoane diferite (*„nu există ciumă ci ciumați...nu există lepră ci leproși”*) iar manifestările și gravitatea bolilor infecțioase variază în populație. Diferențele individuale de susceptibilitate la infecții erau atât de evidente încât l-au determinat pe Claude

Bernard să afirme, la sfârșitul secolului 19 – în plină perioadă de “euforie” la descoperirile lui Pasteur – că “*microbul nu-i nimic, terenul este totul*”.

Desigur, rezistența sau vulnerabilitatea la infecții sunt multifactoriale; un rol important îl au vârsta, starea de nutriție, statusul socio-economic etc., dar elementul major îl reprezintă imunitatea, determinată genetic. Variabilitatea populațională și individuală a structurilor determinate genetic ce participă la realizarea imunității reprezintă explicația majoră a diferențelor în susceptibilitatea la infecți; un exemplu ilustrativ îl reprezintă predispoziția genetică la tuberculoză (caseta 8.1).

În fond, orice infecție poate fi considerată “un conflict de interese”, o confruntare între individualitatea genetică a gazdei, ce produce grade diferite de rezistență, și individualitatea genetică a bacteriei, ce determină patogenitatea și virulența ei. Argumentele sunt numeroase, cele mai bine studiate exemple fiind sumarizate în tabelul 8.2. Dintre acestea vom reține, pentru importanța lor:

- studiul polimorfismelor antigenelor HLA în diferite boli infecțioase (tuberculoză, hepatită, SIDA, febră tifoidă, lepră, etc) au permis identificarea unor combinații antigenice ce se corelează cu un răspuns imun slab sau puternic;
- pierderea funcției receptorului citokinic CCR5, “poartă de intrare” pentru virusul imunodeficienței umane (HIV), se asociază cu rezistența la infecția cu HIV.

**Tabelul 8.2. Exemple de polimorfisme genetice care modifica susceptibilitatea la unele infectii umane** (modificat după Cooke și Hill, 2001)

Genă (variante alelică)	Localizarea cromosomică	Proteina codificată	Boala	Efectul asupra bolii
HLA I B8 B35 B53 B57	6p21.3	Antigene leucocitare umane clasa I	Tuberculoza pulmonară SIDA Malaria severă SIDA	Susceptibilitate Susceptibilitate Rezistență Rezistență
HLA II DRB1*1302 DRB1*1352 DRB1*1101 DRB1*04 DR2 DR2 DR7	6p21.3	Antigene leucocitare umane clasa II	Hepatita B Anemia asociată malariei Hepatita C Febră tifoidă Tuberculoza pulmonară Lepra, Hepatita B	Rezistență Rezistență  Rezistență Susceptibilitate Susceptibilitate Susceptibilitate
CCR2[V62I]	3p21	Receptor chemokinic cu motiv CC, tip 2	SIDA	Inetinirea progresiei
CCR5[32bpdel]	3p21	Receptor chemokinic cu motiv CC, tip 5	SIDA	Progresie accelerata
CD36[T1264G]	7q11.2	Receptor plachetar pentru trombospondină	Infecția cerebrală în cadrul malariei	Susceptibilitate
DARC	1q22	Receptor chemokinic (antigenul de grup sanguin Duffy)	Infecția cu <i>Plasmodium vivax</i>	Susceptibilitate
ICAM1[K29M ]	19p13.3	Molecula de adeziune intercelulara tip 1	Infecția cerebrală în cadrul malariei cu <i>P. falciparum</i>	Susceptibilitate
IL10[- 592C>A]	1q31-q32	Interleukina tip 10	Hepatita B  SIDA	Infecție persistentă Susceptibilitate
IFNGR1 [S395X] [-56C>T]	6q23-q24	Receptor tip 1 al interferonului gamma	Infecții micobacteriene atipice; infecția cu <i>H. pylori</i>	Susceptibilitate
MBL2[G54D]	10q11.2-q21	Lectina de legare la manoză	Meningita meningococică	Susceptibilitate
NRAMP1 sau SLC11A2	2q35	Transportor de cationi divalenți	Lepra Tuberculoza pulmonară	Susceptibilitate

Genă (varianta alelică)	Localizarea cromosomică	Proteina codificată	Boala	Efectul asupra bolii
SDF1[801G>A]	10q11.1	Factorul 1 derivat din celulele stromale	SIDA	Rezistență
STAT1[K706S]	2q32.2	Transductor al semnalului și activator al transcripției tip 1	Infecții micobacteriene atipice	Susceptibilitate
TNFA [-376G>A] [-308G>A]	6p21.3	Factorul de necroză tumorală tip alfa	Infecția cerebrală în cadrul malariei; șoc septic	Susceptibilitate
VDR	12q12	Receptorul pentru vitamina D	Tuberculoza pulmonară	Rezistență

Din această perspectivă infecțiile încetează să fie boli “pur ecologice” și devin, ca și alte afecțiuni multifactoriale, consecința incongruenței, nepotrivrării, dintre genotip și mediu sau rezultanta interacțiunii lor.

### CASETA 8.1

#### Predispoziția genetică la tuberculoză

După cum se știe, tuberculoza este o boală infecțioasă cronică produsă de *Mycobacterium tuberculosis*, și care, reprezintă o problemă de sănătate publică, întrucât circa 1/3 din populația globului este infectată cu *M.tuberculosis*; potrivit OMS, în 1998 s-au înregistrat 8 milioane cazuri noi de tuberculoză clinică și 1,9 milioane de decese prin tuberculoză. În aceste condiții este firesc ca boala și agentul patogen să fie în centrul atenției cercetătorilor.

S-a stabilit că genomul *M. tuberculosis* (4,5 milioane pb) are circa 4000 de gene, dintre care aproximativ 90% au funcție cunoscută, codificând învelișul lipidic, factorii de patogenitate (genele *mce*, *sigA*, *erp* etc), factorii de supraviețuire intracelulară sau de rezistență la anumite medicamente.

Infecția cu *M. tuberculosis* și tuberculoza clinică rezultă prin interacțiuni complexe între agentul infecțios, factorii de mediu și gazdă; cert este că nu toți indivizii expuși la *M. tuberculosis* devin infectați și numai circa 10% din numărul mare de indivizi infectați dezvoltă tuberculoza clinică; există deci o susceptibilitate genetică la această boală.

Studiile privind controlul genetic al imunității antimicobacteriene și al tuberculozei clinice se pot grupa în trei categorii:

- *Asocierea dintre tuberculoză și anumite gene ce codifică proteine implicate în imunitatea antimicobacteriană*; studii populaționale, efectuate în diferite țări, au evidențiat asocieri cu: proteina fixatoare de manoză (în *India*), interleukina-1 beta (în *Gujarti*), NRAMP1 – proteina macrofagică asociată cu rezistența naturală (în *Gambia*), anumite alele HLA clasa II, receptorul vitaminei D. Aceste studii pledează pentru o *predispoziție poligenică* complexă; alelele implicate au însă un rol funcțional incert și efecte moderate.
- *Sindromul de susceptibilitate la infecțiile micobacteriene* produs de mutații rare<sup>1</sup>, cu transmitere *monogenică*, ce produc forme severe de tuberculoză;
- *Identificarea unor gene majore de susceptibilitate la tuberculoza clinică*; recent (Greenwood et al, 2000) a fost identificată (într-o populație autohtonă din Canada neexpusă anterior la tuberculoză) o genă care determină un risc crescut (x10) de boală. Genă de susceptibilitate a fost localizată în regiunea cromosomică 2q35, în care se află și gena *NRAMP1*. Nu se știe încă dacă gena de susceptibilitate este *NRAMP1* sau o altă genă din imediata apropiere. Genă *NRAMP1* este un bun candidat deoarece omologul ei la șoareci reglează faza inițială a infecției micobacteriene; la om această genă ar controla progresia de la starea de infectat (indivizi cu test cutanat pozitiv la tuberculină) la starea de afectat (indivizi cu boală). În alte populații, cu un istoric de expunere intensă la tuberculoză, genotipurile susceptibile au dispărut rapid și probabil alte gene polimorfice, cu efecte medii, pot predispuce la îmbolnăvire într-o modalitate mai puțin evidentă.

<sup>1</sup> Mutațiile se produc în genele implicate în imunitatea mediată de interferonul gama sau funcția fagocitelor, limfocitelor T

Natura susceptibilității genetice la tuberculoză nu este încă elucidată și nu este exclus ca diferite alele ale unei/câtorva gene să fie implicate în toate cele trei situații descrise mai sus. Cercetările având ca obiectiv înțelegerea controlului genetic al imunității antimycobacteriene continuă deoarece au implicații biologice majore și deschid o nouă cale de a combate tuberculoza: detecția precoce și urmărirea prelungită a indivizilor cu risc crescut și introducerea unor noi terapii (de exemplu, de restaurare a unei deficiențe parțiale a răspunsului imun).

Variabilitatea/diversitatea genetică umană a fost un avantaj evident al populațiilor umane confruntate cu infecții devastatoare, care n-au putut fi integral decimate nici de marile epidemii ale Evului Mediu. Dar polimorfismul actual al unor markeri biologici și predominanța unor boli genetice în anumite populații pot fi corelate, într-o oarecare măsură, și cu selecția naturală produsă de bolile infecțioase. Este bine cunoscut avantajul selectiv (rezistența la infestarea cu *Plasmodium falciparum*) al heterozigoților pentru diferite gene ale căror mutații produc hemoglobine anormale (HbS, Hb C, talasemie etc) sau G6PD față de malarie, acest mecanism selectiv explică frecvența crescută a hemoglobinopatiilor în anumite populații ce trăiesc în zonele (tropicale) în care malaria este endemică (figura 8.1). Intens studiată și ilustrativă pentru selecția naturală produsă de infecții este variația geografică a anumitor grupe sanguine ABO: frecvența crescută a grupei O în America Centrală și de Sud a fost corelată cu rezistența persoanelor cu acest grup sanguin la sifilis; în schimb frecvența scăzută a persoanelor cu grup sanguin O în Europa a fost pusă pe seama vulnerabilității lor la ciumă și holeră<sup>2</sup>. Predominanța grupului B în Asia Centrală și de Sud s-a explicat prin acțiunea combinată a vulnerabilității persoanelor cu grupa A la variolă și a celor cu grupa O la holeră.

## 1.2. ECOGENETICA NUTRIȚIONALĂ

Cel mai cunoscut exemplu privind diferențele genetice la alimente îl reprezintă absența (la copii) sau reducerea (la adulți) a activității **lactazei intestinale** care produce intoleranța la lactoza din lapte sau din alte produse lactate (OMIM 150220), manifestată în special prin diaree severă. În aceeași „zonă” se plasează și boala celiacă în care se produce o malabsorbție a unor alimente datorită sensibilizării la gluten (intoleranța intestinală la gliadină și proteinele înrudite prezente în cereale). Alte boli ecologice produse de unele substanțe din alimentație sunt menționate în tabelul 8.1. Ne vom referi în continuare la variații în susceptibilitatea la boala (ateroscleroza) coronariană corelate cu alimentația. Nivelul colesterolului sanguin depinde de alimentație dar poate fi influențat și de mutația unor gene, dintre care cea mai frecventă este a genei pentru receptorul LDL ce produce hipercolesterolemia familială (OMIM 143890) (vezi și capitolul 13).

Recent, un alt factor de risc pentru boala coronariană a început să fie amplu analizat: nivelul sanguin ridicat al aminoacidului **homocisteina**. Există două erori înăscute de metabolism ce produc creșterea nivelului de homocisteină: homocistinuria (OMIM 236250) și deficiența în metilen-tetrahidrofolat-reductaza (MTHFR) (OMIM 236250). Dar cea mai frecventă cauză a hiperhomocisteiniei este polimorfismul enzimei MTHFR. O alelă ce codifică o enzimă termolabilă asociată cu ingestia alimentară redusă de acid folic poate produce creșterea nivelului homocisteinei și riscul pentru boală coronariană. Mai multe studii au arătat că 17-28% dintre bolnavii coronarieni sunt homozigoți pentru gena ce codifică această variantă enzimatică. Tinând cont de frecvența bolii coronariene devine evidentă că suplimentarea alimentară cu acid folic (prezent în făină și produse de cereale) ar putea contribui la scăderea nivelului homocisteinei.

O altă aplicație benefică a suplimentării cu **acid folic** ar putea fi efectul protector față de anumite malformații congenitale. În unele studii populaționale administrarea de acid folic

---

<sup>2</sup> Frecvența crescută a fibrozei chistice în populațiile din Europa a fost corelată cu avantajul selectiv al heterozigoților pentru aceleași boli infecțioase, ciuma și holera

înaintea concepției și în primele luni de sarcină ar reduce cu circa 50% riscul nașterii unor copii cu defecte de tub neural și malformații cardiace. Foarte probabil polimorfismul enzimelor ce influențează absorbția sau metabolismul folaților poate face ca anumite persoane să aibă un risc crescut la aceste malformații; în aceste condiții depistarea persoanelor susceptibile și suplimentarea periconcepțională cu acid folic ar putea avea efecte profilactice benefice.

În cadrul ecogeneticii „nutriționale” vom include și variațiile genetice în metabolizarea *alcoolului*, deși opiniile privind încadrarea alcoolului printre alimente sau printre droguri se confruntă și în prezent. Cert este că un consum exagerat, dependența de alcool – **alcoolismul** – și consecințele lor sunt o mare problemă de mare actualitate, care are mai mult o cauzalitate socio-economică. Există totuși studii ce implică și intervenția unor factori genetici. Nu ne vom referi la studiile familiale sau la cele efectuate pe gemeni și copii adoptați care validează prevalența crescută a unor „probleme” dependente de alcool printre rudele bolnavilor alcoolici, deoarece nu poate fi exclus un „model comportamental” familial dar dobândit. Vom preciza numai că enzimele implicate în metabolizarea hepatică a alcoolului prezintă un polimorfism ce poate explica variațiile individuale (și uneori populaționale/etnice) în răspunsul organismului și în eliminarea alcoolului, inclusiv în apariția bolilor legate de alcoolism: ciroza hepatică, sindromul Korsakov sau sindromul alcoolismului-fetal (FAS). Alcoolul este transformat în ficat în aldehydă (sub acțiunea unei alcooldehidrogenaze; ADH) iar aceasta este apoi degradată prin intervenția unei aldehyd-dehidrogenaze (ALDH). ADH este un dimer realizat prin combinarea a trei tipuri de subunități:  $\alpha$ -codificată de gena ADH1,  $\beta$ -codificată de gena ADH2 și  $\gamma$ -codificată de gena ADH3; unele combinații, în special a subunităților  $\beta$  și  $\gamma$ , au o eficiență metabolică mai redusă și pot duce la o stare toxică la consumul unor cantități mici de alcool. Și ALDH prezintă două variante enzimatică: ALDH1 și ALDH2. Interesant este faptul că deficiența de ALDH2 produce, chiar la cantități mici de alcool, o congestie/înroșire facială și o stare acută de disconfort, inclusiv cefalee. Astfel, indirect, persoanele respective – cu toleranță mică la alcool – sunt „protejate” față de alcoolism. Datele actuale privind polimorfismul enzimelor implicate în metabolismul alcoolului argumentează diferențele individuale în răspunsul organismului la consumul de alcool.

### 1.3. ECOGENETICA CHIMICĂ

În cursul vieții, celulele organismului sunt supuse la o mare varietate de agenți chimici toxici – de origine endogenă (de exemplu, radicali liberi de oxigen) sau exogenă – care pot interfera cu structura sau metabolismul celular, inclusiv cu genomul. Astfel, se apreciază că 2/3 din cancere sunt produse de agenți din mediu, în majoritate chimici. În consecință organismele vii au dezvoltat mecanisme de detoxifiere, protecție și, eventual, reparare a leziunilor. Sistemele de detoxifiere acționează, în general, în două faze (figura 8.2). O primă reacție enzimatică produce *metaboliți intermediari* ce posedă un compus reactiv puternic destinat ca în a doua etapă să realizeze *conjugarea* cu glutatationul sau un alt grup chimic, de exemplu acetil (prin acetilare), care să determine o mai mare solubilitate și o excreție eficace (vezi și secțiunea B.2.1). Trebuie însă subliniate două elemente:

- agentul chimic ajuns în organism – prin inhalație (fumul de țigară, ș.a), pe cale digestivă, prin contact cu diferite mucoase – *induce* expresia unor gene ce codifică enzimele necesare transformării sale în prima etapă a detoxifierii;
- metaboliții intermediari produși sunt mult mai reactivi, în special față de ADN, decât compușii primari și deci mai mutageni și cancerigeni. Ei pot produce necroză celulară sau pot genera o clonă celulară anormală, ce duce la o proliferare tumorală.

Organismul este capabil să se apere și față de aceste efecte celulare secundare fie prin sistemul imun, care poate elimina celulele canceroase, fie prin inducerea apoptozei. În această schemă generală, prin care organismul încearcă să neutralizeze efectele unor agenți chimici

din mediu, intervin numeroși și variați compuși proteici, codificați de gene. Mutația acestor gene produce variante alelice care pot determina o susceptibilitate crescută sau o rezistență la anumite boli, în special cancere. Vom analiza rolul acestor variații individuale determinate genetic în diferite etape ale biotransformării compușilor chimici exogeni (vezi figura 8.2)

(1) În procesul de transformare a substanțelor chimice din mediul extern în produși intermediari intervine în special familia proteinelor citocromului P450 (codificată de genele *CYP*), un veritabil „scut metabolic”. Aceste proteine prezintă un polimorfism important ce determină în ultimă instanță un risc crescut sau scăzut la leziuni celulare, inclusiv la nivelul ADN.

- Hidrocarburile policiclice, mai ales din fumul de țigară, induc expresia genei *CYP1A1* care codifică o enzimă – aril-hidrocarbon-hidroxilază – ce produce transformarea lor într-un epoxid mai ușor de eliminat din organism dar mult mai cancerigen. Intensitatea metabolizării hidrocarburilor policiclice este controlată genetic de diferite alele ale genei *CYP1A1*. Alela „puternic inductibilă” codifică o variantă enzimatică cu activitate crescută. Fumătorii homozigoți pentru această alelă au un risc de 7 ori mai mare de a dezvolta cancer pulmonar comparativ cu homozigoții pentru alela „slab inductibilă”, ce codifică o enzimă puțin eficace în transformarea hidrocarburilor.
- O altă enzimă din familia citocromului P450 este *CYP2D6* (codificată de o genă situată pe 22q) implicată în oxidarea unor substanțe (numeroase medicamente, inclusiv beta-blocantul *debrisoquină*, primul studiat). Varianta „metabolizator lent” determină o rezistență crescută la efectul potențial cancerigen al fumului de țigară sau a unor cancerigeni industriali (azbest, amine aromatice); în schimb varianta „metabolizator intens” determină un risc crescut (de 18 ori) de cancer pulmonar<sup>3</sup> și de vezică urinară. Aceeași variantă, implicată în detoxifierea neurotoxinelor, se corelează cu un risc crescut pentru boala Parkinson.

(2) Conjugarea produșilor intermediari cu glutationul sau gruparea acetil poate fi redusă la anumite persoane, ducând la acumularea acestor produși înalt reactivi.

- Astfel variațiile activității *glutathion-S-transferazei* (*GSTM1*) se corelează cu un risc crescut (activitate enzimatică nulă sau scăzută) sau scăzut (protecție) la anumite cancere; de exemplu, s-a stabilit că circa 70% din bolnavii cu cancer de colon proximal nu au activitate *GSTM1*. Persoanele care combină genotipul nul pentru *GSTM1* și alela *CYP1A1* cu activitate crescută au un risc relativ de cancer de 30 ori mai mare decât cei care nu prezintă aceste caracteristici.
- *Acetilatorii lenți* au un risc crescut de cancer vezical dacă fumează sau sunt expuși la amine aromatice; ei au deasemenea un risc crescut de cancer colorectal dacă în alimentația lor se află produși potențial cancerigeni (rezultați frecvent prin anumite metode de preparare).

(3) Produși intermediari intens reactivi pot produce leziuni ale ADN (mai ales la cei cu deficiențe relative ale enzimelor de reparare, cum ar fi heterozigoții pentru gena *ATM* sau persoanele cu mutații ale genelor *BRCA 1* și *2*; vezi capitolul 6.B.4), activarea unor oncogene sau mutații ale genei *TP53* ce codifică proteina p53, „gardianul” genomului uman (de exemplu, mutația codonului 249 în cancerul de ficat la subiecții expuși la aflatoxina B1, toxină produsă de ciupercile din genul *Aspergillus*, ce pot contamina unele alimente).

(4) Proliferarea celulelor ce au suferit leziuni genomice este facilitată probabil de anumite deficiențe imunologice, determinate genetic.

Datele prezentate argumentează convingător existența unei susceptibilități diferite la cancerigeni a unor persoane diferite. Deși bazele genetice și biochimice ale vulnerabilității sau rezistenței la cancerele induse de factori din mediu necesită noi cercetări, consecințele benefice pentru sănătatea publică ale identificării persoanelor cu risc crescut sunt evidente.

---

<sup>3</sup> În unele studii 70-80% din bolnavii cu cancer pulmonar sunt „metabolizatori intensi” (sau oxidatori rapizi) pentru *CYP2D6*.



În contextul ecogeneticii chimice ne vom referi, tangențial, la un subiect deja abordat (vezi capitolul 6.D.1.3): *polimorfismul  $\alpha_1$ -antitripsinei*. Variantele SS și ZZ, datorită unor substituții de aminoacizi în situsul activ al enzimei, au o activitate antiproteazică redusă la 60% și respectiv 10% realizând o deficiență de  $\alpha_1$ -antitripsină (OMIM 107400). Această reducere a activității inhibitorilor favorizează acțiunea elastazelor, eliberate în procesul inflamator, asupra elastinei din pereții alveolelor pulmonare; degradarea elastinei determină emfizem pulmonar. Progresia bolii este mult accelerată la fumători deoarece fumul de țigară oxidează metionina 358 din situsul activ al enzimei și astfel îi reduc afinitatea pentru elastază de circa 2000 de ori. Acesta este unul din cele mai clare exemple de „boală ecogenetică”.

#### 1.4 ECOGENETICA FIZICĂ

Radiațiile ultraviolete solare reprezintă cauza principală a cancerului cutanat la toți indivizii dar mai ales la cei care au o cantitate redusă de melanină, pigmentul ce absoarbe razele UV. De aceea, persoanele blonde sau cu albinism (OMIM 203100) au o vulnerabilitate mai mare la cancer cutanat. La acest grup se adaugă cei cu defecte ale enzimelor de reparare a ADN, cum ar fi bolnavii de xeroderma pigmentosum (OMIM 278700) (vezi capitolul 6.B.4.1). Probabil că studiile viitoare ale polimorfismul normal al enzimelor de reparare va aduce date suplimentare pentru identificarea persoanelor vulnerabile la cancer în general și cancer cutanat în special.

## 2. FARMACOGENETICA

Evaluarea efectelor terapeutice ale medicamentelor a permis, în timp, constatarea unor diferențe în acțiunea lor la bolnavi diferiți suferind de aceeași boală, precum și a unor reacții adverse, neașteptate, care uneori erau fatale. Aceste variații individuale pot fi produse de factori multipli – vârstă, sex, boală, interacțiuni medicamentoase etc – dar o serie de observații clinice au dus la concluzia că factorii genetici („*individualitatea biochimică*” după Garrod, 1909) influențează decisiv metabolismul și deci eficacitatea medicamentului precum și producerea unor *reacții adverse*<sup>4</sup>. Astfel, în 1950 se descoperă sensibilitatea la primachin (la subiecții cu deficiență în G6PD), metabolizarea lentă a izonoazidei (la unii bolnavi de tuberculoză) și apneea prelungită la succinilcolină; toate aceste caracteristici legate de acțiunea medicamentelor se transmit ereditar. Treptat, prin noi descoperiri, a devenit evident că, foarte probabil, orice cale de metabolizare a medicamentelor poate prezenta variații genetice<sup>5</sup> iar aceste variații sunt *frecvente* și au incidențe diferite, uneori importante, în grupuri populaționale diferite. Pe această bază Motulsky (1957) și Vogel (1959) introduc conceptele și termenul de *farmacogenetică* – *domeniu de studiu a variațiilor individuale determinate genetic la acțiunea medicamentelor*<sup>6</sup>.

Conceptul de farmacogenetică își are originea în observațiile clinice ale unor pacienți cu *concentrații* plasmatiche sau urinare crescute sau scăzute ale unor medicamente; apoi s-a stabilit că *modificările* chimice care produc aceste variații sunt ereditare și abia mai târziu s-au identificat *enzimele* implicate în metabolizarea medicamentelor, genele care le codifică și variantele lor *alelice* (deci variații în secvența ADN) asociate cu caracterul ereditar respectiv. În aceste condiții și ținând cont de frecvența semnificativă a polimorfismelor genetice în populațiile umane, s-a ajuns la ideea că dezvoltarea farmacogeneticii, într-o variantă modernă

<sup>4</sup> Incidența reacțiilor adverse la medicamente este de 6-7% în SUA, majoritatea fiind determinate genetic

<sup>5</sup> O proporție însemnată – 20-95% - din variabilitatea individuală a răspunsului la acțiunea medicamentelor este determinată de ereditate.

<sup>6</sup> Unii autori consideră, într-o definiție mai largă, că farmacogenetica se ocupă de studiul variațiilor genetice individuale la acțiunea tuturor substanțelor chimice exogene, a xenobioticelor. Totuși, există un consens actual de a restrânge firesc domeniul farmacogeneticii la medicamente și de a-l considera ca o parte a ecogeneticii care studiază variațiile individuale determinate genetic la acțiunea factorilor de mediu.

de *farmacogenomică*, ar putea să permită în viitor – prin folosirea unor teste adecvate – stabilirea drogului și/sau dozei corespunzătoare pentru fiecare pacient...sau, pe scurt, *personalizarea medicației* („medicamentul potrivit pentru pacientul potrivit”).

Apariția farmacogeneticii a adus însă în discuție o problemă deosebit de interesantă: *originea polimorfismelor* ce determină răspunsul variabil la droguri și *mecanismul menținerii lor*, deoarece era evident că ele au apărut înaintea folosirii drogurilor și nu „ca răspuns” la utilizarea lor. Deoarece enzimele implicate în biotransformarea drogurilor participă și la metabolizarea substanțelor alimentare obișnuite, se consideră că polimorfismele au apărut în populații diferite ca urmare a presiunii selectivă alimentare. Aceasta explică și frecvența lor diferită în grupuri etnice diferite.

Studiile variațiilor normale în răspunsul la medicamente al indivizilor dintr-o populație pot da informații privind *natura* determinismului genetic:

- o distribuție discontinuă, bimodală sau trimodală, indică o ereditate monogenică (de exemplu, o enzimă codificată de alelele unui singur locus polimorfic); *curba bimodală* (figura 8.3) se observă atunci când în populație există indivizi homozigoți hipometabolizatori, purtători ai unei mutații inactivatoare și indivizi normo- sau hipermetabolizatori, care au un genotip normal; dacă heterozigoții realizează o grupă separată între cele două tipuri de homozigoți atunci distribuția este trimodală.
- o distribuție continuă – o *curbă de tip gaussian* – reflectă un determinism multifactorial, deci o combinație a factorilor genetici și de mediu; ponderea acestor elemente este apreciată prin studiul gemenilor; mediana acestei curbe a fost desemnată drept LD50 (*lethal dose* - doza letală - pentru 50% dintre subiecți).

Orice medicament administrat unui pacient este *absorbit* și apoi *transportat* și *distribuit* la situsurile sale de acțiune, unde *va interacționa* cu țintele terapeutice, receptori sau enzime; aici va suferi *transformări* în *metaboliți* (care sunt mai solubili în apă și mai ușor de eliminat) și în final va fi *excretat*; uneori produsul inițial este convertit în compuși terapeutici activi iar alții se pot produce metaboliți toxici, ce trebuie neutralizați. Fiecare dintre aceste procese poate fi potențial influențat de variații genetice semnificative clinic; ele se grupează în două categorii:

- **variabilitatea farmacocinetică** care se referă la diferențele privind absorbția, rata de metabolizare și eliminare a medicamentului și a cataboliților săi; aceasta influențează relația doză-concentrație plasmatică și relația doză-concentrație tisulară;
- **variabilitatea farmacodinamică** ce include polimorfismele proteinelor implicate în transportul medicamentelor în organism și ale țintelor terapeutice (receptori, enzime); acestea influențează direct relația doză-efect.

## 2.1 FARMACOGENETICA METABOLISMULUI MEDICAMENTELOR

Farmacologii au stabilit că în procesele (căile) de metabolizare ale medicamentelor există, principal<sup>7</sup>, două etape:

- Faza I de *biotransformare*, prin reacții de oxidare, dehidrogenare, hidroliză etc;
- Faza II de *conjugare*, prin reacții de acetilare, glucuronidare, sulfatare, metilare etc.

Primele observații clinice de “afecțiuni farmacogenetice” datează de circa 50 de ani când a fost descrisă o perturbare a unei reacții de fază I – *hidroliza succinilcolinei* (un relaxant muscular folosit în chirurgie), de către butirilcolinesterază (pseudocolinesterază); subiecții cu o formă atipică de enzimă nu pot hidroliza succinilcolina fapt ce determină o prelungire a paraliziei musculare indusă de medicament și apnee. Această caracteristică se transmite ereditar, autosomal recesiv.

Aproape în aceeași perioadă a fost observată și o variație genetică în faza II de metabolizare a medicamentelor prin *acetilare*. Concentrația plasmatică a unor medicamente metabolizate de către N-acetiltransferază (isoniazida – un agent tuberculostatic, hidralazina – un antihipertensiv, procainamida – un drog antiaritmie) prezintă variații individuale la subiecții cu acetilare lentă sau rapidă, care au

<sup>7</sup> Aceste faze nu sunt obligatoriu respectate: faza I poate lipsi uneori sau faza II poate precede faza I.

consecințe clinice. Aceste exemple de variații individuale farmacogenetice au dus la amplificarea studiilor variabilității genetice în alte căi de biotransformare ale medicamentelor.

#### a. Farmacogenetica fazei I de transformare a medicamentelor.

Cele mai importante enzime implicate în faza I de metabolizare a medicamentelor sunt enzimele din superfamilia **citocromului P-450**. Dintre acestea, **CYP2D6** sau citocromul P-450 2D6 prezintă un polimorfism genetic ce influențează metabolizarea multor medicamente (tabelul 8.3) și determină diferențe individuale ale efectelor farmacocinetice și terapeutice.

**Tabelul 8.3. Polimorfisme genetice care afectează răspunsul la o serie de medicamente**

<i>Enzima (varianta alelică)</i>	<i>Localizare cromosomică</i>	<i>Frecvența metabolizatorilor slabi</i>	<i>Exemple de droguri metabolizate</i>	<i>Efectul administrării drogului</i>
<b>Enzime de clasa I</b>				
CYP2D6[*2A, *3, *4, *5, *6, *10, *17]	22q13.1	6-10% dintre caucazieni; 2-5% dintre afro-americieni; 1% dintre asiatici	Debrisoquina; Sparteina; Nortriptilina; Codeina.	Efect accentuat; Efect accentuat; Efect accentuat; Efect redus.
CYP2C9[*2, *3]	10q24	6-8% dintre caucazieni	Warfarina; Fenitoina	Efect accentuat; Efect accentuat.
CYP2C19[*2, *3]	10q24.1-24.3	3-5% dintre caucazieni; 12-23% dintre asiatici	Omeprazol	Efect accentuat
Dihidropirimidin dehidrogenaza [D74V; C29R]	1p24	1% din întreaga populație	5-Fluorouracilul	Efect accentuat
Butirilcolinesteraza [D70G; T243M]	3q26.1-26.2	1 la 3500 europeni	Succinilcolina	Efect accentuat
<b>Enzime de clasa II</b>				
NAT2 [*58]	8p23.1-21.3	52% dintre caucazieni; 17% dintre japonezi	Izoniazida; Hidralazina; Procainamida.	Efect accentuat; Efect accentuat; Efect accentuat.
Uridin difosfat glucuronozil-transferaza 1A1 [P229Q, G309E]	2q37	11% dintre caucazieni; 1-4% dintre asiatici.	Irinotecanul; Bilirubina	Efect accentuat; Sindroamele Gilbert și Crigler-Najjar
Tiopurin 5-metiltransferaza [A80P, A154T]	6p22.3	1 la 300 caucazieni; 1 la 2500 asiatici.	Mercaptopurina; Azatioprina	Toxicitate; Toxicitate.
Catecol O-metiltransferaza [V158M]	22q11.2	25% dintre caucazieni	Levodopa	Efect accentuat

Circa 5-10% din persoane în populația caucaziană au o *deficiență relativă* în abilitatea lor de a oxida două medicamente “test” pentru această categorie – *debrisoquina*, un medicament antihipertensiv, și *sparteina*, un antiaritmie și oxitocic – alcătuind un grup de subiecți cu *metabolizare redusă* (“slabă”); ei au o eliminare urinară diminuată a metaboliților și, consecutiv, o creștere a concentrației lor plasmatică, fapt ce produce efecte mai exagerate ale celor două medicamente-test, comparativ cu persoanele cu *metabolizare rapidă* (figura 8.4). Studiile genetice au arătat că oxidarea redusă a debrisoquinei și sparteinei *se transmite ereditar*, autosomal recesiv, iar subiecții sunt *homoziгоți* (sau heterozigoți compuși) pentru alele ce codifică enzime cu activitate CYP2D6 redusă sau nulă.

Având în vedere numărul mare de medicamente transformate prin oxidare mediată de CYP2D6 s-au elaborat metode pentru determinarea statusului de *metabolizator redus sau metabolizator rapid (intens)* folosind ca “droguri test” debrisoquina sau sparteina. Din păcate aplicarea lor clinică de rutină s-a dovedit a fi dificilă. Atunci s-a recurs la tehnicile de genetică moleculară care au permis caracterizarea unor variații genetice (polimorfisme ADN) responsabile pentru activitatea redusă sau absentă a CYP2D6. Au fost descrise peste 75 de alele CYP2D6. Studiul subiecților cu *metabolizare rapidă* a arătat, surprinzător, că ei posedă mai multe copii ale genei CYP2D6. Aceasta explică răspunsul terapeutic inadecvat la dozele standard ale medicamentelor metabolizate de CYP2D6 (de exemplu, antidepressivul *nortriptilină*).

Studiul polimorfismelor genetice a fost extins și la alte isoforme ale citocromului P-450, implicate în metabolizarea unor medicamente specifice (tabelul 8.3):

- CYP2C9 – care metabolizează warfarina, losartanul, fenitoina;
- CYP2C19 – care metabolizează omeprazolul;
- CYP3A5 – implicat în biotransformarea unui număr mare de medicamente.

Un alt exemplu de farmacogenetică a fazei I de transformare a medicamentelor îl reprezintă metabolismul *fluorouracilului*, un medicament antineoplazic, care în dozele standard poate produce o afectare fatală a SNC la persoanele cu deficiență a dihidropirimidin dehidrogenazei.

### **b. Farmacogenetica fazei II de transformare a medicamentelor.**

Unul din primele exemple descoperite de variații ereditare a enzimelor implicate în faza II-a de metabolizare a medicamentelor a fost *acetilarea izoniazidei* de către N-acetiltransferază (NAT). Astăzi se știe că există două gene (localizate pe cromosomul 8) ce codifică acetiltransferaze – NAT1 și NAT2 – și că multe alte medicamente sunt metabolizate prin intervenția lor (procainamida, hidralazina, nitrazepamul, dapsona, sulfametazina etc.).

Polimorfismul acetilării a fost identificat prima dată la bolnavii cu tuberculoză tratați cu izoniazidă. Acetilatorii lenți, homozigoți pentru o alelă NAT2 deficientă, au o concentrație plasmatică crescută a medicamentului, la o terapie standard, și dezvoltă o neuropatie periferică, toxică. De asemenea acetilatorii lenți expuși la arilamine cancerigene (de exemplu, benzidina) au o incidență crescută a cancerului de vezică iar femeile la postmenopauză fumătoare au un risc crescut de cancer de sân. Acetilatorii rapizi au frecvent eșecuri ale terapiei cu izoniazidă administrată o dată pe săptămână. Dacă sunt hipertensivi necesită o doză mai mare de hidralazină pentru controlul tensiunii arteriale

Un alt exemplu îl reprezintă *metilarea tiopurinelor* (mercaptopurina și azatioprina), antimetaboliți folosiți în clinică ca imunosupresoare și pentru tratamentul unor neoplazii. Metilarea este produsă de către enzima *tiopurin S-metiltransferază* (TMTP). Pe baza nivelului de activitate a TMTP în hematii, populația poate fi divizată în trei grupe – cu metabolizare scăzută, medie, înaltă – iar nivelul individual se transmite *codominant*. La dozele standard de tiopurine persoanele cu activitate TMTP scăzută au o concentrație crescută de metabolit activ și un risc important de mielosupresie; la persoanele cu activitate TMTP înaltă eficacitatea tiopurinelor este redusă, deoarece drogul este metabolizat rapid. Astăzi există posibilitatea testării efectului farmacogenetic al TMTP și individualizării terapiei pe această bază. Mai mult, gena TPMT a fost clonată iar variantele alelice responsabile de nivelul scăzut sau crescut al activității TPMT au fost identificate, putându-se astfel practica un diagnostic molecular precis.

## 2.2. POLIMORFISMELE GENETICE CU EFECTE INDIRECTE ASUPRA RĂSPUNSULUI LA MEDICAMENTE.

Polimorfismul unor gene ce codifică proteine care nu sunt implicate în biotransformarea medicamentelor și nici în țintele directe ale acțiunii lor – pot influența răspunsul la tratament:

- Diferențe individuale în acțiunea *factorilor de coagulare* pot predispute femeile ce iau contraceptive orale la tromboze venoase (ale venelor profunde sau venelor cerebrale);
- Mutații ale genei *RYR1* ce codifică proteine ce formează un canal de eliminare a ionului de calciu din celulă produce *hipertermia malignă* (vezi caseta 8.2).
- Polimorfismul genelor pentru proteine de transfer ale *esterilor de colesterol* poate influența progresia aterosclerozei sub terapia cu statine;
- Variații genetice în *transportorii celulari de sodiu și potasiu* (de exemplu, gena *KCNE2* ce codifică o subunitate a canalului de potasiu) pot avea un rol predispozant la efectele toxice (aritmii grave) ale unor droguri (trimetoprin-sulfametoxazol; claritromicină) ce induc la anumiți pacienți un sindrom QT-lung;

- Polimorfismul genei *apolipoproteinei E* (APOE) pare a influența răspunsul la terapia pentru boala Alzheimer precum și la medicamentele ce scad lipidemia. Astfel pacienții cu boală Alzheimer care au alela 4 a APOE (circa 40%) au răspuns redus la tratamentul cu inhibitori de acetilcolinesterază (tacrină); pacienții cu alela 2 APOE au o diminuare mai importantă a LDL după terapia de scădere a lipidelor, inclusiv cu statine.

## CASETA 8.2

### Boli farmacogenetice frecvente

#### **Sensibilitatea la succinilcolină.**

Succinilcolina, folosită ca miorelaxant în intervențiile chirurgicale, este formată din două molecule de acetilcolină și necesită intervenția unei colinesteraze serice pentru metabolizare (hidrolizează acetilcolinei). Funcția normală a acestei enzime nu este încă bine definită dar ea nu poate avea un rol fiziologic major deoarece absența completă nu produce obișnuit boală.

Circa una din 3000 de persoane din populația europeană este homozigotă pentru o alelă mutantă, ce codifică o colinesterază atipică. Homozigoții sunt incapabili de a degrada succinilcolina, ceea ce conduce la instalarea unei apnei prelungite (peste o oră), ce necesită ventilație artificială.

Gena implicată în sensibilitatea la succinilcolină este gena pentru butirilcolinesterază (BCHE) localizată pe cromosomul 3q21-26. În populație există două variante genice cu acțiune codominantă: "U" (usual) și A (atipică). Alela A a rezultat prin mutația cu sens greșit (Asp70Gly) și determină o sensibilitate exagerată la acțiunea succinilcolinei.

#### **Hipertermia malignă.**

Este o afecțiune monogenică cu *transmitere dominant-autosomală*. Boala apare după administrarea unor anestezice inhalatorii, de tipul halotanului, sau a unor miorelaxante, de tipul succinilcolinei. Maladia se caracterizează prin hipertermie, spasme musculare și, în final, exitus.

Incidența bolii la copii este estimată la 1:12000, iar la adulți la 1:100.000.

În majoritatea cazurilor, este implicată gena RYR1, localizată pe cromosomul 19q13.1-13.2, care codifică un canal ionic de calciu. În alte cazuri, au fost identificate mutații ale genei CACNL1A3, care codifică subunitatea  $\alpha_1$  a receptorului dihidropiridinei.

#### **Porfirie acută intermitentă.**

Este o boală cu transmitere autosomal dominantă ale cărei manifestări clinice sunt declanșate de diferite medicamente (barbiturice, sulfamide etc), unii hormoni steroizi sau înfometare. Tabloul clinic este polimorf și poate mima variate stări patologice, de la abdomen acut la psihoze. Defectul primar este reprezentat de către deficiența în porfobilinogen (PBG) dezaminază, care transformă PBG într-un precursor al hemului. Administrarea unor compuși chimici crește sinteza de citocrom P450 hepatic (proteină ce conține hem) și prin aceasta scade nivelul celular al hemului care, prin mecanism feed-back, va declanșa sinteza de PBG; acesta nu va putea fi însă metabolizat, determinând disfuncțiile neurologice.

#### **Deficiența în glucozo-6-fosfat dehidrogenaza**

Este o afecțiune recesivă legată de X și este considerată a fi cea mai frecventă boală enzimatică cu circa 400 milioane indivizi afectați în întreaga lume. Boala se manifestă prin apariția la bărbați a unor crize de hemoliză induse de o serie de medicamente oxidante ca antimalaricul primachina, antibioticele sulfonamidice, sulfonele precum dapsona utilizată în tratamentul leprei, naftalenul sau ingestia de *Vicia faba*. Toți acești agenți acționează prin depleția NADPH care protejează eritrocitele împotriva alterărilor oxidative prin regenerarea glutationului redus.

## 2.3 FARMACOGENOMICA ȘI VARIABILITATEA FARMACODINAMICĂ

În afara variațiilor genetice ale metabolismului medicamentelor, descrise anterior, aria farmacogeneticii s-a extins și la alte etape ale farmacocineticii și farmacodinamicii drogurilor. Au fost studiate în mod deosebit proteinele implicate în *transportul* medicamentelor în

organism iar, mai recent interacțiunea medicamentelor cu *țintele terapeutice* (receptori, enzime etc). Cert este că multe medicamente sunt transportate și metabolizate prin intervenția unor proteine-enzime multiple, care acționează în etape și pe căi multiple – astfel că variațiile genetice au un *determinism poligenic*, cu o distribuție suprapusă, de aspect gaussian. În aceste condiții numai studiile bazate pe *polimorfismul ADN* (SNPs<sup>8</sup>, microsateții, minisateliții, inserțiile și delețiile mici etc) (vezi capitolul 6.D.2) ar putea permite obținerea unor informații farmacogenetice despre numeroasele gene ce codifică proteine relevante în biotransformarea și acțiunea unor medicamente. Se trece astfel de la farmacogenetică la **farmacogenomică**. Termenii sunt relativ sinonimi ca sens și numai din rațiuni practice și ...didactice deosebim *farmacogenetica* – care folosește metodele clasice ale geneticii (bazate pe relația fenotip-genotip) concentrându-și preocupările pe *metabolismul* medicamentelor – de *farmacogenomică*, care folosește studiul polimorfismelor ADN din genomul uman (relația genotip-fenotip) pentru analiza variațiilor în *transportul* medicamentelor și *țintele lor de acțiune*(receptori, enzime etc). Au fost deja identificate peste 60.000 de SNPs în regiunile *codante* ale genelor și unele dintre acestea au fost deja asociate cu modificări substanțiale în metabolismul sau efectele medicamentelor.

#### **a. Polimorfismul proteinelor de transport**

Proteinele de transport au un rol important în absorbția, distribuția și excreția multor medicamente. Cel mai intens studiate sunt proteinele din familia transportorilor membranari-fixatori de ATP (numiți și transportori ABC) și în special **glicoproteina-P**, codificată de gena *ABCB1* (numită și MDR1 – de la *Multiple Drug Resistance*); funcția principală este *efluxul celular* de substrate (și deci de numeroase medicamente) sau, mai clar, excreția de xenobiotice și metaboliți în urină, bilă, lumen intestinal; ea acționează și la nivelul barierei creier-sânge din plexurile coroide, limitând acumularea multor droguri în creier. În structura genei *ABCB1* au fost identificate două *polimorfisme SNPs*, în codonul 21 și 26, care s-au dovedit a fi asociate cu variații în disponibilitatea drogurilor, concentrațiile plasmatice sau efectul lor (spre exemplu, în tratamentul epilepsiei sau în terapia antitumorală. În afara de glicoproteina-P, au fost studiate polimorfismele altor transportori ABC și influența lor asupra acțiunii unor medicamente (de exemplu, unele variante alelice ale genei *ABCC4* dau rezistență la tratamentul cu agenți antiretrovirali în HIV).

#### **b. Polimorfismul genetic ce influențează țintele medicamentelor.**

Variațiile genetice în țintele de acțiune ale medicamentelor (de exemplu, receptorii) pot avea un efect important asupra eficacității lor. Dintre multiplele exemple studiate recent vom menționa polimorfismul genei *ADRB2* pentru **adrenoreceptorul-2**, “ținta” celor mai frecvent utilizate medicamente în astm dar și în alte afecțiuni. Diferite variante (SNPs) ale genei influențează funcția receptorului (procesul de transducție a semnalului) și răspunsul farmacologic la o serie de medicamente: agoniști-2 (folosiți pentru vasodilatație sau bronhodilatație, în astm), inhibitori ai enzimei de conversie ai angiotensinei (ACE) sau inhibitori de arahidonat-5-lipooxigenază (*ALOX5*).

În cazul cancerului mamar, administrarea de herceptin, un anticorp monoclonal hibrid cu fixare specifică pe *receptorul HER2*, are eficiență crescută la pacientele cu hiperexpresie a acestui receptor; la ora actuală există un test specific – *HERCEPTEST* - de detecție a activității receptorului, ceea ce permite alegerea pacientelor la care acest tratament este benefic.

#### **c. Perspectivele farmacogenomicii**

Una din marile probleme ale medicinei moderne este aceea a îmbunătățirii efectului medicamentelor. Există, însă, dificultăți serioase în evaluarea componentei ereditare a răspunsului la medicamente:

- cunoștințe incomplete despre farmacocinetica și mecanismul de acțiune a unor medicamente;

---

<sup>8</sup> SNPs – de la *Single Nucleotid Polimorphism*; se citește *snaips*.

- răspunsul organismului la droguri are un determinism poligenic, fapt ce necesită identificarea multiplelor gene implicate și stabilirea relației dintre efecte medicamentelor și anumite polimorfisme ADN ale acestor gene;
- realizarea dificilă a studiilor familiale; necesitatea unui mare număr de pacienți expuși la drog și urmăriți *à la longue*;
- relațiile farmacogenetice trebuie să fie validate pentru fiecare indicație terapeutică și în diferite grupuri etnice, din cauza heterogenității populațiilor (un anumit genotip poate fi important în determinarea efectelor unui medicament într-o anumită populație dar nu și în altele);
- existența unor dileme bioetice legate de furnizarea de date prognostice și alegerea terapiei.

Dezvoltarea geneticii moleculare și amplificarea cunoștințelor despre genomul uman și acțiunea genelor va avea un impact major asupra producerii medicamentelor și administrării lor, într-un mod care este greu de imaginat astăzi. În mod cert ele vor duce la identificarea unor noi medicamente precum și la ameliorarea eficacității și siguranței medicamentelor, în toate specialitățile medicale (vezi caseta 8.3).

### CASETA 8.3

#### Aplicațiile farmacogeneticii în domeniul cardiologiei.

- Pacienții cu *insuficiență cardiacă congestivă*, purtători ai mutației genei enzimei de conversie a angiotensinei (ACE) ce determină formarea unei variante trunchiate a enzimei ar putea beneficia de tratament cu betablocante; acest lucru este posibil deoarece la homozigoții mutanți nivelul activității ACE este foarte înalt, cordul este suprasolicitat, deteriorându-se rapid; la acești pacienți, tratamentul betablocant având acțiune deprimantă asupra axului renină-angiotensină-aldosteron (RAA) are efecte benefice asupra funcției cardiace.
- Ținând cont de aceste aspecte, efectul inhibitorilor ACE în HTA variază în funcție de profilul genetic, fiind astfel utilă determinarea acestui profil, bazat pe identificarea SNPs.
- În plus, efectul medicației antihipertensive depinde și de rata de metabolizare a aldosteronului, a cărui sinteză depinde de acțiunea mai multor enzime CYP polimorfe (11- $\beta$ -hidroxilaza și aldosteron-sintetaza); gradul de remodelare cardiacă (hipertrofia) și vasculară (rigidizarea) în caz de HTA este influențat de cantitatea și de tipul celor două enzime din țesutul miocardic și vascular, de unde și variabilitatea răspunsului la antialdosteronice.
- Răspunsul la inhibitorii de HMG-reductază în tratamentul hipercolestoremiei ar depinde de polimorfismul CETP (colesteryl-ester-transfer-protein). Purtătorii de alele B1B1 prezintă niveluri crescute cu CETP și concentrații crescute de LDL, dar răspund mai bine la tratamentul cu statine (comparativ cu purtătorii de alele B2B2 care pot fi clasați drept non-responderi).

*Domeniile cercetării farmacogenomice* sunt reprezentate de:

- identificarea genelor cauzatoare de boală, ce pot fi manipulate prin medicamente;
- identificarea polimorfismelor genetice implicate în metabolizarea medicamentelor (la cele 3 nivele: enzime de biotransformare și conjugare, proteine de transport, receptori);
- stratificarea medicamentelor în funcție de polimorfismul mononucleotidic, adică individualizarea terapiei medicamentoase în funcție de profilul genetic individual pentru a evita reacțiile adverse;
- stratificarea genetică populațională prin scanarea genomului uman pentru identificarea genelor implicate în răspunsul la tratament;
- determinarea tipurilor de expresie genică (proteom) în țesuturile țintă precum și a interacțiunii dintre medicament și receptorul-țintă prin analiza programului transcripțional al țesutului țintă privind răspunsul la medicament.

Nu înseamnă totuși că farmacogenetica va revoluționa medicina... peste noapte, deoarece translația rezultatelor din cercetare în medicina clinică este dificilă, de durată și

scumpă. Costurile actuale pentru asemenea „screeninguri farmacogenomice” sunt mari dar cu siguranță tehnologia microcipurilor (“*microarray*”)<sup>9</sup> se va dezvolta iar beneficiile reducerii frecvenței răspunsurilor adverse și ale creșterii eficienței terapeutice vor justifica investițiile. „Medicina predictivă și individualizată”, personalizată în funcție de genotipul individului afectat și tratat, este realmente posibilă dar...într-un viitor apropiat.

**În concluzie**, farmacogenomica reprezintă un nou domeniu de aplicare al farmacogeneticii, cu implicații majore în sinteza țintită a anumitor medicamente și cunoașterea profilului răspunsului individului la acțiunea noilor medicamente. Aceste implicații pot avea două beneficii majore: predicția, cu un grad înalt de acuratețe, a indivizilor ce pot avea reacții adverse la un medicament (prin cartografierea SNPs a genomului) și dezvoltarea profilurilor farmacogenetice, ce va permite ajustarea dozei medicamentoase pentru realizarea unei eficiențe maxime.

## C. BOLILE GENETICE

Recunoașterea rolului factorilor genetici în cauzalitatea bolilor umane a determinat clasificarea lor în trei mari categorii: boli ecologice – negenetice (produse de factorii din mediul extern), boli multifactoriale (produse de acțiunea combinată a factorilor de mediu și a factorilor genetici) și boli genetice (determinate predominant de mutații). În secțiunile precedente ale acestui capitol am argumentat faptul că, în afară de traumatisme, termenul de “negenetic” poate fi impropriu căci este greu de conceput că o boală poate fi integral negenetică. Factorii genetici sunt prezenți de la concepție iar dezvoltarea unui individ depinde de interacțiunea factorilor genetici și de mediu. De aceea, orice variație umană, atât în starea de sănătate cât și de boală, implică acțiunea într-o anumită proporție a factorilor genetici. Astfel, chiar în bolile bine definite ecologic (de exemplu, infecțiile) factorii genetici pot juca un rol critic. Se poate deci afirma că aproape *toate bolile umane au o componentă genetică*, mai mare sau mai mică. În aceste condiții se pune firesc întrebarea: ce sunt de fapt bolile genetice?

Termenul de **boli genetice** este rezervat cu precădere afecțiunilor *determinate* de mutații genice și anomalii cromosomice dar genetica medicală include în sfera sa de acțiune și bolile multifactoriale, *condiționate* genetic sau cu predispoziție genetică, mai ales acelea în care factorii genetici au o contribuție (exprimată prin *heritabilitate*) mai mare de 50% (majoritatea malformațiilor izolate, bolile comune ale adultului și numeroase forme de cancer). Indiferent de terminologie și încadrare, se poate afirma justificat că *mutațiile reprezintă o cauză majoră de boală sau predispoziție la boală*. Genetica umană a dobândit, într-un timp relativ scurt, un rol din ce în ce mai important în practica medicinei clinice, fiind o componentă centrală a înțelegerii celor mai multe boli majore (de la bolile copilăriei până la bolile comune ale adultului), a diagnosticului și profilaxiei lor.

### 1. CLASIFICAREA BOLILOR GENETICE

În funcție de tipul de modificări genetice, de localizarea și acțiunea lor – se pot deosebi cinci categorii de boli genetice: boli cromosomice, boli monogenice (mendeliene sau moleculare), boli mitocondriale, boli multifactoriale și boli ale genomului celulelor somatice.

Aceasta este o clasificare “practică” dar de etapă, deoarece, așa cum vom vedea, diferențele dintre aceste categorii tind să se estompeze iar identificarea unor mecanisme genetice noi va duce, probabil, la noi clasificări. În acest sens vom reaminti (vezi capitolul 6.B.1.3) grupul de *boli genomice* produse prin recombinarea omologă nealelică între diferite regiuni din genom, determinată de „arhitectura” lui specifică; în funcție de mărimea segmentului genomic implicat se poate produce: o boală monogenică, un sindrom al genelor contigue sau o aberație cromosomică (vezi tabelul 6.1).

---

<sup>9</sup> Într-o singură probă obișnuită de sânge se va putea evalua polimorfismul a 20.000 SNPs din 5000 de gene pentru determinanții principali ce influențează distribuția și efectele medicamentelor.



### **a. Bolile cromosomice.**

Bolile cromosomice sunt produse de modificări în numărul și structura cromosomilor, „vizibile la microscop” (inclusiv prin tehnicile de FISH; vezi capitolul 2.D.3.2). Această ultimă precizare exclude delețiile/duplicațiile genice identificate numai prin tehnicile de analiză moleculară. Oricum, sindroamele produse de microdeleții sau microduplicații de circa 4Mb se găsesc la limita dintre bolile cromosomice și bolile moleculare.

Frecvența anomaliilor cromosomice, estimată (cu tehnicile clasice) prin studii sistematice la nou-născuți vii, este în jur de 6‰. Această valoare este, evident, o subestimare a frecvenței reale și, pe baza datelor obținute cu tehnicile de marcaj în benzi și FISH, se apreciază că frecvența reală este de circa 9-10‰ nou-născuți vii (vezi capitolul 6.C.3); anomaliile neechilibrate vor produce sindroame plurimalformative (peste 600 de entități în catalogul editat de Schinzel, 1984) iar cele echilibrate, deși nu modifică fenotipul pacientului, pot genera tulburări de reproducere. Aceste cifre reprezintă doar „partea vizibilă” a icebergului deoarece așa cum am arătat deja (vezi tabelul 6.6) mulți embrioni cu anomalii cromosomice se elimină precoce în viața intrauterină.

Oricum, aberațiile cromosomice sunt principalele cauze ale anomaliilor congenitale multiple, retardului mintal, tulburărilor pubertare sau de reproducere (sterilitate, avorturi spontane, nou-născuți morți). Cele mai frecvente boli cromosomice vor fi descrise în capitolul 10.

### **b. Bolile monogenice.**

Bolile monogenice sunt produse de *mutația unei singure gene* (din genomul nuclear) *cu efect major*, care codifică o proteină de structură sau o enzimă. Aceste mutații se *transmit* în succesiunea generațiilor după tipul mendelian: autosomal dominant, autosomal recesiv sau legat de X; de aceea mai sunt numite boli mendeliene și sunt repertoriate în catalogul *Mendelian Inheritance of Man*, editat (din 1966) de Victor McKusick (ed.12, 1998; *OMIM* - versiunea online) (vezi caseta 5.4). Din cele peste 14.000 de caractere mendeliene, normale sau patologice, listate în *OMIM* aproape 9.000 reprezintă boli monogenice care realizează o frecvență globală estimată inițial la 10‰ nou-născuți (Carter,1977); incidența reală, actuală, este foarte probabil dublă (20-24‰) dar există motive să apreciem că aceasta va crește o dată cu identificarea unor noi mutații genice. În circa 40% din bolile monogenice a fost localizată (deseori clonată) gena implicată și se cunoaște defectul primar, proteina anormală; pentru aceste afecțiuni se folosește deseori, în practică, termenul de *boli moleculare*. Bolile monogenice, mendeliene, mai frecvente vor fi prezentate în capitolul 11.

### **c. Bolile mitocondriale**

Bolile mitocondriale sunt un tip particular de boli monogenice produse de mutații în *genomul mitocondrial*, care afectează producerea de energie în mușchi și nervi; ele au un rol important în îmbătrânirea celulară. Se cunosc până în prezent 60 de boli mitocondriale, în majoritatea lor rare, dar probabil că mutațiile genomului mitocondrial sunt implicate într-un mod mult mai complex în patologia umană (vezi capitolul 12).

### **d. Bolile multifactoriale**

Bolile multifactoriale pot avea o *distribuție familială* dar NU se transmit mendelian (!). Această caracteristică demonstrează intervenția unor factori ereditari (reprezenți de obicei prin mai multe gene – poligenie) care interacționează permanent și complex factorii de mediu, pentru a produce starea de boală. De cele mai multe ori, factorii genetici realizează o *predispoziție genetică*, o vulnerabilitate individuală la îmbolnăvire. Bineînțeles, nu toți indivizii predispuși se îmbolnăvesc deoarece vulnerabilitatea se distribuie în populație sub forma curbei Gauss și este necesară intervenția factorilor de mediu care, atunci când depășesc un anumit prag, transformă predispoziția în boală (vezi capitolul 6.E.2 – modelul distribuției continue cu prag).

Progrese recente în studiul unor boli multifactoriale pledează pentru existența unui model alternativ, mixt, în care factorii genetici sunt reprezentați de o componentă monogenică majoră (una sau două gene importante în patogenia bolii, cu mai multe alele cu

acțiune/eficiență variabilă) și o componentă poligenică minoră care interacționează cu factori de mediu și împreună modulează efectul genei/genelor majore.

*Teoria oligogenică* ar reprezenta de fapt o piesă a spectrului complex al determinismului bolilor umane, ilustrat în figura 8.5, care face tranziția dintre bolile monogenice și cele poligenice. Această teorie deschide o perspectivă optimistă pentru identificarea genelor de predispoziție, depistarea indivizilor predispuși genetic și descoperirea agenților de mediu decisivi pentru o boală. Paradoxal, unul din cele mai importante beneficii ale identificării genelor de susceptibilitate la boală nu este potențial util pentru terapia genică ci mai curând pentru oportunități de tratament și prevenție a bolilor prin intermediul manipulării mediului în care anumiți indivizi dezvoltă un risc genetic (vezi capitolul 6.E.3).

Vom încheia această prezentare subliniind că bolile multifactoriale (vezi capitolul 13) nu sunt numai complexe ci și relativ frecvente: malformațiile congenitale și bolile psihice la copil au o incidență de 20-30‰ iar bolile comune ale adultului au o frecvență de două ori mai mare; per total, incidența bolilor multifactoriale depășește 50 ‰.

#### **e) Bolile prin mutații somatice**

Bolile prin mutații somatice rezultă prin efectul cumulativ al unor *mutații somatice succesive, în gene diferite*, unele produse prin erori de replicare a ADN, iar altele de către factori de mediu. În această categorie se includ marea majoritate a cancerelor, multe boli autoimune, precum și procesul de îmbătrânire; bolile se produc *după concepție*, sunt *limitate la celulele somatice* și deci *NU se transmit la descendenți*. Într-un procent mic de cazuri o mutație inițială (importantă dar nu suficientă pentru producerea bolii) se poate moșteni de la unul din părinți, producând o predispoziție genetică la boală (de exemplu, mutația genei BRCA1 în cancerul de sân familial). Frecvența acestei categorii de boli este estimată la circa un sfert din populația adultă (vezi tabelul 1.2).

## **2. CARACTERELE GENERALE ALE BOLILOR GENETICE.**

Bolile genetice prezintă o serie de caracteristici generale determinate de natura lor, care permit deseori medicului practician să-și orienteze diagnosticul clinic și etiologic.

Indiferent de tipul de boli genetice și deci de încadrarea în una din cele cinci categorii precizate mai sus, în determinismul lor intervin – în proporții variabile – factori genetici, mutații patogene sau neutre (generatoare de polimorfisme genetice), în celulele germinale sau somatice. Ele pot fi identificate direct prin analiza cromosomilor sau a ADN genomic și/sau indirect prin efectele primare (la nivelul proteinelor) sau secundare (la nivel celular) (vezi “modelul” sicklemiei, prezentat în capitolul 4.B.3) și, uneori, prin caracterul familial/ereditar al bolii.

Bolile genetice sunt determinate prenatal, prezente la naștere dar manifeste clinic neonatal sau mai târziu în alte perioade de viață, inclusiv la adult (de exemplu, hemocromatoza, hipercolesterolemia familială sau ADPKD – ca să nu cităm decât unele boli frecvente – se manifestă fenotipic după 30-40 de ani). Acest *caracter congenital* (lat. *congenitus = născut cu*) este un indicator prețios pentru natura genetică a unui caracter. Dar sensul corect, subliniem încă o dată, este de *existent* la naștere, cu origine anterioară acestui moment, adică în viața intrauterină. De asemenea este important să știm și să nu greșim punând semnul egalității între congenital și genetic, deoarece există anomalii congenitale negenetice, produse de agresiuni embrio-fetale exercitate de unii agenți externi ca, de exemplu, virusul rubeolei, alcoolismul matern sau unele medicamente (celebrul caz al talidomidei) (vezi capitolul 14). Vom mai menționa faptul că bolile prin mutații somatice (de exemplu, neoplaziile) nu au, de obicei, un caracter congenital (excepție fac desigur cancerile ereditare sau familiale).

Bolile genetice sunt deseori *familiale* regăsindu-se și la alți membri ai familiei bolnavilor. Desigur, aceasta nu este o regulă absolută deoarece există destule boli genetice *sporadice*, în care bolnavul (ce a suferit o *mutație* nouă) este singurul membru afectat al

familiei, sau boli negenetice prezente la mai multe persoane din familie care au același mediu de viață (de exemplu, unele infecții cronice ca tuberculoza sau hipotiroidia prin carență de iod în alimentație or alcoolismul).

O parte din bolile genetice sunt *ereditare*, în sensul transmiterii lor în succesiunea generațiilor, frecvent după un model mendelian. Termenul de boală genetică, produsă prin mutații, este mai general și nu se suprapune obligatoriu cu cel de boală ereditară, care presupune evident prezența afecțiunii la bolnavi din generații diferite. Multe boli cromosomice și monogenice sunt genetice dar modificările fenotipice consecutive mutațiilor sunt fie sunt letale înainte de perioada de reproducere, fie determină o incapacitate de procreare (organică sau situațională). De asemenea, circa 2/3 din cancere se produc prin acumularea de mutații succesive în unele celule somatice (ce formează o clonă anormală) care însă nu se transmit la descendenți. De subliniat necesitatea evitării erorii de a considera ereditare unele boli exogene, pentru că sunt prezente la bolnavi din generații diferite; nu se poate vorbi de tuberculoză ereditară (deși așa cum am menționat există o prediposiție genetică; vezi caseta 8.1) și nici de sifilis ereditar (pentru că *Treponema pallidum* nu afectează genomul ci doar se transmite trans-placentar de la mamă la făt).

În literatura de specialitate, bolile determinate sau condiționate genetic au mai fost caracterizate prin concordanța lor mult mai mare la gemenii monoziți, comparativ cu gemenii diziziți (vezi capitolul 5.E) sau prin distribuția lor în anumite grupuri etnice sau populaționale (vezi capitolul 7.B.4). Aceste caracteristici au firească mai puțină utilitate practică.

În încheierea acestei prezentări a caracterelor generale ale bolilor genetice, utile pentru a preciza natura lor, vom spune că nu este întotdeauna ușor de răspuns cu “DA” sau “NU” la întrebarea: “boala pacientului este determinată genetic?”. Este drept că în cadrul discuției despre etiologia bolilor, am afirmat că orice afecțiune care nu este cert și evident cauzată de factori externi poate fi considerată genetică dar aceasta este doar o generalizare care nu permite încadrarea în boli determinate genetic (bolile cromosomice, bolile monogenice și mitocondriale) sau boli condiționate genetic (bolile multifactoriale). Analiza, uneori dificilă, a criteriilor menționate mai sus va permite o clasificare adecvată, în funcție de natura mutațiilor (detalii în capitolul 9). Cert este că acuratețea diagnosticului, anamneza familială, posibilitățile de explorare genetică și, nu în ultimul rând, experiența medicului sunt decisive. Iar acțiunea aceasta nu este numai “un joc al inteligenței” ci un fapt necesar pentru buna îngrijire și consiliere medicală a bolnavului și familiei sale, o latură obligatorie a relației actuale dintre medic și pacient.

### **3. IMPACTUL ȘI CONSECINȚELE BOLILOR GENETICE ASUPRA STĂRII DE SĂNĂTATE**

Impactul și consecințele bolilor genetice (cromosomice, monogenice și multifactoriale, cu predispoziție genetică) asupra stării de sănătate este important și deosebit de actual; el poate fi ușor demonstrat prin statisticile internaționale și modul în care este abordată această patologie în numeroase țări.

Bolile genetice sunt numeroase. Se cunosc peste 10.000 de boli determinate sau condiționate genetic; o parte semnificativă din aceste afecțiuni sunt mai frecvente (1:500 – 1:10.000 nn), altele sunt însă mult mai rare; ele au o mare diversitate și *se regăsesc în aproape toate specialitățile medicale*. Deci, orice medic, de la medicul de familie la specialiști, vor fi confrunțați în activitatea lor cu diferite probleme de patologie genetică.

Bolile genetice sunt, în ansamblul lor, *frecvente*; ele afectează 5-8% din nou-născuți deci 1 din 20 de indivizi până la 25 de ani și probabil 30-40% în tot cursul vieții (vezi, în capitolul 1, tabelul 1.2). În fiecare an se nasc în România circa 7.500 copii cu anomalii congenitale, boli monogenice sau cromosomice și alți 10.500 vor face o afecțiune multifactorială înainte de 25 de ani. Deci peste 18.000 de copii și familiile lor (cu risc de

recurență) au nevoie anual de diagnostic, explorări și sfat genetic. La aceasta se adaugă rolul important al factorilor genetici în determinismul tulburărilor de reproducere (sterilitate și avorturi spontane).

Bolile genetice au o contribuție majoră la creșterea *morbidității și mortalității*, mai ales la copii.

- Acum mai puțin de un secol bolile produse de cauze negenetice (malnutriție, infecții, condiții insalubre etc) produceau majoritatea deceselor la copil; în secolul XX sănătatea publică s-a îmbunătățit și, ca rezultat, *mortalitatea infantilă* s-a redus iar bolile genetice au devenit responsabile de cele mai multe decese la copil. De exemplu, în Marea Britanie mortalitatea infantilă era în 1914 de 154 la 1000 de nou-născuți iar bolile genetice și malformative produceau 16,5% din decese; până în anul 1991 mortalitatea infantilă a scăzut spectaculos la 7,4 la 1000 de nou-născuți iar “contribuția” patologiei genetice a ajuns la aproape 50%.
- Îmbolnăvirile prin afecțiuni genetice sau anomalii congenitale determină 30-50% din *internările în spitalele de copii* și circa 10% din internările în spitalele de adulți. Mai mult, pacienții cu boli genetice sunt spitalizați mai frecvent și pe perioade mai lungi.
- Bolile genetice sunt *boli cronice* care realizează frecvent un handicap fizic / senzorial / motor sau mintal (circa 75% din toate handicapurile severe ale copilăriei sunt de natură genetică). Natura cronică a multor boli genetice implică o *grea povară medicală, financiară și emoțională* pentru pacienții afectați și familiilor lor ca și pentru societate în general.

Se poate conchide fără rezerve că *bolile genetice reprezintă o problemă majoră de sănătate publică*, ce impune MSF acțiuni concrete și eficace de diagnostic și profilaxie la nivel național. Genetica medicală a devenit o specialitate clinică distinctă care se ocupă de diagnosticul și îngrijirea pacienților cu boli genetice precum și de familiile lor, prin: sfat genetic, diagnostic prenatal, screening neonatal sau diagnostic presimptomatic. În felul acesta genetica este implicată în asigurarea *“sănătății de-a lungul generațiilor”*. Ponderea serviciilor de genetică medicală în asistența medicală a populației a devenit importantă și nu mai poate fi ignorată. *“Copiii handicapați sunt victime ale destinului și este păcat să fie și victime ale indiferenței sau ignoranței noastre”* (J.F.Kenedy).

În aceste condiții, precum și datorită contribuțiilor noi, majore și eficace în prevenirea bolilor, serviciile de genetică medicală trebuie să devină o parte integrantă a strategiei sanitare a fiecărei țări. Dacă ne referim la strategie, să nu uităm că numeroasele descoperiri din ultimele decenii au avut efecte importante asupra *teoriei și practicii medicale*. Medicina a devenit moleculară, s-a introdus diagnosticul genotipic au apărut farmacologia genomică și terapia genică și s-au pus bazele profilaxiei personalizate și medicinei predictive (vezi capitolul 1.D). Toate acestea vor reduce semnificativ “povara genetică”.

## D. ABORDAREA GENETICĂ ÎN MEDICINĂ

Practica medicală se bazează în esență pe *îngrijirea* unor pacienți care au o anumită *suferință*. Medicul implicat în această acțiune trebuie să obțină date pentru a răspunde la două întrebări specifice, esențiale:

(1) *ce are pacientul?*

(2) *ce se poate face pentru pacient?*

Aceste întrebări exprimă în principiu elementele majore, clasice, ale *relației medic – bolnav*: diagnosticul și tratamentul bolii, care – așa cum am arătat mai sus – constituie reperele concepției esențialiste despre boală.

Dezvoltarea remarcabilă a *geneticii medicale* în ultimii 30 de ani, atât în planul informațiilor cât și al posibilităților practice de evaluare a pacienților, a adăugat alte două întrebări care, evident, lărgesc sfera problemelor și raporturilor dintre medic și pacient:

(3) *de ce acest pacient a făcut această boală, acum?*

(4) *ce posibilități există pentru a preveni sau reduce în viitor manifestarea bolii – la pacient și/sau familia sa?*

Prin a treia întrebare se urmărește stabilirea *etiopatogeniei afecțiunii*. Genetica umană a demonstrat că *fiecare om este unic* pentru că are o anumită structură genetică și biologică care explică diferențele individuale în capacitatea de apărare sau metabolizare a substanțelor și, deci, în vulnerabilitatea organismului la agresiunile mediului. Deasemeni, a devenit evident că aproape *orice boală este rezultatul interacțiunii factorilor genetici cu factorii de mediu*.

Ultima întrebare vizează *prognosticul și profilaxia* complicațiilor bolii la pacient precum și *riscul de apariție a afecțiunii la alți membri ai familiei*. Posibilitatea transmiterii genelor mutante sau a genelor de susceptibilitate la rudele bolnavului determină implicarea medicului în viața familiei, pentru a evita apariția sau recurența bolii la alte persoane.

A devenit evident că în relația sa cu bolnavul medicul trebuie să țină cont de toate aceste elemente noi, fundamentate de genetică. În felul acesta relația medic-pacient devine mai complexă, căpătând o nouă dimensiune reprezentată de **abordarea genetică** (figura 8.6). Ea a devenit o componentă de rutină a îngrijirii bolnavilor și a prevenirii îmbolnăvirilor.

Abordarea genetică se bazează pe trei principii majore, ce determină acțiuni distincte:

- pacientul are o anumită individualitate biologică,
- în marea majoritate a bolilor intervin factori genetici, determinanți sau favorizanți,
- genele mutante se transmit la alte persoane din familie.

#### (2) *Individualitatea biologică*

Individualitatea biologică a fiecărei persoane este determinată de structura genetică unică, matricea dezvoltării sale (sex, vârstă, gândire, comportament), mediul în care s-a dezvoltat și experiența sa de viață (educație, ocupație, status socio-economic, obiceiuri, alimentație etc) (vezi capitolul 1.B.1). Această *unicitate bio-psiho-socială* poate explica:

- *răspunsul specific la agresiunile* factorilor de mediu sau *predispoziția genetică* la anumite boli comune; așa cum vom vedea în secțiunea următoare (ecogenetica), în funcție de structura și eficiența sistemelor ce intervin în menținerea homeostaziei, fiecare om este mai rezistent sau mai vulnerabil la anumite agresiuni ale factorilor biologici, chimici sau fizici din mediu; cu alte cuvinte „*suntem inegali în fața bolii*”;
- *manifestările variabile și gravitatea bolii*, au fost recunoscute de mult timp și sintetizate în celebrul aforism „*nu există boli ci numai bolnavi*”; explicațiile acestor fenomene au fost denumite „constituție” sau „teren” dar în final reprezintă consecințele individualității biologice, determinată în primul rând de gene și apoi de mediu;
- *răspunsul particular la tratament* al fiecărui bolnav, determinat de capacitatea de metabolizare și eliminare a compușilor chimici (vezi secțiunea de farmacogenetică); la bolnavi cu aceeași afecțiune un medicament administrat în aceeași doză poate avea efecte diferite: la unii va fi terapeutic, la alții nu va produce vindecarea iar la unele persoane va da reacții adverse; tratamentele și dozele medicamentelor vor fi adaptate la fiecare bolnav.

#### (2) *Natura genetică a bolii.*

În funcție de ponderea factorilor etiologici – genetici și de mediu – bolile umane sunt *determinate genetic* (produse predominant de mutații), *condiționate genetic* (multifactoriale) și *negenetice*. Cele mai numeroase afecțiuni, mai ales în medicina adultului, sunt bolile multifactoriale, în care factorii genetici determină o *predispoziție genetică* la boală; persoanele vulnerabile se îmbolnăvesc numai în anumite condiții de mediu.

“*Toți clinicienii trebuie să fie capabili să determine* dacă o anumită boală este genetică, parțial (posibil) genetică sau negenetică...*Ei trebuie să înțeleagă* natura bolii și consecințele sale și să fie capabili să discute aceste informații cu bolnavul și familia lui și să-i îndrume, dacă este necesar, la alți specialiști...” (Riccardi).

Stabilirea naturii genetice a unei boli nu este o acțiune simplă (vezi capitolul 9); ca și în alte domenii ale medicinei, aceasta poate implica mai mulți specialiști (inclusiv geneticieni)

precum și explorări genetice. Dar orice practician, de la medicul de familie la specialist, trebuie să știe *cum să procedeze* și mai ales să fie convins că *stabilirea naturii bolii este decisivă* pentru determinarea evoluției (istoriei naturale) și prognosticului bolii, îngrijirea bolnavului, evaluarea riscului genetic de recurență în familia sa precum și a posibilităților de reducere a acestui risc. În aceste condiții el nu va ignora anamneza familială și va ști ce explorări genetice să recomande.

Medicului practician trebuie să-i fie familiare o serie de concepte genetice: pleiotropie, expresivitate variabilă, penetranță, heterogenitate genetică, fenocopii, moduri de transmitere și riscuri genetice. Aceasta nu înseamnă nicidecum că practicianul se va substitui specialistului în genetică medicală ci numai că el va realiza o „medicină de bună calitate” aplicând principiile geneticii sau, pe scurt, „o medicină genetică”. Ținând cont de rolul tot mai important al factorilor genetici în determinismul bolilor și de faptul că în orice specialitate medicală există o patologie genetică această abordare genetică a bolilor este deja o componentă de rutină a îngrijirii bolnavilor.

După stabilirea diagnosticului clinic și etiologic este absolut necesară *informarea pacientului* sau a familiei sale (în cazul unui copil sau al unei persoane cu handicap) asupra naturii bolii, evoluției și consecințelor ei. Această acțiune este importantă, plină de responsabilitate; ea necesită nu numai dibăcie de comunicare ci și cunoștințe precise despre genetica bolii respective. Orice medic trebuie să fie conștient de necesitatea unei pregătiri fundamentale prealabile, care îi va permite, cu ajutorul unei biblioteci și a internetului, să capete informațiile necesare procesului de informare a pacientului. Apoi, el se va implica – direct sau indirect – în informarea și evaluarea altor membri ai familiei bolnavului.

### (3). *Familia ca unitate de acțiune.*

“Abordarea genetică este o atitudine care reflectă obligația medicului *de a asista nu numai bolnavul ci și familia sa...* pentru a evita apariția sau recurența bolii în familie... Prin aplicarea curentă a acestei atitudini, clinicianul poate contribui efectiv la *prevenirea bolilor genetice*”. Această acțiune derivă din esența eredității ce implică transmiterea genelor mutante la alți membri ai familiei. Medicul poate identifica alte cazuri nediagnosticate (deseori oligo-simptomatice), precum și persoane sănătoase dar cu risc de a fi moștenit gena mutantă.

În funcție de tipul de boală – monogenică, recesivă sau dominantă (eventual cu debut mai tardiv) sau multifactorială – se va acorda un sfat genetic adecvat și se va recurge eventual la un diagnostic presimptomatic / prenatal (vezi capitolul 9). Chiar dacă medicul de familie nu poate să îndeplinească toate sarcinile ce decurg din această atitudine, el este obligat să se asigure că familia le cunoaște și, prin trimiterea la alți specialiști, familia primește îngrijirea competentă necesară.

A devenit evident că „*nu există boli ci numai...familii de bolnavi*” iar familia este o unitate de acțiune. În acest context, în afara de cunoștințe, dublate de abilitatea de comunicare, medicul trebuie țină cont de implicațiile psihologice posibile și să aplice principiile bioeticii: respectul confidențialității, consimțământul informat, dreptul de a nu ști etc.

## INTERNET

1. Pharmacogenetics Research Network, US National Institute of General Medicine: <http://www.pharmagkb.org/pdfs/model.pdf>
2. Aplicarea cercetărilor farmacogenetice în industrie: <http://www3.diahome.org/committees/pharmacogenetics>
3. Polimorfismul mononucleotidic (SNPs): <http://www.snp.cshl.org/index.html>
4. Farmacogenetica citocromului P450: <http://www.imm.ki.se./cypalleles>
5. Genethon (France): <http://www.genethon.fr>
6. National Center for Genomic Resources: <http://www.ncgr.org>
7. National Human Genome Research Institut: <http://www.nhgri.nih.gov>

### Bibliografie specifică selectivă

1. Abel I, Casanova JL. – *Genetic predisposition to clinical tuberculosis: bridging the gap between simple and complex inheritance* – Am. J.Hum.Genet. 2000;67:274-277
2. Brinkmann U., Roots J., Eichelbaum M. – *Pharmacogenetics of the human drug-transporter gene MDR1; impact of polymorfisms on pharmacotherapy* – Drug Discovery, 2001, 6:16, 835-840
3. Cooke G.S., Hill A.V.S. - *Genetics of susceptibility to human infectious disease* - Nat. Rev. Genetics, 2001; 2: 967-977.
4. Costa L.G. - *The emerging field of ecogenetics* - Neurotoxicology. 2000; 21: 85-89.
5. Evans WE, McLeod HL. - *Drug therapy: pharmacogenomics-drug disposition, drug targets and side effects* - N.Engl.J.Med 2003;348:538-549
6. Guțiu I.A. – *Farmacogenomica – cea mai nouă ramură a geneticii medicale. Aplicații în cardiologie*, Farmacia, 2001, XLIX,2, 53-66
7. Motulsky AG – *Nutritional ecogenetics: homocysteine-related arteriosclerotic vascular disease, neural tube defects and folic acid* – Am.J.Hum.Genet. 1996;58:17-20.
8. Mukherjee D., Topol E. : *Pharmacogenomics in Cardiovascular Diseases* – Progres in Cardiovascular Diseases, 2002, 44, 6, 479-98
9. Nagao M, Ochiai M, Ushijima T, Watanabe M, Sugimura T, Nakagama H. - *Genetic determinant and environmental carcinogens*. - Mutat. Res. 1998; 402: 85-91.
10. Nebert DW, McKinnon RA, Puga A. - *Human drug-metabolizing enzyme polymorphism: effects on risk of toxicity and cancer* – DNA Cell Biol. 1996;15:273-280.
11. Kalow W, Grant DM. – *Pharmacogenetics* – in Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited diseases*, 7th ed, McGraw-Hill, New York, 1995, 1981-2030
12. Kalow W.– *Pharmacogenetics in biological perspective*, Pharmacol. Reviews, 1997, 49, 4, 369-380
13. Reich T, Hinrichs A, Beirut L. – *Genetic studies of alcoholism and substance dependence* – Am.J.Hum.Genet.1999; 65:599-605
14. Roden D. M., George A. L. Jr - *The genetic basis of variability in drug responses* , Drug Discovery 2002, 1, 37-44
15. Roses A. D.– *Pharmacogenetics*, Human Molec. Genetics, 2001, 10, 20, 2261-2267
16. Sadée W.– *Pharmacogenomics*, BMJ, 1999, 319:1286
17. Shi M. M., Bleavin M.R. , Iglesia F.A. – *Pharmacogenetic application in drug development and clinical trials*, Drug Metab. and Disp., 2001, 29, 4, 591-595
18. Stoica O., Braha E., Ungureanu G. : *Terapeutica medicamentoasă la începutul erei genomice* – Rev. Med. Chir. Soc. Nat. Iași, 2002, 106, 2-3
19. Weinsihilboum R. – *Genomic medecine: Inheritance and drug Response* – N.Engl.J.Med 2003;348:529-537
20. Wolf C R., Smith G. , Smith R. L. – *Pharmacogenetics* , BMJ, 2000, 320: 987-990.

## CAPITOLUL 9

# CONSULTUL ȘI SFATUL GENETIC

Bolile genetice și malformative sunt foarte *diverse*, se manifestă la vârste diferite și afectează orice sistem sau organ; de aceea bolnavii cu aceste afecțiuni se pot adresa diferitelor categorii de medici specialiști. În consecință, cunoașterea unor principii de genetică medicală este *necesară și utilă oricărui practician* confruntat cu patologia genetică, care trebuie să știe și să aplice metodologia generală a *consultului genetic*, să indice adecvat efectuarea unor *explorări genetice*, să înțeleagă și să interpreteze corect rezultatele lor și, nu în ultimul rând, să poată *sfătui genetic* – în limitele sale de competență – în mod corect pacientul și/sau familia sa, confruntată cu un risc genetic.

## A. CONSULTUL GENETIC

### 1. DEFINIȚIE. OBIECTIVE.

**Consultul genetic** este un act medical specializat și complex prin care se pune sau se evaluează diagnosticul unei boli, se precizează natura sau componenta sa genetică și se acordă un sfat genetic bolnavului sau familiei sale.

- Primul obiectiv al consultului genetic este *realizarea unui diagnostic clinic cât mai precis posibil*; acest lucru este deseori dificil dar absolut necesar deoarece, mai mult decât în alte specialități, el condiționează direct prognosticul, calitatea îngrijirii medicale, prevenirea complicațiilor și corectitudinea sfatului genetic, de care depind opțiunile reproductive ale pacientului sau cuplului.
- Al doilea obiectiv este *stabilirea naturii sau a componentei genetice a bolii*; aceasta este o activitate specifică medicului genetician care (pe baza istoricului familial și explorărilor genetice) trebuie să diferențieze bolile genetice de cele condiționate genetic sau negenetice.
- Al treilea obiectiv al consultului genetic este acordarea *sfatului genetic*, o acțiune absolut caracteristică consultului genetic, prin care bolnavul sau rudele cu risc sunt sfătuiți în ce privește: *natura și consecințele bolii* (istoria naturală, prognosticul), *riscul de recurență și căile prin care riscul poate fi redus sau prevenit* (opțiunile reproductive, posibilitățile de diagnostic prenatal).

Deci, consultul genetic este un act medical complex care presupune o pregătire solidă, o mare disponibilitate de colaborare cu alți specialiști, deci într-o echipă în care *geneticianul reprezintă punctul de convergență* (decizie), care stabilește concluziile finale. Nu în ultimul rând, este nevoie de *o înfinită dorință de a ajuta și alina* bolnavii confrunțați cu un handicap pentru o viață, precum și pe părinții lor ce trăiesc drama unei neîmpliniri și tragedia unui destin genetic potrivnic.

### 2. CADRUL ORGANIZATORIC

Consultul genetic este realizat de către un **medic genetician** care trebuie să aibă o pregătire medicală de *bază* – pentru a înțelege boli ce afectează orice organ, la orice vârstă<sup>1</sup> – precum și o pregătire *specifică* în domeniul geneticii medicale, solidă și mereu actualizată. În

<sup>1</sup> „...geneticienii clinicieni sunt probabil ultimii generaliști adevărați în medicina actuală” (Hall, 1999).



plus, medicul genetician trebuie să posede anumite trăsături de personalitate și *calități psihologice* pentru a putea face față dificultăților inerente pe care le ridică diagnosticul și îngrijirea bolnavilor.

Abordarea corectă și completă a patologiei genetice și malformative nu se poate realiza decât în **Servicii (Centre) de genetică medicală** specializate (vezi secțiunea D). *Obiectivul* principal al acestor servicii este de a răspunde necesităților individului și familiei care sunt confrunțați cu o boală genetică, în special dorinței lor de a ști dacă au sau nu un risc de a dezvolta sau transmite o boală cu o componentă genetică.

Serviciile de genetică se deosebesc de alte servicii medicale pentru că:

- realizează diagnostic, investigații și îngrijiri medicale pentru boli care afectează *orice sistem de organe și la orice vârstă*; acest lucru implică multiple investigații, în diferite specialități; planificarea, coordonarea și centralizarea rezultatelor revine medicului genetician.
- *unitatea de studiu este familia* și nu individul;
- *acordă sfat genetic*, caracteristică definitorie a serviciilor de genetică;
- cuprind într-o structură integrată – clinică și de laborator – o *echipă multidisciplinară* de personal medical (geneticieni) și non-medical (psihologi, biologi, asistenți sociali, etc)

### 3. INDICAȚIILE CONSULTULUI GENETIC

În mod obișnuit, consultul genetic este solicitat de un pacient sau un cuplu, confrunțați cu o problemă de “genetică”.

- *Pacientul bolnav* – cu o afecțiune posibil genetică sau cu o anomalie congenitală – solicită diagnostic, îngrijire și/sau evaluarea riscului de recurență la descendenți.
- *Pacient sănătos*, dar cu risc genetic crescut (are o rudă apropiată afectată) – dorește să știe dacă “va face” boala (diagnostic pre-simptomatic) sau dacă va transmite o genă mutantă la urmași; mult mai rar el solicită un sfat premarital, determinat de o viitoare uniune consanguină (de regulă veri).
- *Cuplu sănătos* – poate solicita diagnostic și sfat genetic:
  - *preconcepțional* – în situația unor rudeafectate, când vârstă maternă depășește 35 de ani, există tulburări de reproducere (infertilitate) sau consanguinitate.
  - *prenatal* – în cazul unor antecedente familiale pozitive, după expunerea la teratogeni sau după identificarea unor semne ecografice de alarmă;
  - *postnatal* – după nașterea unui copil afectat (anomalii congenitale) sau atunci când la un copil apar tulburări de creștere sau dezvoltare psihomotorie, boli metabolice, tulburări pubertare);

### 4. PRINCIPIILE DE BAZĂ ALE CONSULTULUI GENETIC

Complexitatea consultului genetic impune aplicarea unor principii de acțiune. Pe baza experienței dobândite în acest domeniu propunem următorul „decalog”:

(1) *Evaluarea pacientului și familiei sale se va face metodic, în etape sau trepte succesive de acțiune*, fiecare cu obiective și activități distincte. Avantajul acestui „mod de lucru” – valabil pentru *orice medic* confruntat cu patologia genetică și malformativă – este reprezentat nu numai de coerență și finalitate, ci mai ales de faptul că permite obținerea celor mai bune rezultate medicale și psihologice în condițiile proprii examinatorului.

(2) *Examenul clinic este decisiv*, chiar în condițiile medicinei moderne dominată de tehnologii sofisticate și performante; „întoarcerea” la genetica clinică este absolut necesară deoarece „...fără fenotip nu poate exista un genotip iar fără clinică nu există fenotip”.

(3) O atenție egală se va acorda și *anamnezei personale și, mai ales, anamnezei familiale* – care furnizează informații prețioase pentru diagnosticul și managementul pacientului și familiei sale. Succesul acestei acțiuni va depinde de tehnica și perseverența medicului (care trebuie să

se convingă de veridicitatea faptelor), precum și de timpul alocat (*carența factorului T – timp – este una din „bolile profesionale” ale medicului actual*).

(4) Începând de la primul contact cu pacientul și familia sa și apoi în toate etapele diagnosticului, *procesul de evaluare va fi dublat și de un sprijin psihologic, atent și constant*. Medicul va trebui să susțină și să încurajeze permanent familia pacientului, confruntată acut cu o situație dramatică.

(5) În aceste condiții, se va acorda o atenție specială și un timp adecvat *procesului de comunicare*, care va fi simplu și clar, adaptat fiecărei etape de acțiune (explicând ce se face și de ce) și nivelului de percepție al pacientului/părinților, plin de înțelegere și simpatie. Chiar dacă nu putem face multe pentru consultanți în mod sigur putem să le alinăm suferința.

(6) *Problemele geneticii clinice se abordează și se rezolvă „în echipă”, în sensul larg al cuvântului, fapt ce presupune colaborări eficiente cu alți colegi, din diferite specialități clinice și paraclinice, consultarea altor specialiști în genetică medicală pentru verificarea și validarea concluziilor*. Să nu uităm că diagnosticul genetic este „pus pentru o viață” și consecințele sale sunt imense.

(7) Medicul genetician reprezintă *punctul de convergență* al tuturor datelor despre consultanți, obținute în etape succesive, din surse variate. Acest lucru impune *adunarea, ordonarea și interpretarea datelor* sau, cu alte cuvinte, *un stil special de lucru*, ce trebuie dublat de *răbdare și prudență*, pentru a evita concluzii și diagnostice pripite, până ce faptele nu vor fi bine stabilite și documentate. Este mai bine să nu greșim decât să punem un diagnostic „cu orice preț”

(8) Arta diagnosticului genetic se bazează pe un *un fond solid și complet de cunoștințe „bazale”, reprezentat de cunoașterea morfologiei și înțelegerii morfogenezei normale și anormale, precum și a principiilor de genetică umană și medicală; acest fond de cunoștințe catalizează un diagnostic deoarece permite „ochilor minții” să se îndrepte spre elemente ce altfel ar putea fi omise*. Cu timpul se va adăuga o experiență necesară dar *actualizarea permanentă a cunoștințelor* rămâne obligatorie.

(9) Este cert că nimeni nu poate ști totul în genetica clinică iar pentru „începători” numărul mare de entități genetice este foarte descurajant; în aceste condiții *biblioteca, computerul și Internetul* sunt soluțiile salvatoare. Geneticianul trebuie obligatoriu să stăpânească accesul *online* la informații și baze de date.

(10) NU este posibil totdeauna un diagnostic clinic și genetic dar – după principiul „nu ai reușit, continuă” – medicul genetician trebuie să aibă abilitatea de a fi *răbdător și tenace*, atunci când nu a reușit un diagnostic specific și precis. De aceea, *urmărirea în timp a bolnavului și familiei sale va aduce cu siguranță beneficii diagnostice și de îngrijire*.

## 5. ETAPELE CONSULTULUI GENETIC

Așa cum am precizat, evaluarea pacientului și familiei sale se va face metodic, *în etape sau trepte succesive de acțiune (figura 9.1)*, fiecare cu obiective și activități distincte:

- Evaluarea inițială a bolnavului (anamneză, examen fizic);
- Alte examene clinice și explorări paraclinice;
- Analiza și interpretarea datelor;
- Explorări genetice;
- Finalizarea consultului genetic;
- Comunicarea concluziilor;
- Urmărirea evoluției bolnavului;
- Contactarea rudelor cu risc genetic crescut

În toate etapele, procesul de evaluare va fi dublat și de un *sprijin psihologic* corespunzător.

### 5.1. CONTACTUL INIȚIAL CU BOLNAVUL

Primul contact cu bolnavul, deseori copil însoțit de cineva din familie, este important pentru a stabili o atmosferă de încredere și cooperare. De obicei se începe cu întrebările clasice prin care se stabilește „*motivul consultației*” și problemele majore care frământă pacientul sau familia sa. Stabilirea „obiectivului” consultației va concentra atenția medicului asupra anumitor probleme și va permite și stabilirea „nivelului de anxietate” al consultanților.

Perioadă inițială „de acomodare reciprocă” (uneori foarte necesară) poate fi prelungită prin *analiza documentelor medicale* existente din care important este să se identifice elementele obiective. Urmează apoi anamneza detaliată și examenul fizic, minuțios și complet.

## 5.2. ANAMNEZA

Anamneza se desfășoară pe două direcții majore: anamneza personală și familială.

**a. Anamneza medicală personală** vizează toate etapele vieții individului și, evident, istoricul bolii. Desigur, vârsta pacientului și tipul de patologie vor influența *secvența și ponderea informațiilor*. Schematic, putem deosebi:

(1) *Anamneza gestațională* – care se va referi la concepție, evoluția sarcinii și naștere.

- *Concepția* – antecedentele reproductive și vârsta părinților, eventualele lor boli conice (diabet zaharat, epilepsie ș.a), grupele sanguine, data debutului sarcinii;
- *Evoluția sarcinii* – boli și expuneri teratogene în trimestrul I, apariția și evoluția mișcărilor fetale, cantitatea de lichid amniotic și datele ecografice;
- *Nașterea* – vârsta gestațională, durata travaliului, prezentația, anomalii ale lichidului amniotic, cordonului ombilical și placentei, scorul APGAR/reanimarea nou-născutului, datele morfologice (greutate, talie, perimetru cranian).

Din analiza acestor date se pot reține o serie de „semnale de alarmă”, utile în analizele ulterioare (vezi secțiunea A.5.5).

(2) *Anamneza neonatală* este la fel de importantă deoarece dificultățile în „adaptarea copilului la viața extrauterină” sau o serie de manifestări anormale pot semnala malformații și/sau malfuncții congenitale. Dintre acestea menționăm: crize de apnee, dificultăți de sugere, vărsături, hipotonie, convulsii, cianoză, icter prelungit.

(3) *Anamneza postnatală* – vizează evaluarea creșterii, a dezvoltării psihomotorii și sociale (achiziții motorii, comportament, limbaj, performanțe etc), bolile copilăriei și – atunci când este cazul – ale dezvoltării pubertare.

(4) *Istoricul bolii pacientului*: momentul debutului, manifestări, evaluări clinice și paraclinice, îngrijiri medicale etc. Dar, atenție, ar fi o mare greșeală să ne limităm la anumite elemente; trebuie puse întrebări specifice despre funcționarea tuturor organelor („*revista sistemelor*”) pentru identificarea unor elemente corelate cu boala de bază.

### **b. Anamneza familială.**

(1) *Definiții, importanță, condiții.*

Anamneza familială reprezintă, în esență, o sumă de informații despre relațiile biologice și sociale/legale, despre starea fizică și mentală a indivizilor familiei precum și despre funcția lor reproductivă. Aceste informații se înregistrează și se reprezintă grafic într-o formă standardizată denumită **arbore genealogic** (în engleză, *pedigree*).

Orice manual de semeiologie subliniază utilitatea istoricului familial *directionat* (antecedentelor familiale sau „heredo-colaterale”) ca etapă primară a evaluării bolnavului și orice Foaie de observație folosită în clinică are o secțiune distinctă pentru acest istoric. Deseori această acțiune este „expediată” prin câteva întrebări banale și în rubrica corespunzătoare se scrie „nimic de semnalat”. Această atitudine reflectă grabă, superficialitate sau, poate, o minimalizare a problemei; un celebru profesor de semeiologie spunea „*a nu reuși să iei un istoric familial corect este o practică medicală rea, care uneori poate fi o neglijență criminală*” (Child, 1882). Într-adevăr, anamneza familială poate furniza informații decisive pentru: diagnosticul medical; decizia strategiilor de testare; stabilirea modului de transmitere; determinarea riscului de recurență; identificarea persoanelor cu risc genetic crescut, etc

Datorită importanței sale, anamneza familială necesită o *tehnică* perfectă (inclusiv în realizarea unei bune colaborări cu familia pacientului), *acuratețe, timp și eficiență*. Aceste

rațiuni ne determină să prezentăm pe larg metodologia anamnezei familiale și construirii unui arbore genealogic. Vom face însă, mai întâi, câteva precizări generale.

- Realizarea unui istoric familial se face de obicei de către medicul consultant printr-un *intervi*u „față în față” (cu pacientul sau părinții săi, dacă este copil), într-o ambianță confortabilă, fără elemente perturbatoare, și care să asigure confidențialitatea relatărilor.
- Arborele genealogic începe de obicei cu individul care solicită consultația genetică (pentru evaluare, sfat sau testare genetică) și care poate fi sau nu afectat; el se numește **consultand**. Pentru prima persoană bolnavă care aduce familia în atenția medicală se folosește termenul de **proband** (denumit și *propositus* sau *caz index*, mai ales în lucrări științifice). Deseori consultandul și probandul sunt aceeași persoană, dar în familie pot fi mai mulți consultanți.
- Efectuarea arborelui genealogic este o componentă a evaluării medicale, ce devine document medical; de aceea se va face cu cerneală<sup>2</sup> permanentă, pe o hârtie „oficială” și într-o formă standard (de obicei A4, în lung, cu antet).

În antet se va preciza obligatoriu: serviciul, numărul Fișei de consult genetic, data, numele și prenumele consultandului / probandului, numele persoanei care relatează datele și al examinatorului, motivația consultului, eventual etnia și existența consanguinității precum și legenda simbolurilor particulare sau abrevierilor.

Vom sublinia foarte clar că realizarea unei reprezentări corecte, precise și ușor de interpretat este nu numai o obligație ci și o probă de profesionalism.

- Istoricul familial are o mare încărcătură psihologică și emoțională deoarece medicul „pătrunde” în esența vieții individului și familiei, a relațiilor lor intime, ce reflectă *o istorie umană unică*. Medicul trebuie să fie prudent, politicoș, sensibil la unele aspecte culturale, etnice, religioase sau socio-economice, foarte atent la credințe și obiceiuri. Obținerea informațiilor despre istoricul familial reprezintă însă o excelentă oportunitate pentru examinator de a stabili *o relație de încredere* cu pacientul și/sau familia sa, de a face *observații psihologice* utile privind consultanții: interacțiunea dintre cuplu și familie, nivelul de stress al persoanelor, ideile și miturile lor privind cauzalitatea bolii, sentimentul de vinovăție, timiditate etc. Multe răspunsuri și reacții vor depinde de limbajul folosit și calitatea întrebărilor.

(2) Simboluri și informații standard folosite în realizarea arborelui genealogic.

Pentru construcția arborelui genealogic se vor folosi simboluri și abrevieri standardizate (figurile 9.2 și 9.3).

- Un bărbat este desenat printr-un *pătrat* și, dacă este posibil, se va plasa la stânga unei parteneri, o femeie desenată printr-un *cerc*. Probandul și consultandul vor fi obligatoriu identificați printr-o *săgeată*, însoțită de litera P pentru proband (figura 9.2).
- Relațiile dintre indivizii familiei se marchează prin patru tipuri de linii (figura 9.3): *linia de legătură* unește doi parteneri; dacă s-a produs separarea lor, linia de legătură se va întrerupe cu două liniuțe oblice, iar dacă partenerii sunt înrudiți se va desena o linie dublă. *Linia descendenței* merge vertical (sau oblic, dacă nu avem spațiu suficient) până la *linia orizontală a fratriciei*, din care se desprinde – pentru fiecare frate-soră – *linia individului*. Simbolurile pentru membrii din fiecare generație se desenează pe același rând, iar în frătrie de obicei în ordinea nașterii. Uneori, datele despre copiii sănătoși se pot reda sintetic, printr-un *număr* (echivalent cu numărul de frați sau numărul de surori) plasat în interiorul simbolului de sex masculin sau feminin (figura 9.4).
- O sarcină în curs de evoluție este simbolizată printr-un pătrat sau cerc, dacă se cunoaște sexul, sau un *romb* (sex necunoscut) în care se scrie litera S (de la sarcină: unii preferă litera P de la *pregnancy*); sarcinile care nu evoluează la termen (avort spontan sau întrerupere) – sunt reprezentate printr-un *triunghi* (sub care se scrie sexul, dacă se cunoaște) iar linia individului va fi mai *scurtă*. În figura 9.3 sunt prezentate semnele pentru gemeni și copii adoptați sau plasați în adopție.
- Fiecare persoană afectată se va reda printr-un *simbol hașurat*; dacă sunt mai multe afecțiuni simbolul va fi împărțit în *sectoare*, fiecare reprezentând o boală (figura 9.4); același sistem se folosește și pentru afecțiunile cu expresivitate variabilă dar, în acest caz, fiecare sector va corespunde unei manifestări clinice majore; în ambele cazuri semnificația fiecărui cadran se va menționa în legendă.

---

<sup>2</sup> Unii preferă creionul și radiera pentru corecțiile ce pot apărea în cursul relatării; în această variantă, la final se va redesena arborele genealogic în cerneală, cu atenție pentru a nu omite date.

- O linie diagonală ce trece printr-un simbol (pătrat, cerc, romb, triunghi) semnifică faptul că individul respectiv a *decedat*.
- Chiar dacă se folosesc simboluri standardizate este obligatoriu să se includă, pe foaia cu arborele genealogic, o *legendă* care va cuprinde informațiile necesare interpretării.

Arborele genealogic va cuprinde de asemenea o serie de *informații standard* despre persoanele incluse, notate clar, complet sau abreviat (**tabelul 9.1**). Dacă informațiile nu sunt certe este preferabil să se pună tilda ~ iar dacă nu se cunosc date despre istoricul familial al ascendenților sau descendenților se va pune semnul de întrebare (?).

**Tabelul 9.1 Informații incluse în arborele genealogic**

<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vârsta/data nașterii sau anul de naștere al pacientului și membrilor familiei sale</li> <li>- Vârsta la deces și cauza decesului (d); pentru nou-născuții morți (<b>nm</b>) se notează vârsta gestațională</li> <li>- Statusul pacientului: afectat /sănătos (definit în legendă, prin umbrirea simbolului)</li> <li>- Vârsta debutului bolii și/sau diagnosticului bolii.</li> <li>- Caz evaluat personal sau documentat medical (*)</li> <li>- Statusul testării (E – definit în legendă)</li> <li>- Informații relevante pentru sănătate (ex., talie, greutate)</li> <li>- Sarcină (S); se notează data UM sau VG (spt)</li> <li>- Complicațiile sarcinii: avort spontan (AVS), sarcină ectopică (<b>ECT</b>), întreruperea sarcinii (<b>TS</b>)</li> <li>- Inferilitate sau opțiune de a nu avea copii</li> <li>- Etnia bunicii</li> <li>- Consanguinitate</li> </ul>
--

### (3) Metodologia istoricului/anamnezei/familial(e)

Medicul genetician va începe anamneza familială explicând pe scurt pacientului și/sau părinților scopul și utilitatea informațiilor despre familie și garantând păstrarea confidențialității lor. Realizarea istoricului familial și construcția arborelui genealogic se va face „*pas cu pas*”; întrebările se pun *secvențial*, ghidând pacientul spre lucrurile relevante (prin întrebări directe și specifice) și desenând concomitent (pe o foaie standard) arborele genealogic, pe baza răspunsurilor.

Se va începe cu consultandul, marcând toate datele precizate mai sus. Dacă este un adult și are o parteneră aceasta se va trece pe arbore (ambii se plasează de obicei în centrul paginii). Urmează, în ordine cronologică rudele apropiate: copiii și/sau sarcinile, fratria, părinții și bunicii paterni și materni – înregistrându-i pe aceeași linie ce corespunde generației lor și stabilind orice factor adițional care ar putea avea consecințe asupra evaluării riscului. Dacă despre unii ascendenți sau descendenți nu sunt suficiente date se va pune în dreptul lor un semn de întrebare. Dacă este un copil se vor marca părinții și fratria, iar apoi rudele de gradul doi și trei. Pentru fiecare membru al familiei se întreabă despre starea de sănătate. Se notează dacă este „viu și sănătos” (de ex., V&S) sau bolnav; întrebările despre starea de boală pot fi mai generale sau țintite, fie pentru fiecare sistem de organe fie pentru anumite manifestări ale unei boli, atunci când există un diagnostic. Se va insista asupra: fondului etnic (țara de origine, naționalitatea familiei, religia), înrudirii /consanguinității și se va avea totdeauna în minte întotdeauna *posibilitatea non-paternității*, a unor parteneri multipli, a unor copii înfiați sau adoptați.

Este obligatorie *documentarea* fiecărui caz de boală (înregistrări medicale, rezultate de laborator, necropsie etc – obținute cu consimțământul scris al pacienților) și eventual *evaluarea* lui directă de către medicul consultant; toate datele vor fi trecute/anexate ordonat în fișa de consult. În aceste situații documentate, pentru a le deosebi de acelea relatate (din amintiri) de către consultand sau familie, cazul se va marca cu asterisc (\*). Evaluările clinice sau testele (de ex., CT/RMN, cariotip, teste moleculare) se notează cu litera **E** (de la evaluare); dacă s-au făcut mai multe evaluări acestea se vor nota cu **E<sub>1</sub>**, **E<sub>2</sub>**; se poate menționa rezultatul: normal ”–” sau anormal ”+” sau ”ns” (nesemnificativ/ noninformativ) (**figura 9.5**).

La încheierea interviului, medicul trebuie să-i dea „o șansă în plus” interlocutorului pentru relatarea unor situații particulare („... *există altceva despre care nu v-am întrebat și pe care Dv credeți că este important ca eu să știu?*”) și pentru cazurile de boală (mai ales în sindroame dismorfice, a căror manifestare se poate schimba în timp) va solicita consultarea „albumului de familie”, pentru a urmări evoluția fenotipului pacienților.

La finalizarea diagnosticului *se va reveni* asupra istoricului familial deoarece întrebările pot fi mai precis direcționate spre manifestările oligosimptomatice de boală. De asemenea cu ocazia evaluărilor ulterioare datele familiale obținute vor fi *reactualizate*.

#### (4) Interpretarea anamnezei familiale și analiza arborelui genealogic.

Anamneza familială poate fi:

- *pozitivă*<sup>3</sup> – atunci când sunt identificate și alte persoane afectate;
- *negativă dar informativă* – pacientul este singurul bolnav dar unele date sunt utile: vârsta părinților (a bunicului patern pentru bolile legate de X), existența consanguinității etc;
- *negativă și neinformativă* – fie prin lipsa cunoaștințelor despre familie, tehnică neadecvată, alte cauze (abateri de la paternitate, mutații noi sau fenocopii, boli recesive sau multifactoriale etc), fie pur și simplu pentru că pacientul este un caz sporadic.

Geneticianul trebuie să interpreteze cu grijă datele sintetizate în arborele genealogic al familiei pentru a stabili corect riscul de recurență și persoanele cu risc. Pentru aceasta va lua în calcul toate modalitățile de transmitere ereditară și va fi foarte atent la fenomenele de expresivitate variabilă, penetranță (inclusiv dependentă de vârstă) și heterogenitate genetică (descrise în detaliu în capitolul 5.D și E).

### 5.3 EXAMENUL FIZIC

Examenul fizic este decisiv în genetica medicală și dismorfologie deoarece reprezintă, împreună cu istoricul medical, „fundatia” unui diagnostic clinic corect și complet. El este prima probă a calificării unui clinician și necesită:

- *condiții optime* (pacient cooperant și relaxat, lumină și temperatură optimă, iar pentru copii – prezența mamei);
- *o tehnică impecabilă*, ce include o evaluare metodică și completă, atentă și minuțioasă;
- abilitatea de a fi un *observator priceput*; această abilitate se obține în timp, fiind atent la detalii și dezvoltând simțurile (aprecierea) mărimii, proporției, poziției și simetriei; dismorfologia este în principal o *specialitate vizuală*;
- *un fond de cunoștințe „bazale”*, reprezentat de cunoașterea morfologiei și înțelegerea morfogenezei normale și anormale.

Evaluarea genetică medicală se bazează pe examinarea fizică standard, a copilului sau adultului (Bates, 1983), dar conține anumite elemente particulare, generate de prezența dismorfiilor, produse de tulburări ale procesului de morfogeneză.

#### **a. Examinarea generală**

Componentele de bază ale examinării fizice generale ale unui bolnav sunt:

- evaluarea semnelor vitale (frecvență cardiacă, respiratorie, presiune arterială);
- determinarea parametrilor de creștere (talie, greutate, perimetru cranian), habitusul general al corpului și proporțiile sale;
- evaluarea generală a stării de sănătate și statusului nutrițional;
- examinarea metodică a sistemelor și structurilor anatomice; ordinea examinării poate varia în funcție de vârsta pacientului și acuzele principale dar esențial este ca examenul să fie complet.

#### **b. Examenul dismorfologic**

Are ca obiectiv recunoașterea *formelor anormale* (dismorfii) și deci identificarea unor anomalii minore, ce pot realiza un *model* caracteristic.

Uneori **diagnosticul este instantaneu**<sup>4</sup> deoarece multe sindroame au un *aspect (facial) stereotip*, care permite o recunoaștere rapidă, un diagnostic vizual și mental imediat (de exemplu: sindromul Down, acondroplazia, s.a.).

---

<sup>3</sup> Termenii de „anamneză pozitivă” și „anamneză negativă” au de fapt o semnificație inversă, ce poate deruta uneori pacientul. Ar fi de preferat evitarea celor două adjective, eventual printr-o perifrază.

<sup>4</sup> Pentru diagnosticul instantaneu al unor sindroame se folosește, pe toate meridianele, un cuvânt derivat din germană – *gestalt*.

Acest tip de diagnostic se bazează pe abilitatea naturală a omului de a fixa imaginile (în special cele faciale) în memorie și de a le evoca (aminti) când este necesară o comparare și recunoaștere. Dismorfologii nu fac de obicei eforturi speciale de memorizare vizuală ci mai curând *descompun* imaginile pacientului în elemente fizice individuale și apoi *le recompun* într-un model unic, specific unui sindrom. Pentru medicul practician nu este utilă memorarea sutelor de sindroame ci în special cunoașterea unor semne evocatoare pentru unele dintre ele și apoi folosirea atlaselor (Jones, 1997; Gorlin et al, 2000; ș.a) sau bazelor de date (POSSUM, LDDDB)

Recunoașterea instantanee necesită o experiență dobândită în timp și poate duce frecvent la erori fie din cauza manifestării variabile a sindroamelor, fie datorită tentației de a pune un diagnostic rapid (înainte de a se finaliza o evaluare completă a pacientului sau ignorând unele elemente clinice semnificative).

De cele mai multe ori **diagnostic este analitic**, batându-se pe o *evaluare clinică completă și minuțioasă*. Se vor observa cu atenție și se vor descrie corect (cu termenii specifici ai semeiologiei malformative) *forma, mărimea, proporțiile, poziția, conturul, pliurile, spațierea, simetria* – tuturor elementelor anatomice (a căror morfologie normală, cu variantele descrise, trebuie bine cunoscută). O atenție deosebită se va acorda anomaliilor minore – modificări subtile ale unor structuri. Inspecția loco-regională a *structurilor de suprafață* se va completa cu palparea lor și cu o serie de manevre active.

Evaluarea va fi *calitativă* (absent/prezent-detalii) și/sau *cantitativă* pentru structurile ce pot fi *măsurate obiectiv* (cu tehnici corecte și instrumente adecvate) pentru a constata (prin comparație cu *standardele de vârstă și sex*) o deviere semnificativă ( $> \pm 2DS$ ) de la normal. Vom preciza totuși că nici un set de măsurători nu va înlocui gândirea clinică în determinarea prezenței și semnificației variațiilor morfologice.

Un mijloc prețios de obiectivare și comparare este *fotografia clinică* de foarte bună calitate (digitală dacă se poate), precum și înregistrarea video, obligatorii pentru dismorfologi; imaginile sunt mai bune decât orice descriere detaliată.

O situație particulară o reprezintă *examenul fizic al nou-născutului mort*.

În acest caz se vor parcurge următoarele etape: stabilirea vârstei gestaționale; măsurarea taliei, greutateii, perimetrului cranian; examinarea fătusului, a cordonului ombilical (posibilitatea existenței unei artere ombilicale unice) și a placentei (mare, mică, prezența altor modificări); fotografierea generală și pe segmente; efectuarea unei radiografii a întregului corp (*bebigramă*); necropsia sistematică și atentă efectuată de către un fetopatolog; puncția cardiacă (permite prelevarea unei cantități de sânge) sau biopsia cutanată, în vederea efectuării unui cariotip (având în vedere că 20% din cazuri sunt datorate unor boli produse de anomalii cromosomice) sau a unor analize ADN.

### c. Înregistrarea și sinteza datelor; planul de investigații.

În finalul evaluării, datele obținute se vor înregistra corect, cu multă grijă, într-o „Fișă de consult genetic” – cu o structură standard care să faciliteze culegerea și descrierea lor; pentru începători (și nu numai) este utilă o *listă de semne* pe segmente și regiuni sau o listă de semne pentru unele sindroame frecvente. Anomaliile vor fi *descrise precis* (folosind termenii dismorfologiei<sup>5</sup>) și se va menționa clar care dintre elemente sunt *certe sau probabile*,

Indiferent de modul de abordare al pacientului – instantaneu (*gestalt*) sau analitic – se va face o *sinteză primară a datelor obținute*, stabilind care sunt anomaliile majore și minore, certe și probabile, precum și distribuția lor pe segmente și/sau regiuni ale corpului. Pe această bază se vor formula mai multe *opțiuni posibile de diagnostic*. Acest lucru este necesar pentru a se va întocmi un *plan individual* de examene clinice de specialitate și explorări paraclinice, care să valideze și nuanțeze elementele identificate la examenul fizic și să permită o diferențiere între opțiunile diagnostice.

### d. Informarea părinților.

La toate activitățile consultației inițiale (anamneză, examen fizic) se vor adăuga obligatoriu acțiuni de *susținere psihologică* și sfat medical a părinților/ cuplului/ bolnavului (figura 9.1). Nu trebuie să uităm că ei traversează o criză psihologică și de aceea chiar de la acest

---

<sup>5</sup> Fiecare specialitate are „un limbaj” propriu care permite comunicarea dintre specialiști și compararea cu datele literaturii de specialitate



prim contact ar trebui să se înceapă procesul de consiliere, care va evolua și se va dezvolta o dată cu acțiunile de diagnostic și îngrijire a bolnavului.

La sfârșitul evaluării medicul trebuie să prezinte – într-o formă simplă și accesibilă – o schiță a problemelor identificate (anomalii, semne, simptome) și un plan de evaluare medicală și îngrijire (management), fără un diagnostic detaliat sau informații despre riscul de recurență. Este adevărat că părinții sunt nerăbdători dar trebuie explicat, cu prudență și delicatețe că diagnosticul nu este de obicei o urgență și cere timp; din aceste motive se recomandă un “diagnostic preliminar” cu descrierea anomaliilor și o opinie rezervată asupra diagnosticului final. Chiar dacă procesul de diagnostic nu s-a încheiat este bine ca medicul consultant să *informeze și în scris* asupra rezultatelor evaluării – pacientul/ părinții săi, precum și medicul care a trimis cazul.

#### 5.4 ALTE EXAMENE CLINICE ȘI EXPLORĂRI PARACLINICE.

Datele obținute prin anamneză și examen clinic trebuie *validate și confirmate* prin expertiza altor medici specialiști (colaboratori „antrenați” în studiul patologiei genetice și malformative) și a unor explorări paraclinice.

Medicul genetician este, am mai spus acest lucru, *un soi de generalist* care, evident nu are priceperea unui specialist în evaluarea și explorarea completă a unui organ. De aceea el va solicita colaborarea altor specialiști și apoi va fi responsabil *de adunarea și integrarea unitară a tuturor datelor obținute de el*, prin anamneză și examen fizic, precum și ale acelor ce provin din alte evaluări clinice sau paraclinice

- Examenul clinic de specialitate vor fi „ghidate” printr-o *trimitere* ce va cuprinde elementele semnificative și, eventual, supozițiile de diagnostic, precizând – acolo unde este cazul – ce anume se urmărește.
- Testele funcționale hepatice, renale, hematologice, metabolice, echilibrul acido-bazic și electroliții etc, vor fi adecvate (țintite) modificărilor/ anomaliilor înregistrate.
- Evaluările radiografice, în special ale scheletului (vârstă osoasă, mărime craniu, lungime oase lungi, lungime oase mână etc), sunt necesare pentru diagnosticul displaziilor scheletice și sindroamelor cu anomalii congenitale osoase.
- Studiile imagistice speciale – ecografie, ecocardiografie Doppler, CT, RMN – vor fi bine motivate și „țintite” pe anumite organe. Trebuie să subliniem că imagistica (printr-o gamă largă de explorări) completează anatomia de suprafață a dismorfologului cu o *anatomie de profunzime* și este decisivă pentru anumite categorii de sindroame.

#### 5.5 ANALIZA ȘI INTERPRETAREA DATELOR

Analiza și interpretarea datelor anamnestice, clinice și paraclinice referitoare la un pacient sau cuplu care solicită un consult genetic este o *etapă esențială* deoarece orientează diagnosticul spre o anumită categorie de boli/sindroame genetice și spre una sau câteva entități. Acțiunea cere timp pentru ca medicul să *adune* datele, să le *valideze* (documenteze) și *ordoneze*, iar apoi, pe baza unei analize logice, să le *interpreteze*, să încerce să le explice și coreleze. Abordarea interpretativă – ca alternativă la abordarea instantanee (gestalt) și analitică – este o etapă de maturitate a unui sindromolog care trebuie să-și explice ceea ce el observă. Diagnosticul necesită nu numai informații ci și cunoștințe, capacitate de analiză și sinteză, experiență.

**a. Adunarea și ordonarea datelor** trebuie să se finalizeze cu stabilirea unor „*elemente de alarmă*” (tabelul 9.2) precum și a anomaliilor/simptomelor *certe și probabile*. Ele vor fi notificate pe o pagină distinctă a dosarului clinic al pacientului.

**Tabelul 9.2 Semne de alarmă pentru existența unor malformații congenitale și/sau sindroame plurimalformative**

Vârstă maternă avansată (pentru anomaliile cromosomice)	Retard sau accelerare de creștere postnatală
Vârsta paternă avansată (pentru mutații noi)	Creștere disproporționată (de ex., membre scurte)
Avorturi spontane repetate	Anomalii minore multiple
Anamneză familială semnificativă	Microcefalie



Prezența pelvină	Întârziere în dezvoltarea psihomotorie
Întârziere de creștere intrauterină	Hipotonie ± contracturi
Perturbarea creșterii intrauterine a capului (de ex., microcefalie, evaluată prin ecografie)	Laxitate țesut conjunctiv

**b. Interpretarea datelor** se va face prin prisma proceselor embriologice (timp de producere, tipuri și corelații între anomalii, mecanism de producere, ș.a) și a datelor genetice (categorii etiologice) – în mai multe etape, folosind eventual un algoritm de diagnostic

(1) Se va începe cu stabilirea precisă a existenței unei **anomalii congenitale izolate (unice)** sau a unor **anomalii multiple** (tabelul 9.3). Acțiunea este decisivă pentru diagnosticul final și depinde de *calitatea examenului fizic* (evidențierea și înregistrarea tuturor anomaliilor minore) precum și de *identificarea secvențelor* și a *defectelor de câmp de dezvoltare* – care deși se prezintă sub forma unor anomalii multiple reprezintă, din punct de vedere patogenetic, defecte unice (vezi capitolul 14).

Secvența reprezintă o singură anomalie inițială care determină secundar alte anomalii (de exemplu, în secvența Robin, hipoplazia mandibulei determină secundar despicătură palatină și glosoptoză). Defectul de câmp de dezvoltare se produce prin afectarea (de către cauze diferite) a unei singure unități embrionare („câmp”) din care rezultă structuri diferite, dar vecine (exemplu spectrul de anomalii al holoprosencefaliei); mulți autori consideră că *secvențele* și *defectele de câmp embrionar* reprezintă în fond același lucru.

**Tabelul 9.3. Categorii de anomalii congenitale**

Categorie	Subcategorie	Definiție	Exemple
<b>Defecte izolate</b>	Variante normale	Prezente la >4% din populație	Pete mongoliene
	Anomalii	Deviații de structură, formă și/sau funcție care sunt considerate anormale	
	Anomalii majore	Anomalii cu consecințe medicale, chirurgicale sau cosmetice	Despicătură palatină
	Anomalii minore	Efect minim asupra sănătății individului; utile în diagnostic	Urechi jos plasate
	Malformații	Defecte morfologice produse printr-un proces primar și intrinsec de dezvoltare anormală	Aplazie radială
	Displazii	Organizarea anormală a celulelor în țesuturi	Hemangioame
	Disrupții	Distrușterea extrinsecă a unei structuri normal formate	Bride amniotice
	Deformații	Formă sau poziție anormală a unei părți a corpului produsă prin forțe mecanice	Picior strâmb
	Secvențe	O combinație de anomalii ce derivă dintr-o singură anomalie inițială sau este produsă de factori mecanici	Secvența malformativă Pierre Robin Secvența deformativă Potter
Defecte de câmp de dezvoltare	O unitate de morfogeneză (un set de primordii embrionare) ce reacționează identic la cauze diferite, producând mai multe anomalii.	Spectrum holoprosencefalie	
<b>Defecte multiple</b>	Sindrom	Anomalii multiple considerate a fi etiopatogenic corelate și care nu reprezintă o secvență	Sindrom Down Sindrom Marfan Sindrom Zellwegwer
	Asociație	Întâlnirea neîntâmplătoare la unul sau mai mulți indivizi a mai multor malformații ce nu sunt identificate ca fiind o secvență sau un sindrom	Asociația VA(C)TER(L)

(2) **Anomaliile congenitale izolate** trebuie diferențiate în *anomalii majore* și *anomalii minore* (fără semnificație medicală sau cosmetică) iar acestea din urmă trebuie deosebite de *variantele familiale*. De precizat că :

- *anomaliile majore* nu sunt mai importante pentru diagnostic decât cele minore; ele sunt doar mai evidente și mai grave, atrăgând mai rapid atenția medicului;
- *anomaliile minore* (ce trebuie bine cunoscute și căutate) pot semnala existența unei anomalii majore neidentificate și pot constitui repere prețioase pentru diagnostic.

(3) **Anomaliile majore izolate** vor fi *clasificate patogenic* în anomalii primare (malformații și displazii) sau secundare (disrupții și deformații):

- **anomaliile primare** sunt produse precoce (embriopatii) printr-un proces primar și intrinsec de dezvoltare anormală: în primul caz al unor componente anatomice (ex.: *anencefalia, polidactilia, agenezia renală, ș.a.*) și în al doilea caz al țesuturilor din care sunt formate (ex.: *osteo-condro-displazii*);
- **anomaliile secundare** – se produc *tardiv* (fetopatii), pe structuri *normal formate*, care sunt deformatate (ex. *piciorul strâmb*) sau distruse (ex.: *atrezia intestinală sau amputațiile congenitale*).

Includerea unei anomalii congenitale majore în una din cele patru categorii are valoare prognostică și pentru stabilirea riscului de recurență. Dificultatea majoră este reprezentată de faptul că un anumit tip de anomalie poate fi produs prin mecanisme diferite și poate fi heterogen cauzale (vezi capitolul 14).

(4) **Anomaliile congenitale multiple** (majore și/sau minore) pun cele mai dificile probleme de diagnostic deoarece ele pot forma *sindroame specifice, asociații sau combinații întâmplătoare* de anomalii congenitale care individual sunt frecvente. Pentru a stabili un diagnostic de grup sau de tip sunt utile o serie de acțiuni „interpretative”.

- Stabilirea *momentului ontogenetic de producere* (debutul) a anomaliilor prezente la pacient permite (printr-o serie de date anamnestice sau fizice) să deosebim *defectele prenatale* (prin erori de morfogeneză), de cele *perinatale sau postnatale*.
  - *Defectele prenatale* se pot produce fie în perioada de blastogeneză (2-4 săptămâni după fecundare) când afectează întregul embrion, producând malformații majore multiple (ex.: *VACTERL*) fie în primele 5-8 săptămâni, când afectează numai anumite organe – în funcție de orarul lor embriologic – și produc malformații majore izolate. După săptămâna 9, majoritatea regiunilor și organelor s-au format, este alterată *reglarea fină* a edificării structurilor embrionare și apar *anomalii minore*.
  - *Defectele perinatale* se produc spre sfârșitul sarcinii, în cursul travaliului/nașterii sau postpartum, prin *alterări hipoxice* care se însoțesc *secundar* de microcefalie, contracturi, deficiențe de creștere, hipertrichoza.
  - *Defectele postnatale* apar la un *copil născut normal conformat*, la o anumită perioadă după naștere, ca urmare a unor evenimente acute sau cronice care schimbă morfologia și alterează progresiv statusul neurologic și diferite organe (ex.: *mucopolizaharidozele*). De subliniat că în multe sindroame (mai ales displazice) unele componente definitorii pentru diagnostic apar *la perioade diferite de viață* (de ex.: *sdr. Bardet-Biedl, NF-1, sdr. Marfan*)
- Determinarea *distribuției anatomice* a anomaliilor multiple permite orientarea spre anumite diagnostice (de exemplu, sindroamele oto-palato-digital, velo-cardio-facial, oro-facio-digital etc) și permite căutarea lor în bazele de date informatizate sau atlase.
- Identificarea unor *modificări clinice* ce pot evoca existența unor sindroame:
  - tulburări importante de creștere<sup>6</sup> (hipostatură, talie înaltă, obezitate precoce), cu debut prenatal și/sau postnatal, proporționate sau asimetrice;
  - întârziere în dezvoltarea psihomotorie sau retard mintal<sup>10</sup> asociată sau nu cu alte fenomene neurologice (spasticitate) sau psihice (autism);
  - hipotonie și/sau contracturi (artrogripoză) de cauze neurologice (centrale sau periferice), musculare, poziționale (prin oligohidramnios); *secvența de akinezie fetală* este relativ frecventă;
  - afectare scheletică, viscerală, senzorială, gonadală;
  - laxitatea (articulară, cutanată) sau reducerea (sclere albastre) a țesutului conjunctiv.
- Stabilirea *relațiilor etiopatogenice* dintre anomalii congenitale multiple și încadrarea lor într-un sindrom sau asociație (vezi tabelul 9.3 și capitolul 14).
  - Un *sindrom dismorfic* sau plurimalformativ este o combinație caracteristică de anomalii congenitale majore și minore observate împreună, într-un mod predictibil, la mai mulți pacienți în familii diferite și, uneori, în aceeași familie; ele au foarte probabil o cauză sau un mecanism comun de producere (pe această bază se deosebesc: sindroame cromosomice, necromosomice sau teratogene). Elementele componente sunt

---

<sup>6</sup> Tulburările de creștere și dezvoltare au cauze multiple și totdeauna se va evalua atent posibilitatea unui determinism socio-economic și exogen (dobândit)

nespecifice (pot fi prezente și în alte sindroame și pot avea cauze diferite) și rareori una din anomalii duce la diagnostic; combinația este unică și nu părțile sale.

- *Asociațiile* sunt combinații neîntâmplătoare ale mai multor malformații majore, care nu au o cauză comună evidentă care să ducă al un model predictibil; exemple: *VACTERL*, *CHARGE* sau *MURCS*. Spre deosebire de sindroame, asociațiile nu includ anomalii minore și prezintă o mare variabilitate clinică: diagnosticul se afirmă ori de câte ori găsim la un pacient cel puțin 2-3 din elementele componente.

**(5) Incadrarea bolnavului într-o categorie diagnostică** este rezultanta acțiunilor de analiză și interpretare a datelor pacientului (vezi tabelul 9.3). Așa cum am precizat, problemele sunt dificile în cazul unor anomalii multiple, deseori minore, asociate cu tulburări de creștere și dezvoltare. Pentru a se ajunge la opțiuni adecvate de *diagnostic specific* se vor folosi *algoritmuri* (Caseta 9.1) și *chei de diagnostic*, atlase de sindroame, precum și bazele de date accesibile pe CD (POSSUM, LDDb) sau prin Internet (Orphanet, GeneClinic, OMIM).

Pe baza datelor și cunoștințelor dobândite se încadra cazul într-o anumită categorie, în funcție de care se vor stabili testele genetice necesare:

- boală genetică, sindrom, asociație;
- sindrom malformativ, disruptiv, deformativ sau displazie;
- sindrom cromosomic, monogenic (Mendelian), poligenic, teratogen, de cauză necunoscută;
- subgrup particular de sindroame malformative caracterizat printr-un element major: sindroame cu hipostatură sau talie înaltă, sindroame cu obezitate, sindroame cu contracturi sau cu laxitate articulară, sindroame cu despicături palatine, etc, displazii scheletice

## 5.6 EXPLORĂRI (TESTE) GENETICE

O valoare deosebită pentru diagnosticul final o au, desigur, **testele genetice** – analize cromosomice (prin tehnici cu marcaj sau FISH), probe biochimice și teste bazate pe studiul ADN. Acestea pot fi planificate după examenul fizic al pacientului sau mai bine după ce s-au adunat toate datele și se stabilesc elementele ce pledează pentru o boală cromosomică, o boală metabolică sau o boală monogenică.

Ținând cont de caracterul „decisiv” al acestor teste trebuie să subliniem că laboratoarele care le realizează trebuie să fie acreditate, să folosească tehnici standardizate și să fie incluse într-un control extern de calitate.

Medicul consultant, care planifică și solicită teste de laborator, în special genetice, trebuie:

- să cunoască bine *indicațiile și limitele* testelor; vom preciza că nu sunt teste pentru fiecare boală sau sindrom plurimalformativ (și în acest caz clinica este „suverană”) precum și faptul că fiecare metodă are limitele ei;
- să știe ce *produs biologic* trebuie să recolteze, modalitatea de *obținere și stocare*, modul și mijloacele de *trimitere* la laborator;
- să obțină un *consimțământ informat scris* al pacientului/părinților, în deosebi pentru testele pre-simptomatice (și în special la copii) sau prenatale (vezi capitolul 20);
- să asigure *confidențialitatea* rezultatelor și utilizarea lor numai cu acordul persoanei.

## 5.7. FINALIZAREA CONSULTULUI GENETIC

La finalul etapelor descrise mai sus medicul genetician va trebui: (1) să formuleze un diagnostic specific și un prognostic; (2) să întocmească un plan de urmărire/îngrijire a bolnavului (ce va include și posibilitățile de recuperare, prevenirea complicațiilor) și (3) să stabilească riscul genetic de recurență, precum și eventualele opțiuni reproductive ce ar putea evita acest risc.

**CASETA 9.1****ALGORITM DE DIAGNOSTIC  
ÎN ANOMALIILE CONGENITALE MULTIPLE**

(adaptat după Aase, 1992, Wilson, 2000)

**1). Pacientul are o anomalie structurală?**

- NU → *continuarea diagnosticului NON sindromologic !*
- DA

↓

**2). Sunt prezente anomalii multiple?**

- NU → anomalia izolată este majoră? NU → *liniștirea părinților !*
- DA DA → *terapie adecvată, sfat genetic (risc mic)*

↓

**3). Toate anomaliile sunt minore?**

- DA → se caută o malformație majoră ocultă → A fost găsită? NU → *liniștirea părinților !*

DA

- NU → **pacientul are ACM majore și minore** ←

**4). Sunt implicate mai multe țesuturi?**

- DA → se caută o displazie → *terapie adecvată, prognostic, sfat genetic*
- NU

↓

**5) Este o anomalie distructivă ?**

- DA → se caută etiologia teratogenă a disrupției → *Terapie, sfat genetic (risc mic)*
- NU

↓

**6). Există o deformare a oaselor și articulațiilor?**

- DA → **pacientul are o secvență sau un sindrom cu deformări** →  
→ A fost raportat oligohidramnios?
  - NU → au existat alte cauze de compresie intrauterină?
    - DA → Urmărire, sfat reproductiv, prognostic bun și risc de recurență mic
    - NU → este prezentă hipotonia?
      - DA → posibil o **artrogripoză neurologică sau miopatică** → consult neurologic
      - NU →
  - DA → există o anomalie reno-urinară?
    - DA → posibil o **secvență deformativă idiopatică** → liniștirea părinților, recuperare, urmărire.
    - NU → terapie de sprijin, sfat genetic.
- NU → **pacientul are malformații multiple ± deformări / disrupții**

↓

**7). Una din malformațiile primare produce secundar alte anomalii (secvență)?**

- DA → posibil o **secvență malformativă** → terapie adecvată, prognostic bun, sfat genetic
- NU

↓

**8). A fost recunoscut un sindrom dismorfic?**

- DA → ± confirmare de laborator → terapie adecvată, prognostic, sfat genetic
- NU

↓

**9). Analiza literaturii sau bazelor de date informatizate; se stabilesc 1-3 semne / anomalii „cardinale” (de obicei mai rare, ce pot fi definite mai specific) ce vor constitui „puncte de intrare”.**

↓

**10). A fost recunoscut un sindrom dismorfic?**

- DA → ± confirmare de laborator → terapie adecvată, prognostic, sfat genetic
- NU → **sfatul altor specialiști**

**Reevaluare periodică a pacientului.**

Acuratețea și precizia unui **diagnostic clinic și etiologic** sunt esențiale deoarece acesta nu este numai „o sentință pentru o viață” ci și un element care influențează hotărâtor o serie de decizii:

- *identificarea unor malformații oculte*, neevidente la evaluarea inițială; un diagnostic corect implică o căutare atentă a unor malformații viscerale asociate sindromului (de ex.: anomaliile renale în sindromul Turner sau sindromul velo-cardio-facial).
- *prognosticul*,
- *alegerea unor opțiuni terapeutice*, chirurgicale (dacă sunt posibile) sau medicale (ex.: extirparea gonadelor în sindromul Turner sau în disgenezia gonadică mixtă, când există o linie XY, sau corectarea hipoglicemiei în sindromul Beckwith-Wiedemann pentru a preveni convulsiile și alterarea creierului);
- *urmărirea atentă a pacientului* pentru evitarea unor complicații (ex.: evaluarea periodică ecocardiografică a diametrului inelului aortic la pacienții cu sindrom Marfan);
- *sfatul genetic* și riscul de recurență în familie,
- opțiunile reproductive, inclusiv diagnosticul prenatal.

Nu în ultimul rând, un diagnostic specific este benefic pentru liniștea pacienților și/sau familiei (care va înțelege și accepta mai ușor „handicapul genetic” și va dezvolta o atitudine realistă și pozitivă).

În fiecare caz și mai ales în sindroamele plurimalformative:

- *se va valida diagnosticul* comparând din nou datele bolnavului cu cele din literatură / bazele de date de specialitate (ambele obligatorii în dotarea unui dismorfolog), existând obligația de identificare mai întâi a prezenței caracterelor mai frecvente din sindrom și apoi a celor mai evidente (de exemplu: în sindromul Waardenburg: distopia cantusului intern vs meșă albă frontală).
- *se va stabili gradul de certitudine a diagnosticului* : 100% - cert, 99 – 80 % - probabil, 79 – 50 % - posibil, sub 49 % - imprecis; acest lucru este important deoarece diagnosticul va influența toate activitățile viitoare: teste, management, sfat genetic;

Cu toate eforturile specialiștilor, într-o proporție variabilă de cazuri (30-50%) nu se poate formula un diagnostic specific. Situația este delicată pentru medic și trebuie explicată clar și onest pacientului/familiei, oferindu-le două soluții:

- consultarea altor specialiști cărora să le fie trimis dosarul clinic și fotografiile pacientului;
- urmărirea și evaluarea la anumite intervale de timp; simptomatologia unor boli sau sindroame (cu expresivitate variabilă) se poate completa în timp.

Responsabilitățile medicului nu se încheie o dată cu finalizarea unui diagnostic. O acțiune la fel de importantă sau, poate, mai importantă pentru părinții unui copil afectat de o boală genetică sau un sindrom malformativ— este stabilirea unui **plan de îngrijire** a pacientului (inclusiv de educație) bazat pe manifestările bolii, ce trebuie influențate pozitiv, precum și pe evoluția ei (istoricul natural), pentru prevenirea unor complicații și stabilirea unor acțiuni în favoarea pacientului. Fiecare sindrom are o listă de complicații potențiale care formează baza unor ghiduri de management preventiv. Astfel de ghiduri „standardizate” sunt disponibile astăzi pentru cele mai frecvente boli și sindroame (vezi Cassidy și Allanson – „Management of genetic syndromes”, 1999).

O atenție specială și permanentă se va acorda **sprijinului psihologic și social** al familiei, prin intervenția unor asistenți sociali, grupuri de sprijin (asociații ale părinților copiilor bolnavi).

Ultima acțiune va fi **calcularea riscului de recurență** – în funcție de boală, datele familiale, etc – și identificarea, pe arborele genealogic, a persoanelor cu risc genetic crescut din familie, în vederea unui sfat genetic.

O dată încheiate aceste activități se va ordona și verifica **dosarul clinic** al pacientului, care va cuprinde: fișa de consult genetic (standard), arborele genealogic, fotografiile pacientului, sinteze ale altor evaluări clinice, buletine de analize de laborator, de radiologie sau anatomo-patologice, sinteza<sup>7</sup> cazului (epicriza), date medicale despre alți membri ai

---

<sup>7</sup> Sinteza de caz este nu numai foarte utilă ci și obligatorie; se va folosi metoda clasică, învățată în Facultate și denumită, în literatura engleză, **SOAP** în care **S** – înseamnă date subiective furnizate de consultant, **O** –

familiei, formele (semnate) de consimțământ pentru teste genetice/solicitări de informații medicale etc, copii ale scrisorilor către pacient/familie și către medicul de familie care trimite cazul. Importanța medicală, etică și legală a acestei documentații nu mai trebuie discutată dar vom preciza că ignorarea obligației sau „amânarea” ei din lipsa de timp (mai ales redactarea sintezei de caz/epicrizei și scrisorilor cu concluzii și recomandări către pacientul /familia consultat(ă) și medicul ce a trimis cazul) poate avea consecințe negative.

#### 5.8. COMUNICAREA CONCLUZIILOR.

Această etapă se adresează pacientului/consultandului și/sau părinților săi precum și medicului de familie sau celui care a trimis cazul. În primul caz, întrevăderea trebuie atent pregătită, revizuind datele, identificând problemele dificile și stabilind „un plan” de prezentare, care va include: diagnosticul de boală, caracteristicile bolii, istoria ei naturală, posibilitățile de recuperare și îngrijire, ereditatea și riscul de recurență, opțiunile reproductive, ș.a. De multe ori o singură „ședință” este insuficientă și ineficientă; de aceea comunicarea verbală se va însoți de o comunicare scrisă, materiale educaționale și invitația la alte discuții, cu medicul consultant sau cu un personal auxiliar („nurse” de genetică, asistenți sociali, psihologi) cu experiență în domeniu.

Informațiile transmise trebuie să fie precise, clare, cuprinzătoare, adaptate nivelului de înțelegere și percepție ale consultanților, precum și statusului lor cultural (religie, credințe). Trebuie respectate autonomia, confidențialitatea și, în cazul sfatului genetic, caracterul non-direcțional. O problemă delicată este comunicarea unor date altor membri ai familiei care, prin natura genetică a bolii, pot avea un risc crescut de a face sau transmite boala. Consultandul trebuie încurajat să facă el acest lucru sau să fie de acord (în scris) cu abordarea lor de către medicul genetician.

#### 5.9. URMĂRIREA EVOLUȚIEI PACIENȚILOR

Urmărirea efectivă și eficientă pe termen lung a pacienților și familiei este o acțiune necesară în toate cazurile dar mai ales atunci când diagnosticul trebuie confirmat sau stabilit. Sfaturile și îngrijirile acordate pacienților vor fi diferite la vârste diferite; cunoștințele despre bolile genetice evoluează progresiv și pot apărea noi teste sau posibilități de diagnostic; urmărirea în timp poate facilita profilaxia complicațiilor posibile.

#### 5.10 CONTACTAREA RUDELOR CU RISC GENETIC CRESCUT

Pe baza datelor familiale, cu acordul consultanților și sprijinul medicilor de familie rudele apropiate cu risc genetic vor fi evaluate (dacă acceptă acest lucru) pentru a se stabili dacă sunt sau nu purtători sănătoși de mutație. Acest diagnostic presimptomatic este important mai ales pentru bolile (autosomal dominante) care debutează clinic după 30-40 de ani.

\* \* \*

Indiscutabil, consultul și sfatul genetic sunt acțiuni complexe, dificil de realizat, ce necesită cunoștințe, aptitudini și atitudini dar și mult timp. Importanța lor decisivă pentru cursul vieții pacientului și familiei sale este o motivație puternică pentru un profesionalism desăvârșit.

## **B. EXPLORĂRILE GENETICE**

### **1. DIAGNOSTICUL CROMOSOMIC**

Analiza cromosomică reprezintă o metodă valoroasă de diagnostic în multiple situații clinice, prenatal sau postnatal. Medicul practician trebuie să cunoască indicațiile și limitele

---

reprezintă datele obiective identificate de medic; **A** (de la „assessment” - apreciere, evaluare) – conține succint concluziile diagnostice; **P** – planul recomandărilor terapeutice și acțiunilor viitoare.

metodelor citogenetice, modul de recoltare, procesare și trimitere la laborator a probelor utilizate pentru aceste teste, precum și interpretarea rezultatelor obținute de către laborator. În capitolul 2.D au fost prezentate datele relevante privind morfologia și studiul cromosomilor umani iar în capitolul 6.C s-au discutat anomaliile cromosomice și consecințele lor fenotipice. Aceste noțiuni sunt absolut necesare diagnosticului bolilor cromosomice (capitolul 10). În această secțiune ne vom referi la **indicațiile practice ale examenelor citogenetice**.

### 1.1 TESTUL CROMATINEI SEXUALE

Cromatina sexuală ne oferă informații privind *numărul cromosomilor sexuali* și, prin aceasta, date prețioase pentru stabilirea sexului genetic (XX sau XY) precum și a anomaliilor numerice (aneuploidiilor) gonosomice.

- Cromatina X rezultă prin inactivarea unui cromosom X la femeia XX, care prin heterocromatinizare va forma corpusculul Barr vizibil în nucleul interfazic (vezi capitolul 2.D.2.2). Numărul corpusculilor Barr este egal cu suma cromosomilor X minus 1; testul Barr va fi deci pozitiv la femeia normală și negativ la bărbatul normal.
- Cromatina Y reprezintă heterocromatina din cele 2/3 distale ale brațului lung al cromosomului Y, vizibilă la microscopul în fluorescență sub forma corpuscului F; numărul de corpusculi F este, firesc, egal cu numărul cromosomilor Y.

Testul cromatinei sexuale este simplu, ieftin și util în practică, în situații clinice bine definite. Un test anormal reprezintă o opțiune foarte serioasă pentru diagnostic, mai ales într-un context clinic sugestiv. Totuși, trebuie precizat că diagnosticul final va fi pus numai prin analiza cromosomică.

În practica curentă se folosește mai ales determinarea cromatinei X (testul Barr), realizată cu o metodă standardizată și o interpretare atentă și corectă. Un rezultat anormal (test Barr negativ la persoane feminine, test Barr pozitiv la persoane masculine sau prezența a doi corpusculi Barr) va fi confirmat prin repetarea testului și o evaluare independentă de către un alt examinator. O problemă delicată apare în cazul rezultatelor cert pozitive dar cu un procent mic de celule cromatin-X pozitive (sub 10-12 %); dacă se exclude un viciu tehnic și rezultatul persistă este necesară analiza cromosomică. O altă problemă delicată, dar mult mai rar întâlnită, este prezența unui corpuscul Barr de dimensiuni anormale, mai mic sau mai mare de 1,5 microni, care poate reflecta o anomalie de structură a cromosomului X: o deleție de X sau un isocromosom X. Testul cromatinei Y se folosește mult mai rar, fiind și mai laborios și necesitând o echipare cu microscopie în UV. În prezent, în laboratoarele modern utilizate, se folosește metoda FISH interfazic cu sonde pentru X și Y, care pune un diagnostic de certitudine, fără a fi necesară de obicei efectuarea cariotipului.

Testul cromatinei X se recomandă, în prezent, în două situații frecvente:

- o anomalie a organelor genitale externe (hipospadias ± testiculi necoborâți congenital, micropenis etc) sau o stare intersexuală evidentă; cromatina sexuală va permite stabilirea sexului genetic și încadrarea diagnostică a cazului.
- semne clinice care ar putea evoca fenotipul unor anomalii ale cromosomilor sexuali (în special 45,X sau 47,XXY) sau ale unor disgenezii gonadice:
  - la fete: hipostatură proporționată, gât scurt ± palmat, limfedem pe fața dorsală a picioarelor sau/și mâinilor; pubertate întârziată, caractere sexuale secundare reduse, amenoree primară sau secundară precoce;
  - la băieți: talie înaltă, pe seama membrelor inferioare; caractere sexuale secundare reduse; ginecomastie, testiculi mici.

Limitele testului cromatinei sexuale sunt reprezentate de caracterul echivoc al testului (spre exemplu un test Barr negativ la o persoană de sex feminin poate semnala fie un sindrom Turner – 45,X, fie un sindrom Morris – 46,XY, fie o disgenezie gonadică mixtă – 46,XY/45,X) și necesitatea efectuării cariotipului pentru a avea un diagnostic citogenetic cert.

### 1.2 ANALIZA CROMOSOMILOR UMANI

Studiul cromosomilor se efectuează postnatal – pentru diagnosticul anomaliilor constituționale sau dobândite (în unele neoplazii sau după expunerea la agenți clastogeni, ce rup cromosomii) și prenatal – pe celule fetale recoltate din placentă (vilozități coriale, la 10-11 săptămâni de sarcină) sau lichid amniotic (15-16 săptămâni de sarcină), sub control ecografic. Metodele actuale de studiu (vezi capitolul 2.D) se bazează de obicei pe culturi de celule și marcaj cromosomic în metafază (300-400 de benzi); în funcție de datele clinice (când se suspectează un sindrom cu microdeleție sau duplicație) și/sau rezultatele metodelor standard se recurge la tehnici sofisticate de generația a III-a (analiza cromosomilor în pro-metafază, cu 550-850 benzi) sau de generația a IV-a (FISH).

Analiza cromosomilor este o metodă complexă (necesită un laborator special utilat) și scumpă dar relația cost-beneficiu este excelentă deoarece se pune un diagnostic precis, pentru o viață (de regulă nu este nevoie repetarea analizei). Totuși medicii practicieni trebuie să cunoască indicațiile metodelor de analiză cromosomică pentru o selecție corectă a cazurilor.

Ținând cont de consecințele fenotipice și reproductive ale anomaliilor cromosomice (vezi capitolul 6.C) studiul cromosomilor este indicat în următoarele situații:

- (1) La copiii cu anomalii congenitale multiple (minore ± majore) mai ales dacă se însoțesc de tulburări de creștere prenatală și/sau întârziere în dezvoltarea psiho-motorie postnatală sau dacă anamneza familială evidențiază cazuri de avorturi spontane/nou-născuți morți/ nou-născuți vii plurimalformați. Efectuarea cariotipului se va face obligatoriu chiar și în situațiile în care aspectul clinic este caracteristic pentru un diagnostic de boală cromosomică (în special sindrom Down), pentru a stabili exact genotipul pacientului.
- (2) În debilități mintale (indiferent de grad) de cauze nedeterminate (se exclud deci cazurile de suferință fetală, meningo-encefalite postnatale, boli metabolice) și/sau tulburări de comportament - mai ales dacă se însoțesc de dismorfie facială și/sau anamneză familială pozitivă. La subiecții de sex masculin se va face cariotipul standard cu marcaj precum și teste pentru evidențierea cromosomului X fragil.
- (3) La cuplurile cu tulburări de reproducere ( $\geq 2$  avorturi spontane și/sau nou-născuți morți/vii plurimalformați) pentru a se evidenția o posibilă anomalie cromosomică echilibrată la unul dintre parteneri (5-10% din cazuri).
- (4) Dacă în situațiile (1) și (2) se identifică o anomalie de structură neechilibrată (ce produce o monosomie sau trisomie parțială) se va studia cariotipul părinților pentru a se căuta prezența unei eventuale anomalii cromosomice echilibrate. Dacă aceasta se confirmă se va recomanda analiza cromosomică la rudele de gradul 1, care ar putea moșteni anomalia echilibrată.
- (5) La persoanele cu stări intersexuale, pentru stabilirea sexului genetic (XX sau XY) sau evidențierea unor anomalii ale cromosomilor sexuali.
- (6) În tulburările de dezvoltare pubertară sau în prezența unor semne de disgenezie gonadică), mai ales dacă la băieți se adaugă anomalii ale OGE, ginecomastie sau o spermogramă anormală (azoo- sau oligospermie) sau dacă la fete se asociază amenoree primară (absența menarhei) sau amenoree secundară precoce.
- (7) În hemopatiile maligne, mai rar în tumorile solide, pentru diagnostic pozitiv și diferențial, prognostic sau urmărirea evoluției tratamentului.
- (8) În cazurile rare de sindroame cu instabilitate cromosomică (sindromul Bloom, anemia Fanconi, sindromul Nijmegen, sindromul ICF, sindromul Roberts Ataxia-telangiectazia) (vezi capitolul 6.C.1.5).
- (9) Pentru depistarea efectului mutagen al expunerii profesionale sau accidentale la radiații ionizante și unele substanțe chimice (clastogene).
- (10) În diagnosticul prenatal, studiul cromosomilor în celulele fetale este indicat la femeile gravide:
  - a) peste 35-38 de ani;
  - b) atunci când unul din părinți are o anomalie cromosomică echilibrată;



- c) atunci când cuplul a avut un copil cu o anomalie cromosomică *de novo* (deci cariotipul părinților este normal) și uneori poate avea un risc crescut pentru un alt copil cu anomalie cromosomică (de exemplu, mozaicism gonadic parental);
  - d) pentru stabilirea sexului genetic, în cazul bolilor recesive gonosomale (în care se îmbolnăvesc numai ½ din băieți), mai ales atunci când nu există o metodă de diagnostic prenatal specific pentru afecțiunea respectivă.
  - e) atunci când se identifică semne ecografice de alarmă (vezi capitolul 18) sau testele de screening biochimic (triplu test) pentru sindromul Down sunt pozitive (vezi capitolul 10)
- Limitele metodelor de analiză cromosomică sunt determinate de rezoluția lor, care nu permite evidențierea mutațiilor genice sau poligenice. Subliniem din nou necesitatea unui laborator de citogenetică bine echipat, cu personal calificat, tehnici standardizate și control intern și extern de calitate.

## 2. DIAGNOSTICUL MOLECULAR

### 2.1. DEFINIȚIE.

Orice boală este definită ca entitate morbidă pe baza mai multor elemente: cauza (*etiologie*), mecanismul de producere (*patogenie*) – care determină manifestările clinice – tabloul clinic și paraclinic (fenotipul) specific. Cu cât aceste elemente sunt mai bine definite, cu atât diagnosticul este mai precis, iar strategiile terapeutice și preventive sunt mai clar direcționate.

În medicina clasică, procesul diagnostic este bazat pe identificarea unui tablou clinic și pe analiza *in vitro* a celulelor sau țesuturilor modificate, a căilor biochimice alterate sau a unor agenți infecțioși cauzali. Cu toate că această *analiză fenotipică* a fost constant îmbunătățită în decursul timpului prin aplicarea unor tehnici și metode noi (ca microscopia, spectrometria, enzimologia sau imunohistochimia, ș.a.), multe boli nu au putut fi complet definite din punct de vedere etiopatogenic până la dezvoltarea metodelor de analiză genotipică, a ADN sau ARN.

Conceptul de **diagnostic molecular** se referă la noile tehnologii de diagnostic care au drept obiect (țintă) de studiu ADN-ul și ARN-ul celular, urmărind identificarea mutațiilor și polimorfismelor genice implicate în producerea bolilor, identificarea unor genomuri exogene patogene (în unele boli infecțioase) precum și identificarea precisă a persoanelor („tiparea genetică” – DNA fingerprinting). În această secțiune vor fi prezentate doar principiile de bază ale unor metode de diagnostic molecular și vor fi aduse unele exemple sugestive. O listă completă și actualizată permanent a metodelor de diagnostic molecular al bolilor genetice se poate găsi pe site-ul GeneTests – GeneClinics la adresa de web <http://www.geneclinics.org>.

**Obiectivele** diagnosticului molecular al bolilor genetice sunt:

- diagnosticul genotipic postnatal sau chiar prenatal al bolnavilor cu afecțiuni monogenice
- diagnosticul presimptomatic al purtătorilor de gene dominante cu manifestare tardivă;
- identificarea purtătorilor sănătoși (heterozigoți) de gene recesive;
- identificarea persoanelor purtătoare de premutații (pentru afecțiunile determinate de mutații dinamice);
- identificarea unor mutații genice sau rearanjării cromosomice în vederea stabilirii stadiului sau a evaluării prognosticului unor tumori sau hemopatii maligne.

În funcție de nivelul cunoștințelor referitoare la substratul genetic al afecțiunii și la numărul și frecvența populațională a mutațiilor, se disting două categorii de *metode de diagnostic molecular*:

- **Metodele directe** – aplicabile atunci când gena și/sau mutația sunt cunoscute - urmăresc evidențierea unei mutații la nivelul genotipului unui individ. Specimene (ADN, ARN) provenite de la consultand sunt testate pentru identificarea unui anumit tip de mutație; testul este individual și furnizează informații doar despre respectivul individ.

- **Metodele indirecte** – aplicabile atunci când gena nu a fost secvențiată sau este greu accesibilă diagnosticului direct - urmăresc transmiterea intrafamiliară a unor markeri genetici înlănțuiți cu locusul morbid, pentru a descoperi dacă consultantul a "moștenit" sau nu alela mutantă de la un părinte heterozigot; testul vizează o familie și furnizează informații referitoare la segregarea unui anumit segment cromosomic în această familie.

## 2.2 TEHNICI DE BAZĂ ALE DIAGNOSTICULUI MOLECULAR

### **a. Izolarea ADN genomic**

Diagnosticul molecular la nivel de ADN presupune ca prim timp izolarea ADN genomic (nuclear sau mitocondrial) de calitate (puritate și integritate corespunzătoare, dimensiuni ale fragmentelor mai mari de 150 kb) din țesuturi sau culturi de celule. Cel mai frecvent se utilizează sângele venos. Metodele de izolare utilizate în prezent se caracterizează prin gradul lor înalt de stringență necesar înlăturării proteinelor (cu ajutorul unor detergenți și proteinazei K), lipidelor (prin extracția fenol-cloroform), ARN-ului (prin tratare cu RN-ază) sau a altor constituenți celulari care ar putea interfera cu activitatea enzimelor de restricție, a ligazelor sau a polimerazei. Sunt, de asemenea, esențiale eliminarea oricăror nucleaze care pot degrada ADN-ul de greutate moleculară mare, precum și evitarea stresului mecanic care poate duce la fragmentarea ADN-ului genomic în cursul purificării.

### **b. Sectionarea cu enzime de restricție**

Pentru obținerea unor fragmente de ADN (ce conțin o genă sau o parte din genă) în vederea amplificării și analizei ulterioare se folosesc *enzime de restricție* (vezi capitolul 3.C.1.1). Enzimele de restricție nu secționează ADN la întâmplare ci au un grad înalt de specificitate: ele "scanează" ADN și se opresc atunci când recunosc o secvență nucleotidică specifică, numită *situs de restricție*, la nivelul căreia secționează ADN.

Clivarea moleculei de ADN cu o anumită enzimă de restricție "fragmentează" ADN într-un *număr definit, caracteristic și reproductibil de fragmente*, care reflectă localizarea și frecvența situsurilor specifice de clivare sau *harta de restricție*. Situsurile de restricție sunt dispuse la distanțe variate iar fragmentele produse prin secționare sunt inegale; pe această bază, ele pot fi ușor separate prin electroforeză în gel. Diferite mutații pot modifica situsul de restricție (care nu va mai fi cunoscut de enzimă) sau pot crea situsuri noi. De aceea clivarea ADN unor persoane diferite din populație cu aceeași enzimă de restricție va produce fragmente de ADN cu lungimi diferite. Se realizează un amplu fenomen de "*polimorfism al lungimii fragmentelor de restricție*" (RFLP), care poate fi folosit ca un marker genetic prețios în diagnosticul unor boli genetice. Hărțile de restricție permit compararea moleculelor de ADN de la diferiți indivizi, fără a fi necesară determinarea în detaliu a secvenței nucleotidice.

### **c. Separarea fragmentelor de ADN prin electroforeză în gel**

Datorită prezenței grupurilor fosfat, încărcate negativ, în prezența unui câmp electric, fragmentele de ADN vor migra spre anod. Rata migrării este determinată de frecare, astfel că moleculele mai mari străbat cu mai multă dificultate porii, deplasându-se mai lent decât moleculele mici. Gelul acționează ca o sită cu pori prin care trebuie să treacă moleculele de ADN. Odată cu eșantioanele de ADN se pun să migrează "markeri ADN" cu o mărime cunoscută; ei oferă posibilitatea calculării lungimii moleculelor din eșantion.

Pentru vizualizarea directă a moleculelor de ADN se utilizează bromura de etidiu, inclusă în gel. Acest colorant se intercalează între bazele ADN-ului dublu catenar și are o fluorescență roșu-oranj când este iradiat cu lumină ultravioletă (260-360nm). Colorantul neintercalat nu este fluorescent; ca atare numai benzile de ADN din gelul de agaroză vor fi vizualizate în lumină ultravioletă.

Există trei tehnici de electroforeză în gel care fac posibilă separarea și vizualizarea unor fragmente de ADN cu lungimi cuprinse între 5 nucleotide și 5.000.000 de nucleotide.

- *Electroforeza în gel de agaroză* – permite separarea unor fragmente de ADN cuprinse între 0,1-20 kb.
- *Electroforeza în gel de poliacrilamidă* este similară celei în gel de agaroză, dar discriminarea fragmentelor se realizează în funcție de mărimea porilor. Gelurile de 3,5% poliacrilamidă pot separa fragmente de cuprinse între 1.000-2.000 Kb iar gelurile de 20% acrilamidă fragmente de 6-100 nucleotide; rezoluția fragmentelor este foarte bună, aceste geluri fiind folosite și pentru secvențierea ADN.

- *Electroforeza în câmp electric pulsatil* face posibilă separarea unor fragmente mari de ADN, de până la 5 Mb, prin schimbarea (alternarea) direcției câmpului electric.

#### **d. Amplificarea in vitro a secvențelor de ADN (Polymerase Chain Reaction)**

Reacția de polimerizare în lanț (PCR, “polymerase chain reaction”) permite amplificarea enzimatică aproape exponențială a ADN-ului pornind de la cantități foarte mici de material, mimând mecanismul de bază al replicării ADN. Principiul metodei PCR a fost prezentat în capitolul 3.C.2. și figura 3.20. Avantajele clonării aceluiași ADN prin PCR sunt determinate în primul rând de *simplitatea* sa (nu necesită nici o altă manipulare, în afara variațiilor termice necesare diferitelor etape ale reacției, și de aceea se pretează la automatizare, folosind un *termociclor*); în al doilea rând, PCR este o metodă *rapidă, sensibilă, eficientă și ieftină*.

Metoda PCR a fost aplicată cu succes la studiul diverselor tipuri de secvențe de ADN: genomic, mitocondrial, exogen (în special viral), precum și la molecule de ARNm, după ce în prealabil s-a obținut cu ajutorul transcriptazei inverse o moleculă de ADN complementar unui mesager (RT-PCR sau *reverse transcriptase PCR*). Tehnica PCR a revoluționat atât analiza genetică, cât și diagnosticul molecular al bolilor genetice, prin detecția directă a mutațiilor sau diagnosticul indirect prin polimorfismul RFLP sau al markerilor minisatelitici. În acest scop s-au elaborat numeroase variante ale PCR.

#### **d. Secvențierea ADN**

Etapa principală de analiză genotipică este *determinarea secvenței nucleotidice*, deci a informației genetice a unui fragment de ADN (genă). Această acțiune este decisivă pentru a stabili *structura* genei precum și secvența de aminoacizi a *proteinei* codificată de genă (în cazul în care ea nu a fost identificată). În viitor, cunoașterea genomului uman și perfecționarea unor sisteme automate vor da posibilitatea diagnosticării bolilor genetice direct prin secvențiere.

Secvențierea ADN este o versiune modificată a replicării ADN, realizată în condiții controlate *in vitro*. Principiul metodei a fost descris în capitolul 3.C.3.2. Vom menționa doar că secvențierea diferă de replicarea normală prin faptul că în mediul de reacție sunt incluse a didezoxinucleotidele (ddNTP), cărora le lipsește grupul 3'-OH necesar pentru extensia lanțului de către ADN polimerază. În momentul încorporării unui ddNTP în ADN, polimerizarea se încheie și, de aceea, metoda este denumită **secvențiere prin încheierea lanțului** (“chain termination sequencing”). Produsii reacției pot fi detectați prin încorporarea în mediul de incubare (în amorse sau în nucleotide) a unor markeri (marcați fluorescent diferit pentru fiecare tip de nucleotid), urmată de electroforeza în gel de poliacrilamidă pentru separarea perfectă a fragmentelor (figura 9.6).

#### **e. Hibridizarea acizilor nucleici**

Detecția și identificarea unor secvențe specifice de acid nucleic constituie o procedură de rutină în biologia moleculară. O astfel de metodă se bazează pe faptul că, în condiții favorabile, *două molecule monocatenare de acizi nucleici pot forma o moleculă hibrid, în funcție de gradul de complementaritate a secvențelor lor nucleotidice*. Formarea duplexului se realizează în principal prin legături de hidrogen între guanozină și citozină, și respectiv între adenozină și timidină (sau uridina, în cazul ARN-ului). Astfel, hibridizarea moleculară asociată cu o metodă de marcarea și detecție devine foarte utilă pentru identificarea unor secvențe identice (sau înrudite) cu ajutorul unei secvențe nucleotidice de referință (sondă / probă) (vezi capitolul 3.C.3.1).

#### **(1) Analiza ADN genomic prin metoda de transfer Southern.**

Southern blotting reprezintă o metodă de stabilire a prezenței / absenței unei anumite secvențe de ADN în ADN-ul genomic, cu ajutorul unei secvențe ADN complementare (sondă / probă ADN).

Întrucât ADN-ul genomic este de dimensiuni foarte mari, el este tăiat cu una sau mai multe enzime de restricție, după care fragmentele sunt separate în funcție de mărime prin electroforeză în gel (de obicei, de agaroză). Moleculele migrate în gel sunt denaturate în molecule monocatenare prin tratament cu alcali, apoi neutralizate și transferate prin capilaritate pe o membrană de hibridizare (“blotting”), utilizând o soluție ionică concentrată. ADN-ul este legat ireversibil la membrană prin intermediul unor legături încrucișate (cross-linking) sub acțiunea luminii ultraviolete. Astfel, molecula țintă monocatenară este disponibilă pentru hibridizarea (asocierea pe baza complementarității bazelor) cu o

probă marcată (radioactiv sau fluorescent) de ADN monocatenar. După înlăturarea hibridizării nespecifice prin spălare cu detergenți (SDS) și soluții ionice concentrate, interacțiunile specifice dintre țintă și probă (moleculele hibride) sunt detectate fie prin autoradiografie, fie prin metode de detecție non-radioactive (vezi figura 3.21 și figura 9.7).

De la introducerea sa în 1975 (Southern, 1975), analiza ADN prin Southern blotting a devenit o tehnică de rutină în analiza organizării genelor, identificarea și clonarea unor secvențe specifice, studiul mutațiilor, caracterizarea genotipurilor prin analiza polimorfismelor fragmentelor de restricție (RFLPs – „restriction fragment length polymorphisms”), diagnosticul bolilor genetice și al cancerului, detecția prezenței unor microorganisme în țesuturile umane sau identificarea genetică (“genetic fingerprinting”) în medicina legală.

## (2). Analiza ARN prin Northern blot

Analiza ARN-ului prin Northern blot este o procedură esențială pentru obținerea de informații privind expresia genelor în organismele multicelulare, deoarece poate aprecia cantitatea unei secvențe de ARN (de obicei ARNm) într-un anumit țesut sau tip de celule. În diagnosticul mutațiilor, această metodă poate releva prezența unor modificări în nivelul expresiei sau în mărimea moleculei de ARNm corespunzătoare unei anumite gene.

### f. Analiza proteinelor prin metoda de transfer Western blotting

Această tehnică permite obținerea de informații privind dimensiunea și cantitatea proteinelor mutante extrase din probe tisulare de la pacienți cu boli genetice (vezi figura 3.24).

## 2.3. METODELE DIRECTE DE DIAGNOSTIC MOLECULAR

Metodele directe urmăresc evidențierea unei mutații cunoscute în genotipul unui pacient; testul este individual și furnizează informații doar despre respectivul pacient. Există astăzi o multitudine de metode de analiză directă a ADN, fiecare cu indicații și limite precise (tabelul 9.4).

**Tabelul 9.4 Metode directe de diagnostic molecular**

Metoda	Comentarii
Analiza RFLP (digestie enzimatică a ADN-ului amplificat prin PCR și evaluarea mărimii fragmentelor prin electroforeză în gel și Southern blot)	Numai pentru deleții sau inserții de dimensiuni mari sau mutații punctiforme în care mutația creează sau abolește un situs de restricție natural sau unul introdus prin utilizarea unor primeri PCR speciali (PCR-based Southern)
Hibridizarea ADN-ului amplificat cu oligonucleotide specifice de alelă (ASO) pe dot-blot sau gene chip	Metodă generală pentru mutații punctiforme determinate; utilizarea unor seturi largi de oligonucleotide permite scanarea concomitentă pentru multiple mutații
PCR utilizând primeri cu specificitate de alelă (test ARMS)	Metodă generală pentru mutații punctiforme; design-ul amorselor este critic. Poate fi adaptat pentru tehnologia cipurilor.
Testul de ligare a oligonucleotidelor (OLA)	Metodă generală pentru mutații punctiforme determinate
PCR cu primeri situați de o parte și de alta al unui punct de translocație, deleție sau inserție	Amplificarea reușită indică prezența <u>rearanjării</u> cromosomice căutate.
Secvențierea	Permite detecția și caracterizarea completă a mutației. Este necesară cunoașterea secvenței genomice a genei.

### a. Analiza RFLP (restriction fragment length polymorphism)

Analiza prezenței și mărimii fragmentelor de restricție corespunzătoare secvenței genomice a unei anumite gene permite evaluarea unor modificări (deleții, inserții) de dimensiuni mari (sute de pb) ale secvenței nucleotidice la diferiți pacienți. În anumite boli genetice, mutația responsabilă anulează un situs de restricție specific pentru o anumită enzimă, situat în interiorul genei. În această situație, analiza lungimii fragmentelor de restricție generate de enzima în cauză va indica direct prezența sau absența mutației. (figura 9.8).

### b. Metoda ASO (allele specific oligonucleotides)

Mutațiile punctiforme ale unei gene pot fi detectate cu ajutorul PCR, cu condiția cunoașterii secvenței genice din vecinătatea mutației. În acest caz, amorsele (*primeri*) utilizate sunt specifice (complementare) fie alelei normale (ASO-N), fie celei mutante (ASO-M), fiind

denumite *oligonucleotide cu specificitate de alelă*. (vezi capitolul 3.C.3.1.b) Cele două oligonucleotide diferă doar printr-o singură bază, dar acest fapt este suficient pentru ca hibridizarea oligonucleotidelor să fie specifică pentru o anumită alelă.

Când se realizează detecția unei mutații, specimenul de ADN este amplificat alături de 3 specimene cunoscute: homozigot normal (NN), heterozigot (Na) și homozigot mutant (aa). Produsele PCR sunt transferate pe filtre de nitroceluloză ("dot blot") și apoi sunt hibridizate (separat, în două reacții) cu cele două oligonucleotide specifice, marcate radioactiv (cu <sup>32</sup>P). Hibridizarea se face în condiții de stringență înaltă, pentru ca o diferență de o singură bază ("mismatch") să împiedice asocierea nespecifică (vezi figura 3.22).

Dacă un specimen de ADN este recunoscut de oligonucleotidul specific alelei mutante, înseamnă ca persoana este purtătoarea a cel puțin unei gene mutante. Diferențierea între heterozigoți și homozigoți mutanți se realizează prin analiza filtrului cu oligonucleotidul normal, hibridizarea acestuia cu același specimen de ADN semnificând faptul că persoana este heterozigotă (figura 9.9) Trebuie subliniat faptul că acest test este specific unui anumit tip de mutație, iar *absența hibridizării cu oligonucleotidul specific alelei mutante nu înseamnă absența mutațiilor ci doar absența mutației particulare pentru care s-a făcut testarea*.

### c. Metoda ARMS (amplification refractory mutation system)

Metoda ARMS este o metodă care permite în principiu detectarea oricărei mutații punctiforme printr-o tehnică tip PCR în care se utilizează amorse cu specificitate alelică. Principiul este asemănător cu cel utilizat în ASO, numai că în acest caz nu se desemnează primeri care diferă între ei în porțiunea mijlocie a secvenței (pentru a maximiza instabilitatea termodinamică a heteroduplexurilor) ci la nivelul extremității 3'. Atunci când primerul nu realizează o împerechere corectă a bazei 3' (există un mismatch), Taq polimeraza nu va putea declanșa reacția de polimerizare. Utilizarea a două reacții (una cu primerul corespunzător mutației și alta cu cel corespunzător alelei normale) permite genotiparea corectă atât a homozigoților cât și a heterozigoților. Mai nou se utilizează așa numita tehnică tetra-ARMS care permite genotiparea eficientă a polimorfismelor mononucleotidice într-o singură reacție (figura 9.10).

## 2.4. METODE INDIRECTE DE DIAGNOSTIC MOLECULAR

Deși secvențierea genelor este metoda cea mai directă de identificare a mutațiilor, mărimea genelor umane (sute de mii sau milioane de pb) și existența unei largi game de mutații (heterogenitate alelică) pentru multe dintre ele fac ca această metodă să fie utilizată abia după ce existența unei mutații la nivelul unei anumite gene a fost demonstrată printr-o metodă indirectă, mai rapidă și mai ieftină.

**Tabelul 9.5 Metode indirecte de diagnostic molecular**

Metoda	Avantaje	Dezavantaje
Mobilitatea electroforetică în gel a heteroduplexurilor	Metodă foarte simplă și ieftină	Numai pentru secvențe sub 200pb. Sensibilitate limitată. Nu relevă poziția modificărilor.
Cromatografie de înaltă rezoluție în soluție denaturantă	Metodă rapidă, cantitativă	Echipament costisitor. Nu relevă poziția modificărilor nucleotidice.
Polimorfismul conformației ADN monocatenar (SSCP)	Metodă simplă, echipament ieftin.	Numai pentru secvențe sub 200pb. Sensibilitate limitată. Nu relevă poziția anomaliilor.
Electroforeză în gel cu gradient denaturant (DGGE)	Metodă sensibilă	Alegerea amorsoarelor este critică. Amorsoarele sunt costisitoare. Nu relevă poziția anomaliilor.
Clivarea perechilor de baze anormale: (mismatch cleavage) Chimic, enzimatic	Metodă sensibilă. Identifică poziția modificării nucleotidice.	Reactivi toxici. Metodă dificilă. Rezultate de calitate slabă.
Testul proteinelor trunchiate (PTT)	Mare sensibilitate pentru mutațiile cu terminare prematură a translației. Identifică poziția mutației.	Numai pentru mutații cu încheiere prematură a lanțului. Metodă costisitoare, dificilă. Necesită ARN

Dideoxy fingerprinting	Mare sensibilitate.	Dificil de interpretat
“Cipuri” ADN de hibridizare de minisevențializare	Metode rapide, eficiente. Pot detecta și defini toate modificările nucleotidice	Echipament costisitor. Gamă limitată de gene. Tehnologie nouă, încă în dezvoltare.
Analizele de înlănțuire	Metodă foarte simplă și ieftină.	Necesită studii în cadrul familiilor

### a. Metoda SSCP („single strand conformational polymorphism”)

Analiza SSCP a fragmentelor de ADN genomic amplificate prin PCR se bazează pe tendința ADN-ului monocatenar de a forma structuri secundare prin legături de hidrogen, intramoleculare. Prezența unei mutații punctiforme determină modificarea legăturilor de hidrogen din interiorul moleculei și deci și a conformației moleculei. Intrucât mobilitatea electroforetică în gel a moleculelor de ADN este dependentă nu numai de mărime, ci și de conformația lor, două molecule de ADN monocatenar, care diferă numai printr-o singură bază, migrează electroforetic diferit (figura 9.11). Avantajul principal al SSCP constă în faptul că nu este necesară cunoașterea precisă a mutației sau a secvenței complete a genei. Singura cerință este cunoașterea parțială a secvenței nucleotidice, pentru realizarea amorsoarelor.

ADN-ul amplificat prin PCR este denaturat și apoi aplicat imediat pe un gel nedenantant, pentru a nu permite renaturarea în soluție. În gel, catenele rămân separate, dar formează structuri secundare prin legături de hidrogen, deoarece ADN-ul bicatenar este mai stabil decât cel liniar, monocatenar. Catenele cu structuri diferite au mobilitate electroforetică diferită, SSCP putând detecta o diferență de o singură bază dintr-o catenă de 500 nucleotide. Izolarea din gel a fragmentului de ADN cu migrare anormală permite secvențierea și determinarea precisă a modificării nucleotidice. Modificarea secvenței ADN poate sta sau nu la originea unei afecțiuni, prin urmare nu orice polimorfism reprezintă o mutație dezavantajoasă.

### b. Metoda DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)

Metoda DGGE implică amestecarea fragmentelor de ADN genomic denaturat cu o probă ADN monocatenară, marcată (de obicei radioactiv) urmată de electroforeza acestui amestec într-un gel cu gradient denaturant. ADN-ul genomic identic ca secvență cu proba utilizată va forma cu aceasta un homoduplex care va rămâne stabil chiar și în condițiile denaturante din gel, în timp ce fragmentele de ADN care diferă de secvența probei formează inițial heteroduplexuri cu aceasta, dar pe parcursul migrării sunt denaturate, rezultând o structură ramificată cu mobilitate redusă comparativ cu homoduplexul (vizualizarea se realizează prin autoradiografie) (figura 9.12).

### c. Metoda clivării chimice a secvenței anormale

Chemical cleavage mismatch (CCM) se bazează pe capacitatea unor substanțe chimice - hidroxilamină sau tetraoxid de osmiu – de a reacționa cu nucleotide libere – citozina, respectiv timina. Prin denaturarea ADN-ului genomic dublu catenar și hibridizarea sa cu o probă de ADN monocatenar marcată radioactiv, orice citozină, (respectiv timină) neîmperecheată va fi susceptibilă la reacția cu hidroxilamina (respectiv tetraoxidul de osmiu). Adăugarea de piperidină duce la clivarea ADN-ului la nivelul acestor situsuri. Această tehnică localizează împerecherile greșite pentru ambele catene și deci detectează indirect mutațiile care implică substituția cu adenină sau guanină prin identificarea timinelor sau citozinelor complementare din cealaltă catenă.

### d. Testul proteinelor trunchiate (PTT)

Testul proteinelor trunchiate se bazează pe obținerea de ADNc pornind de la ARN-ul mesager pe baza reacției de transcripție inversă (RT-PCR). Transcripția inversă presupune utilizarea unei amorse specifice care conține un promotor și o secvență de inițiere a translației. ADN-ul complementar rezultat este apoi supus transcripției și translației într-un sistem special. Produsul proteic este analizat prin electroforeză în gel, iar obținerea unei proteine de dimensiuni mai mici (trunchiate) semnifică prezența unei mutații nonsens sau cu schimbarea cadrului de lectură în gena corespunzătoare (figura 9.13).

### e. Analizele de înlănțuire



Analizele de înlănțuire se realizează în trei etape (vezi capitolul 3.D.1). În prima etapă se face diferențierea celor doi cromosomi omologi la cuplul relevant (găsirea unui marker genetic – RFLPs, minisateliți, microsateleți – strâns înlănțuit cu alela mutantă pentru care părinții sunt heterozigoți). Apoi se determină "faza de înlănțuire" (identificarea cromosomului purtător al genei mutante). În final are loc identificarea setului de cromosomi primit de consultand de la părinți.

## C. SFATUL GENETIC.

### 1. DEFINIȚIE. OBIECTIVE. CIRCUMSTANȚE DE ACORDARE.

Sfatul genetic a fost definit ca un *proces de comunicare* care se ocupă cu problemele umane și psihologice asociate cu prezența unei boli genetice sau cu riscul ei de apariție într-o familie<sup>8</sup>. În esență, « pacienții și/sau rudele lor cu risc pentru o boală ce poate fi ereditară sunt sfătuiți asupra consecințelor bolii, probabilitatea apariției sau transmiterii ei în familie și căile prin care aceasta poate fi prevenită sau ameliorată » (Harper, 1998).

Acest proces, efectuat de una sau mai multe persoane specializate (genetician, psiholog-consilier, asistent social), implică o încercare de a ajuta individul sau familia:

- să înțeleagă faptele medicale, inclusiv diagnosticul, evoluția probabilă a bolii și posibilitățile de îngrijire;
- să aprecieze modul în care factorii genetici contribuie la producerea bolii, modul ei de transmitere și riscul de recurență la anumite rude;
- să înțeleagă opțiunile și alternativele reproductive determinate de riscul de recurență ;
- să aleagă acțiunile care li se par corespunzătoare în raport cu riscul lor și scopurile familiei lor și să acționeze în concordanță cu această decizie informată;
- să facă cea mai bună corecție posibilă a bolii la o persoană afectată din familie și/sau a riscului de recurență a acelei boli.

Aceste obiective demonstrează evident că sfatul genetic este un *act medical, specializat și complex*. El reprezintă de fapt *acțiunea finală a consultului genetic* (vezi figura 9.1) prin care medicul a stabilit diagnosticul și prognosticul bolii probandului, posibilitățile de îngrijire și recuperare, tipul de boală genetică și riscul de recurență pentru consultand. Toate aceste date vor fi comunicate adecvat celor care le-au solicitat, pentru a lua decizii informate.

Sfatul genetic poate fi solicitat (vezi și secțiunea A.3):

- *premarital* (mai rar) – atunci când unul dintre membrii cuplului este afectat de o boală genetică sau are o rudă apropiată afectată; o altă situație este posibilitatea unei uniuni consanguine;
- *preconcepțional* – pentru una din situațiile menționate mai sus la care se adaugă vârsta maternă peste 35 de ani sau existența unor tulburări de reproducere (de exemplu, avorturi spontane repetate);
- *prenatal* – în cazul unei expuneri accidentale la teratogeni sau a descoperirii unor semne ecografice de alarmă;
- *postnatal* – după nașterea unui copil afectat de o boală genetică sau anomalii congenitale

### 2. PRINCIPII ȘI METODOLOGIE.

Sfatul genetic necesită cunoștințe, pricepere, abilitate de comunicare, umanism și finețe psihologică. Toate aceste calități se dobândesc și se perfecționează în timp cu condiția înțelegerii importanței și particularităților acestei acțiuni. Unii geneticieni sau pediatri-geneticieni au remarcabile calități de diagnostic dar uneori minimalizează complexitatea sau

---

<sup>8</sup> După Comitetul de Sfat Genetic al Societății Americane de Genetică Umană (1975)

consecințele sfatului genetic; exemplul clasic pentru această abordare simplistă este reprezentat de cazurile de sindrom Down, care sunt “rezolvate” uneori în câteva fraze. Vom încerca să prezentăm sintetic câteva principii și modalități generale de acordare a sfatului genetic, care desigur nu pot fi decât un cadru general ce trebuie dezvoltat prin lectura unor lucrări dedicate acestui subiect și mai ales prin exerciții practice.

## 2.1 PRINCIPII GENERALE DE ACORDARE A SFATULUI GENETIC

(1) Medicul care acordă sfatul genetic (consilierul sau sfătuitorul genetic) trebuie să posede o pregătire adecvată în acest domeniu, permanent actualizată, care să-i permită să rezolve toate obiectivele sfatului genetic. Această parte tehnică trebuie dublată de umanism, capacitate de comunicare și simț psihologic.

(2) Acuratețea diagnosticului clinic și etiologic este elementul esențial al unui sfat genetic corect pentru că, la fel ca și în alte specialități medicale, “*unde diagnostic nu e, nimic nu e...*”.

(3) Ședința de consiliere (ce se adresează cel mai frecvent unui cuplu) trebuie atent pregătită:

- Se va *planifica* atunci când diagnosticul a fost finalizat și la un interval suficient de timp după un eveniment traumatizant pentru cuplu (nașterea unui copil malformat, decesul unui copil, pierderea unei sarcini dorite etc.);
  - Se vor identifica în prealabil (telefon, vizita asistentului social) necazurile și preocupările consultandului/ părinților săi (dificultățile de mobilitate, limbaj, înțelegere; statutul socio-economic) și, eventual, dorința de a fi sau nu însoțit de cineva din familie, un prieten;
  - Se va insista asupra *prezenței ambilor părinți* sau membri ai cuplului deoarece nivelul de înțelegere al celor doi părinți poate fi diferit iar transmiterea unor date de către părintele prezent spre celălalt părinte poate fi incompletă sau eronată, voit sau ne-voit.
- Se va analiza dosarul medical al consultandului/ probandului și vor fi revăzute datele despre boală, pentru a stabili ce probleme vor fi discutate (vezi secțiunea 2.2).
- O atenție specială se va acorda acțiunilor ce urmează după sfatul genetic: monitorizarea evoluției bolnavului, materiale documentare, legătura cu grupuri de sprijin sau asistenți sociali, menținerea legăturii cu medicul și Centrul de genetică medicală (se va avea în vedere o nouă vizită, după o perioadă de timp)
- Se va alocă un timp adecvat, suficient pentru o primă discuție, fără întreruperi, telefoane etc;
- Locul ales trebuie să nu fie stressant, să asigure intimitate și confidențialitate; prezența eventuală a altor persoane din echipă trebuie explicată și aprobată de consultanți.

(4) Explicațiile oferite trebuie adaptate la *nivelul de înțelegere* al părinților iar limbajul adecvat nivelului lor de cunoștințe. Pentru un sfat genetic eficient este indispensabil să se realizeze o comunicare reală cu aceștia, astfel ca părinții să rețină toate elementele necesare unei percepții exacte a situației nou apărute în viața lor. Se vor evita formulări, expresii sau cuvinte greoaie, rare, necunoscute interlocutorilor. Este de preferat un limbaj simplu, exact, clar, fără prea multe noțiuni de specialitate.

(5) Se va acorda o atenție deosebită problemelor psihologice ale sfatului genetic. Riscul genetic are o componentă afectivă atât pentru medic cât mai ales pentru cuplul care așteaptă cu nerăbdare și teamă verdictul medicului. De aceea se poate spune că “*riscul se calculează la rece și se transmite cu căldură*”. Pacienții și familiile cu probleme genetice sunt aproape întotdeauna supuși unui stress emoțional și social care poate merge până la detrese grave. Unii pacienți au tăria să se confrunte personal cu asemenea probleme; ei preferă să primească orice veste proastă decât să rămână neinformați și ei iau singuri decizii pe baza informațiilor ce le obțin. Alții, reclamă mult mai mult suport și chiar au nevoie de psihoterapie.

(6) Un aspect deosebit al sfatului genetic este *caracterul non-direcțional*: medicul



sfătuiește cuplul consultant, dar nu ia decizii în locul acestuia. Important este ca membrii cuplului consultant să conștientizeze toate implicațiile bolii și să ia deciziile cunoscând toate informațiile referitoare la aceasta.

(7) Sfatul genetic *nu se termină* odată cu transmiterea datelor și riscului ci include o serie de acțiuni ulterioare.

- Trebuie stabilit cât mai clar posibil dacă pacienții au înțeles într-adevăr ceea ce li s-a spus despre boală, despre măsurile posibile, despre risc. Este surprinzător că multe informații sunt uitate sau greșit interpretate. Un sistem de urmărire periodică (implicând medicul sau/și o asistentă socială) este util.
- Totdeauna se va da consultanților și medicului de familie o scrisoare ce sintetizează punctele esențiale ale consultației, inclusiv riscul, pentru ca pacienții să poată avea un document de referință, clar, asupra căruia să revină atunci când cred că este nevoie să-și precizeze, explice, unele date și concluzii.
- Sprijinul realizării opțiunilor reproductive decise de către consultanți.
- Sprijin activ pentru rezolvarea oricărei probleme ulterioare privind îngrijirea bolnavului, planificarea familială, suportul socio-economic

## 2.2. PROBLEME CE VOR FI PUSE ÎN DISCUȚIE

Problemele ce vor fi puse în discuție derivă din obiectivele sfatului genetic. Dar, înainte de orice, consultanții trebuie să înțeleagă clar scopul și conținutul sfatului genetic, la ce se pot aștepta din această acțiune și ce sprijin vor primi; ei vor fi asigurați de confidențialitatea datelor și caracterul non-directiv al informațiilor: deciziile le aparțin și trebuie luate pe baza unor elemente clare, bine fundamentate.

- Se va începe prezentând afecțiunea probandului sau „problema” cu care se confruntă cuplul, manifestările și consecințele ei, evoluția probabilă (istoricul natural) și prognosticul bolii, posibilitățile de îngrijire și de prevenire a unor complicații. În fața unui bolnav sau a unor părinți cu un copil bolnav este bine să folosim un ton optimist, încurajator.
- Apoi se va explica natura genetică a bolii, mecanismul de producere și modul de transmitere ereditară. În această explicație ne putem confrunta cu o serie de concepții greșite despre ereditate, izvorâte fie din tradiție, fie din ignoranță, fie din lipsă de cultură medicală (tabelul 9.6); vom încerca să le limpezim cu tact și răbdare, pentru a reuși să convingem și să lămurim lucrurile (vezi și capitolul 8.C.2).

**Tabelul 9.6. Concepții greșite despre afecțiunile ereditare**

Absența altor cazuri de boală în familie înseamnă că boala nu este genetică, ereditară și invers, orice boală familială este genetică.
Orice afecțiune congenitală este și genetică.
Toate bolile genetice sunt ereditare, în sensul de transmitere.
Traumele mentale sau psihice în cursul sarcinii produc malformații.
Toate bolile genetice sunt netratabile
Un risc de 1:2 ar însemna că tot al doilea copil va fi afectat sau un risc de 1:4 ar însemna că după un copil bolnav următorii 3 copii nu vor fi afectați;
Un risc de 1 din 20 (de ex., pentru spina bifida) înseamnă o șansă din 20 de a avea un copil normal.
Dacă în familie există doar femei sau bărbați afectați boala are transmitere legată de un cromosom sexual
Toate bolile genetice pot fi detectate prin analiză cromosomică

- Prezentarea riscului se va face în toate formele posibile (de exemplu : 25%, ¼, 1 din 4), subliniind concomitent gravitatea afecțiunii, posibilitățile terapeutice, șansele unei vieți independente, inserția socială etc. În funcție de acești factori și fără a influența decizia consultanților, prezentarea riscului se poate face în mai multe variante – după exemplul « paharul este pe jumătate gol sau pe jumătate plin » - mai ales în funcție de gradul de handicap. Se va preciza că riscurile se referă la viitor, se aplică la fiecare sarcină indiferent de ce s-a întâmplat la celelalte sarcini (« șansa/riscul nu are memorie »). Multe persoane nu au o idee clară despre ceea ce înseamnă un risc « mare » sau « mic ». De aceea este utilă

compararea riscului calculat cu riscurile din populația generală (tabelul 9.7); în felul acesta riscul va fi mai bine înțeles și impactul mai ușor de suportat.

**Tabelul 9.7. Riscuri în populația generală**

Afecțiune	Risc general
Avort spontan	1/5-1/6
Deces perinatal	1/30 – 1/100
Deces neonatal*	1/150
Deces în primul an de viață*	1/500
Malformații congenitale majore	1/33 sau 2-3%
Handicap mental sau fizic major	1/50 sau 1-2%
Cancer în perioada adultă	1/4 sau 25%

\* Datele sunt valabile pentru țările dezvoltate

- Se vor discuta (în aceeași ședință sau ulterior) alternativele și opțiunile reproductive determinate de riscul de recurență sau posibilitățile și opțiunile de testare genetică, avantajele și dezavantajele lor, implicațiile psihologice și sociale, modul de realizare/obținere :
  - alternativele reproductive sunt : contracepția (reversibilă sau definitivă), reproducere asistată (prin donare de gameți), diagnosticul pre-implantator sau adopția ;
  - opțiunile reproductive includ : diagnosticul prenatal, terminarea sau continuarea unei sarcini cu un făt afectat ;
  - opțiunile de testare și acțiunile preventive sunt valabile pentru persoanele cu risc pentru boli cu debut tardiv ; o situație specială este testarea stării de purtător sănătos.
  - Consultații vor fi încurajați să aleagă acțiunile care li se par corespunzătoare în raport cu riscul lor și scopurile familiei.
- O problemă importantă ce trebuie obligatoriu abordată este existența altor persoane, rude, cu risc genetic crescut în familie – care rezultă din caracterul genetic al bolii și datele arborelui genealogic. Consultații vor fi încurajați să informeze aceste persoane asupra riscului și utilității prezentării la medicul genetician sau dacă nu vor/nu pot să o facă ei însăși li se va cere acordul scris pentru ca medicul să-i contacteze și informeze.

### 3. RISCUL GENETIC ÎN BOLILE CROMOSOMICE

Sfatul genetic în bolile cromosomice prezintă dificultăți legate de tipul anomaliei cromosomice, sexul pacientului la care este prezentă anomalia, gradul de afectare a reproducerii, modalitatea de segregare a cromosomilor în cursul meiozei și viabilitatea produșilor de concepție. Fără a intra în detalii, vom prezenta succint câteva repere practice.

#### 3.1 SFATUL GENETIC ÎN ANOMALIILE CROMOSOMICE NUMERICE.

În **sindromul Down**, riscul de recurență depinde, în primul rând, de tipul anomaliei.

- În cazul *trisomiei 21 libere omogene* riscul de recurență variază cu vârsta maternă în momentul concepției, fiind de 0,1% la 30 de ani, de 0,3% la 35 de ani, de 1% la 40 de ani și de 4,4% la 45 de ani (tabelul 9.8). Practic, se poate considera că la femeile sub 30 de ani riscul de recurență al sindromului Down este nesemnificativ. Totuși se recomandă efectuarea analizei cromosomice prenatale la toate gravidele care au avut deja un copil cu sindrom Down prin trisomie 21 liberă omogenă (posibilitatea unui mozaic germinal) și mai ales la gravidele peste 35 de ani.
- În cazurile de sindrom Down prin *trisomie 21 în mozaic*, riscul de recurență a afecțiunii este nesemnificativ, deoarece anomalia este determinată de un accident mitotic în primele etape ale dezvoltării embrionare.
- În *trisomia 21 prin translocție Robertsoniană neechilibrată* se impune obligatoriu efectuarea analizei cromosomice la ambii părinți. În cazul în care translocția este *de novo*, ambii părinți având cariotip normal, riscul de recurență a bolii este mai mic de 1%. În cazul

în care translocația este prezentă la tată, riscul de recurență este mai mic de 1%, deoarece prezența anomaliai cromosomice induce o blocare a meiozei **în spermatoците cu dezechilibru cromosomic**. În cazul în care translocația este prezentă la mamă, riscul de recurență depinde de tipul anomaliai. În translocațiile Robertsoniene între cromosomi acrocentrici neomologi, riscul de naștere al unui nou copil cu sindrom Down este de 10%. În schimb, în cazul prezenței unei translocații Robertsoniene t(21;21) riscul de recurență este total de 100%.

**Tabelul 9.8. Corelația între vârsta maternă în momentul concepției și riscul de sindrom Down la descendenți (după Hecht și Hook, 1994)**

Vârsta maternă (ani)	Prevalența sindromului Down la naștere	
	‰	1/ nn
20	0,65	1560
30	1,12	890
35	2,81	355
36	3,57	280
37	4,59	220
38	5,98	170
39	7,84	130
40	10,4	97
41	13,8	73
42	18,3	55
43	24,5	41
44	32,8	30
45	44,1	23

În cazul **altor aneuploidii viabile** (trisomiile 13, 18, 45,X, 47,XXY, 47,XYY și trisomia XXX) riscul de recurență este mai mic de 1%. În aceste cazuri, este indicată efectuarea analizei cromosomice prenatale mai mult din motive psihologice.

### **3.2. SFATUL GENETIC ÎN ANOMALIILE CROMOSOMICE STRUCTURALE ECHILIBRATE**

În anomaliile cromosomice echilibrate riscul purtătorului de a avea un descendent cu o monosomie și/sau trisomie parțială depinde de sexul purtătorului, cromosomii implicați și de tipul anomaliai. Deseori în cazul bărbaților purtători de anomaliai echilibrate între autosomi, se poate observa afectarea gametogenezei, ce poate merge până la blocarea ei. În schimb, meioza feminină este rareori afectată de existența lor.

#### **a. Translocațiile reciproce echilibrate**

În translocațiile reciproce echilibrate riscul purtătorului de a avea un descendent cu o anomalie cromosomică structurală neechilibrată este de circa **5-10%**, în funcție de sexul purtătorului, cromosomii implicați și de tipul anomaliai.

Majoritatea aneuploidiilor parțiale viabile (96%) conțin monosomii parțiale mai mici de 2% sau trisomii parțiale mai mici de 4% din materialul genetic al unui set haploid de cromosomi. Produșii de concepție cu anomaliai cromosomice parțiale mai severe sunt avortați. De aceea riscul unui purtător de translocații ca sarcina să se încheie prin avort spontan este de aproximativ **20-30%**. O situație particulară apare în cazul existenței unor translocații X-autosom. Jumătate dintre femeile purtătoare și toți bărbații purtători ai unei astfel de translocații sunt sterili. Femeile care sunt fertile prezintă un risc de **20-40%** de a avea descendenți anormali, cu formulă cromosomică neechilibrată.

#### **b. Translocațiile Robertsoniene**

În cazul translocațiilor Robertsoniene între cromosomul 21 și un alt cromosom prezente la unul dintre părinți, riscul de recurență este: <1% dacă anomalia este la tată și 10-12% dacă este prezentă la mamă; în translocațiile Robertsoniene între cromosomi 21 riscul de recurență este de 100%;

#### **c. Inversiile pericentrice**

Riscul general al unui pacient cu o inversie pericentrică de a avea un descendent cu anomalie cromosomică neechilibrată datorită recombinării intracromosomice este de circa 5-10%. Riscul de apariție al unui descendent anormal este direct proporțional cu lungimea fragmentului inversat și invers proporțional cu lungimea fragmentelor neinversate. Unele inversii, precum cele ale regiunii heterocromatiniene ale cromosomilor 1, 9, 16 sau Y sau inversiile inv(3)(p11-13;q11-12) inv(5)(p13;q13) și inv(10)(p11.2;q21.2) nu prezintă nici un risc pentru descendenți.

#### d. Inversiile paracentrice

Riscul este nul deoarece prin crossing-over la nivelul buclei de inversie rezultă gameți cu cromosomi acentrici sau dicentrici, neviabili.

#### e. Inserțiile

Inserțiile reprezintă rearanjamentele cromosomice cu cel mai mare risc de copii anormali. Riscul global în inserțiile intracromosomice este de **15%**, dar este posibil ca această cifră să reprezinte o subestimare. În situațiile în care fragmentul inserat este mare, există un risc crescut de recombinare la nivelul segmentului inserat, producții de concepție cu anomalii cromosomice neechilibrate sunt, de regulă, neviabili (avorturi spontane), iar riscul pentru descendenți anormali va fi de **0-5%**. În cazul în care inserția este de dimensiuni mici, producții de concepție cu trisomie parțială sunt viabili, iar cei cu monosomie parțială sunt neviabili, fiind avortați. Într-o astfel de situație riscul teoretic al unui purtător de inserție de a avea un copil afectat este de aproximativ 33%, în timp ce riscul practic este de **10-20%**.

## 4. RISCUL GENETIC ÎN BOLILE MONOGENICE

Calcularea riscului de recurență în bolile monogenice este, în principiu, o problemă simplă, în condițiile în care se cunosc principiile de transmitere mendeliene (vezi capitolul 5.D) și genotipurile persoanelor consultate. Totuși dacă nu se cunosc genotipurile lucrurile se complică fiind necesară aplicarea legilor probabilităților și teoremei Bayes.

Calcularea riscului genetic presupune cunoașterea unor elemente de calcul al probabilităților.

Un eveniment se poate realiza cu mai multe probabilități. De exemplu, un părinte heterozigot (AB) poate transmite la un copil fie gena „A” fie gena „B”; există deci două posibilități, dar numai una din ele se va realiza. Probabilitatea („p”) a evenimentului „A” este identică cu probabilitatea evenimentului „B” și egală cu ½ sau, mai general, probabilitatea de a se produce un eveniment este egală cu:

$$p = \frac{\text{numărul cazurilor favorabile } n}{\text{numărul cazurilor posibile } N} = \frac{n}{N}$$

Probabilitatea producerii unui eveniment este cuprinsă între 0 (imposibilitate) și 1 (certitudine).

Dacă un eveniment (transmiterea genei „A”, în exemplul de mai sus) nu se produce înseamnă că se realizează fenomenul contrar (transmiterea genei „B”), a cărui probabilitate „q” este:

$$q = \frac{\text{numărul cazurilor favorabile } N-n}{\text{numărul cazurilor posibile } N} = \frac{N-n}{N} = 1 - \frac{n}{N} \text{ sau } 1 - p$$

deci **q = 1 - p** sau altfel scris: **p + q = 1**; aceasta înseamnă că *probabilitatea tuturor evenimentelor este egală cu 1*.

Calculul probabilităților se bazează pe câteva teoreme și legea Hardy-Weinberg.

- **Teorema probabilităților compuse** (legea multiplicării): dacă pentru realizarea unui eveniment sunt *necesare* două sau mai multe evenimente independente, atunci probabilitatea acestui eveniment este egală cu *produsul* probabilităților individuale de producere ale fiecărui eveniment:  $p = p_1 \times p_2$

De exemplu, într-o boală recesiv autosomală, probabilitatea unui cuplu sănătos, neînruit, care provine din familii în care nu există cazuri de boală, de a avea un copil bolnav este egală cu produsul a trei probabilități:

- probabilitatea mamei de a fi heterozigotă, Na;
- probabilitatea tatălui de a fi heterozigot, Na;
- probabilitatea unui cuplu heterozigot de a avea un copil bolnav (relația 12.3.).

$$P_B = P_M \times P_T \times P_C = 2pq \times 2pq \times \frac{1}{4}$$

unde:  $P_B$  - probabilitatea copilului de a fi bolnav,  $P_M$  - probabilitatea mamei de a fi heterozigotă,  $P_T$  - probabilitatea tatălui de a fi heterozigot,  $P_C$  - probabilitatea unui cuplu heterozigot de a avea un copil afectat.  $P_T$  și  $P_M$  de a fi heterozigoți este  $2pq$  = frecvența heterozigoților în populație (conform legii Hardy-Weinberg) iar  $P_C = 1/4$ .

- **Teorema probabilităților totale** (legea adunării) : dacă un eveniment poate fi realizat prin două sau mai multe evenimente independente, atunci probabilitatea acestui eveniment este egală cu *suma* probabilităților de realizare a fiecăruia din evenimente ce-l pot realiza, produse independent unul de altul.

De exemplu, probabilitatea unui cuplu heterozigot (Na) pentru o boală recesiv autosomală de a avea un copil sănătos ( $P_{CS}$ ) este egală cu suma probabilității de a avea un copil sănătos homozigot ( $P_{NN}=1/4$ ) și a probabilității de a avea un copil sănătos heterozigot ( $P_{Na}=1/2$ ).

	N	a
N	NN	Na
a	Na	aa

$$P_{CS} = P_{NN} + P_{Na} = 1/4 + 2/4 = 3/4$$

- **Teorema probabilităților cauzei sau Teorema Bayes** ia în considerare toate posibilitățile sau evenimentele (*probabilitate condițională*) care modifică probabilitatea inițială (*probabilitate anterioară*) și permite calcularea unei probabilități corijate (*probabilitate posterioară*) pe baza acestor date. În felul acesta, în calcularea riscului actual se va ține cont de o serie de evenimente (condiții) ce pot interveni : penetranță incompletă, expresivitate variabilă (mai ales privind vârsta de debut), mutații *de novo* (în multe boli autosomal dominante sau legate de X), rezultatele unor teste orientative de laborator (de exemplu, dozarea CPK în bolile musculare), număr de copii neafecțați / afectați în familie, ș.a.

În cadrul teoremei Bayes sunt luate în calcul patru categorii de probabilități:

- **probabilitatea anterioară ( $P_A$ )** reprezintă probabilitatea inițială a unui eveniment și se calculează pe baza informațiilor “anterioare”, cum ar fi anamneza familială;
- **probabilitatea condițională ( $P_C$ )** reprezintă probabilitatea evenimentului în funcție de anumite condiții;
- **probabilitatea combinată sau unită** este produsul ( $P_A \times P_C$ ) dintre probabilitatea anterioară ( $P_A$ ) și probabilitatea condițională ( $P_C$ ) când cele două situații pot apărea împreună (sau suma lor, când cele două situații se exclud reciproc).
- **probabilitatea posterioară sau relativă ( $P_R$ )** reprezintă raportul dintre probabilitatea combinată a unui eveniment (de ex., de a fi bolnav) și suma tuturor probabilităților combinate ale tuturor posibilităților (de ex., de a fi bolnav și de a nu fi bolnav)

De exemplu, dacă notăm cu  $P_A$  probabilitatea anterioară de apariție a unui eveniment (de ex., de a fi bolnav), cu  $P_{(NA)}$  probabilitatea anterioară ca acel eveniment să nu apară (de ex., de a nu fi bolnav), cu  $P_C$  probabilitatea condițională ca un al doilea eveniment (de ex, prezența altor copii sau vârsta de manifestare) să fie asociat cu evenimentul luat în discuție (**A**) și cu  $P_{(NC)}$  probabilitatea condițională ca cel de al doilea eveniment să nu fie asociat cu evenimentul luat în discuție, atunci probabilitatea posterioară (**P<sub>R</sub>**) sau relativă de apariție a evenimentului luat în discuție (**a**), asociat cu cel de-al doilea eveniment este dată de relația:

$$P_P = \frac{P_A \times P_C}{[P_A \times P_C] + [P_{NA} \times P_{NC}]}$$

În ultimă instanță această formulă reprezintă raportul dintre numărul cazurilor „favorabile” – la numărător – și numărul total al cazurilor posibile, la numitor.

Aplicarea acestei formule (exemplificată în secțiunile următoare) devine puțin mai clară dacă se construiește un tabel Bayesian:

	Evenimentul A se produce	Evenimentul A nu se produce (NA)
Probabilitate Anterioară	$P_A$	$P_{NA}$
Condițională	$P_C$	$P_{NC}$
Combinată	$P_A \times P_C$	$P_{NA} \times P_{NC}$

Probabilitatea Posterioară	$P_p = \frac{P_A \times P_C}{[P_A \times P_C] + [P_{NA} \times P_{NC}]}$
-------------------------------	--

#### 4.1 SFATUL GENETIC ÎN BOLILE AUTOSOMAL DOMINANTE

Calcularea riscului de recurență a afecțiunii în bolile autosomal dominante este ușor de calculat în condițiile în care boala are *penetranță completă* și este lipsită de expresivitate variabilă. În aceste condiții riscul este următorul:

- un cuplu în care un părinte este bolnav heterozigot (An) iar celălalt sănătos (nn) are un risc de 1/2 de a avea un descendent afectat
- doi părinți bolnavi heterozigoți (An) au un risc de 3/4 de a avea un descendent afectat
- doi părinți sănătoși (nn) au un risc 0 de a avea un descendent afectat<sup>9</sup>

##### a). Boli dominante cu penetranță incompletă

În numeroase boli dominante a fost observat fenomenul de penetranță incompletă, caracterizat prin absența manifestărilor clinice la o parte dintre heterozigoți. Penetranța, notată P, reprezintă raportul dintre indivizii afectați de o boală dominantă și indivizii purtători ai genei anormale (AA + An), înmulțit cu 100 .

$$P = \frac{B}{AA + An} \times 100$$

Pentru bolile cu penetranță incompletă, la calcularea riscului de recurență a afecțiunii trebuie să se țină cont și de valoarea P. De exemplu, în cazul unui bolnav heterozigot (I1) cu o boală AD cu penetranță de 80% sau 0,8, căsătorit cu o femeie sănătoasă (I2), riscul de a avea un copil afectat (II1) va fi dat de produsul  $1/2 \times P = 1/2 \times 0.8 = 0,4$  (figura 9.14).

În condițiile în care un individ sănătos are un părinte afectat de o boală autosomală dominantă cu penetranță incompletă și dorește să afle riscul copiilor săi de a fi afectați, trebuie aplicată teorema Bayes (figura 9.15.).

Probabilitate	II.1. heterozigot	II.1. neheterozigot
Anterioară	1/2	1/2
Condițională - clinic normal	1-P	1
Unită/combinată	$1/2 \times (1-P)$	$1/2 \times 1 = 1/2$
Posterioară	$P_{II.1.An} = \frac{\frac{1}{2}(1-P)}{\frac{1}{2}(1-P) + \frac{1}{2}} = \frac{1-P}{2-P}$	

- Rezultă că probabilitatea individului II.1 de a fi heterozigot este (1-P)/(2-P)
- probabilitatea individului III.1. de a fi afectat poate fi determinată calculând produsul următoarelor probabilități: *probabilitatea relativă a individului II.1 de a fi heterozigot (An) ori probabilitatea individului III.1 de a moșteni gena A ori penetranța.*

$$P_{III.1.B} = \frac{\frac{1}{2}(1-P)}{\frac{1}{2}(1-P) + \frac{1}{2}} \times \frac{1}{2} \times P = \frac{1-P}{2-P} \times \frac{1}{2} \times P = \frac{P-P^2}{4-2P}$$

Folosind formula de mai sus și diferite grade de penetranță s-a calculat că riscul maxim al unui individ care are un bunic afectat de o boală AD cu penetranță redusă în condițiile în care tatăl (mama) este clinic sănătos, nu depășește valoarea de  $0,086 \approx 1/12$ .

##### b). Expresivitatea variabilă

<sup>9</sup> riscul real este egal cu rata mutației genei respective în populația generală, dar de obicei acest risc este nesemnificativ

O mare parte dintre maladiile dominant autosomale se caracterizează prin expresivitate variabilă, persoanele bolnave din familii diferite sau chiar din aceeași familie având un grad diferit de afectare. În aceste condiții, persoanele mediu afectate își pun problema care este riscul descendenților lor de a avea o formă gravă de afectare. Acest risc poate fi ușor de calculat în condițiile în care incidența în populație a formei severe de afectare este cunoscută. În această situație, se aplică următoarea formulă:

$$p = \frac{1}{2} \times \text{incidența (\%)}$$

**c). Boli autosomal dominante cu debut tardiv.**

Mai multe boli AD se caracterizează prin debut la vârste variabile în viața adultă (boala Huntington, ADPKD, hipercolesterolemia familială etc). Pentru boala Huntington au fost calculate probabilitatea manifestării bolii la diferite vârste și probabilitatea unui individ de a fi purtător de genă mutantă (heterozigot) dacă este clinic neafectat (tabelul 9.9).

**Tabelul 9.9 Riscuri aproximative la diferite vârste pentru persoane clinic neafectate de a fi heterozigoți pentru boala Huntington**

Vârsta (ani)	Probabilitatea detectării expresiei genice	Probabilitatea de a fi heterozigot dacă este clinic sănătos
20	0,02	0,49
25	0,05	0,48
30	0,1	0,47
35	0,2	0,44
40	0,3	0,41
45	0,35	0,39
50	0,5	0,33
55	0,65	0,26
60	0,75	0,20
65	0,85	0,13
70	0,95	0,05

De exemplu, un bărbat în vârstă de 60 de ani (II-1) are mama (I-1) decedată de boală Huntington. Probabilitatea sa inițială de a fi heterozigot este 50% sau 0,5; ea se modifică, conform teoremei Bayes, ținând cont de faptul că la 60 de ani este neafectat, astfel că probabilitatea posterioară de a fi heterozigot, în aceste condiții, este de 0,02.

	Pacientul este heterozigot normal	Pacientul este homozigot normal
Probabilitatea Anterioară	0,5	0,5
Condițională (sănătos la 60 ani)	0,25	1
Combinată	0,5 x 0,25 = 0,125	0,5 x 1 = 0,5
Probabilitatea posterioară	0,125 / (0,125+0,5) = 0,2	

**d. Boli autosomal dominante cu anticipație**

Într-o serie de afecțiuni dominant autosomale a fost evidențiat fenomenul de anticipație, caracterizat prin debutul mai precoce și existența unei forme de boală mai grave la descendenții unei persoane afectate. Majoritatea acestor afecțiuni sunt determinate de mutații dinamice, caracterizate prin amplificarea unor repetiții trinucleotidice în cursul meiozei indivizilor afectați, astfel încât descendenții lor moștenesc un număr sporit de repetiții.

Calcularea riscului în astfel de afecțiuni se poate realiza doar în mod empiric, deoarece la momentul actual nu există nici o metodă concretă de apreciere a riscului. De exemplu, în boala Huntington,

determinată de amplificarea unei secvențe CAG, au fost stabilite, pe baza datelor epidemiologice, următoarele corelații: 40 trinucleotide - vârstă de debut 56 ani; 45 trinucleotide - vârstă de debut 37 de ani; 50 trinucleotide - vârstă de debut 26 ani, dar totuși nu se pot face estimări exacte.

#### 4.2 SFATUL GENETIC ÎN BOLILE AUTOSOMAL RECESIVE

În general, calcularea riscului de recurență și acordarea sfatului genetic într-o afecțiune cu transmitere autosomal recesivă este relativ ușor de realizat, pe baza datelor din arborele genealogic și Legea Hardy-Weinberg, care permite calcularea frecvenței heterozigoților ( $2pq$ ) (vezi capitolul 7.A.2). Dacă, de exemplu, o boală are o frecvență populațională de 1 la 10.000, atunci  $q^2 = 1/10.000$ ,  $q = 1/100$  iar  $2pq = 2 \times 99/100 \times 1/100 \approx 1/50$

În condițiile în care copilul afectat al unui cuplu sănătos (figura 9.16) este homozigot **aa**, cei doi părinți sunt obligatoriu heterozigoți **Na**. Riscul lor de a avea un alt copil afectat este de  $1/4$  iar probabilitatea fiecărui descendent sănătos al cuplului de a fi heterozigot **Na** este de  $2/3$ .

O situație frecvent întâlnită în cazul acordării sfatului genetic este aceea în care medicul trebuie să calculeze riscul unui descendent cu o boală autosomal recesivă în cazul căsătoriei între un individ care provine dintr-o familie afectată și o persoană provenind din populația generală. Condiția obligatorie ca doi indivizi sănătoși să aibă un copil afectat de o boală autosomal recesivă este ca ambii membri ai cuplului să fie heterozigoți. Pentru individul care provine din populația generală, probabilitatea acestuia de a fi heterozigot este de  $2pq$  sau  $2 \times$  radical din frecvența bolii. În cazul persoanei care provine din familia în care există cazuri de boală, calcularea probabilității de a fi heterozigot depinde de gradul de înrudire cu individul afectat (figura 9.17, tabelul 9.10). În aceste condiții calcularea riscului de recurență al bolii se poate face simplu folosind produsul probabilităților. De exemplu, dacă luăm în considerare un cuplu (figura 9.18) în care fratele soțului (II.1) este afectat de fenilcetonurie, iar soția (II.3) provine din populația generală – în care frecvența bolii este de  $1/10.000$ , iar frecvența heterozigoților este  $1/50$  – riscul acestui cuplu de a avea un copil (III.1) afectat este:  $P_{III-1} = P_{M(Na)} \times P_{T(Na)} \times 1/4 = 1/50 \times 2/3 \times 1/4 = 1/300$

**Tabelul 9.10. Probabilitatea de a fi heterozigot Na a rudelor unui individ bolnav**

**aa**

Relație	Na
Părinți, copii	1
Frate - soră	$2/3$
Bunici, unchi, mătuși, nepoți de la copii	$1/2$
Nepoți de la frate sau soră	$1/3$
Verișori primari	$1/4$
Copiii verișorilor primari	$1/8$

O altă situație particulară apare atunci când un individ afectat de o boală recesivă autosomală dorește să afle riscul de a avea descendenți afectați (aa). În acest caz, riscul se calculează în felul următor:  $P_{C(aa)} = P_{T(a)} \times P_{M(a)} = 1 \times 1/2 P_{M(Na)}$ .

În cazul bolilor cu transmitere autosomal recesivă riscul de recurență a bolii crește la cuplurile consanguine, deoarece cei doi membri ai cuplului posedă o serie de alele identice (inclusiv gene mutante), moștenite de la un strămoș comun. De aceea ei au o probabilitate crescută de a transmite gena mutantă la descendenți, care vor fi homozigoți **aa** afectați. De



exemplu, în cazul căsătoriei între doi veri primari, care au avut un bunic afectat de o boală autosomală recesivă, riscul de recurență al bolii la descendenți este de 1/16 (figura 9.19.).

#### 4.3 SFATUL GENETIC ÎN BOLILE RECESIVE LEGATE DE X

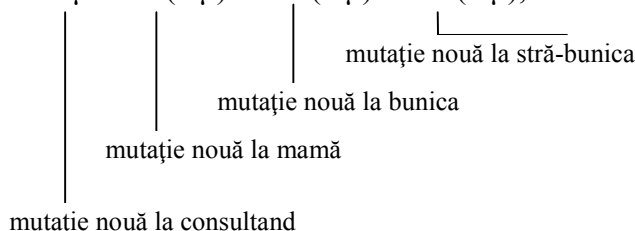
În bolile recesive cu transmitere legată de cromosomul X se pun mai multe probleme, funcție de rata mutațiilor, de numărul bolnavilor, al copiilor sănătoși și, eventual, a unor teste disponibile pentru a stabili (cu un anumit grad de relativitate) starea de purtător. Ele pot fi rezolvate adecvat recurând la teorema Bayes.

##### a. Probabilitatea ca orice femeie să fie purtătoare a unei gene mutante legate de X.

Orice femeie are o probabilitate inițială (anterioară) egală cu  $4\mu$  de a fi purtătoarea unei boli recesive legate de X (cu fitness zero la bărbați) (unde  $\mu$  este frecvența mutațiilor noi pe cromosomul X patern). Valoarea  $4\mu$  a fost calculată astfel:

femeia ar fi purtătoare dacă moștenește o mutație nouă pe cromozomul X patern ( $\nu$ ) sau dacă moștenește o mutație o mutație nouă pe cromozomul X matern ( $\mu$ ). Dacă acceptăm o rată egală a mutațiilor la bărbați și la femei (ambele reprezentate prin  $\mu$ ), fiecare femeie are un risc de 1/2 din riscul mamei, plus suma ratei mutației la bărbați ( $\mu$ ) și femei ( $\nu$ ) sau  $2\mu$  (deoarece  $\mu = \nu$ ). Aceasta conduce la formularea unei serii infinite în care riscul va deveni  $4\mu$ :

$$\text{Risc} = 2\mu + 1/2(2\mu) + 1/4(2\mu) + 1/8(2\mu), \text{ etc.}$$



Această serie poate fi re-aranjată plasând  $2\mu$  înafara parantezelor:  $2\mu(1+1/2+1/4+1/8+\dots)$ , relație care, după un număr infinit de generații, devine  $2\mu(2)$ , adică  $4\mu$ .

##### b) Probabilitatea ca mama unui caz izolat să fie purtătoare

Se poate calcula aplicând teorema Bayes

	Ipoteza I Mama purtătoare	Ipoteza II Mama nepurtătoare
Probabilitate anterioară (inițială)	$4\mu$	$1 - 4\mu \approx 1$
condițională	$\frac{1}{2}$	$\mu$
combinată (unită)	$4\mu \times \frac{1}{2} = 2\mu$	$1 \times \mu = \mu$
Probabilitate posterioară (relativă)	$\frac{2\mu}{2\mu + \mu} = \frac{2}{3}$	$\frac{\mu}{2\mu + \mu} = \frac{1}{3}$

În funcție de probabilitatea  $2/3$  a mamei de a fi purtătoare se poate calcula probabilitatea altor femei din familie (figura 9.20) de a fi heterozigote.

##### c. Probabilitatea unei femei de a fi heterozigotă dacă are mai mulți copii neafecțați

O femeie (III2) a cărui frate (III3) și unchi matern (II3) sunt afectați de distrofie musculară Duchenne, dorește să afle riscul de a avea un băiat bolnav (IV4) în condițiile în care are deja trei băieți sănătoși (IV1, 2, 3) (figura 9.21)

În această situație, dacă facem abstracție de cei trei băieți sănătoși ai consultantei, riscul ei de a avea un băiat bolnav ar fi de 1/4, deoarece probabilitatea inițială (anterioară) a femeii de a fi heterozigotă este de 1/2, iar probabilitatea ei de a transmite gena anormală la

băieți este de asemenea  $1/2$  (relația 12.5.). Pentru a afla care este probabilitatea reală (posterioră) a femeii de a fi heterozigotă, având deja trei copii sănătoși (probabilitate condițională), aplicăm teorema Bayes:

	III-3 este heterozigotă	III-3 nu este heterozigotă
probabilitatea anterioară condițională (3 copii sănătoși) combinată	$1/2$ $1/2 \times 1/2 \times 1/2 = 1/8$ $1/2 \times 1/8 = 1/16$	$1/2$ $1 \times 1 \times 1 = 1$ $1/2 \times 1 = 1/2$
Probabilitate Posterioră	$1/2 \times 1/8 / (1/2 \times 1/8) + (1/2 \times 1) = 1/9$	

Ținând cont de această probabilitate posterioră (relativă), rezultă că riscul copilului de IV4 de a fi afectat este  $1/2 \times 1/9 = 1/18$ , mult mai mic decât cel de  $1/4$  obținut fără a ține cont de datele suplimentare furnizate de analiza arborelui genealogic.

#### d. Probabilitatea unei femei de a fi heterozigotă pentru o boală recesivă legată de X în familiile în care există mai mulți bolnavi

În familiile în care există mai multe cazuri de boală recesivă legată de X riscul unei femei de a fi heterozigotă se poate calcula de asemenea cu ajutorul teoriei Bayes, funcție de probabilitatea mamei sale de a fi purtătoare. Examinând figura 9.22 (a), se observă că probabilitatea femeii III.4. de a fi heterozigotă, știind că mama ei este cert heterozigotă, este de  $1/2$ . Pentru arborele genealogic din figura 9.24 (b), fără a aplica teorema Bayes, se observă că persoana III.4. are o probabilitate de  $1/4$  de a fi heterozigotă, știind că bunica sa maternă este cert heterozigotă iar mama ei (II-4) are o probabilitate de  $1/2$  de a fi heterozigotă. Trebuie însă să luăm în considerare faptul că femeia II.2. are trei băieți sănătoși și să aplicăm teorema Bayes

	Ipoteza I Femeia II.2. purtătoare	Ipoteza II Femeia II.2. nepurtătoare
Probabilitate anterioară condițională combinată	$1/2$ $(1/2)^3 = 1/8$ $1/2 \times 1/8 = 1/16$	$1/2$ $1$ $1/2 \times 1 = 1/2$
Probabilitate posterioră	$\frac{1/16}{1/16 + 1/2} = \frac{1/16}{9/16} = \frac{1}{9}$	

Se poate observa că în aceste condiții probabilitatea femeii II.2. de a fi purtătoare este de  $1/9$  ( $\approx 11\%$ ), iar cea a fiicei sale de  $1/9 \times 1/2 = 1/18$  ( $\approx 5,5\%$ ), mult mai mică decât cea de  $1/4$  ( $25\%$ ) obținută făcând abstracție de faptul că mama sa a născut 3 băieți sănătoși.

## 5. RISCUL GENETIC ÎN BOLILE MULTIFACTORIALE

Bolile multifactoriale au un determinism mixt, genetic și ecologic, dar mecanismul patogenic nu este încă descifrat. Participarea unor factori genetici (vezi capitolul 5.E.2.) implică un risc de recurență care însă nu poate fi calculat. De aceea evaluarea riscului se bazează pe *date empirice*, rezultate din studii populaționale, pe un număr mare de familii în care există unul sau mai mulți bolnavi. În aceste condiții, pentru acordarea sfatului genetic în bolile multifactoriale (anomalii congenitale, unele boli comune ale adultului) trebuie respectate o serie de principii generale.

- Riscul empiric reprezintă *un risc mediu* pentru boala respectivă în populația din care face parte probandul și astfel acest risc este posibil ca în familia studiată riscul mediu să nu fie identic cu cel real;

- În general, riscul empiric de recurență în fratrie sau descendență pentru malformațiile congenitale izolate, cu o frecvență  $\geq$  de 1 la 1000 nou-născuți, este de circa 2-5%; pentru bolile comune, cu o frecvență  $\geq$  de 1 la 100, riscul este de circa 10%.
- Riscul de recurență al afecțiunii este influențat de o serie de factori:
  - *Gradul de rudenie cu probandul.* Riscul de recurență la rudele de gradul I este mult mai mare decât la alte persoane din familie; de exemplu, descendenții și frații unui proband cu despicătură labială<sup>10</sup> au un risc de 3,15 și respectiv 2,79; rudele de gradul doi și trei au riscuri mult mai mici, de 0,47 % și respectiv 0,27%.
  - *Prezența unei forme mai severe de boală la proband.* Dacă probandul are o despicătură labială unilaterală riscul la frați este 1,9%; el crește la 6,6% dacă probandul are o despicătură labială și palatină bilaterală.
  - *Prezența în familie a mai multor indivizi afectați.* În cazul despicăturilor labiale dacă sunt afectați doi frați riscul la următoarea naștere este de 10%; dacă sunt afectați un părinte și un copil atunci riscul pentru un alt copil afectat este circa 14%.
  - *Sexul probandului.* Riscul crește dacă în familie există bolnavi de un anumit sex la care boala respectivă este, în mod normal, mai puțin frecventă (de exemplu, luxația congenitală de șold la băieți și stenoza pilorică la fete);
  - *Există căsătorii consanguine.*
- În cazul în care pentru anumite boli multifactoriale nu există informații privind riscul empiric pentru o populație dată<sup>11</sup> se poate recurge la riscurile calculate în tabelul 9. 11 pe baza frecvenței în populație și a heritabilității afecțiunii respective, precum și a numărului de persoane afectate (aceste date și multe altele se găsesc în programul computerizat RISKMF, elaborat de Charles Smith, 1972). De exemplu dacă din anamneza familială a unui consultand rezultă că unul din părinți și un frate au schizofrenie (frecvența în populație 1%, heritabilitate 80%) atunci riscul său este 18,7%.

**Tabelul 9.11 Riscuri de recurență în boli multifactoriale (după Smith, 1972)**

Frecvența în populație (%)	Heritabilitate (%)	Părinți afectați								
		0			1			2		
		Frați afectați								
		0	1	2	0	1	2	0	1	2
1,0	80	0,9	6,7	14,6	8,5	18,7	27,9	40,3	45,9	50,6
	60	1,0	4,9	10,6	5,7	12,3	19,2	21,7	28,3	34,1
	40	1,0	3,3	6,5	3,5	7,0	1,2	9,7	14,1	18,7
0,5	80	0,5	5,1	12,3	6,2	15,5	24,3	37,6	43,2	47,9
	60	0,5	3,4	8,4	3,8	9,5	15,8	18,1	24,4	30,0
	40	0,5	2,1	4,7	2,2	4,9	8,3	7,0	10,8	14,9
0,1	80	0,1	2,6	8,4	2,9	9,8	17,6	30,4	36,7	41,2
	60	0,1	1,5	4,6	1,5	5,0	9,6	11,5	17,1	22,2
	40	0,1	0,7	0,7	0,7	2,2	4,2	3,6	6,0	8,7

Tabelul este util mai ales atunci când în familie sunt prezente mai multe persoane afectate. De remarcat însă faptul că în tabel nu se iau în calcul rudele afectate de gradul doi sau trei; se admite că două rude afectate de gradul doi sau mai multe rude afectate de gradul trei vor fi echivalente cu o rudă afectată de gradul unu. Dacă în familie este prezentă o singură persoană afectată, de gradul unu ( $I_1$ ), doi ( $I_2$ ) sau trei ( $I_3$ ) riscul poate fi estimat folosind formulele elaborate de Edwards (1976):  $I_1 = P^{1/2}$ ,  $I_2 = P^{3/4}$ ,  $I_3 = P^{7/8}$

## D. SERVICIILE DE GENETICĂ CLINICĂ

### 1. DEFINIȚIE

<sup>10</sup> Datele folosite ca exemplificare provin din studiul familial al despicăturii labiale±palatine efectuate de Carter et al, 1982.

<sup>11</sup> Pentru unele afecțiuni, ca de exemplu defectele de tub neural, există variații geografice și temporale importante ale riscului empiric

Serviciile de genetică sunt servicii medicale *specializate* pentru a ajuta (medical și psihologic) *pacienții* cu boli genetice sau anomalii congenitale (indiferent de cauză) precum și *famiile* lor „...să trăiască și să se reproducă cât mai normal posibil” (OMS,1985,1996).

- Patologia genetică și malformativă poate afecta *orice sistem de organe*, se manifestă la *orice vârstă* și necesită *teste speciale* de diagnostic, complet diferite de alte analize de laborator clinic. Aceste trei caracteristici determină complexitatea serviciilor de genetică medicală și necesitatea unei *echipe multidisciplinare* de profesioniști, cadre medicale sau non-medicale, care să acționeze *coordonat* pentru îngrijirea și prevenția lor.
- Implicarea *familiei* este generată de natura ereditară a factorilor de boală, care trebuie evaluați la rudele bolnavului, eventual în mai multe generații. Deoarece patologia genetică poate avea consecințe asupra întregii familii, în cadrul serviciilor de genetică *unitatea de studiu este familia*.

În funcție de natura și obiectivele lor, serviciile de genetică pot fi axate pe bolnavi și familiile lor (servicii de genetică clinică) sau pe întreaga populație (servicii de genetică comunitară sau de sănătate publică).

## 2. OBIECTIVE

**Serviciile de genetică clinică**, bazate pe indivizi/familie, au următoarele obiective:

- rezolvarea problemelor medicale (diagnostic, îngrijire, sfat genetic) și psihologice ale bolnavilor și familiilor lor;
- Identificarea și supravegherea indivizilor și/sau familiilor cu risc genetic crescut cu scopul de a crește șansele unor descendenți sănătoși;
- Evaluarea riscului ca unele persoane sănătoase să dezvolte o boală monogenică cu debut tardiv sau o afecțiune multifactorială cu predispoziție genetică.

**Serviciile de genetică comunitară**, axate pe întreaga populație și/sau subgrupe de risc (de exemplu, grupe etnice), urmăresc *profilaxia primară* (evitarea cauzelor), *secundară* (depistarea precoce) și *terțiară* (reducerea consecințelor, prevenirea complicațiilor) a bolilor genetice și anomaliilor congenitale la nivel populațional (vezi capitolul 18). În acest scop se folosesc **programe** de sănătate publică axate pe: screeningul și urmărirea prenatală și neonatală, identificarea precoce, monitorizarea și urmărirea defectelor congenitale, serviciile de informare (educație) și evaluare a teratogenilor, screening-ul populațiilor selecționate.

## 3. ORGANIZARE<sup>12</sup>

Organizarea eficientă a serviciilor de genetică medicală trebuie să se bazeze pe trei principii: *prioritate, regionalizare și integrare*. Înființarea și dezvoltarea unor servicii de genetică medicală în România este o *prioritate* absolută, ținând cont de ponderea și consecințele patologiei genetice (vezi capitolul 8.C.3) precum și de situația actuală.

Soluția optimă – recomandată de OMS și Societatea Europeană de Genetică umană – este o *rețea națională* de Centre regionale de genetică medicală – unități terțiare – și Cabinete de genetică medicală satelite (în spitalele județene) – unități secundare – conectate cu unitățile de asistență primară, medicii de familie, baza rețelei. Cu alte cuvinte, activitățile de genetică medicală vor fi organizate, într-o *manieră ierarhizată și coordonată*, la toate cele trei niveluri de asistență medicală, pentru a profita la maximum de resursele existente. Realizarea unor legături bidirecționale, în trepte, între cele trei niveluri de asistență genetică este decisivă pentru eficiența lor.

Această schemă de organizare a serviciilor de genetică medicală – rezultată prin analizele efectuate de către experți, la nivel European – mai prevede două elemente: *integrarea* serviciilor de genetică cu alte servicii înrudite (asistență preconcepțională, prenatală, neonatală, servicii speciale dedicate anumitor

---

<sup>12</sup> Datele sintetice prezentate în această secțiune se bazează pe Recomandările Societății Europene de Genetică Umană „*Provision of genetic services in Europe – current practices and issues*” (2001)

boli) și înființarea unor unități naționale speciale de diagnostic sau îngrijire a unor anumite categorii de bolnavi. ; acreditarea CGM și coordonarea lor va fi asigurată de un Consiliu Național.

**Centrele de genetică medicală (CGM)** trebuie să fie unități *integrate* într-un mare spital (centru terțiar), care să permită colaborări interclinice de mare calitate, explorări clinice și paraclinice complete; ele trebuie să fie dotate cu *capacități proprii* de explorare la nivel cromosomic, biochimic, molecular.

Fiecare Centru va acoperi o regiune definită, de 1,5–3 milioane de locuitori. Numărul de medici geneticieni va fi de 2-3 la 1 milion de locuitori, iar staff-ul de laborator (deobicei ne-medical) de 4 la 1 milion. La această echipă se vor adăuga alte cadre superioare și medii, *medicale și nonmedicale* (psihologi, asistenți de genetică, asistenți sociali, informaticieni, etc). Nu în ultimul rând, CGM trebuie să aibă o logistică solidă, resurse bioinformaticice și comunicații, o bibliotecă cuprinzătoare.

Furnizarea de servicii medicale genetice de calitate (consult, explorare, sfat genetic) se va face de către cadre specializate, pe baza unor *ghiduri clinice sau protocoale de laborator standard* pentru cea mai bună practică, disponibile pe web-site-uri. Va funcționa un *control de calitate*, intern și extern, pentru clinică și laboratoare, precum și un sistem eficient de *educație medicală continuă*.

Aceste reguli profesionale vor fi obligatoriu dublate de o *acoperire financiară* adecvată, de către MSF și Casele de asigurări de sănătate. CGM trebuie să posede toate resursele necesare unui diagnostic de calitate, decisiv pentru îngrijirea bolnavului și familiei. Consultul și sfatul genetic pare scump, consumator de timp iar testele genetice sunt foarte scumpe. Totuși, deoarece un individ sau familie nu au prea des nevoie de servicii genetice (testele genetice se fac « *o dată în viață* ») iar beneficiile pe termen lung sub aspectul diagnosticului corect (care elimină alte explorări), prevenției și tratamentului adecvat sunt importante, sfatul genetic este în ansamblu economic și eficient.

### 3. FUNCȚII

#### a) Consultații genetice.

Serviciile de genetică clinică se ocupă deobicei cu diagnosticul clinic, paraclinic și genetic în bolile monogenice, anomaliile cromosomice, sindroamele plurimalformative cu sau fără retard mintal, tulburările de reproducere; mai recent, grație tehnicilor noi de genetică moleculară, au apărut noi preocupări: testele predictive pentru *bolile neurogenetice și* cancerelor ereditare/familiale; deși aceste canceruri reprezintă o mică parte din toate cancerurile ele reprezintă un număr considerabil de cazuri în comparație cu bolile rare văzute de obicei de medicii geneticieni.

Deoarece bolile genetice sunt foarte numeroase iar diagnosticul lor este deseori dificil, singura cale de a acorda servicii corecte este de a perfecționa experiența specialiștilor de genetică clinică și sindromologie, de a cunoaște utilizarea perfectă a bazelor de date specializate accesibile pe Internet sau CD-ROM și de a consulta alți specialiști, folosind poșta electronică sau, în viitor, teleconsultațiile.

#### b) Informare și sfat genetic

Acordarea sfatului genetic este o caracteristică definitorie a serviciilor de genetică clinică și o componentă obligatorie a evaluării genetice.

Acest proces, implică o încercare de a ajuta individul sau familia de:

- a înțelege faptele medicale, inclusiv diagnosticul, evoluția probabilă a bolii și posibilitățile de îngrijire;
- a aprecia cum contribuie factorii genetici la producerea bolii și care este riscul de recurență la rudele bolnavului;
- a înțelege opțiunile reproductive corelate cu acest risc de recurență;
- a alege acțiunile care sunt corespunzătoare pentru ei în raport cu mărimea riscului, scopurile familiei și a acționa în concordanță cu această decizie informată;
- a face tot ce este posibil pentru corectarea afecțiunii și/sau reducerea riscului ei (Evers-Kebooms, 2000)

Problemele tehnice și etice ale sfatului genetic au fost discutate în secțiunea precedentă; vom sublinia doar necesitatea unui limbaj adecvat, discuții repetate și, în final, *o informare scrisă*.

Pacienților li se va facilita *accesul la alte materiale informative* despre boală, precum și la *grupurile de sprijin*.

#### **c). Diagnostic prenatal (DPN)**

DPN a devenit o activitate constantă a serviciilor de genetică din următoarele rațiuni :

- în condițiile extensiei evaluării ultrasonografice a fătului în practica medicală este necesară *interpretarea datelor prenatale* (« semne de alarmă ») care pot reflecta o boală genetică sau un defect sever de altă natură;
- DPN este recomandat familiilor cu risc genetic crescut de boli genetice care pot fi detectate antenatal; testele de DPN trebuie însă precedate de un sfat genetic adecvat, preferabil înaintea unei noi sarcini, ocazie cu care se vor discuta toate opțiunile reproductive, riscurile și incertitudinile DPN.
- Dacă este diagnosticată prenatal o boală genetică, familia are opțiunea de a continua sau nu sarcina ; în prima situație se vor lua măsuri adecvate de urmărire a sarcinii și asistență specială a nou născutului; în a doua situație, după întreruperea sarcinii și analiza fătului se vor discuta cu familia riscurile de recurență și opțiunile posibile.

#### **d). Testare genetică**

Fără a intra acum în detalii (vezi capitolul 18) vom preciza că dezvoltarea metodelor de diagnostic molecular a permis introducerea în practica medicală a *testării presimptomatice* – pentru boli ce se debutează mai târziu în cursul vieții (un test anormal indică dezvoltarea aproape invariabilă a bolii, la o anumită vârstă), precum și a *testării predictive* - termen ce are un sens mai larg, referindu-se la situații în care riscul de boală este crescut, fără a implica un grad de certitudine. Ambele testări dau informații asupra *statusului viitor de sănătate al unei persoane sănătoase*.

#### **e). Alte activități**

- Asigurarea unei *asistențe efective, continue și anticipative* a bolnavilor și a persoanelor sănătoase cu risc;
- *Păstrarea* corectă și confidențială a datelor genetice ale pacienților (fișe de consult genetic, buletine de analize, protocoale de îngrijire, buletine de sfat genetic);
- Realizarea de *Registre genetice* pentru anomalii congenitale sau pentru anumite boli ereditare frecvente (vezi capitolul 18);
- *Formarea de specialiști* în genetică medicală și educația medicală continuă;
- *Educarea genetică* a studenților, medicilor de familie, altor specialiști, asistentelor medicale sau personalului non-medical;
- Unele programe de genetică comunitară;
- Cercetare;
- Monitorizarea continuă a eficienței și calității serviciilor clinice și de laborator.

### **4. PRINCIPII ETICE**

Din punct de vedere etic, activitățile serviciilor de genetică vor fi bazate pe principiul *autodeterminării persoanei interesate* ; orice test genetic, inclusiv testele genetice sistematice, nu se vor face fără un *consimțământ liber și informat* ; nu se va pune nici-o condiție pentru acceptarea sau efectuarea testelor genetice. O atenție specială se va acorda testării minorilor și persoanelor cu retard mintal, la care investigația va fi permisă numai atunci când este necesară pentru sănătatea lor sau dacă informațiile sunt absolut necesare pentru diagnosticul unei boli genetice la membrii familiei lor.

Famiile vor decide singure dacă doresc sau nu sfat genetic și vor alege liber unde să meargă pentru sfat. *Caracterul non-direcțional* al sfatului genetic va fi o regulă generală.

*Confidențialitatea* are o importanță decisivă și pacienții vor trebui să fie întrebați dacă sunt de acord ca rezultatele testelor lor să fie făcute cunoscute și de alți membri ai familiei, explicându-le că transmiterea acestor informații este spre binele tuturor. Oricum se va garanta *confidențialitatea pentru familie mai curând decât pentru individ* (ținând cont de caracterul familial al bolilor genetice).

### **INTERNET**

1. Alliance of Genetic Support Groups: <http://www.geneticalliance.org>
2. HELIX.University of Washington, Children's Hospital and Medical Care - sfat și teste genetice: <http://www.healthlinks.washington.edu/helix/>

3. Genealogie *online*: <http://www.genealogy.org>
4. Geneclinics (<http://geneclinics.org>)
5. Genetic Interest Group (GIG) – alianță națională (UK) a peste 120 de organizații de sprijin a persoanelor cu diferite boli genetice: <http://www.gig.org.uk>
6. LDDDB (<http://www.hgmp.mrc.ac.uk/DHMHD/lddb.html>)
7. MEDLINE/PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>
8. National Organization for Rare Disorders (NORD): <http://www.pcnet.com/~orphan/>
9. OMIM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
10. Orphanet (<http://orphanet.infobiogen.fr>)
11. POSSUM (<http://possum.net.au/>)
12. Program Australian ce prezintă informații privind construcția unui arbore genealogic: <http://www.genetics.com.au/fhtg.htm>

### **Bibliografie specifică selectivă**

1. Bates B. – *A guide to physical examination* – 3<sup>rd</sup> ed. Lippincott, Philadelphia, 1983
2. Bennett RL, Steinhaus KA, Uhrich SR et al. – *Recommendations for standardized human pedigree nomenclature* – Am.J.HumGenet. 1995;56:745-752
3. Bennett RL – *The practical guide to the genetic family history* – Wiley-Liss, New York, 1999
4. Baker DL, Schuette JL, Uhlmann WR. – *A guide to genetic counseling* - Wiley-Liss, 1998, New York
5. Burke W. (2002) – *Genetic testing* – N. Engl. J. Med., 347: 1867-1875.
6. Evans CD. – *Computers system in dysmorphology* – Clin. Dysmorphol 1995; 4: 185-201
7. Genetic Interest Group – *Guidelines for genetic services* – London, 1998
8. Hall BD. – *State of the art of dysmorphology* – Am.J.Dis.Child 1993; 147:1184-1189
9. Harris R., Reid M. - *Medical Genetic Services in 31 countries: on overview + Europ.J.Hum.Genet.* 1997; 5 (suppl.2) 3-21.
10. Powell SM, Petersen GM, Krush AJ, Booker S, Jen J. – *Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis* – N. Engl. J. Med., 1993; 329:1982-1987;
11. Pyeritz RE. – *Family history and genetic risk factors. Forward to the future* . JAMA, 1997;278:1284-1285
12. Royal College of Physicians – *Clinical genetics services into 21<sup>st</sup> century* – London, 1996.
13. Royal College of Physicians – *Clinical genetics services :activity, outcome, effectiveness and quality* – London, 1998.
14. Slaney, S. F. Wilkie, A. O. M., Hirst, M. C. Charlton, R. McKinley, M. Pointon, J. Christodoulou, Z. Huson, S. M. Davies, K. E. – *DNA testing for fragile X syndrome in schools for learning difficulties* – Arch.Dis.Child. 1995; 72: 33-37.
15. Stromme / *The diagnostic of syndromes by use of a dysmorphology databas* – Acta Paediatr Scand 1991; 80: 106-109
16. WHO/WAOPAD – *Services for the Prevention and Management of Genetic Disorders and Birth Defects in Developing Countries* - Report of a joint WHO/WAOPBD meeting The Hague, 5-7 January 1999.
17. Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN – *An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms* – Nucleic Acids Res.,2001;29:E88-89.



## CAPITOLUL 10

# BOLILE CROMOSOMICE

Anomaliile cromosomice constituționale pot sau nu să producă un dezechilibru genetic și în funcție de acest efect consecințele lor fenotipice sunt diferite (vezi capitolul 6.C).

- Anomaliile de număr sau structură *neechilibrate* determină un fenotip anormal al embrionului, care cel mai frecvent este letal, produsul de concepție eliminându-se ca avort spontan sau nou născut mort. Numai 1 la 250 de nou născuți vii au trisomii sau monosomii, complete sau parțiale, care produc anomalii fenotipice caracteristice unor sindroame cromosomice specifice; anomaliile autosomale sunt mai grave decât cele gonosomale, manifestându-se prin tulburări de creștere, retard mintal, anomalii somatice (majore și/sau minore); anomaliile cromosomilor sexuali produc în special disgezii gonadice.
- Anomaliile de structură *echilibrate* deși în marea lor majoritate nu modifică fenotipul purtătorului pot produce tulburări de reproducere, fie prin blocarea gametogenezei fie prin producerea unor gameți anormali.

Numeroase studii epidemiologice au demonstrat că anomaliile cromosomice reprezintă o cauză majoră de morbiditate și mortalitate și de tulburări de reproducere (vezi tabelul 6.6 capitolul 6.C.3). Medicii din numeroase specialități vor fi confrunțați cu patologia cromosomică și de aceea ei trebuie să cunoască reperele fenotipice majore care „pot semnaliza” acest tip de patologie, precum și situațiile concrete în care ar trebui să recomande o analiză cromosomică, prenatală sau postnatală (vezi capitolul 9.B.1).

## A. BOLI CROMOSOMICE AUTOSOMALE.

Bolile cromosomice produse prin anomalii neechilibrate ale autosomilor sunt numeroase (peste 100 de entități). Există numai trei anomalii *complete și omogene* compatibile cu supraviețuirea: trisomia 21 (sindromul Down), trisomia 18 (sindromul Edwards) și trisomia 13 (sindromul Patau); alte trisomii autosomale sunt rare și se găsesc în mozaic. Anomaliile de structură neechilibrate produc trisomii și monosomii *parțiale* dintre care vom semnaliza în special sindromul velo-cardio-facial (del 22q11) considerat al doilea ca frecvență după sindromul Down.

Înainte de a descrie succint principalele entități clinice (detalii puteți găsi pe internet) vom preciza câteva idei:

- anomaliile fenotipice caracteristice fiecărei afecțiuni sunt determinate de *anomalii de dozaj ale unor gene specifice* situate pe cromosomii/segmentele cromosomice implicate; pentru moment se cunosc puține date despre aceste gene dar cu siguranță ele vor apărea în viitorul apropiat schimbând probabil substanțial modul de abordare a acestor afecțiuni;
- dezechilibrul genetic, indiferent de tip, determină o serie de „*semne comune*” (Opitz, 1981): tulburări de creștere prenatală și postnatală, dismorfie facială și, frecvent, anomalii congenitale majore multiple, displazii, dermatoglife anormale, alterări ale structurii și funcției SNC (retard mintal), tulburări ale funcției gonadale; cunoașterea lor poate orienta un diagnostic spre categoria „boli cromosomice”.
- gravitatea afectării fenotipice depinde de mai mulți factori: mărimea dezechilibrului genetic; tipul de anomalie cromosomică; conținutul genic și cantitatea de eucromatină / heterocromatină a cromosomului implica; numărul celulelor afectate (aneuploidii omogene sau în mozaic)(vezi capitolul 6.C.2).



- deși bolile cromosomice sunt incurabile iar posibilitățile de profilaxie limitate, există totuși multiple acțiuni care pot ameliora îngrijirea bolnavilor precum și depistarea prenatală precoce.

## 1. TRISOMIILE AUTOSOMALE

### 1.1. SINDROMUL DOWN SAU TRISOMIA 21

Sindromul Down sau trisomia 21 este cea mai frecventă și cea mai bine cunoscută boală cromosomică. A fost descrisă clinic de John Langdon Down în 1866 dar, abia în 1959, Jerome Lejeune și colaboratorii au stabilit că afecțiunea este produsă de trisomia 21.

**Incidența** trisomiei 21 a fost estimată la 1:650 – 1:800 nou-născuți vii (prevalența globală este – după Bray et al, 1998 – de 1,42 la 1000 (1/704); frecvența produșilor de concepție cu trisomie 21 este însă mult mai mare (1 la 200) dar circa  $\frac{3}{4}$  sunt eliminați ca avorturi spontane. Boala este mai frecventă la copiii de sex masculin, raportul sexelor fiind de 3 băieți la 2 fete.

**Simptomatologia** clinică diferă în funcție de vârsta la care este examinat pacientul. De obicei sindromul Down este diagnosticat clinic („gestalat”) în perioada neonatală sau la sugar datorită dismorfiilor evocatoare, care, deși variază la diferiți pacienți, realizează un aspect fenotipic caracteristic<sup>1</sup> („...dacă ai văzut un copil cu sindromul Down i-ai văzut pe toți”).

*Nou-născutul* cu trisomie 21 are lungime și greutate mai mică decât parametrii vârstei gestaționale, prezintă hipotonie musculară, hiperextensibilitate și reflexe comportamentale (de exemplu, reflexul Moro) reduse. Capul este brahicefalic, cu occiput turtit și fontanele largi. Fața este rotundă, plată și prezintă o dismorfie sugestivă: epicantus (un repliu în unghiul intern al ochiului), fantele palpebrale oblice în sus și în afară<sup>2</sup>; nasul mic cu rădăcina turtită și narine mici și anteversate; gura deschisă și protruzie linguală (datorită cavității orale mici); urechile mai jos situate, mici și displazice. Gâtul este scurt, cu exces de piele pe ceafă; mâinile sunt scurte și late, cu brahidactilie, clinodactilie (încurbarea) a degetului V și, frecvent, un singur pliu de flexie palmară (pliu simian); inconstant sunt prezente unele malformații viscerale (defecte cardiace, atrezie duodenală, imperforație anală)

*La sugar și copil* fenotipul sindromului Down prezintă elementele descrise mai sus. Talia și greutatea se află sub media vârstei, hipotonia musculară persistă și se asociază cu hiperlaxitate articulară și hiporeflexie nervoasă. Devin mai evidente câteva dismorfii cranio-faciale: microcefalia cu occiput turtit, fantele palpebrale oblice în sus și în afară (mai ales când sugarul plânge), irisul pestriț (cu pete Brushfield, de culoare maronie), hipoplazia etajului mijlociu al feței (față plată), limbă protruzionată (și mai târziu plicaturată) (figura 10.1). La nivelul membrelor brahidactilia și clinodactilia auricularului sunt mai pronunțate, se pot observa (cu o lupă sau prin amprentare) dermatoglifele anormale (pliu palmar transvers unic, exces de bucle cubitale, triradius axial situat distal, ș.a.) iar spațiul interdigital I la picior este mult mai larg. Vom preciza că nici unul din aceste semne, luate separat, nu este relevant; numai în asocieră cu celelalte semne permite evocarea diagnosticului de sindromul Down (tabelul 10.1). Confirmarea citogenetică este obligatorie, mai ales pentru realizarea unui sfat genetic corect.

**Tabelul 10.1. Semnele cardinale pentru diagnosticul de sindrom Down în perioada neonatală și de sugar (adaptat după Hall, 1966)**

Semne	Frecvență (%)
-------	---------------

<sup>1</sup> Diagnosticul este mai dificil la prematuri

<sup>2</sup> Aceste caracteristici au dus la denumirea improprie și prohibită de *mongolism*.

Hipotonie musculară	100
Reflex Moro redus	85
Profil facial plat	90
Fante palpebrale oblice în sus și în afară	80
Urechi mici, rotunde, jos situate	60
Exces de piele pe ceafă	80
Pliu simian	45
Hiperlaxitate articulară	80
Pelvis displazic	70
Clinodactilie	60
<b>Prezența a 6 din cele 10 semne pledează pentru diagnosticul de sindrom Down</b>	

Așa cum am precizat, unii copii cu sindrom Down pot prezenta *diferite malformații viscerale*: cardio-vasculare, digestive și renale. Malformațiile cardiace afectează aproximativ 40% din nou-născuții cu sindrom Down, majoritatea fiind defecte septale (atrio-ventriculare, ventriculare sau atriale). Malformațiile digestive (3-5%) mai frecvente sunt atreziile sau stenozele duodenale și megacolonul.

În al doilea an de viață devine evidentă întârzierea de dezvoltare psiho-motorie: toate achizițiile copilăriei se fac cu 2-3 ani mai târziu decât normal; mersul este mult timp nesigur iar vorbirea relativ simplă. Copiii sunt însă liniștiți, ascultători, au o personalitate atrăgătoare, iubesc anturajul, muzica, veselia. Dar, din păcate, sindromul Down se asociază *întotdeauna cu un retard mental* care variază de la sever la moderat (coeficientul de inteligență – QI – al persoanelor afectate variază între 20 și 85) și este asociat cu tulburări de limbaj. Un bolnav cu sindrom Down poate acumula un nivel maxim de cunoștințe comparabil cu cel al unui copil normal cu vârsta între 6 și 8 ani și *nu este capabil de o viață independentă*.

În sindromul Down ritmul de creștere este redus și talia va fi cu  $\geq 2$  DS sub media normală a vârstei (talia maximă la adult va fi de 140 – 160 cm). Frecvent se asociază obezitatea iar dezvoltarea pubertară este mult întârziată și incompletă. Bărbații sunt sterili iar femeile au o fertilitate redusă; reproducerea este însă numai accidentală, ținând cont de handicapul intelectual.

**Diagnosticul clinic diferențial** al sindromului Down se impune în puține situații. Macroglusia și microstomia din sindromul Down trebuie diferențiate de cele din hipotiroidia congenitală sau din sindromul Beckwith-Wiedemann; unele elemente ale dismorfiei cranio-faciale se întâlnesc și în sindroamele Smith-Magenis, Zellweger sau triplo-X (pentru detalii vezi OMIM sau ORPHANET). Prin efectuarea cariotipului se realizează certificarea diagnosticului de sindrom Down.

**Analiza citogenetică** este esențială pentru diagnostic și obligatorie în fiecare caz, chiar dacă examenul clinic este relevant, deoarece în funcție de rezultatul analizei cromosomice se calculează riscul de recurență și se acordă sfatul genetic. Analiza cromosomică poate evidenția:

- *trisomie 21 liberă și omogenă*, în circa 92-95% din cazurile de sindrom Down; ele se produc prin nedisjunctie meiotică, cel mai frecvent (85-90%) maternă și în special în meioza I (75%)<sup>3</sup>;
- *trisomie 21 liberă și în mozaic cromosomic* (de tip 47/46), în circa 2-3% din cazuri; rezultă prin nedisjunctie mitotică postzigotică sau, foarte rar, prin pierderea unui cromosom 21 în celule ce derivă dintr-un zigot trisomic („salvarea” unei trisomii omogene);
- *trisomie 21 prin translocatie Robertsoniană neechilibrată* – între cromosomul 21 și un alt cromosom acrocentric – poate fi observată în 4-5% din cazuri; cel mai frecvent se întâlnește

<sup>3</sup> Originea maternă sau paternă a nedisjunctiei meiotice și tipul ei – nedisjunctie în meioza I sau meioza II – au fost stabilite prin tehnici moleculare.

translocația 14q;21q care în jumătate din cazuri este moștenită de la unul dintre părinți (cel mai adesea de la mamă, dar fără nici o legătură cu vârsta maternă); translocațiile 21q;22q sau 21q;21q sunt mult mai rare și majoritatea sunt *de novo*;

- *trisomie 21 parțială*, în mai puțin de 1% din cazuri; rezultă prin segregarea meiotică a cromosomilor derivativi, formați în urma unor translocații echilibrate (ce implică un segment din cromosomul 21), prezente la unul dintre părinți.

**Evoluție și prognostic.** În primii ani de viață mulți dintre copiii cu sindrom Down sunt confrunțați cu diferite probleme medicale. Cele mai importante sunt determinate de malformațiile viscerale, în special cardiace și digestive. Infecțiile respiratorii sunt frecvente (printr-o imunodeficiență nespecifică) iar riscul de a dezvolta leucemie este de 15-20 ori mai mare decât în populația generală. Din aceste motive, mortalitatea în primii 5 ani de viață este (era !) mare și în 1960 numai jumătate dintre copii cu sindrom Down supraviețuiau până la această vârstă. În ultimii 30 de ani, în țările dezvoltate, rata de supraviețuire s-a îmbunătățit semnificativ (prin tratamentul chirurgical al cardiopatiilor congenitale, antibioterapie, reducerea instituționalizării și integrare socială) iar speranța de viață este acum de circa 60 de ani. Între 5 și 39 de ani mortalitatea în sindromul Down este aproximativ asemănătoare cu cea din populația generală; totuși morbiditatea este mai crescută : un procent de circa 10-15% din pacienții cu sindrom Down pot prezenta una din următoarele probleme medicale: epilepsie, tulburări vizuale (cataractă, glaucom, strabism), surditate, hipotiroidie, instabilitate atlanto-axială. După 40 de ani se instalează frecvent o demență senilă precoce și mortalitatea crește semnificativ prin accidente vasculare. În țările dezvoltate, rata de supraviețuire la 50 de ani este de 85% iar la 60 de ani este de numai 44%, adică jumătate din aceea a populației generale.

#### **Etiologie și patogenie**

Sindromul Down este produs de trisomia cromosomului 21 și mai exact de trisomia regiunii 21q22 (numită și DSCR – *Down Syndrome Critical Region*). Prin analiza moleculară a rarelor cazuri de trisomii 21 parțiale s-a stabilit că în regiunea 21q22.1-22.3 se găsesc genele care, prin efect de dozaj, produc majoritatea semnelor clinice caracteristice sindromului Down.

Secvențierea recentă a cromosomului 21 permite în principiu identificarea oricărei gene de pe cromosom. În prezent conținutul genic al cromosomului 21 este estimat a fi de 329, cu 165 de gene confirmate experimental, 150 de gene prezise pe baza analizei secvențelor exprimate (tag) și 14 predicții computerizate. O caracteristică oarecum neașteptată este faptul că fracția cromosomului 21 care este transcrisă în ARN este de fapt mai mare decât cea care este ocupată de secvențele codante ale genelor.

Un mijloc utilizat pentru studiul genelor implicate în producerea manifestărilor clinice din sindromul Down este acela al modelelor animale. La șoareci, genele corespunzătoare cromosomului uman 21 se afla localizate pe trei cromosomi. S-a arătat că trisomia genelor omologe de pe cromosomul 16 (corespunzătoare regiunii 21q22 la om) determină o serie de caracteristici asemănătoare cu cele din sindromul Down (deficite ale proceselor de învățare, tulburări ale dezvoltării craniofaciale și modificări neuropatologice asemănătoare celor din boala Alzheimer).

La nivelul regiunii DSCR au fost cartografiate următoarele gene (Hubert et al, 1997, Capone et al, 2001): APP – gena pentru proteina precursor a amiloidului beta și S100B – gena pentru o proteina de legare a calciului (corelate cu neuropatia de tip Alzheimer la pacienții cu sindrom Down), SOD1 – gena pentru superoxid dismutaza 1, ETS2 – oncogena ets-2 (implicată în riscul crescut de leucemie la bolnavii cu sindrom Down), CBS – gena pentru cistationin-beta-sintetază (implicată în metabolismul folaților) și CRYA1 – gena pentru proteina alfa a cristalinelor (corelată cu frecvența crescută a cataractei). Câteva gene candidat pentru retardul mintal în sindromul Down sunt: DYRK1A, ce codifică o protein-kinază (implicată în controlul proliferării neuroblaștilor), SIM2 (necesară pentru sincronizarea diviziunilor celulare în cursul dezvoltării cerebrale), GART ce codifică o fosforibozil gliacinamid-formil-transferaza (implicată în dezvoltarea prenatală a cerebelului), PCP4 – proteina tip 4 a celulelor Purkinje (rol în dezvoltarea cerebelului), DSCAM – Down syndrome cell adhesion molecule (considerată a fi implicată în creșterea axonală precum și o genă candidat pentru defectele congenitale cardiace) și GRIK1 – receptor pentru glutamat (implicat în funcția celulelor piramidale ale cortexului). Cu toate progresele realizate, patogenia sindromului Down are încă multe enigme.

Problema esențială este însă elucidarea etiologiei acestei trisomii frecvente. Vârsta maternă este singurul determinant evident al nedisjunctiei (vezi capitolele 5.C.1 și 6.C) dar numai circa 25% din pacienții cu sindrom Down se nasc din femei peste 35 de ani. Și totuși, faptul că 85-90% din cazuri rezultă prin nedisjunctie maternă (3/4 în meioza I) sugerează intervenția unui factor de risc ce acționează la acest nivel (Yoon et al, 1996). S-au emis diferite ipoteze dar nici una nu a fost validată de probe convingătoare. Evidențierea asocierii între unele polimorfisme ale genelor care codifică enzime implicate în metabolismul foliaților și riscul pentru nedisjunctia cromosomică ce conduce la sindromul Down a fost inițial demonstrată într-un studiu follow-up (de urmarire), dar nu a putut fi confirmată în alte studii ulterioare.

### **Sfat genetic.**

O problemă frecventă în sfatul genetic este determinarea *riscului nașterii unui copil cu sindrom Down*. Datele actuale arată că riscul depinde în principal de vârsta mamei dar și de cariotipul celor doi părinți; vârsta paternă pare să nu aibe nici o influență asupra riscului.

Incidența medie a sindromului Down în populația generală este de 1 la 700 nou-născuți (Bray et al, 1998). După 35 de ani riscul începe să crească de la 1 la 375 până la 1 la 25 (45 de ani), de aceea s-a ales vârsta de 35 de ani ca o indicație de screening ecografic și biochimic (vezi mai jos) precum și de diagnostic prenatal (riscul unui fetus cu sindrom Down fiind mai mare decât riscul de avort asociat procedurii – biopsie de vilozități coriale sau amniocenteză). O problemă delicată este riscul unui cuplu care are o rudă cu sindrom Down și cariotip necunoscut; luând în discuție frecvența trisomiei în funcție de vârsta femeii precum și posibilitatea unei translocatii cel mai mare risc calculat este de 1 la 640 (deci aproape de prevalența în populație) și el este valabil pentru copilul surorii bolnavului.

*Riscul de recurență* al sindromului Down, după ce s-a născut un astfel de copil, este dependent de tipul de trisomie 21. În trisomia 21 liberă și omogenă riscul de recurență este în medie 1%; pentru femeile sub 30 de ani este puțin mai mare, de circa 1,4% (probabil datorită unor mozaicuri germinale nedepistate); pentru femeile de peste 30 de ani riscul este același cu cel determinat de vârsta maternă. Riscul de recurență este nesemnificativ în trisomiile prin mozaic (<0,1%). În schimb, în cazul trisomiei 21 prin translocatie Robertsoniană neechilibrată riscul este moderat în translocatiile între cromosomi neomologi (10-15% dacă mama este purtătoare și 3-5% dacă tatăl este purtător) și total (100%) în translocatiile Robertsoniene între cromosomi 21.

**Depistarea prenatală** a sindromului Down poate fi efectuată (la orice vârstă dar mai ales după 35 de ani) pe baza unor metode de screening – biochimic și ecografic, urmate de confirmarea cazurilor suspecte prin realizarea cariotipului.

- Primă metodă de screening este *triplul test* bazat pe determinarea în sângele matern (trimestrul II de sarcină) a  $\alpha$ -fetoproteinei (AFP), gonadotrofinei corionice umane ( $\beta$ -hCG) și a estriolului neconjugat (uE3). Testul este sugestiv pentru sindromul Down când sunt depistate: un nivel crescut al  $\alpha$ -fetoproteinei, un nivel crescut al gonadotrofinei corionice umane și un nivel scăzut al estriolului neconjugat. Acest test are o acuratețe de 70% și un procent de 5% rezultate fals pozitive. De câțiva ani se folosește cvadruplul test, care asociază la triplu test și dozarea inhibinei A, a cărei sensibilitate este de 81% (Roizen și Petersen, 2003); de asemenea a fost introdusă analiza unor markeri biochimici de trimestrul I, în special proteina plasmatică A asociată sarcinii – PAPP-A (*Pregnancy Associated Plasmatic Protein-A*) și fracția liberă a  $\beta$ -hCG, care cresc acuratețea metodei la 85%, reducându-se totodată și frecvența rezultatelor fals pozitive.
- A doua metodă de screening este reprezentată de *ecografia fetală* (la 11-14 săptămâni de sarcină), principalele semne de alarmă (pentru prezența unui făt cu sindrom Down) fiind edemul cefei (translucența nucală) în primele luni de sarcină și scurtarea femurului / humerusului în a doua parte a sarcinii.

Combinarea rezultatelor screeningului ecografic și biochimic cu vârsta maternă a dus la realizarea unor scheme de predicție a probabilității unui fetus cu sindrom Down. Confirmarea

diagnosticului necesită *examenul citogenetic al amniocitelor* (efectuat în săptămânile 12-16 de sarcină) sau al *celulelor din vilozitățile coriale* (efectuat în săptămânile 9-12 de sarcină).

**Îngrijirea copiilor cu sindrom Down** ridică numeroase probleme care sunt bine standardizate și implică diverși specialiști (informații la adresele Internet menționate în bibliografie). Vom sublinia doar faptul că este necesară o susținere psihologică continuă și un sprijin adecvat al părinților pentru a face față problemelor ridicate de creșterea unui astfel de copil. De asemenea nu trebuie ignorate problemele etice ale sfatului genetic și diagnosticului prenatal în aceste cazuri (vezi capitolul 20).

## 1.2 SINDROMUL EDWARDS SAU TRISOMIA 18.

**Incidență.** Sindromul Edwards sau trisomia 18 are o incidență de aproximativ 1/5000-8000 de nașteri (prevalența medie: 1 la 6000 nn), majoritatea cazurilor (80%) fiind de sex feminin; incidența la concepție este mult mai mare dar aproximativ 95% dintre embrionii cu trisomie 18 sunt eliminați prin avort.

**Simptomatologie.** *Nou-născutul* prezintă o greutate mică pentru vârsta gestațională, hipertonie (!) și o dismorfie cranio-facială evocatoare: cap alungit (dolicocefalie) cu occiput proeminent, frunte teșită, microretrognatism, urechi jos implantate și hipoplazice ("*urechi de faun*"). (figura 10.2). Degetele mâinii sunt strâns flectate și încălecate într-un mod caracteristic: degetele 2 și 5 acoperă degetele 3 și 4; Unghiile sunt hipoplazice și dermatoglifele anormale (exces de arcuri, pliu simian). Sternul este scurt iar piciorul are aspectul de "piolet" (datorită proeminenței posterioare a calcaneului) și halucele scurt. Mai există diverse tipuri de hernii sau omfalocel, Frecvent sunt prezente malformații congenitale grave: cardiace (90% dintre cazuri), renale, cerebrale, vertebrale. Suspiciunea clinică<sup>4</sup> este susținută și de evidențierea anamnestică a polihidramniosului în cursul sarcinii (la circa 60% din cazuri).

**Diagnosticul clinic diferențial** poate fi făcut cu *secvența de akinezie fetală sau sindromul Pena-Shokeir tip I* și cu *artrogripoza distală tip I*; ambele prezintă contracturi articulare multiple, inclusiv încăleări ale degetelor, dar lipsesc malformațiile cardiace și dismorfia facială caracteristică trisomiei 18. De asemenea, prezența malformațiilor viscerale menționate poate duce uneori la confuzia cu asociația CHARGE (vezi capitolul 14).

**Analiza citogenetică** stabilește diagnosticul definitiv prin punerea în evidență a unei trisomii 18 complete - omogenă (94%) sau în mozaic (5%) sau o trisomie 18 parțială (1%).

**Evoluție și prognostic.** Speranța de viață este foarte mică, aproximativ 90% dintre copii murind în primele 6 luni de viață datorită malformațiilor viscerale grave. Doar 5% supraviețuiesc după vârsta de 1 an, dar prezintă o întârziere severă în dezvoltarea psihomotorie.

**Etiologie și patogenie.** Sindromul Edwards este produs de trisomia 18. În trisomiile complete cromosomul adițional rezultă – în marea majoritate a cazurilor (95%) – prin nedisjuncție maternă; frecvența trisomiei 18 prin nedisjuncție crește o dată cu creșterea vârstei materne, dar spre deosebire de trisomia 21, peste 50% dintre erorile de distribuție se produc în meioza II. Nu s-a localizat încă o regiune critică pe cromosomul 18 care să fie corelată cu fenotipul sindromului Edwards clasic dar, foarte probabil aceasta este localizată pe 18q. Trisomiile parțiale rezultă datorită unei translocării sau inversii, care de obicei este moștenită de la unul din părinți.

**Sfat genetic.** Se estimează că riscul de recurență după nașterea unui copil cu trisomie 18 completă este de 1-2%. În trisomiile parțiale riscul depinde de prezența sau absența unei translocării la părinți. Depistarea prenatală a trisomiei 18 este posibilă în 60% din cazuri pe baza ecografiei fetale (întârziere în creșterea intrauterină, chiști ai plexurilor coroide, mărirea cisternei magna, prezența unei malformații majore) și a triplului test (valori scăzute ale AFP, hCG și uE3); confirmarea se face însă numai prin efectuarea analizei cromosomice a celulelor

---

<sup>4</sup> Pentru un neonatolog fără experiență în dismorfologie este utilă folosirea scorului de diagnostic propus de Marion et al, 1988.

fetale.

### 1.3 SINDROMUL PATAU SAU TRISOMIA 13.

**Incidență.** Sindromul Patau sau trisomia 13 are o incidență de aproximativ 1/10.000-20.000 de nașteri (Wylkie et al. 1994)

**Simptomatologie.** *Nou-născutul* prezintă – în cazurile tipice – întârziere în creștere, microcefalie cu suturi larg deschise, aplazie cutanată în regiunea vertexului sau occiputului, frunte teșită, microftalmie /anoftalmie, colobom irian, despicături orofaciale, urechi malformate, pumnul strâns cu degetele încălecate, polidactilie postaxială la mâini și/sau picioare. Aproape constant se întâlnesc malformații ale SNC (arhinencefalie sau holoprosencefalie), ale cordului (80%) și sistemului urogenital.

**Diagnosticul clinic** este sugerat de triada caracteristică: *despicătură labio-palatină, microftalmie/anoftalmie și polidactilie postaxială* – observată la aproximativ 70% dintre pacienți. Absența lor parțială face diagnosticul mai dificil deși sunt și alte semne care pot evoca trisomia 13 (figura 10.3)(de exemplu, proeminența rădăcinii și vârfului nasului); orice copil cu semne de holoprosencefalie trebuie testat citogenetic pentru trisomie 13. Examinarea postmortem evidențiază malformații caracteristice: holoprosencefalia<sup>5</sup>, displazia chistică renală și pancreatică.

**Analiza citogenetică** este decisivă pentru diagnostic; în circa 80% din cazuri trisomia 13 este completă, liberă și omogenă; mozaicurile sunt foarte rare, în schimb în circa 20% de cazuri au fost identificate trisomii complete sau parțiale produse prin translocatii neechilibrate, de obicei t(13q;14q) sau t(13q;13q), din care jumătate sunt moștenite de la unul dintre părinți. Necesitatea unor decizii urgente de management a malformațiilor cardiace la nou născuți implică un diagnostic citogenetic imediat ; în aceste cazuri sau pentru stabilirea diagnosticului postmortem se poate recurge la analiza FISH interfazică cu sonde pentru cromosomul 13.

**Evoluție și prognostic.** Malformațiile viscerale multiple și severe determină decesul a peste 50% din cazuri în prima lună de viață. Doar 3% din bolnavi supraviețuiesc peste un an, având un retard mental sever. Supraviețuirea este mai mare în trisomiile parțiale 13q.

**Etiologie și patogenie.** Sindromul Patau este produs de trisomia 13. În cazurile produse prin nedisjunctie, cromosomul 13 suplimentar este de origine maternă și eroarea de disjuncție s-a produs în meioza I (Robinson et al, 1996). Încercările de a identifica genele răspunzătoare de semnele cardinale ale trisomiei 13 sunt încă puține și neconcludente.

#### **Sfat genetic.**

În cazul trisomiilor libere, riscul de recurență al afecțiunii este foarte mic (mai mic de 1%) în timp ce pentru translocatiile Robertsoniene moștenite de la un părinte riscul poate fi de aproximativ 10% pentru translocatii între cromosomi D neomologi sau chiar 100% în translocatiile între cromosomii 13. Diagnosticul prenatal de trisomie 13 este sugerat de identificarea întârzierii de creștere și prezența malformațiilor cerebrale (holoprosencefalia) și viscerale menționate; triplul test nu este edificator și numai analiza citogenetică a celulelor fetale va tranșa diagnosticul.

## **2. SINDROAMELE CU DELEȚII AUTOSOMALE**

Studiile citogenetice clasice și, mai ales, cele care folosesc marcajul în benzi al cromosomilor metafazici au dus la identificarea a numeroase deleții cromosomice. Dar, în majoritatea cazurilor, numărul de pacienți depistați era mic și acest lucru a împiedicat definirea unor sindroame asociate delețiilor. Într-un număr redus de cazuri a fost, totuși,

---

<sup>5</sup> Holoprosencefalia este un defect al liniei mediane, afectând creierul (o singură emisferă cerebrală, ventricul cerebral unic, agenezie de corp calos), structurile oculare (microftalmie/ anoftalmie) și mugurele frontal (modificările fronto-faciale pot fi severe cu ciclopie și *proboscis* sau hipotelorism și despicătură velo-palatină mediană sau minore cu hipotelorism și incisiv superior central unic).



posibilă stabilirea unei corelații genotip – fenotip ceea ce a permis definirea câtorva sindroame produse de deleții cromosomice. Incidența lor globală este redusă, circa 1/7000 de nașteri. Cel mai frecvent sunt întâlnite în practică sindromul cri du chat (5p-) și sindromul Wolf-Hirschhorn (4p-). Înainte de a prezenta succint cele două sindroame vom preciza că delețiile pot apărea *de novo* sau ca rezultat al unei translocării neechilibrate; de aceea este necesară totdeauna efectuarea cariotipului la părinți, pentru a descoperi dacă unul dintre este sau nu purtător (situație în care riscul de recurență este crescut).

### 2.1. SINDROMUL CRI DU CHAT

Sindromul “*cri du chat*” este produs printr-o deleție importantă a brațului scurt al cromosomului 5. Denumirea acestui sindrom derivă din particularitatea plânsului copiilor afectați, asemănător cu mieunatul de pisică (datorat unei anomalii a laringelui).

**Incidența bolii** este de circa 1/50000 de nașteri, dar prevalența sindromului la copii cu retard mental sever este de aproximativ 1%.

**Simptomatologie.** La sugar, semnele clinice sunt: plâns caracteristic, dismorfie cranio-facială cu microcefalie, facies rotund, hipertelorism, epicantus, urechi jos înserate, uneori cu tuberculi preauriculari, micrognație (figura 10.4). Particularitatea plânsului începe să se atenueze după vârsta de 2 ani, îngreunând diagnosticul clinic, mai ales pentru că unele din semnele menționate se modifică sau se atenuează. Pacienții prezintă un retard mental sever și au deseori malformații cardiace și genito-urinare.

**Analiza citogenetică** relevă deleția 5p- dar mărimea segmentului deletat variază la diferiți pacienți.

**Evoluție și prognostic.** Afecțiunea evoluează cu un retard mental sever iar supraviețuirea este variabilă

**Etiologie și patogenie.** Sindromul cri du chat este produs de monosomia parțială 5p- fiind întotdeauna implicată banda 5p15. Genele implicate în fenotipul sindromului nu au fost identificate; se știe doar că majoritatea semnelor fenotipice sunt determinate de haploinsuficiența unor gene din subbanda 5p15.2 iar hipoplazia laringiană ce produce plânsul caracteristic apare când deleția interesează subbanda **5p15.3**. Majoritatea cazurilor sunt sporadice, doar circa 15% sunt urmașii unui părinte purtător al unei translocării echilibrate.

**Sfat genetic.** Riscul este minim pentru delețiile *de novo* și variabil atunci când unul din părinți are o translocatie (vezi capitolul 9.C.3).

### 2.2. SINDROMUL WOLF-HIRSCHHORN

Sindromul Wolf-Hirschhorn, determinat de monosomia 4p-, este o anomalie rară, cu o incidență de circa 1/50.000 de nașteri.

**Simptomatologie.** Boala este caracterizată prin: hipotrofie staturo-ponderală marcată, microcefalie și o dismorfie facială caracteristică: hipertelorismul, arcadele sprâncenare proeminente și rădăcina nazală lărgită dau feței un aspect comparat cu o “*casă de luptător grec*” (figura 10.5); frecvent urechile sunt anormale (jos inserate, helix plat, sinus preauricular) și există malformații cardiace grave; retardul mental este constant și sever.

**Analiza citogenetică.** Deleția 4p- poate fi identificată uneori pe cromosomii metafazici dar suspiciunea clinică implică folosirea tehnicilor de înaltă rezoluție și FISH. Regiunea critică, a cărei deleție produce fenotipul caracteristic este localizată în regiunea **4p16**. Se recomandă întotdeauna analiza cromosomică a părinților

**Evoluție și prognostic** Speranța de viață este limitată, 1/3 din cazuri murind în primul an de viață.

**Sfat genetic.** Numeroase cazuri sunt sporadice și riscul de recurență este foarte mic, dar uneori deleția este consecința segregării unei translocatii parentale și riscul de recurență crește.

## **3. SINDROAMELE CU MICRODELEȚII ȘI MICRODUPLICAȚII CROMOSOMICE**

Mai multe sindroame dismorfice, care au fost inițial definite clinic, s-au dovedit a fi produse de o deleție cromosomică mică (sub 4Mb), dificil sau imposibil de observat prin tehnicile convenționale; aceste deleții submicroscopice sau microdeleții pot fi evidențiate fie prin tehnicile de analiză cromosomică de înaltă rezoluție fie prin FISH, folosind sonde specifice segmentului respectiv<sup>6</sup> (vezi capitolul 2.D.3).

**Tabelul 10.2 Sindroame produse prin microdeleții sau microduplicații cromosomice**

Sindrom	Tip rearanjament Localizare	Gene identificate	Fenotip
Williams	del(7)(q11.23)	Elastină, sintaxină, LIMK, RFC2, WSCR1	Dismorfie facială caracteristică, stenoză aortică supravalvulară, laxitate articulară, hipercalcemie, hipostatură, retard mental, profil cognitiv și psihic particular
Langer-Giedion (triho-rino-falangian)	del(8)(q23-q24)	EIF3S3, RAD21, osteoprotegerina,	Facies particular, păr rar, nas bulbos, anomalii ale degete exostoze cartilajinoase, retard mental
WAGR	del(11)(p13)	PAX6, WT1	Tumără Wilms, Aniridie, malformații Genito-urinare, Retard mental
Beckwith-Wiedemann	dup(11)(p15.5) (5% cazuri) <sup>1</sup>	IGF2, CDKN1C	Dismorfie cranio-facială, macroglosie, defecte ale peretelui abdominal, macrosomie, visceromegalie
Prader Willi	del(15)(q11-q13) cromosom patern (75% cazuri) <sup>1</sup>	SNRPN, necdina	Hipotonie neonatală, dismorfie cranio-facială caracteristică, obezitate, hipogonadism, retard mental moderat, tulburări de comportament.
Angelman	del(15)(q11-q13) cromosom matern (70% cazuri) <sup>1</sup>	UBE3A	Microcefalie, retard mental sever, tulburări de mers și echilibru, absența vorbirii, tulburări caracteristice de comportament.
Rubinstein-Taybi	del(16)(p13.3) (20% cazuri) <sup>1</sup>	CREBBP	Dismorfie cranio-facială particulară, police și haluce lățit, malformații cardio-vasculare, retard mental
Miller-Diecker	del(17)(p13.3)	LIS1, ABR, 14-3-3-epsilon, CRK, PRP8 MYO1C, SKIP, PITPNA, SCARF1, RILP, SERPINF1	Retard mintal sever și tulburări neurologice – secundare lisencefaliei, dimorfie facială caracteristică
Smith-Magenis	del(17)(p11.2)	RAI1, NT5M, SGN3	Retard mental sever, tulburări de somn, comportament automutilant, dismorfie facială
Alagille	del(20)(p11-p12)	JAG1	Dismorfie facială, stenoza arteră pulmonară, anomalii vertebrale, colestază hepatică
Velo-cardio-facial /DiGeorge	del(22)(q11.2) (85% cazuri) del(10)(p13) (15% cazuri)	TUPLE1, GSCL HIRA, ș.a	Despicătură sau insuficiență velo-palatină, malformații cardiace cono-truncule, dismorfie facială caracteristică, hipoplazie timus și paratiroide (hipocalcemie)
Cat-eye	dup(22)(q11)	CECR7	Colobom irian și/sau coroidian, despicatura palatina, malformații cardiace, renale, hernii, atrezie anală.
DMD, CGD, RP, hipoplazie suprarenală	del(X)(q21)	DMD, CGD, RP	Distrofie musculară Duchenne, boală granulomatoasă cronică (CGD), retinită pigmentară (RP), insuficiență suprarenaliană
Azoospermie	del(Y)(q11.23)	AZFa, AZFb, AZFc	infertilitate

<sup>1</sup> Sindromul poate fi produs și prin alte mecanisme (de ex., disomie uniparentală, mutații)

Studiile moleculare au arătat că punctele de ruptură sunt localizate în secvențe repetitive scurte, identice, care flanchează (încadrează) un anumit segment cromosomic. Prin împerecherea greșită a acestor secvențe din cromosomii omologi și crossing over inegal („recombinare omologă nealelică”) (vezi figura 5.19) rezultă deleții sau duplicații ale

<sup>6</sup> Examenul clinic este esențial pentru alegerea sondei deoarece trebuie să orienteze diagnosticul spre un anumit sindrom.



segmentului respectiv („aneusomie segmentară”). Așa cum am arătat în capitolul 6.B.1.3, recombinația omologă nealelică sau inegală este consecința arhitecturii speciale a genomului și reprezintă un mecanism major de producere a unor „boli genomice” (prin pierderea sau duplicația unei /unor gene) (vezi caseta 6.1); în funcție de mărimea segmentului implicat rezultă boli mendeliene, sindroame cu microdeleții sau microduplicații, aberații cromosomice mari.

Fenotipul sindroamelor cu microdeleție este de obicei determinat de haploinsuficiența mai multor gene învecinate, situate în segmentul deletat (figura 10.6); de aceea pentru denumirea acestor sindroame se mai utilizează termenul de **sindroame ale genelor contigue**. Spre exemplu în sindromul Williams în segmentul deletat din regiunea 7q11.23 se află gena elastinei (ELN), gena pentru factorul de replicare 2 (RFC2), gena pentru kinaza tip 1 cu domeniu LIM (LIMK1) – a căror haploinsuficiență determină modificările țesutului conjunctiv (inclusiv anomaliile vasculare), tulburările de conducere nervoasă și profilul psihocomportamental – caracteristice sindromului Williams. Un alt exemplu, ce demonstrează poate mai clar ideea de fenotip „agregat”, este microdeleția Xp21 ce afectează genele DMD, CGD, RP care fiecare produce prin mutație o boală monogenică distinctă.

În regiunea cromosomică implicată în sindroamele genelor contigue s-au identificat trei categorii de gene:

- *gene dominante*; prin absența genei se produce o haploinsuficiență ce determină un anumit caracter fenotipic; de exemplu, absența genei dominante PAX6 în microdeleția 11p13 produce aniridie, particularitate clinică a sindromului WAGR;
- *gene recesive*; apariția caracterului fenotipic este posibilă doar în situația în care absența genei se asociază cu o mutație inactivatoare a alelei localizată pe cromosomul normal; de exemplu, absența genei recesive WT1, secundară unei microdeleții 11p13, determină apariția unei tumori Wilms și a unor anomalii genitale, doar în situația în care pe celălalt cromosom 11 gena WT1 a suferit o mutație;
- *gene cu amprentare genetică*; fenotipul este secundar instalării unei nulisomii funcționale sau a unei disomii funcționale a unei gene ce prezintă amprentare genetică și a cărei status funcțional normal este monoalelic; de exemplu, în sindroamele Prader-Willi și Angelman prin disomie uniparentală 15q11-q12, fenotipul este consecința unei nulisomii funcționale maternă, respectiv paternă; pe de altă parte, în sindromul Beckwith-Wiedemann, prin disomie uniparentală 11p15 paternă, gena IGF2 are activitate bialelică, ceea ce conduce la creșterea exagerată, caracteristică sindromului.

### 2.1 SINDROMUL VELO-CARDIO-FACIAL.

Dintre multiplele entități cuprinse în tabelul 10.2 vom prezenta mai pe larg sindromul velo-cardio-facial cel mai frecvent întâlnit în practică

**Sindromul velo-cardio-facial** (SVCF) reprezintă un spectru fenotipic continuu, larg și variabil, produs în majoritatea cazurilor prin **micro-deleția 22q11.2**. Acest spectru include: hipoplazia sau aplazia timusului (deficite imune) și a glandelor paratiroide (hipocalcemie), anomalii cardiace conotruncale, dismorfie facială sugestivă, despicătură palatină sau insuficiență velo-palatină (vorbire hipernazală), anomalii reno-urinare, anomalii scheletice, întârziere în dezvoltarea psihomotorie și tulburări psihice, dificultăți de învățare și altele. Unele din aceste manifestări au fost descrise ca entități distincte, cu denumiri diferite: *sindromul DiGeorge*, *sindromul velo-facial*, *sindromul anomalii conotruncale-față*, *sindromul velo-cardio-facial*; ulterior a devenit evidentă suprapunerea fenotipică parțială a acestor entități.

Pentru denumirea acestui spectru fenotipic, ce include mai multe entități clinice, s-a propus un acronim - **CATCH-22** - pe baza caracteristicilor clinice și genetice (C)ardiac anomalies, (A)bnormal facies, (T)hymic hypoplasia, (C)left palate, (H)ypocalcemia, (22)-cromosomul afectat). Această denumire, utilă pentru rememorarea caracteristicilor clinice, nu a fost bine acceptată deoarece are, în limba engleză, o conotație negativă. S-a sugerat că soluția cea mai bună ar fi un termen compus **sindrom DiGeorge/ Velo-cardio-facial**, care are avantajul că păstrează numele principalelor sindroame componente. Probabil că această opțiune este realistă dar pentru frecvența mare a SVCF (comparativ cu sindromul DiGeorge)(SDG) precum și faptul că depășind perioada primei copilării pacienții etichetați inițial cu SDG au un aspect

caracteristic de SVCF mulți autori preferă termenul, mai simplu, de **sindrom velo-cardio-facial** considerând pe bună dreptate ca SDG este o formă severă a SVCF.

**Incidență.** Estimările actuale ale SVCF (confirmat prin tehnici moleculare) sunt cuprinse între 1:2000 și 1:4000 nn, fiind astfel *una din cele mai frecvente boli cromosomice*, încă puțin diagnosticată în practica medicală. SVCF este cel mai frecvent sindrom asociat cu depicătură palatină (8% din copiii cu DP) sau cu malformații cardiace (5% din nou-născuții cu anomalii cardiace, 40% din tetralogiile Fallot).

**Manifestări clinice.** SVCF se caracterizează printr-un spectru larg și variabil (ca intensitate și vârstă de debut) de manifestări fenotipice.

*Malformațiile cardiace* sunt frecvente în SVCF (75-80%) și reprezintă deseori primul semn de diagnostic. Prezența lor nu este însă obligatorie iar gravitatea lor este diferită. Cel mai frecvent se întâlnesc malformațiile conotruncale: tetralogia Fallot, arc aortic întrerupt, defect septal conoventricular, stenoză/atrezie de pulmonară și trunchi arterial. Aceasta impune evaluarea clinică completă a acestor cazuri pentru identificarea altor anomalii și apoi testarea genetică.

*Dismorfia cranio-facială* nu este totdeauna evidentă la sugari și devine mai pronunțată o dată cu creșterea vârstei: microcefalie, fața lungă, uneori asimetrică (la plâns) sau flască, prezintă ariile malare șterse, nasul lung și proeminent, retrognatism. (figura 10.7)

*Anomaliile palatului* sunt frecvente (60-85%) dar gama de modificări variază de la secvența Robin cu despiciătură palatină evidentă și până la integritate structurală a palatului dar cu grade diferite de insuficiență velofaringiană, ce determină refluarea lichidelor pe nas în timpul sugerii, înghițitului, precum și vorbirea nasonală.

*Anomalii endocrine și imunologice.* Hipocalcemia neonatală (manifestă prin convulsii, tremor, rigiditate), consecința unui hipoparatiroidism congenital, poate fi cel mai precoce și unicul semn la sugar în formele medii de SVCF. Aplazia timică (și secundar marea susceptibilitate la infecții grave, letale) este un semn cardinal pentru forma DiGeorge a SVCF (10% cazuri) dar hipolazia timusului și forme variate, combinate, dar moderate de imunodeficiență (a numărului /funcției celulelor T) sunt comune în SVCF, mai ales la sugari și la copii mici. Aceasta impune o evaluare imunologică atentă a copiilor suspecti de SVCF.

În SVCF se mai întâlnesc: statura mică (33%), anomalii musculo-scheletice (60%), anomalii uro-genitale (10%), anomalii neurologice.

*Dezvoltarea psihomotorie* și în special dezvoltarea limbajului este întârziată. Un retard mental ușor sau moderat este prezent la 40% restul având dificultăți școlare importante. Copiii cu SVCF pot avea tulburări de comportament variabile, de la timid și închis în sine până la neînhibat și hiperactiv, iar la 10-22% din adolescenții și adulții cu SVCF se întâlnesc tulburări psihiatrice majore.

**Diagnosticul clinic** de SVCF nu este ușor deoarece sindromul prezintă un spectru larg și variabil de manifestări fenotipice; pacienții pot manifesta forma gravă, deseori letală (datorită malformațiilor cardiace și/sau deficiențelor imune) a sindromului DiGeorge, fenotipuri intermediare (ca în SVCF clasic) sau numai tulburări ușoare de dezvoltare și anomalii faciale subtile sau vorbire hipernazală cu hipoparatiroidism tranzitoriu. Un alt element ce trebuie subliniat este faptul că unele caractere clasice ale VCFS sunt dependente de vârstă (aspectul facial tipic poate să nu fie evident în primul an de viață, tulburările de vorbire sau învățare se observă mai târziu; vârful nasului lat/bulbos este evident la tineri și la adulți) iar altele (dismorfie facială) sunt mai subiective. De aceea sindromul VCFS ar putea fi luat în discuție la noi-născuți/ sugari cu anomalii cardiace cono-truncale și/sau secvență Robin dar și la copii mai mari cu întârzieri în dezvoltare și anomalii faciale sau ORL, dar fără semnele cardinale ale VCFS.

Diagnosticul diferențial se va face cu alte sindroame care prezintă elemente comune cu SVCF: tricho-rhino-falangian, Langer-Giedion, Stickler, cerebro-costomandibular, alcool fetal și distrofia miotonică.

**Diagnosticul citogenetic molecular** este diagnosticul de certitudine. Deleția 22q11 este de obicei prea mică pentru a fi identificată prin cariotipul de rutină. În aceste cazuri

microdeleția poate fi demonstrată prin FISH, pe metafaze cromosomice, cu sonde pentru 22q11<sup>7</sup>. Dacă analiza cromosomică sau proba FISH evidențiază deleția 22q11 atunci *vor fi investigați ambii părinți*, deoarece în 10-15% din cazurile de SVCF deleția va fi prezentă la unul din părinți (exceptând cazurile rare de mozaicism germinal).

**Evoluție și prognostic.** Circa 8% din pacienți decedează, de obicei în primele 6 luni, în special prin malformații cardiace sau din cauza deficitelor imune severe. Un procent variabil din pacienți au un retard mental ușor dar majoritatea prezintă dificultăți de învățare. Nu există nici un element predictiv valabil al expresiei și evoluției clinice dar există posibilități eficiente de intervenție medicală, psihologică sau educațională care pot corecta multe din manifestările bolii.

**Etiopatogenie.** Studiile recente privind etiopatogenia SVCF au demonstrat că majoritatea pacienților (80-85%) cu SVCF (dar nu toți!) au *deleții de mărime variabilă* în regiunea 22q11.2. La circa 80-90% din pacienți deleția se produce *de novo*, este *sporadică*; restul pacienților *moștenesc deleția* de la unul din părinți, mai frecvent de la mamă, care pot avea semne fenotipice minore. Deși mărimea deleției la persoanele afectate este variabilă nu există nici o corelație între mărimea deleției și fenotip; cea mai mică regiune a ADN care este comun deletată (regiunea critică minimă) are 480 Kb lungime; se presupune că această regiune conține gena/ genele care determină fenotipul SVCF; au fost identificate genele GSCL, CTP, CLTD, HIRA, TMVCF și TUPLE1<sup>8</sup>, din care GSCL și HIRA au fost implicate în dezvoltarea embrionară la șoarece sau pui de găină iar TUPLE1 este exprimată în perioadele critice ale dezvoltării inimii și vaselor mari;

Circa 15% din pacienți cu fenotip cert de SVCF nu au o deleție detectabilă cu markerii folosiți; explicațiile posibile ar fi: o deleție foarte mică în regiunea critică, nedetectabilă cu sondele moleculare actuale; o mutație punctiformă a uneia din genele din această regiune; o mutație sau microdeleție în alt cromosom (heterogenitate genetică); o fenocopie produsă de agenți teratogeni.

Concomitent cu eforturile de elucidare a etiologiei VCFS s-au realizat studii care au încercat descifrarea patogeniei sindromului. Se știe că mai multe țesuturi și organe afectate la pacienții cu VCFS derivă embriologic din arcurile și pungile faringiene III și IV. S-a presupus că anomaliile feței, cordului, timusului și glandelor paratiroide observate în SVCF sunt produse printr-un *defect în diferențierea și/sau migrarea celulelor crestei neurale craniale*. Totuși, o parte din caracterele clinice asociate SVCF nu pot fi explicate numai printr-un defect al celulelor crestei neurale. Marea sa variabilitate fenotipică în condițiile unor deleții identice ca dimensiuni presupune intervenția altor mecanisme. Etiopatogenia VCFS nu va fi înțeleasă decât atunci când vor fi identificate în regiunea critică a deleției genele ce produc semnele majore ale SVCF, inclusiv diferențierea / migrarea celulelor din creasta neurală cefalică. Identificarea unei mutații într-una din genele candidat la pacienții cu VCFS fără deleție ar fi un argument important.

**Sfatul genetic.** Riscul de recurență este nesemnificativ în microdelețiile *de novo*; în schimb prezența deleției la unul din părinți face ca riscul de recurență să fie de 50%.

## B. SINDROAMELE CU ANOMALII ALE CROMOSOMILOR SEXUALI

Anomaliile cromosomilor sexuali – numerice și structurale, omogene sau în mozaic – sunt printre cele mai frecvente boli genetice, având o incidență globală de 1 la 400 nou-născuți de sex masculin și 1 la 650 nou născuți de sex feminin (Robinson et al, 1998). Fenotipurile asociate cu aceste anomalii cromosomice sunt, în general, mai puțin severe comparativ cu sindroamele autosomale datorită

<sup>7</sup> În cazurile negative se vor folosi sonde pentru 10q21, un alt locus ce poate da un fenotip VCF

<sup>8</sup> GSCL – genă din clasa “gooseoid” a factorilor de transcripție cu homeodomeniu implicată în dezvoltarea embrionară; CTP – proteina mitocondrială de transport a citraților; CLTD – gena D pentru lanțul greu al clatrinei, cu rol în transducția semnalelor; HIRA – se exprimă în cursul dezvoltării embrionare în regiunea cefalică și mugurii membrelor; TMVCF – codifică o proteină transmembranară cu funcție necunoscută; TUPLE1 – codifică un factor transcripțional.

inactivării cromosomului X și numărului mic de gene de pe cromosomul Y, fenomene ce reduc consecințele dezechilibrului cromosomic. Dezvoltarea fizică și psihică sunt de obicei relativ puțin afectate; în schimb anomaliile cromosomilor sexuali se asociază frecvent cu disgenezii gonadice și sterilitate. De aceea, orice întârziere în dezvoltarea pubertară, amenoreea primară sau secundară precoce, azoospermia și sterilitatea reprezintă indicații clinice importante pentru studiul cromosomilor.

## 1. SINDROMUL TURNER

Sindromul Turner este determinat de monosomia X, completă sau parțială, singura monosomie viabilă la specia umană.

**Incidență.** Boala afectează aproximativ 1/2500-1/3000 din nou-născuții de sex feminin dar se estimează că aproximativ 2% din concepțiile recunoscute clinic prezintă monosomie X care este letală în 95% din cazuri, embrionii fiind avortați (Sybert,2001)(vezi etiopatogenia).

**Simptomatologie.** Este important de subliniat că sindromul Turner tipic poate fi identificat (în circa 2/3 din cazuri) la naștere sau înainte de pubertate, deci la vârste ce permit aplicarea unei terapii hormonale de suplere, destul de eficace.

O treime din cazuri pot fi diagnosticate clinic în *perioada neonatală* prin următoarele semne evocatoare: copil de sex feminin, cu talie și greutate mai mică pentru o vârstă gestațională normală, limfedem (dur, nedureros, tranzitoriu) pe fața dorsală a mâinilor și picioarelor<sup>9</sup>, gât scurt, cu exces de piele pe ceafă și/sau *pterygium coli* (pliu cutanat pe fețele laterale ale gâtului) și distanță intermamelonară mare (figura 10.8).

O altă treime din cazuri pot fi identificate *prepubertar*; suspiciunea clinică se bazează pe existența unui întârzieri majore de creștere, ce devine evidentă după 2-3 ani și atinge -3 DS față de medie la 10 ani. La aceasta se poate adăuga gât scurt, palmat, cu inserția joasă a părului pe ceafă și torace lat cu mameloane îndepărtate.

*Postpubertar* diagnosticul clinic este sugerat de triada: hipostatură, amenoree primară, caractere sexuale secundare feminine deficitare.

- Hipostatura este semnul cardinal al sindromului Turner. În absența tratamentului cu hormon de creștere, înălțimea pacientelor cu sindrom Turner se încadrează în intervalul 130-150 cm, dependent de talia părinților; cu un tratament cu STH, inițiat înainte de 10 ani, se câștigă 6-10 cm la talia finală.
- Amenoreea primară (absența ciclurilor menstruale) și deficitul de sexualizare sunt secundare disgeneziei gonadice, produsă prin degenerescența ovocitelor (ce începe în viața fetală) și înlocuirea ovarelor cu bandetele fibroase. Rareori, degenerescența este incompletă (mai ales la persoane cu monosomie X în mozaic), ceea ce conduce la o dezvoltare pubertară aproape normală și la apariția de cicluri ovulatorii neregulate; totuși, și la aceste cazuri, menopauza este precoce, iar probabilitatea de a avea o sarcină este infimă. Deoarece ovarele disgenetice nu produc ovule, pacientele cu sindrom Turner au sterilitate primară și definitivă.
- Absența secreției hormonilor sexuali feminini (estrogeni și progesteron) induce amenoree primară, dezvoltare insuficientă a caracterelor sexuale secundare feminine (glande mamare puțin dezvoltate, pilozitate axilară absentă, pilozitate pubiană redusă) și creșterea FSH și LH. Organele genitale externe au aspect infantil, iar uterul este hipoplazic. Terapia de suplere cu estrogeni (începută prepubertar) corijează deficitul de sexualizare fenotipică.

În sindromul Turner există o dismorfie cranio-facială necaracteristică, manifestată prin: aspect matur al feței, facies triunghiular, epicantus, fante palpebrale antimongoloide, palat înalt, anomalii dentare, urechi proeminente. Alte semne ce pot fi identificate la pacientele cu sindrom Turner sunt: diametrul biacromial mai mare decât cel bitrohanterian, torace plat („în scut”) cu distanță intermamelonară crescută, *cubitus valgus* (axul antebrațului face un unghi obtuz deschis în afară cu axul humerusului), scurtarea metacarpianului IV, unghii convexe hipoplazice, prezența a numeroși nevi pigmentari. În 30-40% din cazuri pot fi identificate

---

<sup>9</sup> Reprezintă persistența unui limfedem generalizat apărut în viața fetală și vizibil uneori și sub formă de *hygroma colli cysticum* - o acumulare de lichid seros în dilatații limfatice ale gâtului

malformații congenitale renale sau cardiace (coarctare de aortă, prolaps de valvă mitrală, bicuspidie aortică). Dermatoglifyele sunt anormale: triradius axial în poziție distală (t' sau t'') și suma creștelor digitale (SCD) mai mare decât media la sexul feminin.

Inteligența este normală sau la limita inferioară a normalului, cu o scădere în special a percepției spațiale și a capacității de abstractizare. Pacientele pot avea deficiente auditive prin anomalii ale urechii interne.

**Diagnosticul clinic diferențial** se face în copilărie cu sindromul Noonan: hipostatură, facies caracteristic, gât scurt, palmat, deformații toracice/sternale, malformații congenitale de cord (în special stenoză pulmonară, cardiomiopatie hipertrofică sau DSV); la pubertate se vor lua în discuție alte cauze de întârziere pubertară.

**Analiza citogenetică** este decisivă pentru diagnostic.

- *Testul cromatinei X* este negativ în cazurile cu monosomie omogenă și pozitiv, dar cu valori reduse, în cazul monosomiei în mozaic sau în monosomiile parțiale prin anomalii structurale. În prezența unor isocromosomi X de braț scurt, a unor deleții sau cromosomi inelari X dimensiunea corpusculului Barr este mai mică (aproximativ 0,7μm) decât valoarea normală, în timp ce prezența unui isocromosom X de braț lung se asociază cu un corpuscul Barr mai mare (aproximativ 1,2μm). Considerăm că testul cromatinei X este un test screening simplu și ieftin.
- *Examenul cromosomic* este esențial pentru stabilirea diagnosticului de certitudine. În circa 50-60% din cazuri cariotipul evidențiază o monosomie X omogenă; în 25% din cazuri se întâlnesc difertite tipuri de mozaicuri<sup>10</sup>, ce includ obligatoriu o linie cu monosomie X totală sau parțială (cel mai frecvent 45,X/46,XX -15% cazuri); în restul cazurilor se găsesc anomalii de structură ale cromosomului X: isocromosomi X de braț lung sau de braț scurt, deleții Xp sau Xq, cromosomi inelari.

**Evoluție și prognostic.** În perioada copilăriei probleme deosebite pun copiii cu sindrom Turner care au malformații cardiace sau renale ce pot face diferite complicații. Depistarea precoce a bolnavelor permite folosirea unei terapii eficiente cu hormon de creștere și, prepubertar, cu estrogeni. Ulterior, pot să apară, mai frecvent decât în populația generală, tiroidite autoimune, HTA, obezitate și diabet zaharat noninsulino-dependent. Inserția socială este de obicei bună iar viața de familie este posibilă.

**Etiopatogenie.** Studii recente au arătat că circa 2% din sarcinile recunoscute clinic prezintă monosomie X. Cauzele care determină lipsa frecventă a unui gonosom nu se cunosc. Eliminarea ca avorturi spontane a peste 95% din embrionii cu monosomie X se datorează probabil haploinsuficienței unor gene importante de pe cromosomul X care scapă inactivării. Nu se cunoaște încă care este explicația faptului că deși letalitatea în utero a monosomiei X este mare, nou născuții cu aceeași anomalie supraviețuiesc mulți ani fără probleme vitale deosebite. Ipoteza conform căreia majoritatea lor sunt mozaicuri cromosomice nedetectate nu a fost confirmată; se pare că nașterea copiilor cu monosomie X omogenă este corelată cu prezența unei placentă diploide.

Dintre cazurile de nou născuți cu monosomie X omogenă, 50-70% au origine paternă, fiind consecința unei nedisjunctii sau întârzieri anafazice în meioza tatălui, care duce la formarea de gameți lipsiți de gonosom.

Patogenia sindromului Turner este în curs de elucidare. Analizele moleculare au indicat că absența brațului scurt al cromosomului X determină hipostatura (probabil prin haploinsuficiența genei SHOX<sup>11</sup>, localizată în regiunea pseudoautosomală a brațului scurt al cromosomului X) și de malformațiile congenitale, în timp ce deleția brațului lung al cromosomului X produce disfuncția gonadică.

**Sfatul genetic.** Riscul de recurență al sindromului Turner este ușor crescut în raport cu riscul existent în populația generală. Diagnosticul prenatal este posibil numai atunci când se

---

<sup>10</sup> Analizele moleculare (FISH, PCR) au evidențiat – în unele studii recente – o frecvență de 70% a mozaicurilor; datele trebuie însă a fi confirmate.

<sup>11</sup> Gena SHOX este una din genele implicate în dezvoltarea organismului.

identifică semne ecografice de alarmă: hygroma cysticum, hidrops fetalis, malformații congenitale cardiace sau renale dar diagnosticul unui fetus Turner ridică probleme etice majore privind continuarea sau întreruperea sarcinii.

## 2. SINDROMUL KLINEFELTER

Sindromul Klinefelter este consecința fenotipică a trisomiei gonosomale XXY sau a altor polisomii XY; un fenotip asemănător au și bărbații XX.

**Incidență.** Sindromul Klinefelter are o incidență mai mare de 1 la 1000 nou-născuți de sex masculin (probabil 1/600) dar multe cazuri nu sunt diagnosticate din cauza modificărilor fenotipice reduse. Reprezintă principala cauză de hipogonadism la bărbat.

**Simptomatologie.** Diagnosticul clinic al acestei afecțiuni este posibil doar postpubertar. În copilărie sindromul Klinefelter poate fi *suspectat* în prezența unei staturi înalte, a aspectului gracil și a dificultăților de adaptare școlară. La pubertate talia crește, pe seama membrelor inferioare<sup>12</sup>. Testiculi rămân mici (sub 3 cm lungime x 1,5 cm lățime, deci un volum < de 3ml), fermi, nedureroși la palpate – datorită disgeneziei gonadice (nedezvoltarea celulelor germinale, hialinizarea tubilor seminiferi) și degenerescenta Leydigiană, determină absența spermatogenezei și a secreției de testosteron. Nivelul scăzut al testosteronului se asociază cu valori crescute ale hormonilor gonadotropi (FSH și LH).

În absența testosteronului, *caracterele sexuale secundare sunt slab dezvoltate*<sup>13</sup>: pilozitatea facială, axilară și tronculară sunt absente, pilozitatea pubiană este redusă, corpul are conformație de tip feminin, vocea este înaltă, iar adipozitatea are o dispoziție de tip ginoid. Penisul se dezvoltă, de obicei, normal („disociație peno-orhitică”) și funcția sexuală este normală. În circa 30% din cazuri apare ginecomastia (dezvoltarea glandelor mamare la un individ de sex masculin)<sup>14</sup> (figura 10.9).

Sterilitatea din sindromul Klinefelter este primară și definitivă, pacienții cu această afecțiune reprezentând aproximativ 10% din bărbații cu azoospermie. Rareori, la pacienții cu mozaic cromosomic, fertilitatea este păstrată, existând posibilitatea apariției de descendenți.

Dezvoltarea intelectuală este aproape normală, coeficientul intelectual fiind la limita inferioară a normalului sau peste aceasta. 70% din pacienții cu sindrom Klinefelter prezintă tulburări de învățare, determinate de dislexie. Deficitul intelectual este corelat cu prezența unui număr crescut de cromosomi X. Inserția socială este de obicei dificilă.

**Diagnosticul clinic diferențial** se face în special cu sindromul Kallman care asociază hipogonadismul cu anosmia.

**Analiza citogenetică** pune diagnosticul de certitudine. Testul cromatinei sexuale X și testul cromatinei sexuale Y sunt pozitive. Cariotipul relevă în 85% din cazuri o trisomie 47,XXY liberă omogenă. În circa 12-13% din cazuri sunt prezente diferite mozaicuri cromosomice (cel mai frecvent: 46,XY/47,XXY) și mai rar alte cariotipuri 48,XXXY, 49,XXXXY; prezența unui număr mai mare de cromosomi X se asociază cu creșterea severității modificărilor dismorfice și a retardului mental. Rareori se găsește un cariotip 46,XX („bărbații XX”, la care un mic segment de Yp este translocat pe un cromosom X).

**Evoluție și prognostic.** Speranța de viață este normală. Pot apărea probleme de adaptare socială și tulburări de comportament.

**Etiopatogenie.** Sindromul Klinefelter este produs de trisomia XXY sau poli-XY.

<sup>12</sup> aspect determinat de închiderea târzie a cartilajelor de creștere în absența testosteronului.

<sup>13</sup> Administrarea de hormoni sexuali masculini, cu scopul de inducere a dezvoltării caracterelor sexuale secundare masculine, are efecte benefice.

<sup>14</sup> Ginecomastia este consecința secreției de către glandele suprarenale (în prezența nivelurilor crescute de FSH și LH) a unei cantități crescute de androgeni aromatizabili, transformați în ficat în estrogeni, care produc stimularea celulelor mamare. Apariția ginecomastiei este asociată cu un risc crescut de cancer mamar, persoanele cu sindrom Klinefelter reprezentând circa 3% din toate cazurile de cancer mamar la bărbat.



Aceste anomalii cromosomice produc disgenezia testiculară dar mecanismul prin care cromosomii X suplimentari determină acest efect nu se cunoaște. Trisomia XXY omogenă are în 60% din cazuri origine paternă (obligatoriu în meioza I) și în 40% din cazuri origine maternă (nedisjuncției în meioza I – 75% - sau meioza II). Trisomia în mozaic este secundară unei nedisjuncții cromatidiene în mitozele unui embrion cu sex genetic masculin sau pierderii unui cromosom X la un zigot XXY.

**Sfat genetic.** Riscul de recurență nu este mai mare decât în populația generală, fiind dependent de vârsta maternă numai în circa 30% din cazuri.

### **3. TRISOMIA X ȘI ALTE POLISOMII X**

Trisomia X sau sindromul triplo X afectează 1/1000 de nou-născuți de sex feminin și nu produce modificări majore caracteristice.

Diagnosticul clinic, în general dificil, este sugerat de următoarele semne: talia deasupra mediei și coeficientul de inteligență la limita inferioară a normalului (tulburări de vorbire, dificultăți de învățare, probleme educaționale), dismorfie facială necaracteristică (facies rotund, cu fante palpebrale oblice în sus și înafară), tulburări menstruale (cicluri neregulate, menopauză precoce) și de reproducere (sterilitate sau avorturi spontane repetate). Aceste modificări sunt inconstante și de obicei femeile sunt fertile, putând avea copii normali sau copii cu trisomie X sau trisomie XXY.

Explorările citogenetice precizează diagnosticul. Cromatina X este pozitivă, fiind evidențiate celule cu unul sau doi corpusculi Barr. Cariotipul poate releva o trisomie X omogenă sau în mozaic. În 90% din cazuri, cromosomul X suplimentar provine dintr-o nedisjuncție în meioza maternă (de obicei este afectată meioza I). La aceste cazuri a fost observată o asociere cu vârsta maternă crescută în momentul concepției.

La pacientele cu polisomie X intelectul este mult mai sever afectat și de obicei există manifestări dismorfice și sterilitate. Cariotipul evidențiază o tetrasomie X sau pentasomie X, omogenă sau, mai frecvent, în mozaic.

### **4. SINDROMUL 47,XYX**

Trisomia XYY este relativ frecventă, dar diagnosticul clinic este rareori stabilit datorită modificărilor fenotipice minore pe care le determină. Incidența afecțiunii este de 1/1000 de nou-născuți de sex masculin.

Fenotipul se caracterizează prin talie înaltă, dezvoltare intelectuală normală, dar coeficientul de inteligență este cu 10-15 puncte mai mic decât cel al persoanelor înrudite. Prezintă deseori întârziere în dezvoltarea limbajului, dificultăți de învățare (prin dificultăți de citire și deficit de atenție), probleme educaționale, hiperactivitate și impulsivitate (agresivitatea și comportamentul aberant, descrise inițial în literatură, sunt rare).

Diagnosticul se pune numai prin analize citogenetice: testul cromatinei Y pozitiv, cu doi corpusculi F, iar cariotipul este 47,XYY. Toate cazurile sunt consecința unei nedisjuncții în meioza II paternă.

De regulă persoanele cu trisomie XYY au fertilitate normală, dar uneori pot fi depistate tulburări de spermatogeneză, care induc hipofertilitate. Deși, teoretic pot forma gameți anormali, riscul unor descendenți XXY sau XXX nu este mai mare decât în populația generală. Diagnosticul prenatal este de obicei întâmplător dar evidențierea unui făt 47,XYY pune probleme dificile pentru păstrarea sau întreruperea sarcinii.

## **C. TULBURĂRILE DE REPRODUCERE DE CAUZĂ CROMOSOMICĂ**

Circa 10% din cupluri nu pot avea o sarcină, deși își doresc acest lucru, după un an de viață sexuală normală și fără anticoncepționale. Aceste cupluri sunt definite ca sterile

(infertile); infertilitatea afectează în proporții egale bărbatul sau femeia. Alte 10-20% din sarcini sunt pierdute ca avorturi spontane iar la 1% din cupluri se produc avorturi repetate. Aceste date ne arată că tulburările de reproducere sunt o problemă medicală frecventă și importantă.

Cauzele tulburărilor de reproducere sunt multiple: genetice, malformative, endocrine, imunologice sau de mediu. Abordarea medicală implică acțiuni complexe din care nu pot lipsi abordarea și evaluarea genetică deoarece, așa cum vom vedea, într-o proporție semnificativă de cazuri intervin factori genetici.

## 1. STERILITATEA FEMININĂ

Sterilitatea la femei poate avea cauze multiple (tabelul 10.3): disgenezie sau disfuncție ovariană (40%), obstrucție tubară (40%) și anomalii sau boli ce afectează tractul reproductiv (vagin, cervix, uter) (20%) (Willson, 2000).

**Tabel 10.3. Cauzele de sterilitate la femei (după Williamson și Ellias, 1992)**

Categorie	Boli	Manifestări
<i>Disgenezie ovariană</i> Anomalii cromosomice	Sindrom Turner (45,X)	Talie mică, gât palmat, caractere sexuale secundare reduse, amenoree primară.
Anomalii congenitale	Disgenezie gonadică 46,XX (233300; 233400)	Disgenezie ovariană izolată cu sau fără surditate
<i>Disfuncție ovariană</i> Tulburări în sinteza hormonilor sexuali. Ovare displazice. Alte boli endocrine. Boli sistemice, afecțiuni cronice	Hiperplazia congenitală suprarenală Tip I (201710) Sindromul Stein-Levinthal. Deficiență hipofizară. Disfuncție cerebrală, infecții, autoimunitate	Exces de androgeni; deficit de cortizol și aldosteron. Ovare polichistice, hirsutism. Deficiență în FSH, LH. Perturbarea stimulării hipofizare a ovarelor.
<i>Anomalii ale tractului reproductiv</i> Uterine	Uter bicorn, bipartit Multe sindroame plurimalformative	Modificarea anatomiei uterine. Sindromul McKusick/Kaufman (236700): anomalii cardiace, renale, digitale.
Col uterin, vagin	Asociația MURCS Secvența Rokitansky Aplazie cervix, vagin septat	Anomalii uterine, renale, ale coloanei cervicale. Anomalii uterine, renale. Anomalii cervix sau vaginale
<i>Inflamații ale tractului reproductiv</i> Infecții Endometrioze	Gonoree, sifilis, chlamidia. Țesut endometrial în afara uterului	Obstrucție tubară. Menstruații anormale, dureri pelvine

Anomaliile cromosomice care afectează structura și funcția ovariană sunt reprezentate în primul rând de sindromul Turner (inclusiv disgenezia gonadică mixtă 45,X/45,XY) și, mai rar, alte aneuploidii (unele cazuri de trisomie X sau polisomie X), deleții sau translocatii X-autosom (vezi Layman, 2002). Regiunile critice corelate cu disgenezia ovariană sunt POF 1 (Xq26-q28) și POF 2 (Xq13.3-q22) în care se găsesc probabil gene necesare dezvoltării normale a ovarelor (de ex., gena *DIAPH2* în regiunea POF2). Alte boli genetice și anomalii congenitale menționate în tabelul 10.3 au un determinism monogenic sau multifactorial.

## 2. STERILITATEA MASCULINĂ

Cauzele care produc sterilitate masculină (tabel 10.4) sunt reprezentate, în ordinea frecvenței, de către varicocel (dilații anormale ale venelor cordonului spermatic ce pot comprima canalele deferente) (40%), disgenezie testiculară (14%), tulburări endocrine (9%),



diferite alte obstrucții ale canalelor deferente (8%), testiculi necoborâți congenital (criptorhidie, 4%), inflamații.

**Tabel 10.4. Cauzele de sterilitate la bărbați (după Williamson și Ellias, 1992)**

Categorie	Boli	Manifestări
<p><i>Disgenezie testiculară</i> Anomalii cromosomice</p> <p>Masculinizare inadecvată (pseudhermafroditism masculin)</p> <p>Anomalii congenitale</p>	<p>Sindrom Klinefelter (47,XXY)</p> <p>Disgenezie gonadică 46,XY (prin mutații ale genei SRY) Testicul feminizant (313700)</p> <p>Multe sindroame cromosomice și mendeliene</p>	<p>Talie înaltă, caractere sexuale secundare reduse, testiculi mici Fenotip feminin</p> <p>Fenotip feminin, deficit receptori de androgeni Criptorhidism, micropenis, spermatogeneză anormală</p>
<p><i>Disfuncție testiculară</i> Tulburări în sinteza hormonilor sexuali.</p> <p>Alte anomalii endocrine Agenți din mediu.</p> <p>Spermatogeneză anormală</p>	<p>Sindromul Reifenstein (313700)</p> <p>Hipoplaziile congenitale suprarenală</p> <p>Sindromul Kallman (308700) Oreion, hipertermie (testiculi intra-abdominali) radiații Sindromul Kartagener (244400).</p> <p>Anomalii cromosomice structurale</p>	<p>Deficit parțial de receptori de androgeni. Deficit de androgeni, deficit de cortizol, aldosteron. Disfuncție hipofizară, anosmie. Testiculi hipoplazici, blocarea spermatogenezei. Azoospermie, dilatații bronșice, situs inversus. Oligo(azoo)spermie</p>
<p><i>Anomalii ale tractului reproductiv</i> Canale deferente</p> <p>Uretră</p>	<p>Varicocele.</p> <p>Fibroză chistică</p> <p>Multe sindroame malformative cu hipospadias sau stenoză</p>	<p>Dilatații varicoase ale venelor cordonului spermatic Absența canalelor deferente, afectare pulmonară și gastro-intestinală. Sindromul McKusick-Kauffman: anomalii cardiace, renale, digitale</p>
<p><i>Inflamații ale tractului reproductiv</i> Infecții</p>	<p>Gonoree, sifilis, chlamidia, TBC.</p>	<p>Obstrucție canale deferente.</p>

Cauzele genetice sunt relativ frecvente în sterilitatea masculină. Anomaliile cromosomice constituționale afectează 15% dintre subiecții cu azoospermie și 6% dintre subiecții cu oligospermie severă (<10 milioane spermatozoizi/ml). Alte sindroame sau malformații ce afectează structura testiculului sau căile genitale au un determinism monogenic sau multifactorial.

*Anomaliile cromosomice de număr* care afectează structura și funcția testiculară sunt reprezentate în special de sindromul Klinefelter (47,XXY). Bărbații prezintă azoospermie iar biopsia testiculară relevă atrezia celulelor germinale, scleroialinizarea tubilor seminiferi și atrofia celulelor Leydig; mecanismul prin care trisomia XXY produce aceste modificări nu se cunoaște, dar poate fi implicat un efect de dozaj genic, indus de prezența a doi cromosomi X. Singurele trisomii autosomale care pot ajunge la vârsta reproductivă sunt trisomia 21 și trisomia 8, ambele fiind asociate cu sterilitate masculină. Un rol aparte în determinismul infertilității la bărbat îl au anomaliile de structură neechilibrate ale cromosomului Y și anomaliile de structură echilibrate ale autosomilor.

*Anomaliile neechilibrate ale cromosomului Y* nu modifică fenotipul, deoarece acest cromosom conține foarte puține gene somatice. În schimb, ele afectează testiculii, datorită absenței uneia sau mai multor regiuni ale cromosomului Y, implicate în determinismul sexual și/sau controlul spermatogenezei. Cele mai frecvente anomalii sunt microdelețiile Yq. Majoritatea sunt *de novo* și au fost identificate la 3-18% dintre bărbații cu azoospermie nonobstructivă și la 5-10% dintre bărbații cu oligospermie severă. Evidențierea prezenței

microdelețiilor cromosomului Y poate fi realizată prin tehnica FISH (folosind sonde specifice locilor implicați) sau utilizând tehnica PCR.

Prezența unei microdeleții a cromosomului Y determină modificări anatomopatologice testiculare, care variază de la absența completă a celulelor germinale (*Sertoli cell-only syndrome* - SCOS) până la blocarea spermatogenezei. Analizele moleculare au relevat că regiunea critică în microdelețiile cromosomului Y este localizată la nivelul benzii Yq11.23 și a fost denumită AZF (*AZOospermia Factor*) (figura 10.10). Regiunea AZF a fost împărțită în trei domenii notate: AZFa, AZFb și AZFc. Delețiile subregiunii AZFa sunt rare (1-5%) dar severe, fiind asociate cu SCOS. Studiile moleculare au arătat că genele cel mai probabil implicate sunt *USP9Y* și *DBY*. Delețiile AZFb (16%) și AZFc (60%) sunt mai frecvente, fiind asociate cu blocarea spermatogenezei. La nivelul regiunii AZFb a fost identificată gena *RBMV* care face parte dintr-un complex multigenic de 20-50 gene/pseudogene. La nivelul regiunii AZFc a fost identificată gena *DAZ*. Aceasta este prezentă în 4-6 copii, codifică o proteină care se fixează pe ARN și este exprimată doar în celulele germinale testiculare.

*Anomaliile cromosomice structurale echilibrate*, reprezentate de inversii și translocații (reciproce, Robertsoniene, inserții,) produc sterilitate masculină prin afectarea formării veziculei sexuale, datorită prezenței cromosomului(ilor) derivativ(i).

Inversiile cromosomilor 1, 2, 3, 5, 6, 7 și 9 au fost asociate cu sterilitatea masculină, incidența lor fiind de 8 ori mai mare decât la persoanele normale.

Translocațiile reciproce și inserțiile se întâlnesc la 1% din sterilitățile masculine producând blocarea spermatogenezei prin modificarea configurației meiotice normale. Translocațiile Robertsoniene dintre cromosomii acrocentrici sunt implicate în circa 0,7% dintre cazurile cu sterilitate masculină, cea mai frecventă fiind translocația rob(13;14). Afectarea fertilității este însă variabilă de la o spermatogeneză cvasinormală până la blocarea aproape completă a spermatogenezei. Acest aspect este dovedit de existența unor cazuri familiale, în care membri diferiți ai aceleiași familii, purtători de translocație, sunt unii sterili, unii cu hipofertilitate, iar alții prezintă fertilitate normală.

Datele prezentate arată clar necesitatea explorării citogenetice a oricărui bărbat cu spermogramă anormală la care o etiologie infecțioasă este eliminată. Să ne reamintim (vezi capitolul 6.C.3) că 1 din 232 nou născuți are o anomalie cromosomică echilibrată care poate produce o tulburare de reproducere.

### 3. AVORTURI SPONTANE ȘI NOU-NĂSCUȚII MORȚI.

Așa cum am menționat, 90 % din cupluri sunt fertile dar nu sunt „scutite” de alte tulburări de reproducere. În 10-20% din cazuri produsul de concepție se poate elimina sub forma unui avort (în primele 28 săptămâni de sarcină) sau a unui nou-născut mort (după săptămâna 28); avorturile se subîmpart în precoce (0-8 săptămâni) și tardive (9-27 săptămâni) Etiologia pierderilor de sarcină este complexă, implicând factori genetici, malformativi, endocrini, placentari, materni, imunologici (anticorpi antisfingolipide)(tabelul 10.5). Anomaliile cromosomice fetale au o pondere variabilă dar întotdeauna importantă.

Numeroase studii au arătat că *avorturile spontane precoce* (AP) implică în peste 50% din cazuri eliminarea unui embrion cu anomalii cromosomice. Frecvența anomaliilor cromosomice depinde de morfologia avortului. Din acest punct de vedere Kalousek (1997) deosebește trei categorii:

- AP cu creștere dezorganizată (58-70% din toate AP) au o incidență mai mare a anomaliilor cromosomice;
- AP cu morfologie normală sunt produse mai ales de anomalii de fază luteală sau anomalii uterine;
- AP cu defecte focale au un procent mare de anomalii cromosomice deși atunci când se observă malformații unice trebuie invocat mai ales un determinism multifactorial.

*Avorturile tardive* produse după săptămâna 9 de sarcină prezintă o frecvență de numai 4-7% anomalii cromosomice, de obicei monosomie X, triploidii și trisomii autosomale comune. Triploidii se asociază cu anomalii placentare (vilozitățile coriale devin chistice) de tip *molă hidatiformă completă sau parțială*.

**Tabel 10.5 Tipuri de pierderi de sarcină**  
(după Kalousek, 1997)

Tip (frecvență, morfologie)	A.C (%)	Etiologie	Implicații	
<b>Avorturi precoce (AP) (0 – 8 spt.)</b>	50	Trisomii (27%) Poliploidii (10%) Monosomii X (9%) Rearanjări (2%)	De obicei RR scăzut	
<i>Creștere dezorganizată (GD)</i> (58-70% din AP)	60		Defect de fază luteală Anomalii uterine Monosomie X, Triploidie, Trisomii	Studiul cromosomilor parentali când sunt $\geq 3$ AP sau atunci când embrionul are o anomalie de structură.
GD1 (sac, fără embrion)	73			RR scăzut
GD2 (embrion, fără RP)	52			
GD3 (embrion, RP)	37			
GD4 (embrion, disproporții)	37			
<i>Morfologie normală</i> (16-34% AP)	20			
<i>Defecte focale</i> (5-18% din AP) defecte de tub neural, membre, despicături palatine	92		În cazul în care cariotipul este normal este posibil un RR mendelian sau multifactorial	
<b>Avorturi tardive (9 – 27 spt)</b>	4-7	Malformații majore Monosomie X, triploidie Anomalii placentare	RR multifactorial RR mic RR mic	
<b>Nou născuți morți (&gt;28 spt)</b>	5-10	Boli materne (40%) (+abuz nicotină, alcool, droguri) Dezlipire de placentă (15%) Malformații majore (15%) IUGR (11%) Sindroame mendeliene Sindroame cromosomice	De obicei RR mic  RR scăzut RR multifactorial 0-50% 0-50% RR mic	
<b>Decese neonatale (0 – 4 spt după naștere) (sunt determinate de cauze prenatale)</b>	?2-5	Prematuritate Malformații congenitale Unice Sindroame Infecții (produc corio-amniotite) Boli materne Hidrops fetal	RR mic  RR multifactorial 0 – 50% RR mic RR mic 0 – 50%	

AP – avort precoce; RP – pigment retinian (“ochi”); AC – anomalii cromosomice; RR – risc de recurență pentru făt anormal și/sau avort

La producții de avort au fost identificate toate tipurile de anomalii cromosomice neechilibrate, care în ordinea frecvenței sunt: trisomii, poliploidii, monosomia X, anomalii structurale neechilibrate. Se întâlnesc toate tipurile de trisomii, cu excepția trisomiei 1; cea mai frecventă este trisomia 16. Monosomia X este cea mai frecventă anomalie individuală.

*Avorturile repetate* (recurente) ( $\geq 3$ ) sunt prezente la 0,8-1% din toate cuplurile și cauzele genetice (anomalii cromosomice, de obicei structurale neechilibrate, și boli monogenice letale) se află pe locul trei după boli endocrine și malformații sau boli uterine. Translocațiile neechilibrate (5% din avorturile recurente) pot fi consecința segregării unei translocații echilibrate la unul din părinți; în această situație, riscurile unei femei purtătoare sunt: 80% avort, 4% nou născut malformat, 16% nou născut normal. În situația în care părinții sunt normali cromosomic riscurile empirice de recurență sunt: 24% după două avorturi spontane consecutive și 36% după trei avorturi. Deci probabilitatea de a finaliza o sarcină prin nașterea unui copil este mai mare de 60%.

*Nou născuții morți* sunt rezultatul unor cauze multiple și variate: boli materne (inclusiv consumul de nicotină, alcool, droguri), IUGR (întârziere în creșterea intrauterină -

datorită anomaliilor placentare, infecțiilor fetale, sindroamelor genetice), malformații majore, sindroame mendeliene, sindroame cromosomice (5-10%), decolare de placenta.

Orice pierdere a unei sarcini dorite este un eveniment traumatizant, care implică un sprijin psihologic atent. Întrebările cu care se confruntă medicul sunt: de ce s-a produs? Ce risc există la sarcinile următoare? Analiza aprofundată a cauzelor de către o echipă specializată și dotată corespunzător permite răspunsuri adecvate. Cert este că intervenția factorilor genetici este importantă și, funcție de determinismul monogenic, multifactorial sau cromosomic, riscurile variază de la 50% la 3% (tabelul 10.5). La orice cuplu confruntat cu mai multe pierderi de sarcină (avorturi și/sau nou născuți morți) se va face analiza cromosomică chiar dacă numai 2-5% din aceste cupluri au, la unul din parteneri, o anomalie cromosomică echilibrată.

## BIBLIOGRAFIE CAPITOL 10

### INTERNET

1. Alianța grupurilor de sprijin (suport) pentru bolnavii cu afecțiuni genetice: <http://www.geneticalliance.org>
2. Asociația Sindromul Klinefelter : <http://www.genet.org/KS>
3. Congresul național al sindromului Down (USA): <http://www.members.carol.net/~ndsc>
4. Geneclinics – bază de date despre bolile genetice : (<http://geneclinics.org>)
5. Organizații internaționale pentru sindromul Down: <http://www.nas.com/downsyn/org.html>
6. Organizație națională pentru boli rare (NORD): <http://www.pcnet.com/~orphan/>
7. OMIM – catalogul bolilor mendeliene la om: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
8. Orphanet – bază de date pentru boli genetice(<http://orphanet.infobiogen.fr>)
9. POSSUM (<http://possum.net.au/>)
10. Programul HELIX (sfat și teste genetice) al Universității și Spitalului de copii din Washington: <http://www.healthlinks.washington.edu/helix/>
11. Societatea națională (USA) sindromul Down: <http://www.ndss.org>
12. Societate Sindromul Turner (USA) : <http://www.turner-syndrome-us.org>

### Bibliografie specifică selectivă

1. American Academy of Pediatrics Committee on Genetics – *Health supervision for children with Turner syndrome* – Pediatrics 1995, 96: 1166-1173.
2. American Academy of Pediatrics Committee on Genetics – *Health supervision for children with Down syndrome* – Pediatrics 2001, 107: 442-449.
3. Antonelli a, Gandini L, Petrinelli P - *Chromosomal alterations and male infertility* - J.Endocrinol.Invest. 2000,23:677-683
4. Bray I, Wright DE, Davies C, Hook EB – *Joint estimation of Down syndrome risk and ascertainment rates: A meta-analysis of nine published data sets* – Prenatal Diag. 1998;18:9-20
5. Capone GT – *Down syndrome: advances in molecular biology and the neurosciences* – J. Dev. Behav. Pediatr. 2001, 22: 40-59.
6. Carey JC. – *Trisomy 18 and trisomy 13 syndromes* – in “Management of Genetic Syndromes” ed. Cassidy SB, Allanson JE. Wiley-Liss, New York, 2001, 417-436.
7. Emanuel BS, Shaikh TH – *Segmental duplications: an 'expanding' role in genomic instability and disease* – Nat. Rev. Genet. 2001, 2: 791-800.
8. Hobbs CA, Sherman SL, Yi P et al – *Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome* – Am. J. Hum. Genet. 2000, 67: 623-630.
9. Hubert RS, Mutton S, Chen X-N et al – *BAC and PAC contigs covering 3,5 Mb of the Down syndrome congenital heart disease region between D21S55 and MX1 on chromosome 21*– Genomics, 1997;41:218-226

10. Hunter AG – *Down syndrome* – in “Management of Genetic Syndromes” ed. Cassidy SB, Allanson JE. Wiley-Liss, New York, 2001, 103-129.
11. Kalousek DK. - *Pathology of abortion: the embryo and the previable fetus* – In Gilbert-Barnes E, ed. Potter’s Pathology of the fetus and infant, Mosby, StLouis, 1997, pp 106-128.
12. Layman LC. – *Human gene mutations causing infertility* - J Med Genet 2002; 39:153-161.
13. Levy B, Dunn TM, Kern JH, Hirschhorn K, Kardon NB – *Delineation of the dup5q phenotype by molecular cytogenetic analysis in a patient with dup5q/del 5p (cri du chat)* – Am. J. Med. Genet. 2002, 108:192-197.
14. Lindsay EA – *Chromosomal microdeletions: dissecting del22q11 syndrome* – Nat. Rev. Genet. 2001, 2: 858-868.
15. Ogata T., Matsuo N. – *Turner syndrome and female sex chromosome aberrations* – Hum.Gent. 1995;95:607-629.
16. Pryor L, Kent M, Muallem A. – *Microdeletions in the Y chromosome of infertile man* – N.Engl.J.Med., 1997;336:534-539.
17. Regan L. – *Recurrent miscarriage* – BMJ 1991;302:543-544
18. Robinson A, Bender BG, Linden M. – *Prenatal diagnosis of sex chromosome abnormalities* – in “Genetic disorders and fetus”, 4<sup>th</sup> edition, Milunsky A ed., Baltimore, John Hopkins University Press, 1998, p.249-368.
19. Roizen N.J, Patterson D – *Down's syndrome* – Lancet, 2003, 361: 1281-1289.
20. Saenger P. – *Turner's syndrome* – Curr.Ther.Endocrinol.Metab. 1997;6:239-243.
21. Thielemans BJ, Spiessens C, Hooghe TD - *Genetic abnormalities and male infertility. A comprehensive review* Eur.J.Obstet.Gynecol.Reprod.Biol. 1998;81:217-225.
22. Torf CP, Christianson RE – *Anomalies in Down syndrome individuals in a large population based registry* – Am.J.Med.Genet. 1998;77:431-438
23. Zollino M, Lecce R, Fischetto R, Murdolo M, Faravelli F, Selicorni A, Butte C, Memo L, Capovilla G, Neri G – *Mapping the Wolf-Hirschhorn syndrome phenotype outside the currently accepted WHS critical region and defining a new critical region, WHSCR-2* – Am. J. Hum. Genet. 2003, 72: 590-597.
24. Yoon PW, Freeman SB, Sherman SL et al – *Advanced maternal age and risk of Down syndrome characterised by meiotic stage of the chromosome errors* – Am.J.Med. Genet. 1996;58:628-633

## CAPITOLUL 11

# BOLILE MONOGENICE

**Bolile monogenice** sunt afecțiuni produse de mutații ale unei singure gene; aceste mutații se transmit în succesiunea generațiilor după tipul mendelian: autosomal dominant, autosomal recesiv sau legat de X. De aceea, bolile monogenice mai sunt numite **boli mendeliene**<sup>1</sup> și sunt repertoriate în catalogul „*Mendelian Inheritance of Man*” (MIM), editat de Profesorul Victor McKusick (ultima ediție, a 12-a, a fost tipărită în 1998); versiunea Online – OMIM – este actualizată continuu și accesibilă în întreaga lume (vezi caseta 5.4). OMIM cuprinde circa 14.000 de fenotipuri și gene, dintre care aproximativ 10.000 de intrări corespund unor boli monogenice.

Bolile monogenice reprezintă una dintre categoriile majore ale bolilor genetice, atât prin număr și frecvență, cât și prin consecințele importante asupra morbidității și mortalității, mai ales la copil.

Majoritatea bolilor monogenice devin manifeste clinic în perioada neonatală sau în copilărie. Doar aproximativ 10% din bolile monogenice cunoscute debutează clinic după pubertate și doar aproximativ 1% dintre ele după sfârșitul perioadei reproductive.

Deși cele mai multe dintre aceste boli sunt rare, luate împreună ele realizează o pondere importantă în cadrul morbidității și mortalității la copii. Frecvența globală a bolilor monogenice la copii este de circa 2-3%, iar ponderea lor printre cauzelor de spitalizare este de circa 6-8%.

Atunci când se cunoaște defectul primar al unei boli monogenice, adică mutația la nivel genic, precum și consecințele la nivelul proteinei codificate, se utilizează termenul de **boală moleculară**. În prezent cel puțin 1500 de boli monogenice pot fi încadrate în această categorie a bolilor moleculare, iar cercetările în curs de desfășurare vor permite, fără îndoială, descifrarea bazelor moleculare ale tuturor bolilor monogenice.

Studiul bolilor moleculare a produs o adevărată revoluție în medicină. El permite *reclasificarea bolilor* în funcție de mutațiile cauzatoare și mecanismele patogenice. Această acțiune – dublată de posibilitatea unui diagnostic molecular, deseori prenatal sau presimptomatic – are consecințe majore pentru asigurarea unui sfat genetic mai precis, sau pentru selecția celor mai adecvate metode de tratament. Elucidarea bazelor moleculare ale bolilor monogenice este însă utilă nu numai pentru abordarea specifică a acestor afecțiuni, ci și pentru descifrarea mecanismelor moleculare care asigură desfășurarea proceselor biologice normale și, implicit, funcționarea adecvată a organismului uman. Se poate afirma că am intrat într-o nouă etapă a dezvoltării medicinei, denumită pe drept cuvânt **medicină moleculară** (vezi capitolul 1.D.3). De aceea, prezentarea unor date generale despre bazele moleculare și biochimice ale bolilor monogenice, ca model pentru bazele moleculare ale tuturor bolilor umane, este nu numai benefică dar și necesară.

## A. BAZELE MOLECULARE ȘI BIOCHIMICE ALE BOLILOR MONOGENICE.

---

<sup>1</sup> Caracteristicile generale și criteriile de transmitere ale fiecăreia dintre aceste subgrupe de boli au fost prezentate în capitolul 5

Medicina moleculară încearcă să explice mecanismele prin care anumită modificare genetică determină un fenotip clinic particular. În capitolul 6 au fost prezentate natura și mecanismele de producere a mutațiilor; acest subcapitol este concentrat mai ales asupra înțelegerii consecințelor pe care mutațiile le pot avea asupra cantității și funcțiilor unui produs genic și asupra explicării cauzelor pentru care aceste modificări sunt sau nu patogenice asupra unei anumite celule, aflată într-un stadiu particular de dezvoltare.

Se pot deosebi patru categorii de efecte ale mutațiilor asupra funcțiilor proteinelor codificate: mutații cu pierderea funcției, mutații cu câștig de funcție, mutații cu dobândirea unei funcții noi și mutații care conduc la expresia anormală temporal (expresie heterocronică) sau spațial (expresie ectopică) a unei proteine.

O clasificare mai puțin utilizată în prezent împarte alelele mutante în: *alele nule* sau *amorf* (care nu produc nici o proteină), *alele hipomorfe* (care produc o cantitate redusă de proteină sau o proteină cu activitate scăzută), *alele hiperomorfe* (care codifică o cantitate crescută de proteină sau o proteină cu activitate accentuată), *alele neomorfe* (care codifică proteine cu o activitate nouă) și *alele antimorfe* (care antagonizează activitatea alelei normale).

Trebuie precizat că nu există o asociere preferențială între unele gene și una din categoriile de mutații prezentate mai sus. Ca urmare, una și aceeași genă poate suferi atât mutații cu pierderea funcției cât și mutații cu câștig de funcție, iar consecințele acestor mutații se pot exprima prin producerea unor boli diferite.

Un asemenea exemplu este acela al mutațiilor genei RET. Această genă codifică un receptor transmembranar pentru factorul de creștere neuronal derivat din celulele gliale (GDNF). Diferite mutații cu pierderea funcției proteinei RET au ca rezultat producerea **bolii Hirschsprung** (OMIM 142623), caracterizată prin absența neuronilor postganglionari enterici care conduce la megacolon congenital și constipație cronică. Alte mutații specifice au însă ca efect câștig de funcție, determinând o reactivitate exagerată a receptorului față de ligand sau chiar activarea sa în absența GDNF. Aceste mutații au ca rezultat boli genetice diferite precum **carcinoamele tiroidiene** medulare familiale sau **neoplaziile endocrine** multiple tip 2. Există în sfârșit unele mutații cu sens greșit care pot determina apariția simultană a acestor boli, ceea ce sugerează ca aceeași mutație poate avea efecte diferite în țesuturi diferite.

Multe boli monogenice asociază o *variabilitate clinică* considerabilă, chiar în interiorul aceleiași familii în care membrii afectați sunt purtători ai aceleiași mutații. Acest fapt sugerează intervenția altor gene nealele, care modifică fenotipul clinic (*gene modificatoare*), sau a unor factori din mediul înconjurător.

Un exemplu de genă modificatoare este cel al genei PLA2G2A care codifică fosfolipaza A2. Diferite variante alelice ale acestei gene modifică numărul polipilor adenomatoși dezvoltați la indivizii cu **polipoza adenomatoasă familială** (FAP – OMIM 175100). O altă genă modificatoare, localizată pe cromosomul 19q13.2-13.4, poate influența severitatea manifestărilor clinice în fibroza chistică (OMIM 219700).

## 1. MUTAȚII CU PIERDEREA FUNCȚIEI.

Pierderea funcției proteinei codificate de o genă mutantă reprezintă cea mai frecventă modalitate prin care o modificare genetică produce o boală. Există numeroase tipuri de mutații care pot reduce sau aboli funcția unui produs genic (vezi capitolul 6.B.1). Acestea pot fi: deleții sau inserții – ce produc schimbarea cadrului de lectură ("*frameshift*"), mutații nonsens – care determină sinteza unei proteine trunchiate, mutații cu sens greșit ("*missens*") – ce substituie un aminoacid esențial pentru activitatea proteinei, mutații la nivelul regiunilor reglatoare ale gene.; Uneori se pot produce chiar *modificări epigenetice*, cum ar fi de exemplu atenuarea activității genice prin hipermetilarea (și deci inactivarea) regiunii promotor.

Mutațiile cu pierderea funcției tind să se asocieze, în general, cu o *transmitere recesivă*, deoarece la indivizii heterozigoți (Na) alela normală este capabilă să asigure singură o cantitate suficientă de proteină funcțională și, de cele mai multe ori, organismul funcționează normal doar cu 50% din nivelul de activitate genică.

Există însă unele mutații genice, relativ puține la număr, pentru care o reducere cu 50% a

nivelului de activitate determină apariția unui fenotip anormal. Asemenea situații, desemnate prin termenul de *haploinsuficiență*, sunt întâlnite în special atunci când proteina codificată este necesară în cantități mari (celulele funcționează în mod normal la nivelul maxim de transcripție).

Un exemplu este cel al genei pentru elastină ale cărei mutații sunt implicate în producerea **stenozei aortice supravalvulare** (OMIM 185500). La indivizii heterozigoți pentru asemenea mutații, majoritatea țesuturilor bogate în elastină (tegumente, plămâni, vase sanguine) funcționează normal, dar aorta supravalvulară va suferi un proces de stenozare progresivă care poate necesita corecția chirurgicală.

Mutațiile asociate cu un fenomen de haploinsuficiență tind să se transmită dominant și asociază un grad crescut de expresivitate variabilă.

În cazul proteinelor care funcționează ca dimeri (homo- sau heterodimeri) sau în cadrul unor complexe multimerice, mutațiile cu pierderea funcției pot avea drept consecință nu numai alterarea activității polipeptidului respectiv dar și a celui produs de alela normală sau chiar de gene nealelice.

Printre exemplele cele mai cunoscute în această categorie sunt mutațiile genelor pentru colagen care vor fi discutate în subcapitolul următor. Colagenul fibrilar, componenta majoră a țesutului conjunctiv, este organizat sub forma unor lanțuri polipeptidice triplu helicoidale, fie homotrimerice, fie heterotrimerice. Un polipeptid anormal care va forma un triplu helix cu două polipeptide normale va conduce la alterarea activității întregului complex; ca urmare, astfel de mutații pot reduce semnificativ sub 50% cantitatea de colagen funcțional.

În aceste cazuri se consideră că mutațiile au *efecte dominant negative*: se păstrează capacitatea de sinteză a unei proteine funcționale dar cu activitate anormală. Mutațiile dominant negative vor avea în general consecințe fenotipice mai severe decât alte mutații ale acelorași gene care abolesc complet activitatea ei (mutații nule) și se transmit după un model dominant simplu (**figura 11.1**).

Efectele fenotipice ale mutațiilor cu pierderea funcției depind în mare măsură de *gradul de pierdere a funcției* și deci de nivelul activității reziduale a produsului genic. De exemplu, multe substituții aminoacidice pot avea un efect foarte redus asupra funcției proteice, deși altele pot abolii complet funcția normală. Mutațiile cu pierderea funcției pot să intereseze una sau ambele alele. În a doua situație, indivizii sunt afectați dar mutațiile celor două alele pot fi adeseori diferite – realizând statusul de *heterozigoți compuși*. Dacă ambele mutații determină pierderea funcției, dar în proporții diferite, alele care are efectul cel mai puțin sever va dicta nivelul de activitate reziduală și implicit severitatea manifestărilor clinice. Se poate realiza astfel o *recesivitate graduală* în care severitatea fenotipului clinic depinde de nivelul activității reziduale

Un exemplu este cel al mutațiilor care afectează gena pentru hipoxantin-guanin-fosforibozil transferază (HPRT) de pe cromosomul X. Nivelul de activitate reziduală este bine corelat cu fenotipul clinic al bărbaților purtători ai mutației. Astfel, mutațiile care permit o menținere a nivelului activității enzimatic de peste 60% nu determină nici o simptomatologie clinică, mutațiile ce reduc nivelul activității enzimatic de 1,6-8% determină **gută**, o reducere la 1,4-1,6% asociază **coreoatetoza** și automutilare, în timp ce mutațiile ce reduc activitatea enzimatică sub 1,4% determină manifestări clinice de **sindrom Lesch-Nyhan clasic** (OMIM 308000): coreoatetoza, automutilare și retard mintal.

## 2. MUTAȚII CU CÂȘTIG DE FUNCȚIE

Mutațiile pot altera fenotipul clinic nu numai prin reducerea sau pierderea funcției, dar și prin accentuarea funcției unor proteine. Acest efect se poate produce fie prin creșterea nivelului de sinteză a proteinei, fie prin intensificarea funcției proteinei normale.

- Mutațiile care *cresc nivelul de expresie* al unei gene și, ca urmare, cantitatea de proteină funcțională sintetizată, sunt relativ rare. Modul lor de transmitere este dominant. Cea mai frecventă situație este aceea a duplicației unor gene, precum gena DAX de pe cromosomul X (care determină inversiune sexuală prin *efect de dozaj* la indivizi 46,XY – OMIM 300018) sau duplicația genei pentru mielina periferică – PMP22 – implicată în producerea **sindromului Charcot-Marie-Tooth** tip 1A (degenerescența nervoasă periferică – OMIM 118220).



Asemenea mutații care conduc la creșterea nivelului unei proteine normale pot fi considerate și baza moleculară a multora dintre trăsăturile fenotipice în cadrul trisomiilor cromosomice. În plus, acest mecanism este frecvent implicat la nivel somatic, în cadrul fenomenelor de amplificare genică întâlnite în celulele tumorale.

- Mutațiile care amplifică funcția normală a unei proteine sunt relativ frecvente printre bolile monogenice cu transmitere dominantă. Astfel, **hemoglobina Kempsey** (substituția Asp99Asn la nivelul lanțului beta – OMIM 141900.0146) se caracterizează printr-o accentuare a afinității pentru oxigen și, ca urmare, o reducere a nivelului de eliberare a acestuia la nivelul țesuturilor periferice. Un alt exemplu este cel al **acondroplaziei** (OMIM 100800), boală caracterizată prin hipostatură disproporționată, în care substituția unui singur aminoacid în structura FGFR3 (receptorul tip 3 pentru factorul de creștere a fibroblaștilor) determină o activare permanentă a acestui receptor, chiar în absența ligandului.

Recunoașterea bolilor genetice produse prin mutații cu câștig de funcție este foarte importantă deoarece tratamentul acestora diferă în mod esențial de cel al bolilor produse prin mutații cu pierderea funcției. În plus, mutațiile cu câștig de funcție permit adeseori înțelegerea la nivel fundamental a mecanismelor de reglare a expresiei genice sau a bazelor moleculare ale funcției proteinei.

### 3. MUTAȚII CU DOBÂNDIREA UNEI FUNCȚII NOI

Intr-un număr mic de boli, modificarea unui singur aminoacid din structura unei proteine poate determina dobândirea unei calități noi, fără ca funcția proteinei să fie în mod obligatoriu modificată. Un exemplu ilustrativ îl reprezintă **alela Pittsburg** a alfa1-antitripsinei (substituția Met358Arg – OMIM 107400.0026). În mod normal alfa1-antitripsina inhibă elastaza; în schimb, alela mutantă Pittsburg nu mai este activă asupra elastazei dar are capacitatea de a acționa asupra trombinei, producând o tulburare letală de coagulare. Un alt exemplu de mutație cu dobândirea unei funcții noi îl reprezintă, în oarecare măsură, sicklemlia (OMIM 603903). Hemoglobina S își păstrează afinitatea normală față de oxigen, dar în condițiile scăderii presiunii parțiale a oxigenului, precipită determinând deformarea în seceră a eritrocitelor (vezi capitolul 4.B.3).

Cel mai frecvent mecanism care conduce la apariția unor funcții noi este întâlnit la nivel somatic, prin remanieri cromosomice care unesc porțiuni funcționale ale unor gene diferite. Asemenea reasocieri ale exonilor au avut probabil o importanță deosebită în cursul evoluției, permițând apariția unor funcții noi. Cea mai frecventă consecință a unor asemenea rearanjamente somatice este însă dezvoltarea unor neoplazii.

### 4. MUTAȚII ASOCIATE CU EXPRESIA HETEROCRONICĂ SAU ECTOPICĂ

Expresia multor gene este astfel controlată încât să aibă loc într-un moment bine determinat al dezvoltării ontogenetice și în anumite țesuturi. Unele mutații, localizate la nivelul regiunilor reglatoare ale genelor, determină expresia anormală din punct de vedere temporal sau spațial a unor gene. Există însă relativ puține boli monogenice produse prin asemenea mutații. Un exemplu sugestiv îl reprezintă **persistența ereditară a hemoglobinei fetale** (OMIM 141749), în care mutații în regiunile reglatoare ale genelor pentru hemoglobină determină expresia la adult a hemoglobinei gamma, sintetizată în mod normal numai în viața fetală și în perioada neonatală.

Asemenea mutații apar însă mult mai frecvent în cadrul cancerelor. Așa cum va fi prezentat în capitolul 17, protooncogenele sunt gene care promovează proliferarea celulară normală în cursul perioadei de dezvoltare embrionară. Expresia acestor gene în celulele somatice adulte are drept consecință proliferarea celulară necontrolată, care va conduce la dezvoltarea neoplaziilor.

## B. BOLI MOLECULARE

Așa cum s-a precizat la începutul acestui capitol, bolile monogenice pentru care sunt descifrate mecanismele moleculare și biochimice sunt denumite și boli moleculare. Clasificările bolilor moleculare sunt dificile având în vedere complexitatea mecanismelor patogenice care stau la baza lor. De aceea, o clasificare simplă, dar utilă, împarte bolile moleculare în funcție de *clasa* din care face parte proteina mutantă.

Proteinele pot fi clasificate în primul rând după *modul lor de expresie* în:

- *proteine "de întreținere sau menajere" (housekeeping)* prezente la nivelul tuturor țesuturilor, cu rol fundamental în menținerea structurii și funcțiilor celulare; la om circa 10.000 – 15.000 de gene codifică asemenea proteine housekeeping, care vor reprezenta circa 90% din cantitatea proteinelor oricărei celule;
- *proteine specializate* prezente numai în anumite țesuturi, având rol în determinarea caracteristicilor fiecărui țesut diferențiat; proteinele specializate reprezintă circa 10% din proteinele celulare

Această clasificare nu este absolută deoarece unele proteine housekeeping pot fi exprimate la nivele mai mari în anumite țesuturi.

În general, datorită rolului lor major în activitatea tuturor celulelor și țesuturilor, mutațiile genelor housekeeping sunt incompatibile cu supraviețuirea și vor fi rareori întâlnite drept cauză a unor boli genetice. În unele cazuri însă mutațiile unor asemenea gene pot determina boli care se manifestă clinic la nivelul acelor țesuturi în care proteina respectivă este exprimată la un nivel maxim.

Mutațiile genelor care codifică proteine specializate tind să afecteze în mod particular țesutul în care acea proteină este exprimată. Uneori însă pot fi afectate secundar și alte țesuturi sau organe sau, în mod paradoxal, pot să fie evidente clinic numai simptome la nivelul unor organe în care proteina mutantă nu este exprimată.

Proteinele pot fi clasificate de asemenea, în funcție de *activitatea* lor, în câteva clase majore: enzime, proteine implicate în transport, proteine structurale, proteine implicate în controlul homeostaziei, proteine implicate în comunicarea intracelulară și proteine implicate în controlul dezvoltării și diferențierii. Delimitarea acestor clase de proteine nu este întotdeauna facilă întrucât multe proteine pot fi implicate adeseori în mai multe activități prin intermediul domeniilor lor funcționale diferite. Considerăm însă utilă o prezentare schematică a unor date generale privind bolile moleculare produse prin mutații ale unor asemenea clase de proteine, exemplificate prin intermediul unor afecțiuni cu impact clinic deosebit, prin frecvență sau severitatea manifestărilor clinice.

### 1. BOLI ENZIMATICE (ERORI ÎNNĂSCUTE DE METABOLISM)

Toate procesele metabolice celulare sunt catalizate de către *enzime*. Mutațiile care modifică eficiența acestor proteine vor perturba adeseori metabolismul celular până la un nivel care determină apariția bolii.

Primele boli enzimatice (alcaptonuria, albinismul, cistinuria și pentozuria) au fost descrise (1902-1908) de către Archibald Garrod, care a demonstrat că aceste enzimopatii sunt transmise ereditar în concordanță cu legile lui Mendel; astfel, Garrod a introdus mendelismul în medicină și a formulat conceptul de "*erori înăscute de metabolism*". De atunci au fost descrise peste 350 de boli enzimatice. Cele mai multe dintre ele sunt rare, dar luate împreună ele dețin o pondere importantă în morbiditatea și mortalitatea atribuite bolilor genetice (după estimările mai vechi, bolile metabolice ar reprezenta 10% din bolile monogenice la copii și ar avea o frecvență

cumulată de 1/2500 nou-născuți; foarte probabil acestea sunt subestimări ale fenomenului real, datorită dificultăților de diagnostic).

Majoritatea bolilor enzimatice sunt determinate de mutații cu pierderea funcției și, ca urmare, sunt transmise recesiv, autosomal sau legat de X. Numai indivizii care sunt purtători a două alele mutante (homoziгоți sau heterozigoți compuși) vor fi afectați. La heterozigoți (Na), deși alela mutantă produce o proteină cu activitate enzimatică redusă sau chiar absentă, fenotipul lor nu este alterat deoarece ei vor avea, datorită alelei normale, cel puțin 50% din activitatea enzimatică păstrată. De fapt multe enzime pot să mențină – în condiții obișnuite – un nivel normal al reacției catalizate chiar și la concentrații de aproximativ 10% din cele normale (de exemplu hexozaminidaza A).

Deficiența enzimatică produce un „bloc metabolic“ (figura 11.2) care poate avea următoarele consecințe:

- *acumularea* (stocarea) substratului (precursorilor); atunci când substratul care se acumulează este o moleculă mică, ușor difuzabilă, precum fenilalanina, ea poate să fie redistribuită ușor în întregul organism și, ca urmare, manifestările clinice pot fi adeseori sistemice; dimpotrivă, atunci când substratul este o macromoleculă, acesta va rămâne la nivelul țesutului respectiv și va determina în special manifestări clinice localizate;
- *devierea* căii metabolice și sinteza unor produși toxici;
- *deficitul* unui produs de reacție (final sau intermediar) sau o combinație „deficit și acumulare“;
- lipsa controlului feed-back datorită absenței produsului final.

Deficite unor enzime diferite care intervin însă în aceeași cale metabolică pot produce manifestări clinice asemănătoare (de exemplu, mucopolizaharidozele). Pe de altă parte, deficitul parțial sau deficitul complet al aceleiași enzime poate determina boli diferite (vezi exemplul HPRT amintit anterior).

Toate căile metabolice pot fi afectate prin deficiențe enzimatice. Cititorul interesat va găsi informații exhaustive în tratatul „*The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*“ (Scriver CR et al., ed. 8, 2001), în care bolile metabolice sunt grupate pe metabolisme; tabelul 11.1 sintetizează principalele categorii de boli metabolice, exemplificate cu cele mai frecvente și cunoscute afecțiuni. Informații suplimentare prețioase se găsesc și în capitolul „*Boli genetice de metabolism*“ (Paula Grigorescu-Sido) din *Tratatul de Pediatrie* (ed. E. Ciofu, Carmen Ciofu, 2001) sau se pot obține prin accesarea OMIM. În ceea ce urmează vom prezenta sintetic doar câteva dintre cele mai frecvente enzimopatii.

**Tabelul 11.1. Exemple de boli genetice produse prin deficite enzimatice**

<i>Enzima</i>	<i>Gena</i>	<i>Localizare cromosomică</i>	<i>Boala</i>	<i>OMIM</i>
<b>Boli ale metabolismului carbohidraților</b>				
Galactozo-1-fosfat uridil transferaza	GALT	9p13	Galactozemia clasică	230400
Fructozo 1,6-bifosfat aldolaza	ALDOB	9q13-q32	Intoleranța ereditară la fructoză	229600
Fructokinaza	KHK	2p23	Fructozuria	229800
Lactaza	LCT	2q21	Hipolactazia adultului	223100
Glucokinaza	GCK	7p13	Diabetul MODY (maturity onset diabet of youth)	606321
Glucoza-6-fosfataza	G6PC	17q21	Glicogenoza tip Ia (von Gierke)	232200
Alfa-glicozidaza acidă	GAA	17q25.2	Glicogenoza tip II (Pompe)	232300
Amilo-1,6-glicozidaza	AGL	1p21	Glicogenoza tip IIIa (Cori)	232400
Enzima de ramificare a glicogenului	GBE1	3p12	Glicogenoza tip IV (Anderson)	232500
Fosforilaza musculară	PYGM	11q13	Glicogenoza tip V (McArdle)	232600
<b>Boli ale metabolismului aminoacizilor</b>				
Fenilalanin hidroxilaza	PAH	12q24.1	Fenilcetonuria	261600

<i>Enzima</i>	<i>Gena</i>	<i>Localizare cromosomică</i>	<i>Boala</i>	<i>OMIM</i>
Fumarilacetoacetat hidrolaza	FAH	15q23-q25	Tirozinemia tip 1	276700
Cistation beta-sintetaza	CBS	21q22.3	Homocistinuria	236200
Tirozinaza	TYR	11q14-q21	Albinismul oculocutanat	203100
Argininosuccinat sintetaza	ASS	9q34	Citrulinemia clasică	215700
<b>Boli ale metabolismului lipidic</b>				
Acil CoA dehidrogenaza lanțuri medii	ACADM	1p31	MCAD	607008
Acil CoA dehidrogenaza lanțuri lungi	ACADL	2q34-q35	LCAD	201460
Acil CoA dehidrogenaza lanțuri scurte	ACADS	12q22qter	SCAD	201470
<b>Boli ale metabolismului purinic și pirimidinic</b>				
Hipoxantin guanin fosforiboziltransferaza	HPRT1	Xq26-q27.2	Sindromul Lesch-Nyhan	300322
Adenozin deaminaza	ADA	20q13.11	Imunodeficiența combinată severă	102700
<b>Boli ale metabolismului acizilor organici</b>				
Homogentizic acid oxidaza	HGD	3q21-q23	Alcaptonuria	203500
Metilmalonil-CoA mutaza	MUT	6p21	Acidemia metilmalonică	251000
Propionil-CoA carboxilaza	PCCA	13q32	Acidemia propionică	606054
<b>Boli ale metabolismului porfirinelor și hemului</b>				
Porfobilinogen deaminaza	PBGD	11q23.3	Porfirie acută intermitentă	176000
Uroporfirinogen decarboxilaza	UROD	1p34	Porfirie cutanea tarda	176100
Protoporfirinogen oxidaza	PPOX	1q22	Porfirie variegata	176200
UDP-glucuronozil transferaza	UGT1A1	2q37	Sindromul Gilbert	143500
<b>Boli ale enzimelor lizozomale</b>				
Alfa-L-iduronidaza	IDUA	4p16.3	Boala Hurler-Scheie	252800
Beta-hexozaminidaza izoenzima A	HEXA	15q23-q24	Boala Tay-Sachs	272800
Beta-glucozidaza acidă	GBA	1q21	Boala Gaucher tip 1	230800
Sfingomielinaza acidă	ASM	11p15.4	Boala Niemann-Pick	257200
Alfa-galactozidaza A	GLA	Xq22	Boala Fabry	301500
<b>Boli ale enzimelor peroxizomale</b>				
Catalaza	CAT	11p13	Acatlazemia	115500
Fitanoil CoA hidroxilaza	PAHX	10p11.2	Boala Refsum	266500
<b>Tulburari în producția de energie</b>				
Piruvat carboxilaza	PC	11q13.4	Sindromul Leigh	266150
Piruvat decarboxilaza	PDH	Xp22.1	Ataxia cu acidoză lactică tip I	208800
<b>Boli ale enzimelor implicate în sinteza hormonilor</b>				
21-hidroxilaza	CYP21A2	6p21.3	Hiperplazia adrenaliană congenitală	201910
<b>Defecte ale enzimelor extracelulare</b>				
Alfa-1 antitripsina	PI	14q32.1	Deficitul de alfa-1 antitripsina	107400

## 1.1 GALACTOZEMIA

*Definiție.* Galactozemia (OMIM 230400) este o boală autosomal recesivă determinată de mutații ale genei care codifică galactozo-1-fosfat uridil transferaza (GAL-1-P uridil transferaza).

*Incidență.* Forma clasică de galactozemie este cea mai frecventă boală monogenică care interesează metabolismul carbohidraților, afectând 1/48.000 nou-născuți.

*Manifestările clinice* apar la sugar, odată cu alimentația lactată, și constau în incapacitatea de hrănire, hepatomegalie cu insuficiență hepatică, tulburări neurologice, cataractă și întârzierea dezvoltării neuromotorii. Pe termen îndelungat afecțiunea determină retard în creștere, retard mintal, ciroză hepatică macronodulară și insuficiență ovariană la femei.

*Genetică.* Galactozemia se transmite autosomal recesiv. Gena GALT este alcătuită din 11 exoni, dar peste 70% din mutațiile cauzatoare ale acestei boli la caucazieni sunt reprezentate de o singură mutație punctiformă la nivelul exonului 6, care determină substituția unei glutamine cu

arginina (Q188R). Indivizii homozigoți pentru această mutație au o activitate enzimatică de circa 10%, ceea ce afectează capacitatea de conversie a galactozei în glucoză. Galactozemia poate fi determinată, de asemenea, de mutații ale genelor care codifică galactokinaza și uridin difosfat galactozo-4-epimeraza (UDP-galactozo-4-epimeraza). Deficiența galactokinazei asociază dezvoltarea cataractei, dar nu determină retardul creșterii, retard mintal sau afectare hepatică. Deficiența UDP-galactozo-4-epimerazei poate fi limitată numai la nivelul eritrocitelor și leucocitelor și în acest caz nu determină manifestări clinice, sau poate fi sistemică și determină manifestări clinice similare galactozemiei clasice.

*Patogenie.* Deficitul enzimatic de galactozo-1-fosfat uridil transferaza duce la acumularea galactozo-1-fosfatului și galactiolului (figura 11.3); primul metabolit este toxic pentru ficat, creier și rinichi iar cel de al doilea se depune în cristalin

*Diagnosticul* se bazează pe datele clinice și examenele de laborator care relevă galactozurie, valori crescute ale galactozei serice și mai ales activitatea redusă a galactozo-1-fosfat uridil transferazei plasmatică. În prezent este larg utilizat *screening-ul neonatal* pentru această afecțiune, realizat prin măsurarea activității plasmatică a galactozo-1-fosfat uridil transferazei într-o picătură uscată de sânge. Identificarea precoce permite instituirea precoce a tratamentului dietetic care constă în mare în eliminarea aportului de galactoză. Este posibil și *diagnosticul prenatal*.

*Tratamentul dietetic* prin reducerea aportului alimentar de galactoză permite prevenirea substanțială a morbidității asociate efectelor acute induse de metabolizii galactozei. Cu toate acestea, tratamentul dietetic nu influențează instalarea disfuncției cerebrale și a insuficienței ovariene.

*Prognosticul* este rezervat și variabil la diferiți pacienți.

## 1.2. FENILCETONURIA

*Definiție.* Fenilcetonuria (OMIM 261600) este o boală autosomal recesivă a metabolismului fenilalaninei determinată de mutații ale genei PAH (localizată pe cromosomul 12q24.1) care codifică fenilalanin hidroxilaza, enzima ce transformă fenilalanina în tirozină.

*Incidența* fenilcetonuriei este de circa 1/15.000 nou-născuți în populația caucaziană.

*Manifestările clinice* se instalează, de obicei, după primul trimestru de viață; nou-născutul este indemn din punct de vedere clinic, cu excepția pigmentației cutanate reduse asociată cu păr blond și ochi albaștri (toate aceste semne fiind determinate de deficitul de tirozină, un precursor al melaninei). Boala se manifestă prin tulburări neurologice, retard somatic și retard mintal; la aceste fenomene se mai pot adăuga mirosul particular al urinei ("de șoarece" sau „de hambar“) și o dermatită cronică descuamativă.

*Genetică.* Gena pentru PAH a fost izolată în 1986, iar studiile ulterioare au evidențiat mare heterogenitate alelică la indivizii bolnavi. Astfel, au fost descrise peste 400 de mutații, dar majoritatea lor sunt foarte rare. Șase dintre aceste mutații sunt însă responsabile pentru circa două treimi din cazurile de fenilcetonurie în populația europeană. Datorită multitudinii acestor mutații, cei mai mulți dintre bolnavi sunt heterozigoți compuși și aceasta determină o diversitate largă a nivelurilor reziduale ale activității enzimatice.

*Patogenie.* Deficitul PAH determină incapacitatea de transformare a fenilalaninei în tirozină și acumularea în organism a fenilalaninei și ai unor metaboliți ai acesteia (acidul fenilpiruvic, fenilactic etc (figura 11.4) care determină leziuni ale sistemului nervos central în primii ani de copilărie. Excluderea fenilalaninei din alimentație previne apariția acestor manifestări. Aproximativ o treime din pacienții cu hiperfenilalaninemie nu prezintă mutații la nivelul PAH, ci ale unor enzime implicate în metabolismul tetrahidrobiopterinei (BH4), un cofactor al PAH. Aceste enzime sunt: pterin-4-alfa-carbinolamin dehidraza (PCD),

dihidropteridin reductaza (DHPR), guanozin trifosfat ciclohidraza (GTP-CH) și 6-piruviltetrahidropterin sintetaza (6-PTS) – vezi figura 11.4. În cazul acestor pacienți, restricția aportului alimentar de fenilalanina nu este eficientă în evitarea problemelor neurologice, deoarece BH4 este cofactor pentru alte două enzime: tirozin-hidroxilaza și triptofan-hidroxilaza care intervin în sinteza unor neurotransmitători monoaminci precum DOPA, norepinefrina, epinefrina și serotonina. Ca urmare, la acești pacienți este necesară suplimentarea cu L-DOPA și 5-hidroxitriptofan.

*Diagnosticul* de certitudine se stabilește pe baza următoarelor criterii: fenilalanina plasmatică mai mare de 20 mg/dl; eliminare urinară crescută de acid fenil-piruvic și orto-hidroxi-fenil acetic; tirozina plasmatică normală; valoare normală a tetrahidrobiopterinei. Este important ca diagnosticul să se precizeze la nou-născut, înaintea apariției semnelor clinice, deoarece dieta restrictivă în fenilalanina previne instalarea acestora și asigură o dezvoltare somatică și neuro-psihică normală. În acest scop, în majoritatea țărilor se efectuează screening-ul bolii, în maternități, după primele 3 zile de viață (interval în care copilul a primit fenilalanina, prin alimentația lactată), folosind testul Guthrie (bazat pe inhibiția creșterii coloniilor de bacil subtilis de către fenilalanina din sânge); testul pozitiv impune evaluarea completă a pacientului, pentru precizarea diagnosticului. *Diagnosticul diferențial* trebuie să excludă alte cauze de hiperfenilalaninemie la nou-născut sau – în cazul nedorit al unui diagnostic stabilit tardiv – alte cauze de encefalopatie cu spasticitate sau sindrom convulsiv și retard mental.

*Tratamentul* este dietetic, având ca obiectiv reducerea aportului de fenilalanina la minimum necesar pentru asigurarea dezvoltării organismului, în așa fel, încât fenilalanina plasmatică să se mențină la valori între 2-10 mg/dl (preferabil < 6 mg/dl). *Momentul* inițierii este cât mai precoce, în prima lună de viață, cel mai târziu în primul trimestru, iar *durata* este indefinită.

*Prognosticul.* Dacă diagnosticul se face la naștere și tratamentul dietetic este bine condus prognosticul este bun, indivizii afectați având o viață cvasi-normală. Femeile cu fenilcetonurie pot da însă naștere unor copii cu retard mental și microcefalie (encefalopatia fenilpiruvică) dacă prezintă valori înalte ale fenilalaninei plasmatică. De aceea se recomandă ca înainte și în cursul sarcinii, dieta să fie strict supravegheată, în așa fel încât fenilalanina plasmatică să fie < 10 mg/dl (preferabil < 6 mg/dl).

### 1.3. BOLILE LIZOZOMALE

Bolile lizozomale sunt cauzate de deficitul unor enzime (hidrolaze) sau a altor proteine lizozomale funcționale, care determină acumularea substratului nemetabolizat în lizozomi, la nivelul sistemului nervos central, viscerelor sau miocardului.

Au fost descrise până în prezent peste 40 de boli lizozomale, care realizează împreună o frecvență de 1/5.000 – 1/10.000 nou-născuți. În funcție de substratul metabolic acumulat, ele se grupează în mai multe categorii, cele mai importante sunt sfingolipidozele, mucopolizaharidozele și mucopolipidoze.

**a. Sfingolipidozele** constau în acumularea sfingolipidelor neutre și gangliozidelor sau a unor produși de metabolism ai acestora, predominant la nivelul substanței albe (leucodistrofiile) sau a substanței cenușii (gangliozidozele) din SNC, mai rar în alte țesuturi. De aceea majoritatea sfingolipidozelor determină suferință neurologică, secundară acumulării substratului nemetabolizat. Principalele tipuri de sfingolipidoze sunt: *boala Gaucher* (prin deficit de  $\beta$ -glucozidaza), *boala Fabry* (prin deficit de  $\alpha$ -galactozidază), gangliozidoza GM<sub>1</sub> (prin deficit de  $\beta$ -galactozidază), gangliozidoza GM<sub>2</sub> (prin deficit de  $\beta$ -hexozaminidază A) sau *boala Tay-Sachs*, *boala Niemann-Pick* (prin deficit de sfingomielinază) și *leucodistrofia metacromatică* (prin deficit de arilsulfataza A).

**Boala Gaucher** este cea mai frecventă boală lizozomală (1:50.000 nou-născuți), fiind produsă de către deficitul de  $\beta$ -glucozidază, cauzat de o serie de mutații la nivelul genei GBA, localizată pe cromozomului 1q21. În funcție de severitatea deficitului enzimatic, vârsta de debut, prezența sau absența suferinței neurologice și evoluție se descriu trei tipuri de boală Gaucher: *tipul I* (forma cronică, adultă sau nonneuronopatică), *tipul II* (infantil, neuronopatic acut) și *tipul III* (juvenil, neuronopatic subacut). Boala se manifestă prin: splenomegalie și hepatomegalie impresionantă; osteopatia, tradusă pe plan clinic prin dureri (crizele osoase) și fracturi mai ales la nivelul oaselor membrelor, corpilor vertebrelor toracice și pelvisului; simptome secundare de pancitopenie (sindromul anemic și sindromul hemoragipar); suferință neurologică (în tipul II și III). Testele specifice sunt: activitatea redusă a  $\beta$ -glucozidazei în leucocite și prezența mutației genice (analiza ADN)<sup>2</sup>. Boala Gaucher tipul I beneficiază de tratament substitutiv enzimatic cronic, cu enzimă (imingluceraza) obținută prin tehnologia ADN-ului recombinant.

**b. Mucopolizaharidozele (MPZ)** sunt boli cu evoluție progresivă, cauzate de acumularea intralizozomală în exces a mucopolizaharidelor acide, consecutivă deficitului unor enzime lizozomale. Mucopolizaharidele acide (glicozaminoglicanii) se leagă de obicei de proteine, cu care formează proteoglicanii, constituenți majori ale substanței de bază a țesutului conjunctiv. În funcție de defectul enzimatic se deosebesc mai multe tipuri de MPZ, diferite prin defectul enzimatic; cele mai frecvente sunt tipul I (*sindromul Hurler*); tipul II (*sindromul Hunter*); tipul III (*sindromul Sanfilippo*), tipul IV (*sindromul Morquio*). Simptomele și semenele întâlnite în MPZ pot fi cauzate de acumularea tisulară de glicozaminoglicani (trăsături infiltrate ale feței, tegumente îngroșate, opacifierea corneei și hepato-spleno-cardiomegalie), deficitul funcțiilor celulare (retardul mintal, deficitul de creștere, displazia osoasă) sau de interferența dintre glicozaminoglicanii acumulați și colagen sau fibronectină (osteopatia cu anchiloza în flexie, herniile).

**c. Mucolipidozele** se prezintă sub 4 tipuri: *sialidoza* (prin deficit de glicoprotein-sialidază), *mucolipidoza tip II* (boala ci celule I, secundară deficitului de N-acetil-glicozamino-fosfotransferază), *mucolipidoza III* (o formă mai puțin severă a aceleiași deficit enzimatic) și *galactosialidoza*.

#### 1.4. BOLILE PERXIZOMALE

Peroxizomii sunt organite subcelulare delimitate de o membrană lipidică trilaminară, prezenți în toate celulele dar abundenți în ficat și rinichi. Matricea lor conține peste 40 de enzime implicate în reacțiile de oxidare a acizilor grași și biosinteza colesterolului. Există două categorii principale de boli peroxizomale, produse fie de tulburări în biogeneza peroxizomilor (de exemplu, sindromul Zellweger, în care există o reducere marcată a numărului de peroxizomi), fie prin deficiența unei anumite enzime peroxizomale (de exemplu, adrenoleucodistrofia, acatalazemia, boala Refsum).

**Sindromul Zellweger** este o boală letală, transmisă autosomal recesiv care în forma clasică se manifestă prin: dismorfie cranio-facială (fontanele cu suturi larg deschise, occiput plat, hipertelorism, epicantus, anomalii ale pavilioanelor auriculare); disfuncție neurologică gravă (hipotonie, surditate de percepție și cataractă sau corioretinopatie, convulsii); retard psiho-motor, hepatosplenomegalie; icter colestatic (inconstant); chisturi renale și retard somatic. Evoluția este severă, cu deces în primul an de viață.

**Adrenoleucodistrofia** este cauzată de mutația unei gene localizate pe cromozomul X

<sup>2</sup> Primul Centru de Diagnostic al Bolilor Lizozomale din țară, înființat în anul 1997 la Cluj, a introdus recent diagnosticul enzimatic și diagnosticul molecular pentru boala Gaucher .

(Xq 28), care determină sinteza unei proteine peroxizomale – ALDP – implicată în metabolismul acizilor grași saturați cu lanț foarte lung. Boala se transmite recesiv legat de X și debutează de obicei după vârsta de 10 ani, prin scăderea performanțelor școlare, tulburări de comportament, convulsii și insuficiență corticosuprarenală; se produce apoi pierderea progresivă a vederii, a vorbirii și demență. Suferința neurologică severă, caracteristică bolii, este expresia unui proces progresiv de demielinizare cerebrală, determinat de efectul citotoxic al acizilor grași saturați, cu lanț foarte lung. Diagnosticul este confirmat prin demonstrarea valorilor crescute ale acizilor grași cu lanț foarte lung în plasmă sau fibroblaști.

## 2. BOLI PRODUSE PRIN ANOMALII ALE PROTEINELOR DE TRANSPORT.

Deplasarea eficientă a moleculelor – spre interiorul celulelor, între diversele lor compartimente, precum și între celule – necesită adeseori intervenția unor macromolecule care *mediază* transportul lor. Circa o treime din totalul proteinelor care intră în structura diverselor membrane (ale celulelor sau ale diverselor organite) sunt implicate în procese de transport. La aceste procese participă însă și unele proteine citoplasmice sau proteine din spațiul extracelular.

1. **Proteinele de transport transmembranare** pot fi clasificate în patru clase, primele două fiind implicate în difuziunea facilitată, iar ultimele două în transportul activ:

- **Proteinele de transport tip canal** realizează pori care permit unor molecule mici, ce corespund ca dimensiune și încărcare electrică, să traverseze membrana respectivă. Astfel, *aquaporinele* permit moleculelor de apă să străbată membrana mult mai rapid decât acestea o pot realiza prin stratul fosfolipidic iar *canalele ionice* mediază pasajul ionilor prin membrane. **Canalele ionice** sunt caracterizate prin trei proprietăți: a) transportul realizat este extrem de rapid; b) sunt adeseori înalt selective pentru o anumită specie de ioni (fiind astfel clasificate în canale de sodiu, potasiu, clor, calciu sau canale cationice); c) majoritatea canalelor nu sunt permanent deschise, deschiderea lor fiind reglată fie prin legarea tranzitorie a unor liganzi (precum neurotransmitatori sau alte molecule de semnalizare – canale ligand dependente), fie ca răspuns la schimbarea potențialului electric de-a lungul membranei (canale voltaj dependente). Majoritatea canalelor ionice sunt alcătuite din oligomeri ai unor subunități alfa identice sau omologe care formează porii, alături de subunități beta și uneori gamma care sunt implicate în reglarea funcției lor. În genomul uman există circa 260 de gene care codifică diverse subunități ale canalelor ionice.
- **Proteinele de transport tip cărăuș** leagă specific anumite moleculele la nivelul unei fețe a membranei și apoi suferă o modificare conformatională care permite moleculei să străbată membrana și să fie eliberată pe fața opusă. Asemenea proteine sunt implicate în transportul glucidelor, aminoacizilor, nucleozidelor etc. Există trei forme de transport mediat de proteinele cărăuș: *uniport* (transportul unei singure molecule prin difuziune facilitată), *cotransport* (transportul a două sau mai multe specii de molecule în aceeași direcție) sau *antiport* (transportul a două sau mai multe specii de molecule în direcții opuse). Ele nu utilizează nici o altă sursă de energie în afara de energia chimio-osmotică. Cele mai importante pentru patologia umană sunt proteinele din **familia SLC** (*solute carrier*). În genomul uman există 259 gene care codifică proteine ce aparțin acestei familii.
- **Pompele ionice** (precum pompa  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ) utilizează energia obținută prin hidroliza ATP pentru deplasarea ionilor *împotriva* unor gradiente de concentrație. Ele fac parte din familia transportorilor ATP-azici, codificați în genomul uman de 251 de gene.
- **Familia transportorilor ABC** (ATP-binding cassette) este astfel denumită datorită prezenței unor domenii de legare a ATP, înalt conservate. Au fost identificate circa 50 de gene umane care codifică asemenea proteine.

2. **Proteinele de transport intracitoplasmice** sunt implicate în procese precum transportul oxigenului (hemoglobina), transportul asociat microtubulilor (dineina, dinactina, și kinezina) sau procesele de trafic ale structurilor membranare (clatrinele, miozinele, proteinele RAB și proteinele SNARE).

3. **Proteinele de transport plasmatic** asigură deplasarea a diverși compuși între compartimentele organismului. Așa sunt apolipoproteinele, transtiretina, ceruloplasmina etc.

Toate aceste categorii de proteine implicate în transportul unor molecule pot suferi modificări determinate de mutații, ce produc boli monogenice (vezi tabelul 11.2).

Mutațiile implicate în producerea unor boli ale proteinelor de transport pot determina fie



pierdere de funcție, fie câștig de funcție.

- *Mutațiile cu pierderea funcției* determină *boli recesive*, așa cum sunt fibroza chistică sau sindromul Bartter. În cazul proteinelor care formează complexe multimerice, acest tip de mutații pot avea însă *efecte dominant negative*. Este interesant de observat că în funcție de prezența sau absența efectelor dominant negative, mutații diferite la nivelul aceleiași gene pot determina fie boli recesive, fie boli dominante. Așa este de exemplu cazul mutațiilor genei CLCN1 (care codifică canalul de clor de la nivelul mușchilor scheletici): unele mutații determină forma recesivă (tip Becker) de miotonie congenitală, alte mutații produc forma dominantă (tip Thomsen). În plus, formele recesive de boală pot prezenta simptome calitativ noi față de formele dominante; de exemplu, pacienții heterozigoți pentru mutații dominant negative ale genei KCNQ1 (canalul de potasiu voltaj dependent tip 1) prezintă sindrom QT-lung cu aritmii cardiace severe (sindromul Romano-Ward), în timp ce mutațiile recesive, care determină pierderea completă a funcției, vor conduce la homozigoți la asocierea aritmiilor cu surditatea congenitală (sindromul Jervell-Lange-Nielsen).
- *Mutațiile cu câștig de funcție* care vor produce de obicei boli transmise dominant. Un exemplu îl constituie mutațiile subunităților beta sau gamma ale canalului renal epitelial de sodiu (SCNN1B sau SCNN1G) implicate în producerea sindromului Liddle (pseudoaldosteronism).

Având în vedere numărul foarte mare de boli genetice care pot fi produse prin anomalii ale proteinelor de transport trecere lor în revistă depășește scopul acestui capitol; de aceea am realizat în tabelul 11.2 o sinteză a principalelor categorii și tipuri mai frecvente de boli și ne vom limita în cele ce urmează doar la prezentarea unui exemplu ilustrativ – fibroza chistică.

**Tabelul 11.2. Exemple de boli genetice produse prin mutații ale unor proteine de transport**

Proteina	Gena	Localizare cromosomică	Boala	OMIM
<b>Boli prin mutații ale unor proteine canal</b>				
Aquaporina 2	AQP2	12q13	Diabetul insipid nefrogen	107777
Subunitatea alfa a canalului de sodiu neuronal tip 1	SCN1A	2q24	Epilepsia generalizată cu crize comitiale febrile	182389
Subunitatea alfa a canalului de sodiu voltaj-dependent tip 4	SCN4A	17q23.1-q25.3	Paramiotonia congenitală	603967
Subunitatea alfa a canalului de sodiu voltaj-dependent tip 5	SCN5A	3p21	Sindromul Brugada	600163
Subunitatea alfa a canalului de sodiu nonvoltaj-dependent tip 1	SCNN1A	12p13	Pseudohipoaldosteronismul tip 1	600228
Subunitățile beta/gamma ale canalului de sodiu nonvoltaj tip 1	SCNN1B SCNN1G	6p13-p12 6p13-p12	Sindromul Liddle	600760 600761
Canalul de potasiu voltaj-dependent, subfamilia KQT, membrul 1	KCNQ1	11p15.5	Sindromul Romano-Ward (AD) Sindromul Jervell-Lange-Nielsen (AR)	192500
Canal de potasiu, subfamilia J, membrul 1	KCNJ1	11q24	Sindromul Bartter	600359
Canal de potasiu voltaj-dependent, subfamilia ISK, membrul 3	KCNE3	11q13-q14	Paralizia periodică	604433
Canal de calciu voltaj-dependent tip L, subunitatea alfa-1S	CACNA1S	1q32	Paralizia periodică hipokaliemică	114208
Canalul de clor tip 1 din mușchii scheletici	CLCN1	7q35	Miotonia Becker (AR) sau Thomsen (AD)	118425
Canalul de clor tip 7	CLCN7	16p13	Osteopetroza	602727
<b>Boli prin mutații ale proteinelor din familia SLC</b>				
Transportorul de glucoză tip 2	SLC2A2	3q26.1-q26.3	Sindromul Fanconi-Bieckel	227810

Proteina	Gena	Localizare cromosomică	Boala	OMIM
Transportorul pentru cistina, aminoacizi dibazici și neutri	SLC3A1	2p16.3	Cistinuria	220100
Schimbatorul de anioni tip 1/proteina banda 3	SLC4A1	17q21-q22	Sferocitoza ereditară	182900
Cotransportorul sodiu-glucoza	SLC5A1	22q13.1	Malabsorbția pentru glucoză/galactoză	606824
Cotransportor sodiu-iod	SLC5A5	19p13.2-p12	Hipotiroidia congenitală	274400
Transportorul ileal pentru sodiu și acizi biliari	SLC10A2	13q33	Malabsorbția primară a acizilor biliari	601295
Cotransportorul sodiu-clor	SLC12A3	16q13	Sindromul Gitelman	263800
Transportorul de urati	SLC22A12	11q13	Hipouricemia renală	220150
Transportor ADP/ATP mitocondrial	SLC25A4	4q35	Oftalmoplegia externă progresivă cu deleții ale ADN mitocondrial	157640
Transportor de citrina	SLC25A13	7q21.3	Citrulinemia tip II cu debut adult	603471
Transportor de zinc	SLC39A4	8q24.3	Acrodermatita enteropatică	201100
<b>Boli prin mutații ale proteinelor din familia ATPaze-lor</b>				
Transportor Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> , subunitatea alfa 2	ATP1A2	1q21-q23	Migrena familială hemiplegică	602481
Transportor rapid de Ca <sup>2+</sup>	ATP2A1	16p12	Miopatia Brody	601003
Transportor lent de Ca <sup>2+</sup>	ATP2A2	12q23-q24.1	Boala Darier	124200
Transportor lizozomal de H <sup>+</sup>	ATP6V0A4	7q33-q34	Acidoza tubulară renală distală AR	602722
Transportor de Cu <sup>2+</sup> , Polipeptid beta	ATP7B	13q14.3-q21.1	Boala Wilson	277900
Transportor de Cu <sup>2+</sup> , Polipeptid alfa	ATP7A	Xq12-q13	Boala Menkes	309400
<b>Boli prin mutații ale unor proteine din familia ABC</b>				
Proteina ABC, subfamilia A, membrul 1	ABCA1	9q22-q31	Boala Tangier	205400
Proteina ABC, subfamilia A, membrul 4	ABCA4	1p21-p13	Boala Stargardt	248200
Proteina ABC, subfamilia B, membrul 11	ABCB11	2q34	Colestaza familială progresivă intrahepatică tip 2	601847
Proteina ABC, subfamilia C, membrul 2	ABCC2	10q24	Sindromul Dubin-Johnson	237500
Proteina ABC, subfamilia C, membrul 6	ABCC6	16p13.1	Pseudoxantoma elasticum AR sau AD	264800 177650
Proteina ABC, subfamilia C, membrul 7	ABCC7	7q31.2	Fibroza chistică	219700
Proteina ABC, subfamilia D, membrul 1	ABCD1	Xq28	Adrenoleucodistrofia	300100
Proteina ABC, subfamilia G, membrul 5	ABCG5	2p21	Sitosterolemia	210250
Proteina ABC, subfamilia G, membrul 8	ABCG8	2p21	Sitosterolemia	210250
<b>Boli produse prin mutații ale proteinelor de transport citoplasmatic</b>				
Hemoglobina beta	HBB	11p15.5	Hemoglobinopatia Kempsey	141900
Dineina axonemala lantul intermediar tip 1	DNAI1	9p21-p13	Sindromul Kartagener	244400
Dinactina 1	DCTN1	2p13	Boala Lower	607641
Kinezina 5A	KIF5A	12q13	Paraplegia spastică tip 10	604187
Kinezina 1B	KIF1B	1p36.2	Boala Charcot-Marie-Tooth tip 2A	118210
Proteina RAB27	RAB27A	15q21	Sindromul Griscelli	607624
Proteina RAB7	RAB7	3q21	Boala Charcot-Marie-Tooth 2B	600882
Proteina de escorta tip 1 a RAB	REP1	Xq21.2	Coroideremia	303100

Proteina	Gena	Localizare cromosomică	Boala	OMIM
Miozina tip VIIa	MYO7A	11q13.5	Sindromul Usher	276900
<b>Boli produse prin mutații ale proteinelor de transport plasmaticice</b>				
Apolipoproteina E	APOE	19q13.2	Hiperlipoproteinemia tip III	107741
Apolipoproteina B	APOB	2p24	Hipobetalipoproteinemia familiala	107730
Apolipoproteina C-II	APOC2	19q13.2	Hiperlipoproteinemia tip IB	207750
Transtiretina (prealbumina ce leaga tiroxina)	TTR	18q11.2-q12.1	Amiloidoza familială tip 1	176300
Ceruloplasmina	CP	3q23-q24	Aceruloplasminemia	604290

## 2.1. FIBROZA CHISTICĂ

Fibroza chistică sau mucoviscidoza (OMIM 219700) este una dintre cele mai frecvente boli genetice cu transmitere autosomal recesivă din populația caucaziană, prevalența sa fiind estimată la aproximativ 1/2000, iar incidența purtătorilor sănătoși (Na) – la 1/25.

*Simptomatologie.* Principalele manifestări clinice ale bolii sunt determinate de afectarea plămânilor și pancreasului exocrin. Afectarea acestor organe este rezultatul secrețiilor vâscoase ale glandelor exocrine, care determină obstrucția structurilor canaliculare. La nivel pulmonar aceasta determină infecții recurente cu evoluție spre insuficiența pulmonară, iar obstrucția canalelor pancreatice are drept consecință deficiența enzimelor pancreatice, cu afectarea digestiei. Un semn major pentru diagnostic este creșterea concentrației de sodiu și clor în secrețiile sudorale (peste 60mEq/L). Alte manifestări clinice constau în ileusul meconial, la 10-25% din nou-născuții cu fibroza chistică, și absența congenitală bilaterală a vaselor deferente la băieți în 95% din cazuri.

*Genetică.* Gena responsabilă de producerea bolii a fost identificată prin clonare în 1989 și denumită CF (de la *cystic fibrosis*). Analizele funcționale au demonstrat că proteina codificată de gena CF (denumită CFTR) acționează ca un canal de clor localizat la nivelul polului apical al celulelor epiteliale afectate în cadrul acestei boli. Recent, gena CF a fost inclusă în familia genelor transportorilor ABC (cu casetă de legare a ATP), fiind desemnată ca ABCC7. Frecvența crescută a heterozigoților în populația generală a condus la emiterea ipotezei că starea de heterozigot prezintă un avantaj selectiv; această ipoteză este susținută de descoperirea faptului că produsul proteic al genei ABCC7 funcționează ca receptor pentru *Salmonella typhimurium* și este implicat în imunitatea împotriva infecțiilor cu *Pseudomonas aeruginosa*, deci heterozigoții sunt mai rezistenți la aceste infecții.

Gena ABCC7 este localizată pe cromosomul 7q31 și conține 27 de exoni care codifică o proteină canal de clor transmembranară alcătuită din cinci domenii funcționale: două domenii transmembranare (MSD – *membrane spanning domains*), două domenii de legare a ATP (NBD – *nucleotide binding domains*) și un domeniu reglator (R) cu mai multe situsuri de fosforilare (figura 11.5). Prima mutație identificată a fost o deleție a trei nucleotide soldată cu absența aminoacidului fenilalanina din poziția 508 a proteinei ( $\Delta F508$ ). Această mutație este cea mai frecventă în populația caucaziană, reprezentând circa 70% din toate mutațiile. Au fost descrise însă numeroase alte mutații, deși doar 7 dintre ele au frecvențe care depășesc 0,5%; Frecvența lor în diferite populații este însă variată. Astfel, mutația W1282X este prezentă la 51% dintre bolnavii din comunitatea evreilor Ashkenazi, în timp ce mutația 1677delTA este întâlnită cu o frecvență crescută în Balcani și Asia Mica. În populațiile în care frecvența alelei  $\Delta F508$  este de aproximativ 70%, mai mult de jumătate dintre pacienți sunt homozigoți pentru această mutație, în timp ce alți 30% sunt heterozigoți compuși.

S-au descris patru clase de mutații ale genei ABCC7:

- mutațiile de clasa I conduc la defecte în producția proteinei; astfel de mutații sunt cele care determină apariția

unor codoni stop sau a unor specii instabile de ARNm;

- mutațiile de clasa II (cum este, de exemplu,  $\Delta F508$ ) au ca rezultat producerea unor defecte ale procesării proteinei (defecte de plicaturare);
- mutațiile de clasa III apar la nivelul domeniilor NBD sau R și produc dereglări ale activității proteinei;
- mutațiile de clasa IV sunt localizate la nivelul domeniilor MBD și alterează capacitatea de transport a clorului.

Gradul crescut de heterogenitate clinică observat în cadrul bolii este determinat de heterogenitatea alelică, dar și de intervenția unor *gene modificatoare* sau a unor factori de mediu. S-a stabilit existența unei corelații între tipul mutațiilor și funcția pancreatică. Astfel, mutațiile nonsens care produc alele nule sau homozigozitatea pentru mutația  $\Delta F508$  tind să se asocieze cu insuficiența pancreatică, în timp ce mutațiile care permit sinteza unei proteine parțial funcționale – ca, de exemplu, R334W – nu alterează funcția pancreatică. În schimb, la purtătorii aceleiași mutații există un grad crescut de variabilitate a alterării pulmonare. Până în prezent nu a fost identificată nici o genă modificatoare a fenotipului pulmonar, însă o genă modificatoare care influențează apariția ileusului meconial a fost localizată pe cromosomul 19q13. În sfârșit, la pacienții homozigoti pentru alele care alterează doar într-o măsură redusă funcția CFTR singurul semn al bolii îl poate reprezenta doar absența congenitală bilaterală a vaselor deferente. Recent s-a constatat ca heterozigoții pentru mutații CF pot avea o incidență crescută a pancreatitei și bronșiectaziei.

*Screening neonatal.* Fibroza chistică întrunește majoritatea criteriilor necesare pentru introducerea sa în programele de screening neonatal. Cu toate acestea, nu este clar dacă detectarea prin screening a pacienților îmbunătățește semnificativ supraviețuirea lor. Un obstacol îl constituie heterogenitatea genetică a bolii, peste 5% dintre pacienți fiind heterozigoți compuși pentru alele rare în populație. Tipic, screening-ul este realizat pentru 10 până la 30 dintre cele mai frecvente mutații din regiunea geografică respectivă.

*Diagnostic prenatal* este indicat în special în cazul familiilor în care există bolnavi cu fibroză chistică.

*Tratament.* În prezent, circa 50% din pacienți depășesc vârsta de 26 de ani. Un rol major în prelungirea vieții îl au tratamentul intensiv al bolii pulmonare și suplimentarea enzimelor pancreatice.

### 3. BOLI PRIN ANOMALII ALE PROTEINELOR STRUCTURALE

Proteinele structurale asigură forma și organizarea caracteristică a celulelor și țesuturilor citoplasmei. Se pot deosebi trei categorii majore de proteine structurale: proteine ale citoscheletului celular, proteine ale structurii membranare și proteine structurale extracelulare.

- **Citoscheletul celular** este alcătuit din trei tipuri principale de proteine filamentoase: filamentele de actina, filamentele intermediare și microtubulii, care sunt menținute împreună și atașate la organele celulare și la membrana plasmatică printr-o varietate de proteine accesorii.

**Filamentele de actină** sunt alcătuite în principal din monomeri de *actină G* (gamma) polimerizați sub forma unor filamente cu aspect dublu helicoidal. Aceste filamente se asociază cu o serie de proteine care au rol în organizarea în rețele a filamentelor de actină, precum *alfa-actinina*, *filamina*, *vilina* și *fimbrina*. Filamentele de actină se atașează și la nivelul membranei celulare prin intermediul unor complexe proteice, diferite în funcție de tipul celular. Astfel, la nivelul eritrocitelor, rețeaua filamentelor de actină este atașată la nivelul *proteinelor banda 3* membranare prin intermediul unor complexe proteice care conțin *spectrina*, *ankirina*, *proteina banda 4.1* și *aducina*. Alte proteine din familia spectrinei sunt *distrofina* (în celulele musculare striate) sau *fodrina*. În plachete, *filamina* este echivalentul proteinei 4.1 eritrocitare iar în celulele epiteliale *eprina* atașează filamentele de actina la CFTR. În sfârșit, filamentele de actină pot fi atașate la o serie de structuri specializate ale membranei plasmatică numite joncțiuni. Astfel, *talina*, *vinculina* și *alfa-catenina* mediază ancorarea filamentelor de actină la *integrinele* din structura joncțiunilor focale, în timp ce *beta-cateninele* mediază interacțiunea filamentelor de actina cu *caderinele* din structura joncțiunilor aderente.

**Filamentele intermediare** sunt alcătuite dintr-o varietate de proteine care diferă în funcție de tipul celular. Au fost identificate peste 50 asemenea proteine care au fost clasificate în 6 grupuri: tipul I (*keratinele acide* –

localizate în celulele epiteliale), tipul II (*keratinele neutre și bazice* – în celulele epiteliale), tipul III (*vimentina* – în fibroblaști, eritrocite, *desmina* – în celulele musculare, *proteina fibrilară acidă bazică glială* – în celulele gliale, *periferina* – în neuronii periferici), tipul IV (*proteinele neurofilamentare: NF-L, NF-M, NF-H* – în neuroni), tipul V (*laminele A, B și C* în membranele nucleare) și tipul VI (*nestina* – în celulele stem ale SNC). Filamentele intermediare sunt deseori organizate sub forma unor heterodimeri (de exemplu keratinele tip I și II sunt întotdeauna heterodimeri, la fel ca și neurofilamentele). Filamentele de keratină și vimentina sunt atașate la membrana nucleară, având se pare rol în poziționarea acestuia în celulă. În plus, filamentele intermediare sunt atașate și la nivelul a două structuri specializate ale membranei plasmatică: desmozomii și hemidesmozomii.

**Microtubulii** sunt alcătuiți din două tipuri principale de proteine, *tubulinele alfa și beta*. Ei sunt implicați în realizarea structurilor caracteristice unor tipuri celulare, cum sunt axonii celulelor nervoase, axonema flagelului spermatozoizilor sau banda marginală a plachetelor, precum și în funcționarea aparatului mitotic etc.

- **Proteinele de structură membranară** sunt implicate în adeziunea și comunicarea intercelulară. Există cinci clase principale de proteine de adeziune intercelulară (CAMs – *cell adhesion molecules*): caderinele (precum *caderinele E, P și N*), *superfamilia imunoglobulinelor (N-CAM și I-CAM)*, *selectinele* (precum *selectina P*), *mucinele și integrinele* (reprezentate de *integrinele alfa și beta*). Deși sute de asemenea proteine individuale sunt suficiente pentru a asigura adeziunea intercelulară, există și o serie de aglomerări ale unor asemenea proteine care realizează structuri specializate în adeziunea intercelulară. Acestea sunt reprezentate de *joncțiunile aderente* (ce conțin *caderine E* alături de *cateninele alfa și beta*), *desmozomii* (alcătuite din *plakoglobina, desmogleina* – înrudită cu *caderinele și desmocolina*), *joncțiunile strânse* (alcătuite din *claudine și ocludine*) și *joncțiunile gap* (alcătuite din *conexine*, cu în comunicarea intercelulară).
- **Proteinele matricei extracelulare** au drept reprezentant principal *colagenul*, cea mai abundentă proteină animală. Se cunosc peste 30 de tipuri de colagen care sunt caracterizate prin formarea unor triplu-helixuri. Alte componente proteice majore ale matricei extracelulare sunt *elastinele, fibrilinele și fibronectina*, ultima fiind principala proteină de adeziune a componentelor țesutului conjunctiv între ele precum și la integrinele membranare. Printre specializările matricei extracelulare se numără lamina bazală alcătuită dintr-o rețea de *colagen tip IV, laminină, perlecan și enactină*.

Mutațiile genelor ce codifică proteinele structurale determină boli genetice care pot afecta toate organele și sistemele. Printre clasele cele mai frecvente pot fi amintite *colagenozele, keratinopatiile, fibrilinopatiile, distrofiile musculare* etc. Întrucât multe din proteinele de structură descrise anterior formează homo- sau heteropolimeri, mutațiile lor vor avea adeseori *efecte dominant-negative*, ceea ce va conduce la o *transmitere dominantă* a bolilor. Așa sunt majoritatea bolilor proteinelor matricei extracelulare sau ale filamentelor intermediare. Dată fiind asemănarea structurală și funcțională a proteinelor din anumite familii (precum cea a colagenilor, keratinelor etc.), mutații la nivelul unor gene diferite pot produce boli genetice identice clinic.

De exemplu, în cazul keratinopatiilor, keratinopatia palmoplantară epidermolică este determinată de mutații ale genelor KRT1 și KRT9; distrofia corneala Meesmann este determinată de mutații ale genelor KRT3 și KRT12, în timp ce pachionichia congenitală este determinată de mutații ale genelor KRT6A, KRT6B, KRT16 și KRT17.

Pe de altă parte, acest fenomen al heterogenității genetice de locus este asociat cu fenomenul invers, în care mutațiile unei singure gene pot determina boli genetice diferite.

Astfel, mutațiile genei pentru lamina A produc: distrofia musculară Emery Dreifuss cu transmitere AD (OMIM 181350), distrofia musculară a centurilor tip 1B (OMIM 159001), cardiomiopatia dilatativă tip 1 (cu defect de conducere – OMIM 115200), boală Charcot-Marie-Tooth tip 2B1 (OMIM 605588), lipodistrofia familială parțială (OMIM 151660), sau progeria Hutchinson-Gilford (OMIM 176670).

În tabelul 11.3 am selectat exemplele cele mai reprezentative de boli monogenice produse prin anomalii ale unor proteine structurale, pentru a avea o informație preliminară privind complexitatea acestei categorii de boli și indicațiile OMIM pentru obținerea unor date suplimentare. În ceea ce urmează vom descrie câteva dintre cele mai frecvente boli din această categorie: distrofiile musculare Duchenne și Becker, osteogenesis imperfecta, sferocitoza ereditară, sindromul Ehlers-Danlos; sindromul Marfan a fost descris în capitolul 4 (vezi caseta 4.1).

### **Tabelul 11.3 Exemple de boli genetice produse prin mutații ale unor proteine de structură.**

Proteina	Gena	Localizarea cromosomică	Boala	OMIM
<b>Boli prin mutații ale proteinelor citoscheletului celular</b>				
Actina alfa cardiacă	ACTC	15q14.5	Cardiomiopatia idiopatică dilatativă	115200
Actina alfa scheletică	ACTA	1q42.1	Miopatia nemalinica tipul sever	256030
Filamina alfa	FLNA	Xq28	Heterotopia periventriculară	300049
Proteina 4.1 eritocitară	EPB41	1p36.2-p34	Eliptocitoza ereditară	130500
Spectrina alfa eritocitară	SPTA1	1q21	Eliptocitoza	182860
Spectrina beta eritocitară	SPTB	14q22-q23.1	Eliptocitoza tip 3	182870
Ankirina tip 1	ANK1	8p11.2	Sferocitoza ereditară	182900
Ankirina tip 2	ANK2	4q25-q27	Sindromul QT lung tip 4	600919
Distrofina	DMD	Xp21.2	Distrofia musculara Duchenne	300377
Titina	TTN	2q24.3	Distrofia musculara tibială tardivă	600334
Keratina tip 1	KRT1	12q13	Hiperkeratoza epidermolitică	113800
Keratina tip 5	KRT5	12q13	Epidermoliza buloasa simplex	131900
Keratina tip 9	KRT9	17q12-q21	Keratodermia epidermolitică palmoplantară	144200
Keratina 12	KRT12	17q12	Distrofia corneală Meesmann	122100
Desmina	DES	2q35	Miopatia legată de desmină	601419
Proteina fibrilară acidă glială	GFAP	17q21	Boala Alexander	203450
Proteina neurofilamentară ușoară	NEFL	8p21	Boala Charcot-Marie-Tooth tip 2E	607684
Lamina A	LMNA	1q21.2	Progeria Hutchinson-Gilford	176670
Emerina (proteina asociată I aminelor)	EMD	Xq28	Distrofia musculara Emery-Dreifuss	310300
Proteina tau (asociată microtubulilor)	MAPT	17q21.2	Demența frontotemporală cu parkinsonism	600274
<b>Boli produse prin mutații ale proteinelor de structură membranare</b>				
Caderina E	CDH1	16q22.1	Cancerul gastric difuz familial	137215
Integrina beta 3	ITGB3	17q21.32	Trombastenia Glanzmann	173470
Integrina beta 4	ITGB4	17q11-qter	Epidermoliza buloasa letală cu atrezie pilorică	226730
Desmoplakina	DSP	6p24	Keratoza palmoplantară striată	125647
Placofilina	PKP1	1q32	Displazia ectodermală	604536
Claudina 14	CLDN14	21q22.3	Surditate AR	605608
Claudina 16	CLDN16	3q27	Hipomagneziemia primară	248250
<b>Boli produse prin mutații ale proteinelor matricei extracelulare</b>				
Colagenul tip I, alfa-1	COL1A1	17q21.31-q22	Osteogeneis imperfectă tipurile I-IV	166200 166220
Colagenul tip II, alfa-1	COL2A1	12q13.1- q13.2	Sindromul Stickler tip I	108300
Colagenul tip IV, alfa-3	COL4A3	2q36-q37	Sindromul Alport AR	203780
Colagenul tip V, alfa-2	COL5A2	2q31	Sindromul Ehlers-Danlos tip I-II	130000 130010
Colagenul tip VI, alfa-2	COL6A2	21q22.3	Distrofia musculară scleroatonică Ullrich	254090
Colagenul tip VII, alfa-1	COL7A1	3p21.3	Epidermoliza buloasă distrofică recesivă	226600
Colagenul tip IX, alfa-2	COL9A2	1p33-p32.2	Distrofia epifizeală multiplă tip 2	600204
Colagenul tip X, alfa-1	COL10A1	6q21-q22.3	Condrodisplazia metafizeala tip Schmid	156500
Elastina	ELN	7q11.2	Stenoza aortică supravalvulară	185500
Fibrilina 1	FBN1	15q21.1	Sindromul Marfan	154700
Fibrilina 2	FBN2	5q23-q31	Arahnodactilia contractuală congenitală	121050
Laminina alfa-2	LAMA2	6q22-q23	Distrofia musculară congenitală cu deficit de merozină	156225

Proteina	Gena	Localizarea cromosomică	Boala	OMIM
Laminina gamma-2	LAMC2	1q25-q31	Epidermoliza buloasă joncțională tip Herlitz	226700
Perlecanul	HSPG2	1p36.1	Displazia dissegmentală Silverman-Handmaker	224410

### 3.1. DISTROFIA MUSCULARĂ DUCHENNE

Distrofia musculară Duchenne (OMIM 300377) este o boală transmisă legat de X cu o incidență de circa 1 la 3300 nou-născuți de sex masculin. Gena a cărei mutații determină distrofia musculară Duchenne a fost identificată în 1986 fiind una dintre primele descoperiri majore care au evidențiat potențialul pe care îl are medicina moleculară.

*Simptomatologie.* Pacienții se dezvoltă normal până la vârsta de 3 – 5 ani, când încep să apară semne de hipotrofie (distrofie) musculară manifestată predominant prin hipotonie musculară. Aceasta debutează la nivelul musculaturii membrilor inferioare și evoluează ascendent, până ce afectează musculatura respiratorie și determină decesul pacienților prin insuficiența respiratorie în jurul vârstei de 20 de ani. La aceste fenomene se asociază și retardul mintal moderat, cu o reducere medie a QI de 20 puncte. Forma Becker de distrofie musculară este determinată, de asemenea, de mutații ale genei pentru distrofină (circa 15% din mutațiile acestui locus), dar manifestările clinice sunt mai puțin severe, iar supraviețuirea este mai îndelungată. Majoritatea femeilor purtătoare nu prezintă manifestări clinice, deși 70% din ele au nivele crescute ale creatinkinazei serice. Inactivarea preferențială a cromosomului X purtător al mutației pare a contribui la absența manifestărilor clinice la femeile purtătoare. Există însă și cazuri (circa 8% din femeile heterozigote) când inactivarea cromosomului X interesează preferențial cromosomul X cu gena DMD normală, ceea ce determină hipotonie musculară semnificativă. Există chiar și cazuri rare de manifestări clinice complete la sexul feminin (în unele translocații X; autosomale sau în sindromul Turner).

*Genetică.* Gena DMD este cea mai mare genă umană, cu o lungime de peste 2 Mb, adică 1,5% din lungimea cromosomului X. Această lungime explică cel puțin în parte rata crescută a mutațiilor/locus ( $10^{-4}$ ) comparativ cu alte gene. Gena este alcătuită din 79 de exoni, cu 7 promotori care sunt responsabili de producerea de izoforme cu specificitate tisulară. Izoforma majoră este o proteină voluminoasă (427 kD) care predomină în mușchii scheletici, în miocard și în creier și îndeplinește două funcții majore: rol structural în menținerea integrității membranei (prin medierea interacțiunii între citoscheletul actinic și matricea extracelulară – vezi figura 11.6) și rol în funcționarea joncțiunilor sinaptice.

Cele mai frecvente mutații la pacienții cu distrofie musculară Duchenne sunt delețiile (60%) care în marea lor majoritate sunt localizate în regiunea 5' sau în zona centrală a genei. Mutațiile punctiforme reprezintă circa o treime din cazuri și sunt răspândite pe întreaga lungime a genei. Circa o treime din cazurile de DMD sunt determinate de mutații de novo, în timp ce restul provin de la mame purtătoare ale mutației. Deoarece boala este letală, bărbații afectați nu transmit mutația. În cazul formei Becker de boală, capacitatea reproductivă este de circa 70%, iar bărbații bolnavi pot transmite mutația la fetele lor. Ca urmare, o proporție însemnată din cazuri sunt moștenite în familie și doar 10% sunt determinate de mutații de novo.

*Diagnostic prenatal* al DMD este posibil. În 60-70% din cazuri (determinate de deleții) defectul poate fi pus în evidență prin Southern blot sau prin PCR multiplex (figura 11.7). În familiile în care mutația nu este cunoscută se pot utiliza analizele de înlănțuire. De asemeni, identificarea femeilor purtătoare printre rudele unor băieți afectați se poate realiza cu succes în 75% din cazuri, prin dozarea nivelului creatinkinazei serice.

*Tratament.* Singurul tratament utilizat este cel simptomatic. Există însă numeroase studii care încearcă să abordeze diverse alte metode de tratament (precum terapia genică) care vor fi discutate în capitolul 19.

### 3.2 OSTEOGENEZA IMPERFECTĂ

Osteogeneza imperfectă (OMIM 166200 – 166260) reunește un grup de boli transmise autosomal dominant, produse prin mutații ale colagenului tip I, ce determină predispoziție la deformații scheletice și fracturi osoase în urma unor traumatisme minime. Incidența lor cumulată este de circa 1 la 10000 în populația generală.

*Simptomatologie.* Din punct de vedere clinic se deosebesc patru tipuri majore de boală. Tipul I de boală (forma ușoară) se caracterizează prin asocierea fragilității osoase cu sclere albastre și eventual surditate presenilă; deformațiile scheletice sunt absente. Tipul II (sever) este letal în perioada neonatală și asociază fracturi osoase, deformații scheletice și sclere de culoare închisă. Tipul III asociază adeseori fracturi prezente la naștere cu deformații osoase progresive, hipostatură, sclere albastre, tulburări ale dentiției și surditate. În tipul IV, sclerele au aspect normal, deformațiile osoase sunt ușoare sau moderate dar persistă susceptibilitatea la fracturi, surditate și anomalii ale dentiției.

*Genetică.* Heterogenitatea clinică este explicată cel puțin în parte prin heterogenitatea alelică și de locus: fenotipul variază în funcție de tipul de lanț al procolagenului I care este afectat și de localizarea mutației la nivelul fiecărui locus. Au fost descrise peste 200 de mutații diferite ce afectează genele pentru colagenul I. Colagenul tip I este principala proteină structurală la nivelul osului și altor țesuturi fibroase. Moleculele de procolagen tip I sunt alcătuite din două lanțuri alfa1(I), codificate de o genă de pe cromosomul 17, și un lanț alfa2(I) codificat de o genă de pe cromosomul 7. Asamblarea acestor lanțuri într-un triplu helix în cursul maturării procolagenului începe la nivelul capătului C-terminal și evoluează către capătul N-terminal. Ca urmare, mutațiile în porțiunea C-terminală au efecte mai severe. De asemenea, mutațiile la nivelul procolagenului alfa1(I) tind să aibă efecte mai severe decât mutațiile la nivelul procolagenului alfa2(I), datorită efectelor dominant negative (vezi figura 11.1).

Se pot deosebi două tipuri majore de mutații implicate în etiologia osteogenezei imperfecte: mutații ce determină reducerea producției de colagen tip I și mutații care determină sinteza unor molecule anormale structural. Reducerea cantității de colagen I sintetizată este consecința unor mutații care au un efect sever asupra proteinei codificate. Sunt implicate în special mutații cu apariția unor codoni stop prematuri, mici deleții sau inserții ce determină decalarea cadrului de lectură sau mutații ale situsurilor de matisare. Aceste mutații interesează de regulă lanțurile alfa1(I) și sunt implicate în producerea tipului I de boală. Mutațiile care determină sinteza unor lanțuri proteice anormale, dar stabile tind să aibă consecințe clinice mai severe și se asociază cu formele II-IV de boală. Foarte multe dintre aceste mutații sunt substituții ale unor aminoacizi. Substituțiile la nivelul repetițiilor Gly-X-Y (unde X este adeseori prolina, iar Y este adeseori hidroxiprolina) au efectele cele mai importante. Este important de asemenea tipul de substituție. De exemplu, înlocuirea glicinei (aminoacid neutru) din repetiția amintită cu aspartatul (reziduu acid) are efecte disruptive majore, fiind asociată frecvent cu forma severă (tip II) de boală. Asemenea forme de mutații letale nu pot să fie transmise în succesiunea generațiilor și vor fi întâlnite ca mutații de novo sau, mai rar, în cazul unor mozaicisme germinale. Există și cazuri când aceeași mutație asociază fenotipuri diferite, ceea ce reflectă intervenția unor gene modificatoare.

*Diagnostic prenatal și sfat genetic.* Cunoștințele acumulate în înțelegerea efectelor pe care diferite mutații le pot avea asupra structurii și funcției colagenului permit în oarecare măsură predicția istoricului natural al bolii atunci când este identificată o mutație în cadrul activităților de



diagnostic prenatal. În plus, asocierea care există între mutații și tipul de transmitere (dominant sau recesiv), permite o apreciere mai corectă a riscului de recurență a bolii.

*Tratamentul bolii* consta în mare măsură, până nu de mult, numai în simpla corecție chirurgicală a efectelor fracturilor osoase. În prezent se asociază cu succes biofosfonații, o clasă de compuși care reduce resorbția osoasă, crescând densitatea și conținutul mineral al acestora la pacienții cu forme severe de boală.

### 3.3 SFEROCITOZA EREDITARĂ

Sferocitoza ereditară (OMIM 182900) este o boală genetică determinată de mutații ale unor gene care codifică proteine de structură ale membranei eritrocitare. Frecvența bolii este apreciată a fi de circa 1 la 5000 indivizi în populația europeană.

*Simptomatologie.* Boala se caracterizează printr-o marcată heterogenitate clinică, de la forme cvasiasimptomatice până la forme cu anemie hemolitică fulminantă. Trăsătura morfologică a bolii este prezența microsferocitelor, rezultatul unor pierderi ale membranei eritrocitare. Se adaugă o fragilitate osmotică anormală *in vitro*. Sferocitele sunt eliminate rapid din circulație la nivelul splinei (hemoliză extravasculară). Ca urmare, splenomegalia este una dintre trăsăturile dominante ale bolii. Principalele complicații sunt aplazia sau criza megaloblastică, criza hemolitică, colecistita și colelitiaza și hemoliza neonatală severă.

*Genetică.* Boala este transmisă de regulă autosomal dominant. În acest caz indivizii bolnavi sunt heterozigoți pentru mutația cauzatoare a bolii, formele homozigote nefiind descrise (probabil sunt incompatibile cu viața). Circa 25% din cazuri, deși determinate de mutații dominante, nu au istoric familial pozitiv, fiind rezultatul unor mutații *de novo*. Transmiterea autosomal recesivă este întâlnită în circa 20-25% din cazuri. În această situație indivizii bolnavi sunt homozigoți sau heterozigoți compuși. Dată fiind frecvența globală a bolii se apreciază că frecvența heterozigoților pentru asemenea mutații în populația generală ar fi de circa 1,4%.

Etiologia bolii este heterogenă, până în prezent fiind descrise drept cauză mutații la nivelul a cinci gene.

- Mutațiile genei pentru *ankirina 1* (ANK1 – cromosomul 8p11.2) sunt responsabile pentru circa 50% din cazurile de boală, transmiterea fiind dominantă. Au fost descrise circa 40 de mutații, majoritatea nonsens sau cu decalarea cadrului de lectură și absența produsului proteic.
- Mutațiile *spectrinei β* (SPTB – cromosomul 14q22-q22.3) sunt identificate în circa 20% din cazuri, fiind asociate de asemeni cu o transmitere dominantă. Până în prezent au fost identificate cca 20 de mutații diferite.
- Mutațiile *schimbătorului de anioni tip 1* sau proteina bandă 3 (gena SLC4A1 – cromosomul 17q21-q22) determină circa 15-20% din cazuri, transmiterea fiind recesivă. Au fost identificate peste 50 de mutații, multe dintre ele determinând substituții ale unui singur aminoacid. Bolnavii sunt homozigoți sau heterozigoți compuși, tipul particular al mutației influențând major simptomatologia.
- Mutațiile *proteinei 4.2* (gena EPB42 – cromosomul 15q15) sunt rare și asociate cu transmitere recesivă.
- Mutațiile *spectrinei α* (SPTA1 – cromosomul 1q21) sunt extrem de rare, asociază transmitere recesivă și o simptomatologie foarte severă.

*Diagnosticul prenatal* este posibil atunci când se cunosc mutațiile prezente în familie.

*Sfatul genetic* nu este atât de simplu cum pare la prima vedere datorită heterogenității genetice și mutațiilor noi.

*Tratamentul* substitutiv și splenomegalia pot ameliora evoluția bolii.

### 3.4 SINDROMUL EHLERS-DANLOS

Sindromul Ehlers-Danlos reunește un grup heterogen de boli genetice ale țesutului conjunctiv caracterizate prin hipermobilitate articulară, extensibilitate articulară și fragilitate tisulară. Sindromul Ehlers-Danlos este probabil una dintre cele mai frecvente boli genetice ale țesutului conjunctiv, deși frecvența sa este estimată foarte larg, între 1 la 5000 și 1 la 50.000.

indivizi.

*Manifestări clinice.* În 1986 boala a fost clasificată clinic în tipurile I-VIII. Pentru majoritatea pacienților semnele sunt minore și ei rămân adeseori nedignosificați. În contrast, tipul vascular (tipul IV) poate conduce la moarte prematură în absența tratamentului chirurgical. Manifestările cutanate sunt considerate cardinale și includ aspectul hiperextensibil (cutix laxa), cu textura moale, catifelată, apariția escarelor atrofice și a echimozelor. În tipul I de boală sunt prezente pliuri epicantice. Manifestările articulare sunt prezente de asemeni în toate formele, putând ajunge până la dislocații ale șoldului în forma hipermobilă (tipul III) sau în artrocalazie (tipul VIIA și VIIB). Cifoscolioza pronunțată este patognomonică pentru tipul VI de boală. Anomaliile oculare precum keratoconusul, sclerele albastre, subluxația de cristalin sau dezlipirea retiniană sunt prezente de asemeni în toate tipurile dar au o severitate particulară în tipul VI. În sfârșit, ruptura prematură a membranelor și hemoragiile pre- sau postpartum sunt caracteristice în particular tipului clasic (I) sau vascular (IV) de boală.

*Genetică.* Sindromul Ehlers-Danlos se caracterizează prin heterogenitate genetică:

- Formele clasice de boală (tipurile I și II) sunt forme transmise dominant, determinate de mutații ale colagenului tip V (genele COL5A1 și COL5A2) sau, mai rar, ale colagenului tip I (COL1A1 – numai în tipul I).
- Tipul hipermobil (III) de boală este determinat de mutații ale colagenului tip III (COL3A1). Aceeași genă este implicată și în producerea formei vasculare (IV) de boală, dar, mutațiile implicate sunt diferite iar unele mutații produc fenotipuri mai severe decât altele.
- Tipul V de boală este caracterizat prin transmitere legată de X dar defectul molecular al bolii nu a fost încă identificat.
- Tipul VI de boala asociază transmitere recesivă și este consecința mutației genei pentru lizil hidroxilază (gena PLOD) implicată în modificarea posttranslațională a colagenurilor tip I și III.
- Tipurile VIIA și VIIB sunt transmise dominant și determinate de mutații ale genelor care codifică colagenul tip I (COL1A1 și COL1A2). Tipul VIIC este transmis recesiv și determinat de mutațiile unei procolagen proteinaze (gena ADAMTS2).
- Tipul VIII (cu periodontită) este transmis dominant, dar defectul molecular al bolii nu a fost încă identificat.

#### 4. BOLI PRIN ANOMALII ALE PROTEINELOR IMPLICATE ÎN COMUNICAREA INTERCELULARĂ ȘI CONTROLUL DEZVOLTĂRII.

Semnalizarea intercelulară este o componentă esențială a vieții organismelor multicelulare, având un rol esențial în cursul dezvoltării embrionare, precum și în coordonarea activității tuturor celulelor pe tot parcursul vieții.

Semnalizarea implică molecule extrem de diverse, dar o bună parte dintre acestea sunt proteinele. Există mai multe categorii de proteine care intervin în semnalizarea intercelulară și controlul dezvoltării: proteine care mediază comunicarea intercelulară directă, hormoni peptidici și factori de creștere, receptori, proteine implicate în transducția intracelulară a semnalelor și factori de transcripție. Toate aceste proteine funcționează în una din cele șapte căi majore de semnalizare identificate la organisme superioare și om: calea WNT (*Wingless* – "fără aripi"), calea TGF- $\beta$  (factorul de transformare a creșterii beta), calea HH (*Hedgehog* – "arici"), calea RTK (receptor tirozin kinazic), calea JAK/STAT (Janus kinaza/transductor al semnalului și activator al transcripției), calea Notch ("*crestătura*") și calea receptorilor nucleari.

- **Proteinele implicate în semnalizarea intercelulară directă** alcătuiesc unele structuri precum *joncțiunile gap* (formate din *conexine*) care permit schimbul rapid al unor molecule mici. De asemenea, *integrinele* și *caderinele* discutate anterior nu funcționează numai ca molecule de adeziune, dar și ca molecule de semnalizare a interacțiunilor intercelulare.
- **Hormonii peptidici și factorii de creștere** sunt molecule esențiale de semnalizare la distanță. Exemple cunoscute de *hormoni peptidici* sunt insulina, glucagonul și hormonii hipofizari (hormonul de creștere, FSH, LH, prolactina etc.), la care se adaugă și o serie de *neurohormoni* (endorfinele sau encefalinele) care pot acționa atât la distanță cât și ca neurotransmițători la nivelul sinapselor neuronale. *Factorii de creștere* includ o largă varietate de molecule de semnalizare care controlează creșterea și diferențierea celulelor animale: NGF (factorul de

creștere neuronal), EGF (factorul de creștere epidermală), PDGF (factorul de creștere al plachetelor) etc. Un alt grup larg de factori de creștere polipeptidici sunt *citokinele* care controlează creșterea și diferențierea celulelor sanguine.

- **Receptorii** pot fi localizați intracelular (receptorii pentru hormonii steroizi, tiroxina, acidul retinoic, etc.), dar majoritatea sunt localizați la nivelul membranei plasmatică. În funcție de caracteristicile structurale **receptorii membranari** pot fi clasificați în patru clase majore: receptori cuplați cu proteinele G (receptorii pentru epinefrină, serotonină sau glucagon), receptori – canale ionice (receptorul acetilcolinic), receptori asociați unor tirozin kinaze (receptorii pentru majoritatea citokinelor, interferoni și hormonul de creștere) și receptori cu activitate enzimatică intrinsecă (receptorii pentru insulină, EGF, PDGF, TGF-beta etc.). Receptorii pot fi clasificați de asemenea în funcție de tipul de ligand în receptori hormonal, receptori ai citokinelor sau clase speciale de receptori, cum sunt cei ai unor metaboliți (LDL) sau receptorii pentru lumina etc.
- **Proteinele implicate în transducția semnalului** pot fi clasificate în trei clase principale: proteine cu activitate GTP-azică (proteinele trimerice G atașate direct unor receptori și proteinele monomere din familia RAS), proteine care reglează fosforilarea (proteine kinaze și proteine fosfataze) și proteine adaptor (care nu au activitate catalitică proprie dar mediază interacțiunea altor proteine prin intermediul unor domenii de legare ca, de pildă, domeniile SH2 ale proteinelor STAT ce leagă grupările fosfotirozinice ale altor proteine).
- **Factorii de transcripție** au fost descriși pe larg în capitolul 4. Ei pot fi clasificați în funcție de conformația tridimensională în mai multe clase: proteine cu "degete de zinc", proteine cu "fermoare leucinice", proteine homeodomeniu, etc. Multe dintre acestea au un rol esențial în controlul dezvoltării în perioada embrionară.

Mutațiile genelor ce codifică proteine implicate în semnalizarea intercelulară și în controlul dezvoltării sunt extrem de numeroase în patologia umană. Pentru a avea o vedere "panoramică" asupra acestei categorii de boli moleculare, în tabelul 11.4 am inclus câteva dintre cele mai frecvente clase și boli monogenice produse prin mutații ale unor asemenea proteine, precizând codul OMIM prin care doritorii pot obține informații suplimentare. Ele sunt grupate în următoarele categorii:

- boli produse prin anomalii ale unor proteine implicate în semnalizarea intercelulară directă;
- boli produse prin anomalii ale unor hormoni și factori de creștere;
- boli produse prin anomalii ale unor receptori;
- boli produse prin anomalii ale unor proteine implicate în transducția semnalului;
- boli produse prin anomalii ale unor factori de transcripție.

În rest ne vom limita la descrierea a două dintre cele mai frecvente boli genetice: hipercolesterolemia familială, determinată de mutații ale receptorului LDL, neurofibromatoza și boala polichistică renală a adultului (ADPKD), produsă prin mutații ale unor gene implicate în semnalizarea celulară

**Tabelul 11.4 Exemple de boli monogenice produse prin anomalii ale unor proteine implicate în semnalizarea intercelulară și controlul dezvoltării**

Proteina	Gena	Localizare cromosomică	Boala	OMIM
<b>Boli produse prin mutații ale unor proteine implicate în semnalizarea intercelulară directă</b>				
Conexina 26	GJB2	13q11-q12	Surditatea neurosenzorială nonsindromică AR	220290
Conexina 30	GJB6	13q12	Displazia ectodermală hidrotică	129500
Conexina 31	GJB3	1p35.1	Eritrokeratodermia variabilă	133200
Conexina 32	GJB1	Xq13.1	Boala Charcot-Marie-Tooth legată de X	
Conexina 43	GJA1	6q21-q23.2	Displazia oculodentodigitală	164200
Conexina 46	GJA3	13q11	Cataracta zonulară pulverulentă	601885
<b>Boli produse prin mutații ale unor hormoni și factori de creștere</b>				
Hormonul de creștere	GH1	17q22-q24	Deficit izolat al hormonului de creștere tip IA	262400
Hormonul paratiroidian	PTH	11p15.3-p15.1	Hipoparatiroidismul familial izolat AD	146200
Insulina	INS	11p15.5	Hiperproinsulinemia familială	176830

Proteina	Gena	Localizare cromosomică	Boala	OMIM
Hormonul antimullerian	AMH	19p13.3-p13.2	Sindromul de persistență al ductelor mulleriene tip I	261550
Arginin vasopresina	AVP	20p13	Diabetul insipid central familial	125700
Proopiomelanocortina	POMC	2p23.3	Obezitate, insuficiența adrenaliană, par roșcat	176830
Peptidul insulin-like tip 3	INSL3	1p913.2	Criptorhidismul idiopatic	219050
Factorul de creștere fibroblastică tip 14	FGF14	13q34	Ataxia cerebelară AD	601515
Factorul de creștere al celulelor endoteliale derivat din plachete	ECGF1	22q13.32-qter	Sindromul encefalomiopatiei mioneuro-gastrointestinale	603041
Factorul indus de TGF-beta	TGIF	18p11.3	Holoprosencefalia tip 4	142946
<b>Boli produse prin mutații ale unor receptori</b>				
Receptorul androgenic	AR	Xq11-q12	Sindromul Morris	300068
Receptorul pentru vitamina D	VDR	12q12-q14	Rahitismul vitamino-D rezistent tip IIA	277440
Receptorul pentru factorul de creștere	GHR	5p13-p12	Sindromul Laron	262500
Receptorul pentru hormonul paratiroidian	PTHR1	3p22-p21.1	Condrodisplazia metafizeala tip Murk Jansen	156400
Receptorul pentru insulina	INSR	19p13.2	Diabetul zaharat insulino-rezistent cu acanthosis nigricans	146670
Receptorul pentru aldosteron	HR3C2	4q31.1	Pseudohipoaldosteronismul tip I	177735
Receptorul pentru hormonul luteinizant/coriogonadotropina	LHCGR	2p21	Pubertatea masculină precoce familială	176410
Receptorul pentru lipo-proteinele cu densitate joasă	LDLR	19p13.2	Hipercolesterolemia familială	143890
Membrul 1A al superfamiliei receptorilor pentru TNF	TNFR5F1A	12q13.2	Febra periodică familială AD	142680
Receptorul tip 1 pentru factorul de creștere fibroblastică	FGFR1	8p11.2-p11.1	Sindromul Kallmann tip 2	147950
Receptorul tip 2 pentru factorul de creștere fibroblastică	FGFR2	10q26	Sindromul Crouzon Sindromul Apert Sindromul Pfeiffer Cutis gyrata Sindromul Jackson-Weiss	123500 101200 101600 123790 123150
Receptorul tip 3 pentru factorul de creștere fibroblastică	FGFR3	4p16.3	Acondroplazia Displazia tanatoforică	134934 187600
Lanțul gamma al receptorului pentru interleukina tip 2	IL2RG	Xq13	Sindromul de imunodeficiență combinată severă (SCID) legată de X	308380
Poli-peptidul alfa-1 al receptorului colinergic nicotinic	CHRNA1	2q24-q32	Sindromul miastenic congenital	601462
Poli-peptidul alfa-4 al receptorului colinergic nicotinic neuronal	CHRNA4	20q13.2-q13.3	Epilepsia nocturna de lob frontal tip 1	600513
Rodopsina	RHO	3q21-q24	Retinita pigmentară	180380
<b>Boli produse prin mutații ale unor proteine implicate în transducția semnalului</b>				
Subunitatea alfa stimulatorie a proteinei de legare a GDP	GNAS	20q13.2	Pseudohipoparatiroidismul tip IA Osteodistrofia ereditară Albright	103580
Poli-peptidul 1 cu activitate alfa transducătoare a proteinei G	GNAT1	3p21	Cecitatea nocturna congenitală staționară	163500
Poli-peptidul 2 cu activitate alfa transducătoare a proteinei G	GNAT2	1p13	Acromatopsia	216900
Neurofibrina	NF1	17q11.2	Neurofibromatoza 1	162200
Proteina STAT tip 1	STAT1	2q32.2-q32.3	Infecția familială diseminată cu micobacterii atipice	209950
Janus kinaza tip 3	JAK3	19p13.1	SCID AR tip T negativ/B pozitiv	600802

Proteina	Gena	Localizare cromosomică	Boala	OMIM
Serin treonin kinaza tip 11	STK11	19p13.3	Sindromul Peutz-Jeghers	175200
<b>Boli produse prin mutații ale unor factori de transcripție</b>				
Proteina de legare la CREB	CREBBP	16p13.3	Sindromul Rubinstein-Taybi	180849
Omologul 2 al proteinei "empty spiracles" de la Drosophila	EMX2	10q26.1	Schizencefalia	269160
Membrul 3 al familiei proteinelor Gli-Kruppel	GLI3	7p13	Cefalosinpolidactilia (sindromul Grieg) Sindromul Pallister-Hall Polidactilia postaxială tip A1	175700 146510 174200
Proteina homeobox A11	HOXA11	7p15-p14.2	Sinostoza radioulnara cu trombocitopenie amegacariocitica	605432
Proteina homeobox A13	HOXA13	7p15-p14.2	Sindromul mână-picior-organe genitale	140000
Proteina homeobox D13	HOXD13	2q31-q32	Sinpolidactilia	186000
Proteina Lim homeobox 1 beta	LMX1B	9q34.1	Sindromul unghii-rotulă	161200
Factorul de transcripție asociat microftalmiei	MITF	3p14.1-p12.3	Sindromul Waardenburg tip IIA	193510
Omologul 1 al genei homeobox din segmentul muscular de la Drosophila	MSX1	4p16.1	Hipodontia autosomal dominantă	106600
Omologul 2 al genei homeobox din segmentul muscular de la Drosophila	MSX2	5q34-q35	Craniosinostoza tip Boston	604757
Proteina "paired box" tip 2	PAX2	10q24.3-q25.1	Sindromul hipoplazie renală – colobom	120330
Proteina "paired box" tip 3	PAX3	2q35	Sindromul Waardenburg tip 1	193500
Proteina "paired box" tip 6	PAX6	11p13	Aniridia	106210
Proteina "paired box" tip 8	PAX8	2q12-q14	Disgenezia tiroidiana	218700
Proteina "paired box" tip 9	PAX9	14q12-q13	Oligodontia	604625
Proteina "paired like" tip 2	PITX2	4q25-q26	Sindromul Rieger	180500
Proteina "sal like" tip 1	SALL1	16q12.1	Sindromul Townes-Brocks	107480
Proteina "sonic hedgehog"	SHH	7q36	Holoprosencefalia tip 3	142945
Proteina SRY-box tip 9	SOX9	17q24.3-q25.1	Displazia campomelică	114290
Proteina SRY-box tip 10	SOX10	22q13	Sindromul Waardenburg-Shah	277580
Proteina T-box tip 3	TBX3	12q24.1	Sindromul mamaro-ulnar	181450
Proteina T-box tip 5	TBX5	12q24.1	Sindromul Holt-Oram	142900
Proteina Treacher-Collins 1	TCOF1	5q32-q33.1	Sindromul Treacher-Collins	154500
Proteina WT1	WT1	11p13	Sindromul Denys-Drash Sindromul Frasier	194080 136680

#### 4.1. HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIALĂ

*Definiție.* Hipercolesterolemia familială (OMIM 143890) este o boală transmisă autosomal dominant, determinată de mutații ale receptorului membranar pentru LDL, responsabil de legarea și internalizarea LDL, principală proteină de transport a colesterolului plasmatic.

*Incidența.* Forma homozigotă de boală este rară, cu incidența de 1 la un milion, dar forma heterozigotă reprezintă una dintre cele mai frecvente boli monogenice, cu o frecvență de cel puțin 1 la 500<sup>3</sup>. Se consideră ca până la 5% din indivizii cu hipercolesterolemie din populația generală sunt heterozigoți pentru o mutație LDLR.

*Simptomatologie.* Hipercolesterolemia familială (HF) este încadrată împreună cu alte boli în categoria hiperlipoproteinemiilor tip 2, fiind caracterizată prin creșterea LDL plasmatic și dezvoltarea *prematură* a plăcilor de aterom la nivelul arterelor (care determină boală coronariană

<sup>3</sup> Frecvența crescută a HF s-ar putea explica prin avantajul selectiv al heterozigoților la anumite boli infecțioase (de ex. hepatita)

precoce), a xantoamelor (depozite de colesterol la nivelul tegumentelor și tendoanelor) și arcurilor corneene (depozite de colesterol la periferia corneei). Simptomatologia clinică este prezentă atât la heterozigoți cât și la homozigoți, dar manifestările clinice sunt mult mai severe și apar mai precoce la homozigoți (“efect de dozaj genic”), care prezintă boală coronariană semnificativă încă din copilărie și decedează înainte de 30 de ani.

*Patogenie.* Colesterolul este un component lipidic esențial al membranelor și precursor al hormonilor steroidieni și al sărurilor biliare. Principala formă de transport a colesterolului plasmatic este LDL (*low density lipoprotein*). Receptorul pentru LDL (LDLR) recunoaște apoproteina B-100, principala componentă proteică a LDL, precum și apo E, o proteină prezentă în VLDL, IDL și chilomicroni. LDLR este localizat la nivelul unor zone ale suprafeței celulare care au aspectul unor mici depresiuni, îmbrăcate pe fața internă cu proteina *clatrină*. Legarea Apo B-100 determină internalizarea complexului LDL-receptor (endocitoză) și, după cuplarea cu lizozomii, are loc eliberarea colesterolului liber în citoplasmă și reciclarea receptorului, care va reajunge la nivelul membranei.

LDLR are patru domenii funcționale: domeniul de legare la LDL, un domeniu de omologie cu EGF (factorul de creștere epidermală) necesar pentru disocierea receptorului, cuplat la LDL, la nivelul endosomilor și reciclarea lui, un domeniu transmembranar și un domeniu țintă pentru regiunile membranei plasmatică îmbrăcate cu clatrină.

Mutațiile LDLR determină creșterea LDL-colesterolului plasmatic, care generează ateroscleroza.

*Genetică.* Așa cum am precizat, HF se transmite ereditar autosomal dominant; bolnavii sunt de obicei heterozigoți dar – datorită frecvenței crescute a bolii – se pot întâlni și homozigoți, care fac mai precoce o formă gravă de boală, dovedind existența unui clar efect de dozaj genic (numărul de receptori LDL fiind mult mai redus decât la heterozigoți).

Au fost descrise peste 400 de mutații ale genei LDLR care sunt localizate pe toată lungimea genei. Circa 2-10% din totalul alelelor mutante din populație sunt reprezentate de deleții sau inserții mari, iar restul mutațiilor sunt substituții nucleotidice, deleții sau inserții mici. În unele populații cu o mare prevalență a bolii există de obicei o mutație frecventă, din cauza *efectului de fondator*. Din punct de vedere al consecințelor pe care le au asupra funcției receptorului se pot deosebi cinci clase de mutații.

Mutațiile de clasa 1 sunt mutații care împiedică sinteza oricărei proteine și sunt determinate de deleții ori mutații care alterează stabilitatea ARNm. Ele sunt cele mai frecvente mutații la nivelul acestui locus. Mutațiile de clasa 2 sunt relativ frecvente și alterează capacitatea de plicaturare corectă a proteinei, ceea ce împiedică transportul său de la nivelul reticulului endoplasmatic la nivelul aparatului Golgi și acumularea sa la nivelul primului sediu.

Mutațiile de clasa 3 sunt compatibile cu localizarea membranară a receptorului, dar determină incapacitatea de legare a LDL.

Mutațiile de clasa 4 afectează localizarea corectă a receptorului în regiunile membranare îmbrăcate în clatrină și, ca urmare, complexul receptor-LDL nu poate fi internalizat. În sfârșit, mutațiile de clasa 5 interesează domeniul de omologie cu EGF și, ca urmare, alterează capacitatea de reciclare a receptorului.

Factorii de mediu (în special alimentația bogată în colesterol și acizi grași saturați), sexul masculin și fondul genetic individual (în care se pot găsi *gene modificatoare*) pot influența efectul mutațiilor LDLR asupra nivelului plasmatic al colesterolului și deci producerea aterosclerozei.

*Diagnosticul* de HF se bazează pe evidențierea unui nivel crescut de LDL-colesterol plasmatic, prezența xantoamelor sau bolii coronariene precoce și un istoric familial pozitiv. Diagnosticul molecular este dificil datorită numărului mare de mutații diferite ce produc boala dar nu aduce informații suplimentare pentru prognostic sau tratament

*Tratament.* Obiectivul principal este scăderea importantă a nivelului LDL-colesterolului plasmatic prin dieta săracă în grăsimi și tratament hipocolesterolemiant (cu statine).

#### 4.2. NEUROFIBROMATOZELE

Neurofibromatozele sunt boli genetice care asociază o predispoziție pentru dezvoltarea unor tumori benigne și maligne cu originea în celulele ale sistemului nervos. Neurofibromatoza tip 1 și neurofibromatoza tip 2 sunt boli distincte clinic și genetic.

**Neurofibromatoza tip 1** – OMIM 162200 (denumită anterior boala von Recklinghausen) este o boală transmisă autosomal dominant cu o incidență de 1 la 3000 indivizi în populația generală.

*Diagnosticul clinic* al bolii necesită prezența a două sau mai multe dintre următoarele criterii: pete café-au-lait; două neurofibroame sau un neurofibrom plexiform; pistrui axilari sau inghinali multipli; displazia aripilor sfenoidului sau încurbarea ori subțierea congenitală a cortexului oaselor lungi; glioame bilaterale ale nervului optic; două sau mai multe hamartoame iriene (noduli Lisch); o rudă de gradul întâi cu neurofibromatoză 1 (diagnosticată și ea conform acestor criterii). Pe lângă leziunile amintite mai sus, purtătorii mutațiilor NF1 au un risc moderat pentru dezvoltarea unor tumori precum neurofibrosarcoame, feocromocitoame, tumori carcionide duodenale, neuroblastoame, ependimoame, rabdomyosarcoame și tumori Wilms. Copiii cu neurofibromatoză tip 1 au risc crescut pentru leucemia mielomonocitară tipul juvenil și pentru mielodisplazie.

*Genetică.* Boala este determinată de mutații ale genei NF1 localizată pe cromosomul 17q11.2. NF1 este o genă mare (circa 300 kb), alcătuită din 59 de exoni, care codifică o proteină cu activitate GTP-azică numită *neurofibromina*. Această proteină reglează negativ semnalele transduse pe calea proteinelor RAS, acționând ca o proteină supresoare de tumori. Au fost descrise numeroase mutații la nivelul acestei gene, cele mai multe dintre ele (70-80%) fiind mutații care determină trunchieri ale proteinei. Ca urmare, a fost dezvoltată o metodă de diagnostic genetic bazată pe testul proteinelor trunchiate. O treime până la jumătate din totalul cazurilor apar ca fiind sporadice, ele fiind determinate de mutații de novo.

Există puține recomandări eficiente pentru managementul pacienților cu neurofibromatoză tip 1. Printre acestea se numără măsurarea tensiunii arteriale de două ori pe an (datorită riscului dezvoltării unor feocromocitoame) și investigația clinică a simptomelor neurologice (cefalee, surditate, tulburări ale vederii).

**Neurofibromatoza tip 2** – OMIM 101000 este de asemenea o boală transmisă autosomal dominant, cu o incidență de aproximativ 1 la 35.000 de indivizi în populația generală.

*Diagnosticul clinic* necesită fie prezența unor tumori vestibulare bilaterale, fie a unei rude de gradul întâi cu neurofibromatoză tip 2 la un pacient care prezintă unul din următoarele semne: tumoră vestibulară unilaterală; un neurofibrom plexiform, două sau mai multe neurofibroame; două sau mai multe glioame; două sau mai multe meningoame; cataractă subcapsulară posterioară la o vârstă tânără; dovada imagistică a prezenței unei tumori intracraniene sau la nivelul măduvei spinării. Pacienții au risc de dezvoltare a unor tumori benigne ale SNC; datorită localizării au însă o morbiditate și o mortalitate crescute. Din punct de vedere al severității simptomelor și vârstei de debut se deosebesc două forme: forma Gardner sau moderată și forma Wishart, severă.

*Genetică.* Boala este determinată de mutațiile genei NF2 localizată pe cromosomul 22q12.2 care este alcătuită din 17 exoni ce ocupă 90 kb. Gena codifică o proteină numită *merlina* sau *schwannomina* care interacționează cu proteina transmembranară CD44 și cu citoscheletul actinic și își realizează funcția sa de supresie tumorală prin asigurarea menținerii normale a structurii citoscheletului și reducerea capacităților de motilitate și adeziune celulară. Circa 50% dintre pacienți nu au istoric familial pozitiv, iar aceste cazuri sunt considerate a fi consecința fie a unor mutații de novo, fie a mozaicismului germinal. Penetranța acestor mutații este foarte crescută, peste 95% din purtători dezvoltând simptome clinice până la vârsta de 50 de ani. Majoritatea mutațiilor determină trunchierea proteinei, iar acestea asociază de regulă simptome

mai severe și debut precoce.

Screening-ul clinic al rudelor de gradul întâi ale pacienților includ examinarea neurologică anuală, inclusiv examenul oftalmologic și al capacității auditive. Este disponibil de asemenea diagnosticul genetic.

#### 4.3. BOALA POLICHISTICĂ RENALĂ AUTOSOMAL DOMINANTĂ

Boala polichistică renală a adultului (ADPKD) este o boală multisistemică ereditară, produsă de mutații dominante ale unor gene autosomale, manifestată de obicei la adult și caracterizată prin chiști renali multipli, bilaterali, care se asociază variabil cu anomalii extrarenale, în deosebi hepatice și cardiovasculare. ADPKD este una din cele mai frecvente boli ereditare la om, având o prevalență de circa 1 la 1000.

*Manifestările clinice* ale ADPKD debutează de obicei în a treia - a patra decadă de viață dar chiștii pot fi depistați încă din copilărie, fiind mult timp asimptomatici. Atunci când ating anumite dimensiuni, boala poate fi sugerată de dureri lombare și nefromegalie: Manifestările extrarenale sunt reprezentate de chiști hepatici, hipertensiune arterială (secundară ischemiei renale), prolaps de valvă mitrală, anevrisme intracraniene. Boala evoluează frecvent spre insuficiență renală cronică (IRC) terminală, necesitând terapie de suplere a funcției renale.

*Diagnosticul pozitiv* este de obicei ușor la adult: rinichi mari (bilateral) cu chiști multipli, prezența chiștilor în ficat, anamneza familială pozitivă și sugestivă pentru transmitere autosomal dominantă. Existența altor boli chistice renale – genetice sau negenetice – impune un *diagnostic diferențial* atent, mai ales în două situații: copil cu boală chistică renală, situație în care pentru a stabili dacă este vorba de ADPKD sau ARPKD se va determina prezența sau absența bolii la unul dintre părinți; alte boli renale chistice cu transmitere autosomal dominantă, cum ar fi boala renală glomerulochistică sau scleroza tuberoasă.

*Genetică.* Boala polichistică renală a adultului este o boală ereditară cu transmitere autosomal dominantă, penetranță dependentă de vârstă și expresivitatea variabilă manifestă prin anomalii renale și extrarenale variate la bolnavi diferiți.

Prin studii familiare și moleculare de înlănțuire genică au fost identificate, la diferite familii cu ADPKD, trei gene: PKD1 (prezentă la circa 85% din bolnavi), PKD2 (15% bolnavi) și PKD3 (în câteva familii).

- Gena PKD 1 fost localizată cromosomului 16p13.3) și secvențializată, stabilindu-se că regiunea codantă (alcătuită din 46 exoni) o glicoproteină membranară multifuncțională, numită *policistina 1*, care ar putea avea un rol în interacțiunea celulă-celulă sau celulă-proteine din matricea extracelulară, funcționând ca un *receptor*.
- Gena PKD 2 a fost localizată în regiunea 4q 21-22) și secvențializată. Regiunea codantă are numai 15 exoni, codificând o proteină membranară, cu numai 968 de aminoacizi, numită *policistina 2* care funcționează probabil ca un *canal de calciu*.
- Gena PKD 3. S-au descris câteva familii cu ADPKD la care boala nu este determinată de mutații în genele PKD 1 sau PKD 2 (Daoust et al, 1995). Gena PKD 3 nu a fost încă localizată.

*Patogenie.* Produsele genelor PKD – policistina 1 și 2 - interacționează și pot participa la o cale comună de formare a chiștilor renali. Se crede că policistina 1 ar funcționa ca un receptor pentru un ligand necunoscut din matricea extracelulară care controlează sau mediază o cale de semnalizare ce comunică celulelor epiteliale informația pozițională necesară în structura nefronului. În această cale ar acționa și policistina 2. Mutația genei PKD 1 ar duce, prin absența policistinei 1, la pierderea funcției și deci la absența semnalului; acest fapt ce duce la modificarea programului de diferențiere celulară. În acest caz, celula nu poate să-și mențină structura tubulară normală, crește rata de proliferare și apar o serie de modificări membranare care, împreună cu remodelarea membranei bezală duc la formarea chiștilor.

Ipoteza patogenică descrisă mai sus nu explică una din caracteristicile fundamentale ale ADPKD: deși toate celulele renale au mutația genei PKD 1 (în stare heterozigotă, An), chiștii se



formează numai la 1-2% din nefroni iar nefronii afectați au numai un anumit segment dilatat. O explicație posibilă, propusă de Qian et al (1996), se bazează pe modelul "dublei lovituri" din biologia tumorală: bolnavul se naște heterozigot (An), moștenind o genă PKD1 mutantă de la unul din părinți; existența unei singure gene mutante nu este însă suficientă pentru formarea chistului. În timpul vieții se produce, în anumite celule, "pierderea heterozigozității (prin mutația somatică sau inactivarea celei de a doua gene). Celulele dublu mutante (AA) nu produc deloc policistină, dispare semnalul necesar menținerii stării de diferențiere și începe proliferarea și formarea unei clone ce alcătuiește chistul.

Rămîne de răspuns la o ultimă întrebare: cum se explică efectele multiple (pleiotrope) ale genelor PKD? Manifestările renale și extra renale din ADPKD au fost considerate expresia unor perturbări ale matricei extracelulare și interacțiunii sale cu celulele.

*Diagnosticul genotipic.* Localizarea și identificarea genelor PKD1 și PKD2 au deschis drumul diagnosticului genotipic al ADPKD care poate tranșa diagnosticul bolii la orice vîrstă (inclusiv la făt) și evident atunci cînd imagistica nu o poate face (absența unor chiști renali detectabili sau imagini incerte). Metodele de analiză moleculară permit diagnosticul ADPKD fie prin analiza directă a genei fie prin identificarea unor markeri ADN polimorfici situați în vecinătatea genei și transmiși împreună cu aceasta ("tehnică de înlănțuire genică"). Testarea genetică este indicată în două situații: stabilirea statusului genetic la tinerii peste 18 ani, cu risc de 50% (cînd ecografia nu poate evidenția totdeauna chiști), care în funcție de rezultat pot lua o decizie informată în planingul lor familial; evaluarea unui donator sănătos înrudit cu pacientul care va fi transplantat.

## 5. BOLI ALE PROTEINELOR IMPLICATE ÎN CONTROLUL HOMEOSTAZIEI EXTRACELULARE.

Homeostazia (în greaca veche – *a rămâne la fel*) este definită ca fiind capacitatea organismului de autoreglare dinamică prin care își menține variabilele esențiale în limite acceptabile pentru propria sa structură și funcționare, ca răspuns la perturbările induse de mediu (Cannon 1932). Proteinele au un rol esențial în menținerea homeostaziei organismului. Principalele procese implicate în controlul homeostaziei extracelulare sunt: apărarea imună, hemostaza și inhibiția proteazică.

- **Proteinele responsabile de apărarea imună** fac parte din mai multe categorii funcționale ca de exemplu proteinele sistemului major de histocompatibilitate, proteinele sistemului complement, imunoglobulinele, receptorii de suprafață ai limfocitelor, diverse citokine. Toate aceste clase de proteine și funcțiile lor vor fi detaliate în capitolul 16.
- **Proteinele implicate în hemostază** pot fi clasificate în *factori de coagulare plasmatici* (factorii de coagulare I – XIII, proteina C, proteina S și TFPI – inhibitorul căii factorului tisular), *factori de coagulare plachetari* și *factori de coagulare ai suprafeței celulare* (tromboplastina tisulară și trombomodulina), *factori ai trombolizei*, la care se adaugă o serie de factori activatori și inhibitori ai componentelor amintite (activatorul tisular al plasminogenului – PLAT – sau inhibitorul activatorului plasminogenului – PAI).
- **Proteinele implicate în inhibiția proteazelor** fac parte din câteva familii importante cum sunt cele ale inhibitorilor proteazici (PII – PI14), inhibitorii tisulari ai metaloproteazelor (TIMP), inhibitorii proteazelor serinice (SPINK și SPINT) etc.

În cele ce urmează vom aminti doar câteva exemple de boli genetice produse prin mutații ale unor proteine implicate în controlul homeostaziei extracelulare (tabelul 11.5) și vom descrie o boală reprezentativă pentru această clasă: hemofilia A (vezi caseta 11.7).

### Tabelul 11.5. Exemple de boli produse prin mutații ale unor proteine implicate în controlul homeostaziei extracelulare

Proteina	Gena	Localizare cromosomică	Boala	OMIM
<b>Boli produse prin mutații ale unor proteine implicate în apărarea imună</b>				
Factorul properdinic C	PFC	Xp11.4-p11.23	Deficiența de properdina legată de X	312060
Componenta C2 a complementului	C2	6p21.3	Deficiența componentei C2 a complementului	217000
Proteina Wiscott-Aldrich	WAS	Xp11.23-p11.22	Sindromul Wiscott-Aldrich	301000
Tirozinkinaza Bruton	BTK	Xq21.3-q22	Agammaglobulinemia Bruton	300300
Proteinele de activare ale recombinării 1 și 2	RAG1 RAG2	11p13	Sindromul Omenn	603554
Reglatorul traficului lizozomal	LYST	1q42.1-q42.2	Sindromul Chediack-Higashi	214500
Polipeptidul beta al citocromului B-245	CYBB	Xp21.1	Boala granulomatoasa cronica	306400
<b>Boli produse prin mutații ale unor proteine implicate în controlul hemostazei</b>				
Factorul V Leiden	F5	1q23	Deficitul factorului V	227400
Factorul VII al coagulării	F7	13q24	Deficitul factorului VII	227500
Factorul VIII al coagulării	F8C	Xq28	Hemofilia A	306700
Factorul IX al coagulării	F9C	Xq27.1-q27.2	Hemofilia B	306900
Factorul XI – tromboplastina	F11	4q35	Deficiența PTA	264900
Factorul XII al coagulării	F12	5q33-qter	Deficiența factorului Hageman	234000
Factorul von Willebrand	VWF	12p13.3	Boala von Willebrand	193400
Proteina C	PROC	2q13-q14	Boala trombotică congenitală determinată de deficiența proteinei C	176860
<b>Boli produse prin mutații ale unor inhibitori proteazici</b>				
Alfa-1 antitripsină	PI	14q32.1	Deficiența de alfa-1 antitripsina	107400
Inhibitorul 3 al metaloproteinazelor tisulare	TIMP3	22q12.1-q13.2	Distrofia maculara pseudoinflamatorie tip Sorby	136900
Inhibitorul proteazic tip 12	PI12	3q26	Encefalopatia familială cu incluzii de serpină	604218
Inhibitorul plasminei	PLI	7pter-p12	Deficitul inhibitorului plasminei	262850
Inhibitorul componentei C1 a complementului	CINH	11q11-q13.1	Angioedemul ereditar	106100

### 5.1. HEMOFILIA A

Hemofilia A (OMIM 306700) este o tulburare a coagulării transmisă legat de X, determinată de o deficiență a factorului VIII plasmatic al coagulării. Factorul VIII al coagulării are rolul de cofactor al factorului IX, o protează care reglează activarea factorului X.

*Incidența.* Hemofilia A are o incidență de aproximativ 1 la 5000-10000 de nou născuți de sex masculin.

*Simptomatologie.* Manifestările clinice sunt prezente de regulă la indivizi de sex masculin, deși există și cazuri rare în care apar manifestări clinice la femei care au inactivare preferențială a cromosomului X fără mutație. Boala este caracterizată prin hemoragii la traumatisme minime care pot persista pe durata a câtorva ore sau zile și care conduc la formarea de hematoame la nivelul țesuturilor moi și mușchilor, precum și a hemoragiilor intraarticulare care evoluează spre artroza. Formele severe de boală sunt diagnosticate în perioada neonatală datorită prezenței unor hematoame cefalice excesive sau a hemoragiei prelungite la nivelul cordonului ombilical. Formele moderate dezvoltă hematoame și hemartroze o dată cu începutul mersului, în timp ce în formele minore diagnosticul poate fi pus cu ocazia unor intervenții chirurgicale sau a unor traumatisme.

*Diagnostic.* Diagnosticul se bazează în mod curent pe măsurarea activității factorului VIII al coagulării. Diferențierea trebuie făcută în primul rând de hemofilia B, determinată de mutații

ale genei pentru factorul IX al coagulării. Această boală este identică din punct de vedere clinic, dar incidența este mai redusă (1 la 100.000). În funcție de nivelul activității factorului VIII hemofilia A poate fi clasificată în forma ușoară (activitate restantă de 5-25%), forma moderată (activitate restantă de 1-5%) și forma severă (activitate restantă sub 1%).

*Genetică.* Hemofilia A este determinată de mutații ale genei F8C localizată la nivelul cromosomului Xq28. Mutațiile sunt extrem de variate și includ deleții, inserții, inversii și mutații punctiforme. Cea mai frecventă mutație - care este responsabilă de aproximativ 25% din cazurile de boală și circa 40-50% din formele severe - este o inversie ce asociază și o deleție a porțiunii carboxiterminale a factorului VIII. Această inversie apare ca urmare a unui proces de recombinare intracromosomică neomologă între secvențe localizate la nivelul intronului 22 al genei și secvențe situate telomeric față de genă. O altă categorie de mutații asociate cu forme severe de boală sunt inserțiile unor elemente retrotranspoabile L1 în interiorul genei. Dintre mutațiile punctiforme, cele asociate unor forme severe sau moderate de boală sunt cele care determină apariția unor codoni stop prematuri, mutațiile care alterează capacitatea de legare a factorului VIII la factorul von Willebrand sau la factorul IX al coagulării ori mutațiile care afectează capacitatea proteinei de a fi secretată.

*Tratamentul* standard actual constă în înlocuirea intravenoasă a factorului VIII. Acest tratament a permis prelungirea speranței de viață de la sub 2 ani la începutul secolului XX la circa 65 de ani în prezent. Transplantul hepatic (locul de sinteză al factorului VIII) este o metoda utilizată în situații rare. Există mari speranțe pentru implementarea în viitor a unor metode de terapie genică.

*Sfat genetic.* Dacă o femeie are istoric familial de hemofilie, statusul sau purtător poate fi determinat prin analize de înlănțuire sau prin screening-ul mutației F8C atunci când mutația a fost identificată deja la o rudă. Există și teste care pot fi utilizate pentru analiza prezentei celei mai frecvente mutații, inversia mai sus amintită. Determinarea statusului de purtător prin metode enzimactice este dificilă. Dacă femeia este purtătoare, ea are un risc de 50% de a da naștere unor băieți bolnavi și un risc egal de a da naștere unor fete purtătoare. Având în vedere frecvența inactivării preferențiale a cromosomului X există și un risc mic de a se naște o fată cu simptome de hemofilie. În cazurile în care mama are un băiat cu hemofilie dar nu există istoric familial pozitiv trebuie luată în calcul posibilitatea unor mutații de novo care sunt responsabile pentru circa 1/3 din cazurile de boală. În acest caz riscul de recurență a bolii este în general mai mic (posibilitatea unui mozaicism germinal).

## D. BOLI GENETICE PRODUSE PRIN MUTAȚII DINAMICE

În 1991 au apărut primele rapoarte privind implicarea expansiunii unor repetiții trinucleotidice în etiologia a două boli genetice: repetiția CGG în cazul sindromului X-fragil și repetiția CAG în cazul atrofiei musculare spinobulbare (boala Kennedy). În ambele cazuri s-a constatat că pe măsură ce gena trece de la o generație la alta, numărul de repetiții trinucleotidice crește progresiv, suferă o *expansiune* (de aici și numele de mutații dinamice sau instabile), și când depășește un *anumit prag critic* produce anomalii în expresia genei sau funcția proteinei codificată de genă, care determină starea de boală. De asemenea s-a constatat că există o strânsă corelație între creșterea numărului acestor repetiții și apariția mai precoce și severitatea mai mare a manifestărilor clinice. Ulterior s-a dovedit ca acest mecanism al mutațiilor dinamice este caracteristic și altor boli genetice, astfel ca în prezent se poate vorbi clar despre o nouă clasă de boli genetice: bolile produse prin mutații dinamice, instabile sau prin expansiunea unor repetiții simple, cel mai frecvent trinucleotide. În prezent lista acestor boli cuprinde cel puțin 15 entități clinice distincte (vezi tabelul 11.6).

Tabelul 11.6. Boli produse prin mutații dinamice

Boala	OMIM	Transmitere	Gena	Localizarea genei	Localizarea repetiției	Secvența repetiției	Repetiții stabile	Repetiții instabile
Sindromul X fragil	309550	LX	FMR1	Xq27.3	5'UTR	(CGG) <sub>n</sub>	6-54	200-1000
Ataxia Friedreich	229300	AR	FRDA	9q13-q21.1	Intron 1	(GAA) <sub>n</sub>	~7-22	200-1700
Distrofia miotonică	160900	AD	DMPK	19q13	3'UTR	(CTG) <sub>n</sub>	5-35	50 - 4000
Epilepsia mioclonică	254800	AR	CSTB	21q22.3	Promotor	(CCCCGCC CCGCG) <sub>n</sub>	~2-3	40-80
Boala Huntington	143100	AD	HD	4p16.3	Exon 1	(CAG) <sub>n</sub>	~10-26	36-100
Boala Kennedy – Atrofia musculară spinală și bulbară	313200	XR	AR	Xq11-q12	Exon 1	(CAG) <sub>n</sub>	9-35	38-62
Atrofia dentatorubrală- palidoluisiană	125370	AD	DRPLA	12p13.31	Regiunea codantă	(CAG) <sub>n</sub>	3-35	49-88
Ataxia spinocerebelara 1	164400	AD	ATX1	6p23	Regiunea codantă	(CAG) <sub>n</sub>	6-38	39-83
Ataxia spinocerebelară 2	183090	AD	ATX2	12q24	Regiunea codantă	(CAG) <sub>n</sub>	14-31	32-77
Boala Machado- Joseph (SCA3)	109150	AD	ATX3	14q32.1	Regiunea codantă	(CAG) <sub>n</sub>	12-39	62-86
Ataxia spinocerebelară 6	183086	AD	CACNA1A	19p13	Regiunea codantă	(CAG) <sub>n</sub>	~4-17	21-30
Ataxia spinocerebelară 7	164500	AD	SCA7	3p12-p21.1	Regiunea codantă	(CAG) <sub>n</sub>	7-35	37-200
Ataxia spinocerebelară 8	603680	AD	SCA8	13q21	Regiunea codantă	(CTG) <sub>n</sub>	15-21	100-152
Ataxia spinocerebelara 10	603516	AD	SCA10	22q13	Intron 9	(ATTCT) <sub>n</sub>	~10-22	900- 4000
Ataxia spinocerebelară 12	604326	AD	PPP2R2B	5q31-q33	Regiunea codantă	(CAG) <sub>n</sub>	~9-18	55-78
Ataxia spinocerebelară 17	607136	AD	TBP	6q27	Regiunea codantă	(CAG) <sub>n</sub>	25-42	50-55

S-a stabilit prin convenție (1993) că nomenclatura tripletelor repetitive să se facă în direcția 5'→3'.

## 1. CARACTERE GENERALE

Mutațiile dinamice prezintă o serie de proprietăți comune:

- o creștere *moderată* a numărului repetițiilor *nu* se asociază de obicei cu apariția manifestărilor clinice dar determină o creștere a instabilității repetiției (*premutații*);
- *mutațiile complete* ce produc boala sunt rezultatul unei modificări (de regulă o creștere peste un anumit prag) a numărului repetițiilor față de numărul inițial;
- există o relație relativ liniară între numărul copiilor repetiției și severitatea clinică ori vârsta de apariție a simptomelor (fenomenul de *anticipație*);
- formele cele mai severe se transmit de preferință printr-unul dintre părinți (“*efect parental*”);

În capitolul 6.B.1.4. a fost prezentat mecanismul de producere a mutațiilor dinamice, prin “glisare” sau “derapare” replicativă, determinată de alinierea greșită și împerecherea decalată a repetițiilor trinucleotidice. Important de subliniat este faptul că prezența unui mecanism unic de producere a mutațiilor face ca analiza ADN să fie cel mai bun mijloc de diagnostic exact a fiecăreia dintre bolile prin expansiunea unor repetiții simple. În acest capitol vom discuta consecințele patogenice pe care aceste mutații le au asupra genei afectate și vom prezenta două exemple ilustrative de boli frecvente produse prin acest mecanism, boala Huntington și distrofia

miotonică; despre sindromul X fragil vom discuta în capitolul 15.

Mutații dinamice se pot asocia cu pierderea funcției sau câștig de funcție

- Creșterea numărului repetițiilor poate induce alterarea transcripției și, consecutiv, *pierderea funcției*. Exemple sunt: *sindromul X fragil* în care expansiunea repetiției CGG în regiunea promotor a genei FMR1 conduce la metilarea acestuia; *epilepsia mioclonică* în care expansiunea repetiției determină separarea fizică a factorilor de transcripție în regiunea promotor a genei pentru cistatina B; *ataxia Friedreich* în care expansiunea repetiției intronice conduce la apariția unor conformații terțiare ale ADN care interferează transcripția genei pentru frataxina. Toate aceste cazuri vor prezenta transmitere recesivă, autosomală sau legată de X. Există însă și cazuri în care reducerea activității sau a nivelului unui produs genic realizează un mod de transmitere dominantă, ca urmare a fenomenului de haploinsuficiență. Acesta pare a fi cazul expansiunii repetiției CTG în regiunea promotor a genei SIX5 în cazul *distrofiei miotonice*.
- Mutații dinamice cu *câștig de funcție*. Numeroase expansiuni trinucleotidice sunt localizate în interiorul regiunilor codante ale unor gene și, ca urmare, vor fi translate în structura proteinei (de exemplu sub forma unor *tracturi poliglutaminice* în cazul repetiției CAG). Multe dintre bolile produse prin mutații dinamice asociază asemenea tracturi poliglutaminice expansionate, ceea ce a condus la ipoteza că acestea ar putea exercita un efect "toxic" asupra funcției proteinelor. Un asemenea efect ar putea fi de exemplu o modificare a structurii tridimensionale a proteinei care conține tractul poliglutaminic. Există însă și alte mecanisme care conduc la un câștig de funcție. De exemplu, expansiunea CAG la nivelul genei CACNA1A (ce codifică un canal de calciu) în ataxia spinocerebeloasă tip 6 conduce la o creștere a capacității de transport a calciului de către proteina codificată.

## 2. BOALĂ HUNTINGTON

Boala (sau coreea) Huntington (OMIM 143100) este o boală neurologică degenerativă, progresivă, caracterizată printr-un sindrom extrapiramidal, însoțit de tulburări psihice care evoluează spre demență. Boala se transmite autosomal dominant și este determinată de mutații dinamice ale genei HD pentru *huntingtină*.

*Prevalența* bolii în populația europeană este de circa 1 la 20.000 de persoane.

*Simptomatologie*. Boala este caracterizată prin apariția în a doua jumătate a vieții a unor tulburări neurologice motorii (coree, distonie), tulburări cognitive și de personalitate care evoluează progresiv. În stadiile avansate de boală pacienții dezvoltă tulburări motorii severe (care îi fac dependenți), pierdere ponderală, tulburări de somn, incontinență și mutism, iar evoluția este inexorabilă către decesul prematur (vârsta medie la deces fiind 55 de ani).

*Genetică*. Boala Huntington se transmite autosomal dominant dar are o penetranță dependentă de vârstă (vezi figura 5.26). Boala este determinată de mutații ale genei HD pentru *huntingtină* care afectează predominant striatumul și cortexul și determină manifestările clinice caracteristice. Mutațiile care cauzează boala Huntington sunt de regulă expansiuni ale unei repetiții CAG localizată la nivelul exonului 1 al genei HD.

- Alelele normale ale genei au 10-26 de repetiții.
- Alelele cu un număr de 27-35 de repetiții *nu* determină manifestări clinice dar se asociază cu un risc crescut de expansiune până la mutații complete în cursul gametogenezei.
- Alelele mutante ce produc boala au peste 35 de repetiții; penetranța unor alele cu 36-41 repetiții este însă redusă.
- Vârsta pacientului la diagnostic este invers corelată cu numărul repetițiilor CAG; astfel, formele cu debut adult se asociază cu un număr de 40-55 repetiții, în timp ce debutul juvenil al bolii este asociat unui număr de peste 60 repetiții CAG; nu există însă corelații între numărul

repetițiilor CAG și alte trăsături ale bolii.

- Transmiterea mutațiilor în succesiunea generațiilor se asociază cu un risc de amplificare a numărului repetițiilor, ceea ce determină fenomenul de *anticipație* (apariția mai precoce a bolii în succesiunea generațiilor). Acest fenomen de amplificare este mult mai frecvent în gametogeneza masculină. Ca urmare, indivizii care moștenesc o alelă mutantă de la tată au un risc mai mare de a dezvolta forme de boală cu debut juvenil (circa 80% dintre cazurile severe având alela mutantă moștenită de la tată).

*Patogenie.* Expansiunea repetiției CAG conduce la expansiunea tractului poliglutaminic din structura huntingtinei, ceea ce este echivalentul unei mutații cu câștig de funcție. Huntingtina mutantă pare să fie cauza acumulării unor agregate în citoplasma și nucleii neuronilor de la nivelul neostriatului, cu modificări consecutive ale nivelului receptorilor exprimați la acest nivel și, în final, moartea neuronală. Cu toate acestea, mecanismul exact prin care expansiunea tractului poliglutaminic conduce la producerea bolii nu este bine înțeles.

*Tratament.* În prezent nu există nici un tratament curativ al bolii. Tratamentul utilizat este unul de suport și este concentrat asupra ameliorării tulburărilor neurologice și de comportament.

*Sfat genetic și diagnostic presimptomatic.* Întrucât debutul bolii la vârsta adultă, adeseori către sfârșitul perioadei reproductive, este adeseori probabil ca persoanele purtătoare să fi transmis mutația la descendenți. Probabilitatea unui individ de a fi purtător de genă mutantă (heterozigot) dacă este clinic neafectat dar are un părinte afectat se calculează conform teoremei Bayes (vezi capitolul 9.C.4.1.c). Riscul de transmitere a unor mutații complete este de 50%. În cazul purtătorilor unor premutații riscul de expansiune către o mutație completă este de circa 3% în cazul meiozei masculine. În prezent sunt disponibile metode de diagnostic prenatal și presimptomatic bazate pe analiza numărului repetițiilor CAG de la nivelul exonului 1 al genei pentru huntingtină. Diagnosticul presimptomatic pune însă numeroase probleme etice având în vedere trauma psihologică pe care o asociază predicția unei boli pentru care nu există un tratament curativ.

### 3. DISTROFIA MIOTONICĂ

Distrofia miotonică este o afecțiune neuromusculară transmisă autosomal dominant cu o incidență de circa 1 la 8000 de nou-nascuți, caracterizată prin penetranță incompletă și expresivitate variabilă.

*Manifestări clinice.* Simptomele apar de regulă la adultul tânăr, primul semn fiind cel mai adesea întârzierea capacității de relaxare a mâinii după încăleștarea pumnului. Acest semn este denumit *miotonie* și este prezent în majoritatea cazurilor simptomatice, fiind urmat de hipotonie și hipotrofie musculară progresive. Alte manifestări frecvente sunt tulburările de conducere cardiacă, afectarea musculaturii netede, tulburările mentale, hipersomnia, cataracta oculară și diabetul insulino-dependent. La bărbați se adaugă atrofia testiculară și calviția frontală precoce. Există și forme congenitale care se caracterizează prin severitate crescută (hipotonie musculară, retard mental major, displegie facială, dificultăți de nutriție și tulburări respiratorii) și mortalitate neonatală de până la 25%.

*Genetică.* Studii de înlănțuire au permis cartografierea genei responsabile de boală pe cromosomul 19q13.2-q13.3, iar în 1992 a fost identificată gena DMPK (ce codifică o proteină kinază) și mutația ce produce boala. Distrofia miotonică este inclusă în prezent în categoria bolilor determinate de mutații dinamice, afecțiunea fiind asociată cu expansiunea unui triplet CTG în regiunea 3' netranslată a genei. Numărul normal al acestor repetiții variază între 5 și 30; formele moderate de boală asociază 50-80 de copii ale tripletului, în timp ce indivizii cu forme severe de boală au peste 2000 de copii. Amplificarea repetiției poate avea loc atât în meioza masculină cât și în cea feminină. Cu toate acestea, expansiunile masive, de ordinul a mii de

repetiții, apar numai în gametogeneza feminină. Ca urmare, formele congenitale de boală sunt aproape întotdeauna transmise pe cale maternă. Este posibil ca în patogenia bolii să fie implicată și alterarea funcției unor gene vecine DMPK, cum sunt genele SIX5 (care codifică un factor de transcripție) și RSHL1.

## BIBLIOGRAFIE CAPITOL 11

### INTERNET

1. Asociația națională pentru boli rare (SUA)- NORD : <http://www.NORD~rdb.com/~orphan>
2. Baze de date privind
  - bolile colagenului : <http://www.le.ac.uk/genetics/collagen>
  - fibroza chistică : <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>
  - fenilcetonuria : <http://www.mcgill.ca/pahdb>
3. Geneclinics – bază de date despre bolile genetice : <http://geneclinics.org>
4. Genecards – bază de date genele umane și bolile genetice : :  
<http://www.bighost.area.ba.cnr.it/GeneCards> –sau <http://www.bioinformatics.weizman.ac.il/cards>
5. Genetest – bază de date despre teste genetice : <http://www.genetest.org>
6. OMIM – catalogul bolilor mendeliene la om poate fi accesat prin :
  - site-ul NCBI- USA (Centrul national pentru informații în biotehnologie: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
  - site-ul Centrului pentru proiectul de cartografiere a genolului uman din Marea Britanie : <http://www.hgmp.mrc.ac.uk/omim>
7. Orphanet – bază de date pentru boli genetice : <http://orphanet.infobiogen.fr>
8. Programul HELIX (sfat și teste genetice) al Universității și Spitalului de copii din Washington: <http://www.healthlinks.washington.edu/helix/>
9. Web site al Universității din Michigan: <http://www.med.umich.edu/>
10. Web site-uri de patologie umană:
  - <http://www.emedicine.com>,
  - <http://www.umm.edu/ency/>,
  - <http://healthcenters.healthanswers.com/library/MedEnc>,
  - <http://NetDoctor.co.uk>,
  - <http://www.icondata.com/health/pedbase>,
  - <http://www.modimes.org/>

### Bibliografie specifică selectivă

1. Borst P, Elferink RO – *Mammalian ABC transporters in health and disease* – Ann. Rev. Biochem., 2002, 71: 537-592.
2. Bowen DJ – Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights – J. Clin. Pathol., 2002, 55: 1-18.
3. Burrows NP – The molecular genetics of the Ehlers-Danlos syndrome – Clin. Exp. Dermatol., 1999; 24: 99-106.
4. Cederbaum S – *Phenylketonuria: an update* – Curr. Opin. Pediatr., 2002, 14: 702-706.
5. Delaunay J – *Molecular basis of red cell membrane disorders* – Acta Haematol., 2002; 108: 210-218.
6. Gutmann DH – *The neurofibromatosis: when less is more* – Hum. Molec. Genet., 2001;10: 747-755.
7. Hubner CA, Jentsch TJ – *Ion channel diseases* – 2002, 11: 2435-2445.
8. Larkin K, Fardaei M – *Myotonic dystrophy – a multigene disorder* – Brain Res. Bulletin, 2001;56: 389-395.
9. Mannucci PL, Tuddenham EGD – The Hemophilias — From Royal Genes to Gene Therapy –

- N.Engl.J.Med, 2001; 344:1773-1779
- 10.Nishino I, Ozawa E – *Muscular dystrophies* – Curr. Opin. Neurol., 2002, 15: 539-544.
  - 11.Olkkonen VM, Ikonen E – *Genetics defects of intracellular-membrane transport* – N. Engl. J. Med., 2000, 343: 1095-1104.
  - 12.Ostlund C, Worman H – *Nuclear envelope proteins and neuromuscular diseases* – Muscle nerve, 2003, 27: 393-406.
  - 13.Richards RI – *Dynamic mutations: a decade of unstable expanded repeats in human genetic disease* – Hum. Mol. Genet., 2001, 10: 2187-2194.
  - 14.Ratjen F, Doring G – *Cystic fibrosis* – Lancet, 2003, 361: 681-689.
  - 15.Smith F – *The molecular genetics of keratin disorders* – Am J. Clin. Dermatol., 2003, 4: 347-364.
  - 16.Wu G, Somlo S – *Molecular genetics and mechanism of autosomal dominant polycystic kidney disease* - Mol.Genet.Metab. 2000;60;1-15



## CAPITOLUL 12

# BOLILE MITOCONDRIALE

Trăsătura unificatoare a celor peste 120 de fenotipuri patologice atribuite alterării genetice a funcției mitocondriilor o constituie *deficitul balanței energetice*. Scăderea, sub un prag critic, a producției de energie la nivel mitocondrial antrenează perturbări majore ale activităților celulare, traduse prin declinul capacității unor țesuturi și organe de a-și îndeplini funcțiile specifice.

În marea lor majoritate, defectele genetice ale mitocondriilor se manifestă prin deteriorarea funcțiilor sistemului nervos și ale celui muscular, a căror activitate este dependentă prevalent de energia rezultată din procesul *fosforilării oxidative* (OXPHOS). Patologia mitocondrială nu reprezintă însă apanajul exclusiv al neurologiei. Virtual, *toate organele* pot ajunge în incapacitatea funcțională datorită unor defecte ale mitocondriilor și, ca atare, multe dintre specialitățile medicale sunt inerent confruntate cu acest tip de patologie, identificat cu numai 13 ani în urmă, și care se singularizează printr-o serie de caracteristici neobișnuite. Cunoașterea acestor caracteristici se impune ca o condiție obligatorie a optimizării diagnosticului și a evaluării corecte a prognosticului variatelor entități morbide în a căror patogenie sunt implicate alterările mutaționale ale genomului mitocondrial; este demn de subliniat că prevalența lor depășește cifra de 1/4000 din indivizi și acest fapt implică, o dată mai mult, *necesitatea recunoașterii și diagnosticării corecte a patologiei mitocondriale*.

## A. STRUCTURA MOLECULARĂ, BIOGENEZA ȘI FUNCȚIILE MITOCONDRIILOR

### 1. GENOMUL MITOCONDRIAL

Celulele umane conțin între 500 și 2000 de mitocondrii, fiecare din aceste organite având în alcătuirea ei 2-10 molecule circulare de ADN dublu catenar (vezi figura 2.10), fiecare fiind formate din câte 16.569 pb. Excepțiile le constituie eritrocitele, care sunt lipsite de mitocondrii, ovulele nefertilizate și trombocitele – în ale căror mitocondrii se află doar o singură moleculă de ADN.

#### 1.1. PARTICULARITĂȚILE ADN MITOCONDRIAL

Trăsăturile care diferențiază ADN mitocondrial (ADNmt) de ADN nuclear (ADNn) au fost prezentate în capitolul 2.C.3. și sintetizate în tabelul 2.1. Considerăm însă utilă o succintă recapitulare a particularităților ADNmt.

- Cele două catene de ADNmt se *deosebesc* prin conținutul lor în baze azotate și, implicit, prin densitatea de plutire: una dintre catene este bogată în guanină (lanțul greu, **H**); în mod corespunzător, catena complementară are un conținut înalt în citozină (lanțul ușor, **L**).
- ADNmt este *lipsit de introni*: exceptând un segment de aproximativ 1000 pb (bucla D – *displacement loop*) în care se află atât originea replicării lanțului greu cât și promotorii

transcrierii ambelor catene, întreaga secvență a ADNmt este copiată în molecule funcționale de ARN.

- Genele din ADNmt sunt *contigue* sau separate prin doar 1-2 pb.
- Patru dintre cele 64 de „cuvinte” ale codului genetic al ADNmt au o *altă semnificație* decât cea a codonilor din genomul nuclear (codoni “eretici” sau “disidenți”).
- Atât în procesul replicării cât și în cel al transcrierii, ADNmt se comportă ca o *unitate*: o dată inițiate, cele două procese se desfășoară fără întreruperi, parcurgând întreaga lungime a moleculei.
- Mitocondriile *nu posedă sisteme eficiente de reparare*<sup>1</sup> a ADN și, ca atare, erorile inerente replicării, precum și leziunile produse accidental, rămân în marea lor majoritate necorectate și se acumulează în genom sub formă de mutații; în plus, rata evenimentelor recombinazionale este foarte redusă.
- ADNmt *nu formează complexe cu histonele* (care au rol protector) și de aceea ADNmt este deosebit de vulnerabil la acțiunea agenților mutageni, dintre care unii – radicalii liberi de oxigen, puternic injurianți – sunt generați în cantități mari în chiar matricea mitocondrială, adică în mediul în care se află moleculele de ADNmt.
- ADN polimeraza gamma, enzima replicării ADNmt, operează cu o *fidelitate inferioară* celei a ADN polimerazelor alfa și delta, acceptând împerecheri greșite sau alunecând peste unul sau mai multe nucleotide.

Ultimele trei trăsături sunt cele care furnizează explicația faptului că în ADNmt mutațiile se produc cu o frecvență de 10-20 de ori mai mare decât în ADN nuclear.

## 1.2. HOMOPLASMIA, HETEROPLASMIA ȘI SEGREGAREA REPLICATIVĂ.

Ca urmare a ratei înalte a mutațiilor produse în ADNmt, celulele somatice ale unui adult conțin, de regulă, mixturi de mitocondrii – unele cu genom normal și altele cu genom modificat prin mutații. Termenul utilizat pentru a desemna coexistența într-o celulă a mitocondriilor genetic normale și a celor mutante este cel de **heteroplasmie**, iar cel care definește prezența *exclusivă* a unui tip – normal sau anormal – de mitocondrii este de **homoplasmia**.

În cursul diviziunilor, distribuția mitocondriilor în celulele fiice se realizează *aleatoriu* (figura 12.1). În succesiunea generațiilor de celule – somatice sau germinale – raportul dintre numărul mitocondriilor normale și cel al mitocondriilor mutante este însă supus unor variații importante datorate fenomenului derivei genetice. Variațiile se pot solda cu excluderea totală a uneia dintre subpopulații. Procesul prin care se realizează reducerea de la heteroplasmie la homoplasmie se numește **segregare replicativă**.

Reducerea la homoplasmie a celulelor somatice necesită un număr mare de diviziuni. În linia germinală feminină segregarea replicativă este însă foarte rapidă: după numai două generații, populațiile mitocondriale ale celulelor germinale se omogenizează.

## **2. BIOGENEZA ȘI FUNCȚIILE MITOCONDRIILOR**

La edificarea unei mitocondrii iau parte producția proteicilor ai unui număr de aproximativ 3000 de gene. În marea lor majoritate, aceste gene aparțin genomului nuclear. Sinteza proteinelor codificate de genele nucleare se efectuează pe ribozomii din citosol, de unde sunt transferate în mitocondrii.

<sup>1</sup> În mitocondrii funcționează câteva dintre mecanismele de reparare a ADN nuclear – BER și MGMT – dar eficiența lor este redusă și rata mutațiilor care persistă după intervenția lor este de 10 ori mai mare decât în genomul nuclear (vezi capitolul 6.B.4)

În genomul mitocondrial se afla doar 37 de gene (28 în lanțul greu și 9 în lanțul ușor), toate participă prin produșii lor la constituirea **lanțului respirator**, format din peste 100 de polipeptide. Genele mitocondriale codifică 22 de tipuri de ARN de transfer, două tipuri de ARN ribozomal și 13 polipeptide. Moleculele de ADNmt participă la formarea propriului aparat proteinosintetizator iar polipeptidele se constituie în subunități din componența a 4 din cele 5 complexe enzimatice ale lanțului respirator:

- complexul I (NADH dehidrogenaza) reunește peste 40 de polipeptide, dintre care 7 sunt codificate de ADNmt;
- complexul III (ubiquinol:citocrom c oxidoreductaza) are în alcătuirea sa un singur polipeptid mitocondrial (citocromul b);
- complexul IV (citocrom c oxidaza) conține 3 subunități mitocondriale (CoI, CoII, CoIII);
- complexul V (ATP sintetaza) are 13 polipeptide din care două (ATPazele 6 și 8) sunt specificate de gene mitocondriale.

Ansamblul proteinelor care formează lanțul respirator rezultă, așadar, prin complementarea a două agregate genice separate spațial: nucleul și mitocondriile. Prin urmare, bolile cauzate de defectele lanțului respirator pot fi consecința unor mutații care afectează:

- genele nucleare sau mitocondriale implicate în sinteza subunităților enzimatice individuale ale lanțului respirator; genele nucleare care asigură importul și asamblarea diferitelor subunități ale lanțului respirator;
- genele nucleare care controlează perpetuarea, propagarea și exprimarea genomului mitocondrial.

Dubla origine – nucleară și mitocondrială – a componentelor lanțului respirator constituie explicația faptului că *transmiterea la descendenți* a defectelor acestui sistem se poate realiza atât matriliniar (pe linie maternă), cât și în conformitate cu oricare dintre modurile mendeliene (autosomal dominant, autosomal recesiv, legat de X).

Genomul mitocondrial este lipsit de secvențe repetitive, genele care îl alcătuiesc nu au introni, iar procentul de ADN codant este foarte înalt (97% față de numai 5% în genomul nuclear). Aceste *similitudini cu genomul procariotelor* justifică aserțiunea că ADNmt provine din cromosomii unor bacterii aerobe endocitate de celule mai mari, total dependente de glicoliza anaerobă pentru producerea cantității necesare de molecule macroergice ATP (teoria endosimbiotică). O dată incorporate, bacteriile și-au pierdut autonomia, multe dintre activitățile lor legate de generarea energiei fiind preluate și controlate de genomul nuclear, fapt care explică *transmiterea multimodală a defectelor lanțului respirator*.

Întrucât toate cele 37 de gene mitocondriale sunt implicate în procesul fosforilării oxidative (OXPHOS), mitocondriile au fost asimilate unor *centrale energetice celulare*. Funcțiile mitocondriilor nu se limitează însă la generarea de energie. Ele îndeplinesc și *alte roluri de importanță majoră* pentru realizarea unor variate activități celulare. Printre acestea figurează:

- construcția și funcționarea moleculelor ADN;
- controlul biosintezei pirimidinelor (prin dihidrofolat dehidrogenază);
- sinteza hemului (prin sintetaza acidului delta amino levulinic necesar formării hemoglobinei);
- detoxificarea amoniacului în ciclul ureei;
- metabolizarea colesterolului și sinteza sexosteroizilor;
- metabolizarea neurotransmițătorilor;
- producerea și detoxificarea radicalilor liberi;
- oxidarea grăsimilor, proteinelor și zaharurilor;
- inițierea apoptozei.

### 3. MUTAȚIILE ADNmt

În genomul mitocondrial au fost identificate diferite tipuri de mutații: substituții, deleții și inserții ale unei singure perechi de nucleotide (mutații punctiforme), precum și deleții, duplicații și rearanjări interesând secvențe cu lungimi de sute sau mii de nucleotide.

Mecanismele producerii acestor alterări nu diferă de cele prin care sunt generate mutațiile genomului nuclear. Erorile inerente replicării (împerecheri greșite, derapajele ADN polimerazei gamma, alinierea ilegală a catenelor nou sintetizate în raport cu catenele parentale) se fac răspunzătoare de apariția mutațiilor denumite **spontane**; leziunile ADN provocate de agenții din mediul intern sau extern – rămase nereparate – formează categoria mutațiilor **induse**.

În ceea ce privește consecințele lor, mutațiile ADNmt, similar celor nucleare, se clasifică în neutre, avantajoase și dăunătoare.

Mutațiile **neutre** sunt lipsite de consecințe fenotipice importante și, ca atare, asupra lor nu se exercită presiunea selecției naturale. În marea lor majoritate, mutațiile neutre rezultă prin substituții mononucleotidice în poziția a treia a tripletelor codificatoare (cuvintele de cod) sau în regiunea necodantă (bucla D). Aceste mutații generează polimorfismele ADNmt, puternic corelate cu originea etnică și geografică a populației investigate. Polimorfismele ADNmt sunt intens exploatate în prezent în domeniile paleoantropologiei, criminalisticii și medicinei legale.

Existența mutațiilor **avantajoase** este susținută de argumente circumstanțiale. Se consideră că variantele care, realizând o cuplare strânsă a respirației cu fosforilarea oxidativă, reduc producția de căldură și o cresc pe cea de ATP, sunt favorabile vieții la tropice. Invers, mutațiile care relaxează cuplarea, intensificând astfel termogeneza, ar fi avantajoase în regiunile arctice. Este foarte probabil ca selecția naturală să fi operat reținând, atunci când populațiile au migrat între ecuator și pol, mutațiile optime pentru anumite condiții climatice și eliminându-le pe cele inadecvate. Variantele prezumate a conferi avantaj selectiv nu au fost încă identificate.

Mutațiile **dăunătoare** conduc la apariția unor manifestări clinice a căror severitate diferă în funcție de *gradul heteroplasmiei, tipul celulelor care le poartă și gena afectată*.

În cazul mutațiilor heteroplasmice, relația dintre proporția moleculelor ADN mutante și declinul producției de energie este una directă. Totuși, efectele fenotipice ale mutațiilor se fac resimțite numai atunci când eficiența globală a fosforilării oxidative scade sub un anumit nivel, denumit **prag energetic**, a cărui valoare variază de la un țesut la altul. Cel mai sensibil la deficitul energetic este sistemul nervos; urmează, în ordine, mușchii scheletici, inima și rinichiul, glandele endocrine și ficatul.

Mai puțin evident este însă modul în care alterările diferitelor gene mitocondriale se corelează cu severitatea și – mai mult decât atât – chiar cu trăsăturile fenotipului patologic pe care îl imprimă. Este un fapt bine stabilit că există mai multe mutații care se fac răspunzătoare de apariția unui același fenotip și că o aceeași mutație poate imprima fenotipuri semnificativ diferite. Această disociere între genotip și fenotip se explică prin înaltul polimorfism al ADNmt, precum și prin intervenția unor factori modificali epigenetici.

O mențiune specială i se cuvine **depleției mitocondriale**. *Depleția* este termenul utilizat pentru a desemna *reducerea drastică* (uneori cu 98%) a cantității de ADNmt. Depleția se produce, de regulă, într-un singur organ (specificitate de țesut), căruia îi deteriorează profund și ireversibil capacitatea funcțională. Literatura conține exemple de depleții ale ADNmt din mușchi, rinichi, ficat și creier. Marea lor majoritate determină tulburări clinice de o gravitate extremă, instalate în primele săptămâni de la naștere și compatibile cu o supraviețuire de numai câteva luni. Cauzele depleției par a fi mutațiile unor gene autosomale, un exemplu constituindu-l gena factorului de transcriere NRF1. Acest factor reglează transcrierea genelor nucleare care codifică proteinele mitocondriale. Prezența depleției ADNmt la mai mulți membri ai unei familii, indiferent de sexul lor, precum și absența semnelor la părinți, indică natura recesivă a mutației cauzatoare.

## 4. TRANSMITEREA LA DESCENDENȚI A MUTAȚIILOR ADNmt.

Mutațiile produse în genele mitocondriale se transmit exclusiv pe linie maternă. Exceptând câteva specii de *Drosophila* și de rozătoare, spermatozoizii nu contribuie cu citoplasma lor (în care se află un număr de numai 25-30 de mitocondrii) la formarea zigotului. Potrivit unor observații recente, celor câteva mitocondrii ale spermatozoizilor pătrunse ocazional în ovul în momentul fertilizării, li se atașează molecule de ubiquitină care le marchează în vederea distrucției. Rezultă că toate cele aproximativ 200.000 de mitocondrii prezente în citoplasma zigotului aparțin ovulului și, ca atare, celulele viitorului organism vor fi echipate numai cu mitocondrii maternelor. Consecința poate fi exprimată astfel: mamele își transmit genotipul mitocondrial copiilor de ambele sexe, dar numai fiicele lor vor fi acelea care îl vor transmite generației următoare (figura 12.2). În cazul în care femeia purtătoare a unei mutații mitocondriale are numai descendenți de sex masculin, mutația se va elimina din populație deoarece bărbații nu pot asigura propagarea ei în succesiunea generațiilor.

## B. PRINCIPALELE TIPURI DE BOLI MITOCONDRIALE

### 1. MANIFESTĂRILE CLINICE ALE AFECȚIUNILOR MITOCONDRIALE

Principalele elemente care sugerează implicarea alterării funcțiilor mitocondriilor în etiopatogenia unei boli sunt:

- caracterul *necoerent* al asocierii semnelor și simptomelor clinice;
- debutul cel mai adesea *precoce* și evoluția *rapid progresivă*;
- *afectarea concomitentă* a cel puțin trei organe care nu au în comun nici originea embriologică și nici funcțiile biologice;
- *modificările recurente* survenite în tabloul clinic cu ocazia unor infecții (ameliorări, agravări);
- prezența în tabloul clinic al bolilor comune a unor combinații de *trăsături atipice*, inexplicabile.

Perturbările procesului fosforilării oxidative antrenează – virtual – *disfuncții ale oricărui organ sau țesut*. Ele pot afecta țesuturile individual sau în diferite combinații. În plus, mutații diferite ale ADNmt pot produce manifestări clinice similare, iar o aceeași mutație poate imprima fenotipuri morbide variate. Studii efectuate pe familii în care s-au decelat mutații heteroplasmice ale ADNmt demonstrează că, pe măsura creșterii proporției de ADNmt mutant, are loc o *reducere a producției de energie*, iar când este atins un anumit prag, variabil în funcție de țesut, *criza energetică* determină declanșarea manifestărilor patologice. Valoarea pragului depinde de mai mulți factori: declinul producției de energie; creșterea producției speciilor reactive de oxigen; inițierea apoptozei care, depletând țesuturile, compromite funcționalitatea acestora. Diferența între celulele normale și cele defecte în ce privește funcția mitocondrială este minimă, instalarea bolii producându-se atunci când proporția de ADNmt mutant atinge 85%.

Semnele de debut pot apărea în orice moment al ontogeniei – din perioada antenatală, până la vârsta adultă – iar spectrul simptomelor de debut ale bolilor mitocondriale este foarte larg (tabelul 12.1).

**Tabelul 12.1. Diversitatea simptomelor bolilor mitocondriale și relația cu vârsta de debut.**

Organ	Perioada neonatală	Copilărie	Adolescență,
-------	--------------------	-----------	--------------

	(0- 1 lună)	(o lună-2 ani)	vârsta adultă
SNC	Hipotonie Acidoză lactică Comă acidocetozică	Retard psihomotor Ataxie cerebeloasă Mioclonie Pseudoaccidente vasculare cerebrale Encefalomiopatie necrozantă subacută	Mioclonie Ataxie cerebeloasă Spasticitate Retard psihomotor Leucodistrofie Atrofie corticală Neuropatie periferică
Musculatura striată	Miopatie Atrofie musculară	Miopatie Atrofie musculară Slăbiciune musculară Hipotonie Mialgie Intoleranță la efort Mioglobinurii recurente	Miopatie progresivă Slăbiciune musculară Mialgie Intoleranță la efort Mioglobinurii recurente
Ficat	Insuficiență hepatică	Hepatomegalie Disfuncție hepatocelulară	
Inimă	Cardiomiopatie hipertrofică	Cardiomiopatie hipertrofică	Cardiomiopatie concentrică hipertrofică sau dilatativă Bloc cardiac
Rinichi	Tubulopatie proximală (sindrom Toni-Debre-Fanconi)	Tubulopatie proximală (sindrom T DF)	
Aparat digestiv		Vomă, diaree Atrofie a vilozităților intestinale Insuficiență pancreatică exocrină	
Sistem endocrin		Hipostatură Hipoglicemie	Diabet Hipoparatiroidie Hiperaldosteronism
Sistem hematopoietic		Anemie sideroblastică Neutropenie, trombopenie	
Analizatorul auditiv		Surditate neurosenzorială	Surditate neurosenzorială
Analizatorul vizual		Atrofie optică Oftalmoplegie externă progresivă Retinită pigmentară Ptoză palpebrală Cataractă	Oftalmoplegie externă progresivă Ptoză palpebrală Atrofie optică Leber Retinită pigmentară Cataractă
Piele		Pigmentație anormală a regiunilor expuse la soare. Păr uscat și friabil Tricotodistrofie	

După un interval relativ scurt de timp, semnelor inițiale li se adaugă – invariabil – cele ale *afectării neuromusculare*. În general, semnele prezente la debut persistă și se agravează gradual. Uneori însă, ele pot regresa, chiar până la dispariție, o dată cu dezvoltarea unei simptomatologii care exprimă suferința altor organe. Astfel, diareea, pancitopenia sau insuficiența hepatică se pot remite atunci când în prim-planul manifestărilor clinice se plasează semnele deficitului neuromuscular. De notat că, urmare a acumulării de ADNmt mutant și a segregării replicative, în fenotipul unui bolnav se pot înregistra variații importante, mergând de la înrăutățirea dramatică a manifestărilor clinice până la completa conversie a afecțiunii. Un exemplu îl constituie sindromul Pearson (produs de deleții ale ADNmt din celulele sanguine), caracterizat prin anemie sideroblastică și insuficiență pancreatică exocrină. Bolnavii care supraviețuiesc până în a doua decadă a vieții dezvoltă adesea sindromul Kearns-

Sayre (produs de acumularea de deleții ale ADNmt în mușchi și alte țesuturi), în ale cărui simptome nu se includ anemia și deficitul enzimelor pancreatice.

Principalele tipuri de boli mitocondriale, mutațiile ADNmt care le determină și codul OMIM la care pot fi obținute informații complete și actualizate sunt prezentate în **tabelul 12.2**

**Tabelul 12.2 Boli cauzate de defecte ale funcției mitocondriale și de mutații ale ADNmt.**

Boala	Mutații	OMIM#
Oftalmoplegia externă cronică progresivă (CPEO) Sindromul Kearns-Sayre (KSS) Miopatii oculare Cardiomiopatii ereditare	Deleții Deleții Rearanjări	555000 530000
Miopatie, encefalomiopatie, acidoză lactică, accidente cerebrale vasculare ( <i>myopathy, encephalomyopathy, lactic acidosis, stroke</i> – MELAS)	ARNt <sup>Leu</sup> A→G 3243	540000
Epilepsia mioclonică cu fibre musculare roșii în lambouri ( <i>Myoclonic epilepsy and ragged red fibers</i> – MERFF)	ARNt <sup>Lys</sup> A→G 8344	545000
Boala Leigh și slăbiciunea musculară neurogenică, ataxia și retinita pigmentară ( <i>neurogenic muscle weakness, ataxia and retinitis pigmentosa</i> - NARP)	T→G 8993; T→C 8993	516060
Neuropatia optică ereditară Leber ( <i>Leber hereditary optic neuropathy</i> – LHON)	Multiple	535000 516000
Ototoxicitatea aminoglicozidică ( <i>aminoglycoside ototoxicity</i> )	A→G 1555	580000
Encefalomiopatia progresivă	Δ <sup>B</sup> 271	590050/60
Boala Alzheimer cu debut tardiv, boala Parkinson	ARNt <sup>Glu</sup> A→G 4336	502500

Se acceptă că există cinci categorii majore de afecțiuni, definite molecular, determinate de mutații ale ADNmt (**citopatii mitocondriale**).

- **Oftalmoplegia externă cronică progresivă (CPEO) și sindromul Kearns-Sayre (KSS).**
  - **CPEO** se caracterizează prin ptoză palpebrală, oftalmoplegie, tulburări miopatie la nivelul musculaturii membrilor. La examenul histologic al fragmentelor de mușchi scheletici recoltate prin biopsie se observă aspectul care definește cele mai multe dintre encefalomiopatiile mitocondriale: fibre musculare roșii în lambouri. Acest aspect este creat prin proliferarea anormală a mitocondriilor, consecutivă defectelor biochimice severe ale fosforilării oxidative.
  - **Sindromul Kearns-Sayre (KSS)** se caracterizează prin hipostatură, întârzierea dezvoltării pubertare, oftalmoplegie externă, ptoză palpebrală, semne de hiperparatiroidie, surditate, ataxie cerebeloasă, blocuri cardiace și retinopatie pigmentară atipică. Afecțiunea debutează înaintea vârstei de 20 de ani. Ambele sindroame sunt consecința unei deleții unice mari (8 kb) a ADNmt.
- **Sindromul MELAS** (*Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic acidosis, Stroke-like episodes*) este o boală multisistemică în care, pe lângă semnele cardinale desemnate prin acronimul MELAS există o amplă varietate de anomalii clinice, dintre care cele mai frecvente sunt: hipostatura, surditatea, convulsiile generalizate, episoadele de vomă. Consecutiv ictusurilor cerebrale se instalează hemiplegii, hemianopsii, amauroză centrală. La peste 80% dintre pacienți se detectează mutații punctiforme în gena ARNt<sup>Leu(UUR)</sup> în pozițiile nucleotidice 3243 și 3271.
- **Epilepsia mioclonică cu fibre musculare roșii în lambouri** (*myoclonic epilepsy with ragged-red fibers* – **MERFF**) se definește prin mioclonie intensă, ataxie progresivă, slăbiciune musculară, crize de convulsii generalizate, surditate, demență, acidoză lactică, ictusuri cerebrale recurente. Mutația care determină MERFF este o tranziție A→G la situsurile 8344 sau 8356 din gena pentru ARNt<sup>Lys</sup>.

- **Neuropatie, ataxie, retinită pigmentară (NARP)/ boala Leigh cu transmitere maternă.** Sindromul NARP include: întârziere a creșterii postnatale, detresă respiratorie cu crize de apnee, slăbiciune la nivelul mușchilor proximali ai membrelor, neuropatii senzoriale cu amauroză și surditate, ataxie, convulsii, retinită pigmentară. La bolnavii cu NARP se detectează o mutație punctiformă în poziția 8993 a genei care codifică subunitatea 6 a ATP sintetazei. Când proporția celulelor mutante este foarte înaltă, se constituie fenotipul encefalopatiei necrozante subacute, cunoscută sub numele de **boala Leigh**
- **Neuropatia optică ereditară Leber (LHON).** Boala debutează dramatic prin semne de nevrită retrobulbară acută sau subacută nedureroasă. Pierderea vederii se instalează brusc și este, în 50% din cazuri, unilaterală; afectarea celuilalt ochi este însă obligatorie și se produce în interval de aproximativ o lună. 70% dintre bolnavi sunt bărbați, ceea ce a condus la ipoteza, neconfirmată însă, a intervenției adiționale a unei gene de pe cromozomul X. Vârsta medie de debut este de 23 de ani. Aspectul de papilită este prezent de la începutul bolii; atrofia optică nu reprezintă, totuși, niciodată un semn precoce; dezvoltarea ei este progresivă și devine completă doar la două treimi dintre bolnavi. În unele cazuri, tabloul clinic include, pe lângă manifestările oftalmologice, diferite alte tulburări: neuropatii periferice, distonie, mielopatie demielinizantă, defecte de conducere cardiacă. Mutațiile 3460 și 11778 (de la nivelul genelor ND1 și ND4 imprimă un caracter de gravitate, în timp ce forma indusă de mutația 14484 este mai blândă, compatibilă chiar cu redobândirea parțială a vederii.

**Tabelul 12.3** prezintă sinoptic trăsăturile clinice ale celor mai frecvente sindroame clinice produse de mutațiile ADNmt iar în **tabelul 12.4** simptomele prezente în diferite citopatii mitocondriale sunt grupate pe organe și sisteme.

**Tabelul 12.3. Boli mitocondriale mai frecvent întâlnite.**

Boala	Trăsături clinice	Trăsături adiționale
<b>Oftalmoplegia externă cronică progresivă</b>	Oftalmoplegie externă Ptoză bilaterală	Miopatie proximală moderată
<b>Sindromul Kearns Sayre</b>	Debut prin oftalmoplegie externă progresivă înaintea vârstei de 20 de ani Retinită pigmentară Ataxie cerebeloasă, blocuri cardiace	Surditate bilaterală Miopatie Disfagie Diabet zaharat, Hipoparatiroidism Demență
<b>MELAS</b>	Ictusuri cerebrale înaintea vârstei de 40 de ani Convulsii și/sau demență Fibre musculare roșii în lambouri și/sau acidoză lactică	Diabet zaharat Cardiomiopatie (inițial hipertrofică, ulterior dilatativă) Surditate bilaterală Retinopatie pigmentară Ataxie cerebeloasă
<b>Epilepsie mioclonică cu fibre musculare roșii în lambouri (MERF)</b>	Mioclonii Convulsii Ataxie cerebeloasă Miopatie	Demență Atrofie optică, surditate bilaterală Neuropatie periferică, spasticitate Lipoame multiple
<b>Neuropatia optică ereditară Leber (LHON)</b>	Pierderea bilaterală a vederii, nevrită retrobulbară nedureroasă Raportul bărbați:femei – 4:1 Vârsta medie de debut –23 de ani	Distonie Sindroame de preexcitare cardiacă
<b>Neuropatie, ataxie și retinită pigmentară (NARP)</b>	Neuropatie periferică cu debut în adolescență sau la adult Ataxie Retinopatie pigmentară	Calcificări ale ganglionilor bazali Electroretinogramă anormală Neuropatie sesorimotorie
<b>Sindromul Leigh</b>	Encefalopatie subacută Semne ale afectării cerebelului și ale trunchiului cerebral	Calcificări în ganglionii bazali Istoric matern de afecțiuni neurologice sau de sindrom



		Leigh
<b>Miopia infantilă și acidoza lactică (forme letale și neletale)</b>	Hipotonie în primul an de viață Dificultăți în alimentație și respirație	Forma fatală poate fi asociată cu cardiomiopatie și/sau cu sindrom Toni-Debre-Fanconi
<b>Sindromul Pearson</b>	Anemie sideroblastică Pancitopenie Insuficiență pancreatică exocrină	Defecte tubulare renale

**Tabelul 4. Tulburări asociate cu citopatiile mitocondriale.**

<b>Organ/sistem</b>	<b>Simptome asociate</b>
Creier	Întârzieri ale dezvoltării, retard mental, tulburări neuropsihice, demență, crize comițiale, mioclonii, tulburări ale motilității (distonie, diskinezie, coree), paralizie cerebrală atipică, migrene, ictusuri cerebrale.
Nervi	Slăbiciune, durere neuropatică, absența reflexelor, probleme gastrointestinale (reflux gastroesofagian, golire gastrică întârziată, constipație, pseudo-obstrucție), lipotimii, transpirație absentă sau excesivă cu afectare a termoreglării.
Mușchi scheletici, Mușchi oculari extrinseci	Slăbiciune, hipotonie, crampe, dureri musculare Ptoză, strabism dobândit, oftalmoplegie
Rinichi	Tubulopatie proximală cu pierderi de proteine, magneziu, fosfor, calciu etc
Inimă	Defecte de conducere (blocuri), cardiomiopatii
Ficat	Hipoglicemie, insuficiență hepatică
Analizator vizual	Reducerea sau pierderea vederii (retinită pigmentară, atrofie optică)
Analizator auditiv	Deficit al auzului, surditate
Pancreas	Diabet și insuficiența secreției exocrine
Sistemică	Falimentul creșterii, hipostatură, oboseală, probleme respiratorii

Unele dintre trăsăturile fenotipice imprimate de diferitele mutații ale ADNmt sunt comune mai multor entități nosologice incluse în categoria citopatiilor mitocondriale. Suprapunerea semnelor clinice este redată în tabelul 12.5, iar în tabelul 12.6 sunt prezentate manifestările sistemică ale citopatiilor mitocondriale.

**Tabelul 12.5. Trăsături clinice asociate cu citopatiile mitocondriale.**

<b>Trăsătura clinică</b>	<b>CPEO/ KSS</b>	<b>MELAS</b>	<b>MERRF</b>	<b>NARP</b>	<b>LHON</b>
Oftalmoplegie	+	±	-	-	-
Degenerarea retiniană	+	-	-	-	-
Retinita pigmentară	-	-	-	+	-
Atrofia optică	-	-	-	-	+
Blocuri cardiace	+	-	-	-	-
Mioclonii	-	-	+	+	-
Ataxia	+	-	+	+	-
Slăbiciune	+	+	+	+	-
Crize comițiale	-	+	+	+	-
Demență	+	+	+	+	-
Hipostatură	+	+	+	-	-
Episoade de vomă	-	+	-	-	-
Cecitate corticală	-	+	-	-	-
Hemipareză, hemianopsie	-	+	-	-	-
Surditate sensorineurală	+	+	-	+	-
Neuropatie	±	±	±	+	-
Acidoză lactică	+	+	+	±	-
Fibre musculare roșii în lambouri	+	+	+	-	-
Istoric familial pozitiv	-	+	+	+	+

**Tabelul 12.6. Manifestări sistemice ale bolilor mitocondriale.**

Metabolice	Acidoza lactică, coma cetoacidotică
Hepatice	Hepatopatie, insuficiență funcțională
Cardiace	Cardiomiopatie, defecte de conducere
Renale	Tubulopatii proximale și distale, glomerulopatii
Intestinale	Diaree, atrofie viloză, sindrom pseudoobstructiv
Pancreatice	Disfuncție a acinilor
Endocrine	Hipertiroidie, diabet zaharat, hipostatură
Oftalmologice	Cataractă, retinopatie pigmentară

Cel mai adesea, manifestările clinice inițiale ale citopatiilor mitocondriale exprimă suferința unui singur organ. Nici una dintre manifestările de debut nu este de natură să orienteze asupra implicării în patogenia bolii a unui defect mitocondrial. Asocierea ulterioară a semnelor afectării altor aparate și sisteme impune efectuarea unor *examene paraclinice* ale căror rezultate pot documenta posibila disfuncție mitocondrială (vezi **tabelul 12.7**). *Testul decisiv de diagnostic îl constituie însă analiza moleculară a ADNmt.*

**Tabelul 12.7. Rezultate posibile ale explorărilor paraclinice în citopatiile mitocondriale.**

Histologie	Fibre musculare roșii în lambouri
Histochimie	Proliferarea excesivă a mitocondriilor și deficiențele citocrom c oxidazei
Microscopie electronică	Anomalii morfologice ale mitocondriilor
Electromiografie	Potențiale miopatie
Audiogramă	Surditate senzorială
Electrocardiogramă	Defecte de conducere
Biochimie	Raport molar lactat/piruvat crescut (>20) în ser și în LCR; hiperlactatemie > 3mm/l sau > 1,5mm/l în LCR ; acidoză metabolică (bicarbonați plasmatici crescuți). Polarografia permite stabilirea consumului de oxigen. Hiperlicemia indică prezența unui diabet asociat.
Neuroimagică (TC,RMN)	Calcificări în ganglionii bazali, atrofie difuză și/sau focală a cortexului și cerebelului
Analiza ADNn și ADNmt	Mutații, deleții, duplicații în celulele sanguine sau din fibrele mușchilor scheletici. Pot fi evidențiate mutații în genomul nuclear sau în cel mitocondrial

## 2. TRATAMENTUL BOLILOR MITOCONDRIALE

Tratamentele convenționale conduc uneori la ameliorarea temporară a simptomatologiei clinice a bolilor mitocondriale și la restaurarea, cel puțin parțială, a parametrilor biochimici alterați. Aceste tratamente comportă administrarea agenților antioxidanți (ascorbat, alfa-tocoferol, menadionă, glutatation, acid lipoic, seleniu), a unor cofactori ai enzimelor lanțului respirator (riboflavină), a vitaminelor complexului B (tiamină, niacină, B6, B12, biotină, acid pantotenic), a L-carnitinei (o substanță alimentară necesară transportului acizilor grași prin membranele mitocondriale) și a coenzimei Q10, aceasta din urmă participând la generarea de energie și acționând ca antioxidant cu rol de protecție a celulelor împotriva injuriei produse de speciile reactive de oxigen. Trebuie specificat că tratamentele convenționale nu reușesc să stabilizeze boala și, cu atât mai puțin, să o vindece. La unii pacienți severitatea simptomelor poate să decline iar progresia bolii poate fi întârziată. Se impune însă ca tratamentul să fie condus de un specialist în boli metabolice deoarece administrarea fără prescripție a medicației se poate solda cu întârzierea sau eșecul stabilirii unui diagnostic corect.

Elaborarea unor strategii alternative reprezintă o cerință obligatorie; aceste strategii nu pot fi altele decât cele ale terapiei genice.

Până în prezent au fost imaginate trei abordări diferite care vizează suplinirea sau corectarea prin metodele geneticii moleculare a defectelor structurale ale ADNmt:

- înlocuirea genelor mitocondriale mutante cu gene normale inserate în genomul nuclear. Procedura presupune convertirea prin mutageneză dirijată a codonilor eretici în cuvinte ale codului universal. Gena este apoi amplasată într-un vector și transfectată prin intermediul acestuia în genomul nuclear. Produsul proteic sintetizat în citoplasmă este cuplat cu o secvență de sortare care îl introduce în mitocondrii unde va funcționa compensând deficitul creat de mutația patologică;
- introducerea în mitocondrii a unei proteine cuplate cu secvența de ADNmt care codifică lanțuri polipeptidice sau molecule de ARNt și ARNr. Importul în mitocondrii este asigurat prin atașarea semnalului de sortare. Prin această tehnică s-a reușit transferul în mitocondrii al unor segmente de ADN cu lungimi cuprinse între 0,3 și 3 Kb;
- eliminarea moleculelor ADNmt mutante prin blocarea specifică a replicării: se utilizează oligonucleotide antisens care, fixându-se pe secvența alterată, fac imposibilă replicarea moleculei în care se află mutația, fără a afecta replicarea moleculelor normale.

În laboratoarele de cercetare aceste strategii și-au dovedit eficiența. Introducerea lor în practică este însă condiționată de rezolvarea multiplelor probleme de ordin tehnic cu care se confruntă, în general, terapia genică.

## C. MUTAȚIILE ADNmt ȘI SENESCENTA

Capacitatea generării ATP prin procesele fosforilării oxidative declină în paralel cu înaintarea în vârstă. Deficitul de ATP este evident în toate țesuturile senescente alcătuite din celule diferențiate terminal (postmitotice). Declinul producției de ATP se corelează atât cu instalarea și progresiunea semnelor senescentei, cât și cu acumularea de alterări mutaționale ale ADNmt.

În celulele sistemului nervos central ale indivizilor vârstnici a fost decelată o deleție de 5 Kb. Cea mai înaltă proporție de molecule ADNmt deletate se înregistrează în substanța neagră, nucleul caudat și putamen. La vârsta de 85 de ani această mutație este detectată în peste 10% din neuronii nucleilor bazali; ea afectează și alte zone ale encefalului, dar lipsește din neuronii cerebelului. În fibrele mușchilor scheletici, pe lângă deleția de 5 Kb, la persoanele vârstnice se decelează și o deleție de 3 Kb. După vârsta de 35 de ani, în fibrele miocardice încep să se acumuleze mutații reprezentate cu precădere de deleția unui segment cu o lungime de 3,6 Kb.

Incrimate în producerea mutațiilor ADNmt sunt speciile reactive de oxigen. Nivelul crescut al 8-hidroxi-guanozinei în ADNmt este consecința stresului oxidativ la care este expus permanent genomul mitocondriilor. Proporția de 100-300 ori mai înaltă a moleculelor cu deleții în ganglionii bazali ai bătrânilor se explică prin faptul că aceste formațiuni sunt foarte bogate în fibre dopaminergice; dezaminarea oxidativă a dopaminei de către monoaminoxidază produce o mare cantitate de radicali liberi. În boala coronariană, alternanța ischemie-reperfuzie stimulează producerea speciilor reactive de oxigen.

Prin intermediul mutațiilor pe care le determină, radicalii liberi se constituie în cauza majoră a deteriorării progresive a mecanismelor mitocondriale implicate în metabolismul energetic. Acumularea în exces a mutațiilor mitocondriale și dezechilibrul subsecvent între necesarul de energie al celulelor și posibilitatea asigurării acestuia se află la originea bolilor degenerative ale vârstei a treia.

## D. MUTAȚIILE ADNmt ÎN BOLILE DEGENERATIVE

În neuronii dopaminergici din regiunea nigrostriat și din mușchii scheletici ai pacienților cu boala Parkinson au fost identificate deficiențe ale complexului I și leziuni oxidative, prezente și în cibrizii realizați din celulele patologice. **Cibrizii** sunt celule himerice, formate prin fuzionare. Nucleii acestor celule provin de la indivizi aparent sănătoși, iar citoplasma – de la bolnavi cu afecțiuni mitocondriale. Raportul ADNmt mutant/ADNmt normal este, în medie, de 10 ori mai înalt la bolnavi comparativ cu martorii sănătoși. Răspunzătoare de perturbarea metabolismului energetic este considerată a fi deleția de 5 Kb a ADNmt, evidențiată mai ales în neuronii nucleilor bazali.

Scleroza laterală amiotrofică este consecința degenerării motoneuronilor somatici din trunchiul cerebral și măduva spinării. Aproximativ 10% dintre bolnavi sunt purtători ai unor mutații autosomal dominante cu penetranță înaltă, exprimate după vârsta de 60 de ani. Mutațiile interesează gena nucleară codificatoare a uneia dintre formele superoxid dismutazei. În lipsa SOD, anionul superoxid rămâne activ perioade mai lungi de timp și își exercită efectul toxic asupra ADNmt, provocându-i leziuni ce se vor traduce prin deficit energetic.

În boala Alzheimer mutațiile ADNmt sunt detectabile în neuronii cortexului cerebral în care se înregistrează și reduceri importante ale activității piruvat dehidrogenazei și a complexului I. Aceste observații certifică participarea la patogenia bolii a perturbării mecanismelor mitocondriale ale generării de energie.

Un alt țesut ale cărui funcții sunt frecvent alterate ca urmare a acumulării defectelor mitocondriale este miocardul. În fibrele musculare cardiace ale bolnavilor cu cardiomiopatie dilatativă analizele moleculare relevă prezența moleculelor ADNmt cu deleții de dimensiuni variate. Majoritatea cazurilor de cardiomiopatie dilatativă sunt familiale. S-a sugerat că de producerea delețiilor multiple ale ADNmt se face răspunzătoare mutația unei gene nucleare cu rol în menținerea integrității genomului mitocondrial.

Diabetul zaharat insulino-independent (DZII) se dezvoltă la vârste avansate și manifestă trăsăturile unei boli degenerative. La unii dintre bolnavii cu DZII au fost detectate mutații ale ADNmt în celulele insulelor Langerhans și în fibrele musculare scheletice. S-a demonstrat că agenții diabetogeni – interleukina  $\beta$ , interferonul  $\gamma$ , factorul de necroză tumorală tip alfa, aloxanul, streptozotocina – acționează asupra mitocondriilor din celulele  $\beta$  insulare, stimulând producerea speciilor reactive de oxigen sau determinând alchilarea ADN. Rupturile induse prin aceste mecanisme în moleculele ADNmt antrenează moartea celulelor beta, urmată de instalarea insuficienței de insulină.

La bolnavii cu sindrom Kearns-Sayre și la cei cu oftalmoplegie externă cronică progresivă incidența diabetului zaharat este de câteva ori mai înaltă decât în populația generală, iar sindromul MELAS se asociază uneori cu DZII. Rezultă, așadar, că celulele  $\beta$  insulare, mari consumatoare de energie, se situează printre elementele cele mai afectate de prezența mutațiilor constitutive sau dobândite ale ADNmt.

## E. MUTAȚIILE MITOCONDRIALE ȘI TUMORIGENEZA

Există un consens în a se considera că ADNmt este implicat în tumorigeneză datorită atât vulnerabilității sale la stresul oxidativ, cât și mutabilității înalte pe care o manifestă. Speciilor reactive de oxigen li se atribuie roluri în inițierea și în promovarea cancerului, precum și în reducerea producției de ATP mitocondrial. Aberații mitocondriale au fost notate în majoritatea tumorilor maligne (cancere de vezică urinară, sân, colon, rinichi, ficat, plămân, stomac, ale capului și gâtului, limfoame și leucemii). Mutațiile ADNmt detectate în cancer sunt similare celor răspunzătoare de producerea bolilor mitocondriale. Recent s-a raportat prezența a 12 mutații somatice homoplasmice în șapte din zece linii celulare stabilite din tumori colorectale. De altfel, în cele mai multe cancer mutatiile sunt homoplasmice, ceea ce sugerează că fixarea anumitor alterări ale ADNmt poate dota celulele maligne cu avantaj

selectiv. Creșterea cantității de transcripte ale ADNmt, precum și creșterea expresiei subunităților codificate de ADNmt din alcătuirea complexelor LR sunt interpretate ca reflectând răspunsul mitocondriilor la cerințele înalte de energie ale celulelor canceroase. Este cunoscut că celulele maligne au, de regulă, o capacitate considerabil mai mare decât cea a corespondentelor lor normale de a realiza glicoliza aerobă, fapt ce justifică aserțiunea că o importanță crucială în procesul tumorigenezei ar avea-o existența unei forme de interacțiune mitocondrie-celulă, încă neprecizată.

## BIBLIOGRAFIE CAPITOL 13

### INTERNET

1. Bază de date privind bolile genomului mitocondrial uman : <http://www.gen.emory.edu/mitomap.html>
2. Geneclinics – bază de date despre bolile genetice : (<http://geneclinics.org>)
3. OMIM – catalogul bolilor mendeliene la om: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
4. Programul HELIX (sfat și teste genetice) al Universității și Spitalului de copii din Washington: <http://www.healthlinks.washington.edu/helix/>
5. Web site MedlinePlus web pentru boala coronariană: <http://www.nlm.nih.gov/>
6. Web site al universității din Michigan: <http://www.med.umich.edu/>

### Bibliografie specifică selectivă

1. Birch-Machin MA, Taylor RW, Cochran B et al. – *Late-onset optic atrophy, ataxia and myopathy associated with a mutation of a complex II gene* – Ann Neurol 2000;48:330-335.
2. Chinnery PF, Andrews RM, Turnbull DM, Howell N. – *Leber's hereditary optic neuropathy: does heteroplasmy influence the inheritance and expression of the G11778A mitochondrial DNA mutation* – Am J Med Genet 2001;98:235-43.
3. Chinnery PF, Turnbull DM. – *The epidemiology and treatment of mitochondrial disease.* Am J Med Genet 2001;106:94-101.
4. Darin N, Oldfords A, Moslemi AR et al. – *The incidence of mitochondrial encephalomyopathies in childhood: clinical features and morphological, biochemical and DNA abnormalities.* Ann Neurol 2001;49:376-83.
5. DiMauro S, Schon EA. – *Mitochondrial DNA mutations in human disease* – Am J Med Genet 2001;106:18-27.
6. Johns DR - *Mitochondrial DNA and disease*- N.Engl.J.Med 1995;333:638-644
7. Leonard JV, Schapira AVH. – *Mitochondrial respiratorz chain disorders I: mitochondrial DNA defects.* – Lancet 2000;355:299-304.
8. Munnich A, Rustin P. – *Clinical spectrum and diagnosis of mitochondrial disorders* – Am J Med Gen 2001;106:4-17.
9. Stefanescu DT, Calin GA, Stefanescu F. – *Genetică Medicală – Progrese Recente.* Editura Tehnică, 1998
10. Suomalainen A, Kaukonen J, Amati P et al. – *An autosomal locus predisposing to deletions of mitochondrialDNA.* – Nat Genet 1995;9:146-51

## CAPITOLUL 13

# BOLILE MULTIFACTORIALE

Mulți medici consideră că domeniul geneticii clinice este rezervat specialiștilor care se ocupă de boli rare, monogenice sau cromosomice. Acest concept este însă profund greșit și tinde să se schimbe rapid deoarece, spre exemplu, în anul 2000, în nouă din primele 10 cauze de mortalitate, printre care bolile cardiace și cancerul, au fost identificate componente genetice importante. Toate aceste afecțiuni sunt considerate astăzi ca fiind boli multifactoriale.

Bolile multifactoriale sunt determinate de interacțiunea complexă dintre factorii genetici și diferiți factori din mediu care declanșează, accelerează sau exacerbează procesul patologic. Aceste afecțiuni sunt comune (frecvente) la copil și adult, interesând mai mult de 5% din populație, și determină o proporție importantă din morbiditatea și mortalitatea generală.

Contribuția factorilor genetici în producerea acestor boli a fost demonstrată de agregarea familială, studiile efectuate pe gemeni, studiile de adopție sau asocierea cu anumiți markeri genetici (vezi capitolul 5.E); mai mult, această contribuție a fost și cuantificată prin determinarea *heritabilității*, ce exprimă proporția factorilor genetici în etiologia bolii (vezi tabelul 5.16). Și totuși, nu se este cunoscut încă numărul genelor implicate în producerea bolii, natura lor și mai ales modul în care un anumit genotip prin combinație cu anumiți factori de risc din mediu determină boala. Se consideră că factorii genetici determină o *predispoziție genetică* la boală care va duce la îmbolnăvire numai dacă asupra individului vulnerabil acționează anumiți factori nocivi din mediu. S-au elaborat diferite modele teoretice explicative (de exemplu, modelul susceptibilității cu prag, descrise în secțiunea 5.E.4.2) precum și reguli privind calcularea riscului empiric de recurență în familie (vezi capitolul 9.C.5).

Numai aplicarea unor tehnici de analiză moleculară a polimorfismelor genice combinată cu noi strategii de epidemiologie genetică va permite, foarte probabil, identificarea genelor sau mai exact a variantelor alelice implicate în bolile multifactoriale, înțelegerea etiopatogeniei lor, evaluarea corectă a riscului și mai ales stabilirea unor mijloace adecvate de prevenție.

Reamintim că o genă poate prezenta mai multe variante alelice care atunci când depășesc o frecvență populațională de 1% realizează un polimorfism genic. Studiul polimorfismelor este important deoarece anumite alele se corelează cu un risc crescut pentru o anumită boală (vezi capitolul 6.D). Printre polimorfismele genetice aproximativ 90% sunt reprezentate de polimorfismele mononucleotidice – SNPs (de la single nucleotide polymorphism; se pronunță „snips”) – cu o distribuție de circa 1 per 1000 pb și localizate inclusiv în regiunile codante (exoni) și reglatoare; de aceea, se crede că ele pot fi implicate în procesul de boală. În felul acesta SNPs reprezintă o nouă generație de markeri genetici utilă pentru identificarea locilor asociați cu boli comune ale adultului precum și cu răspunsul la medicamente. Cert este că acest domeniu va fi intens cercetat în viitor datorită frecvenței și consecințelor medicale importante ale bolilor multifactoriale.

Bolile multifactoriale cuprind două mari categorii de afecțiuni: bolile comune ale adultului (boala coronariană, hipertensiunea arterială, diabetul zaharat, astmul bronșic, ulcerul peptic, schizofrenia, obezitatea, cancerul ș.a) – cu o prevalență de 1-5% – și malformațiile congenitale izolate la copil (defectele de tub neural, despicăturile labiale și/sau palatine, malformațiile congenitale de cord, stenoza pilorică, piciorul strâmb congenital, luxația congenitală de șold ș.a) – cu o incidență de 1-8% de nou născuți. Vom preciza că unele dintre aceste entități (cu etiologie heterogenă) pot include și forme monogenice, cu transmitere

mendeliană, mai mult sau mai puțin rare. Astfel circa 5% din cazurile de boală coronariană, sunt produse de hipercolesterolemia familială (AD) iar circa 5% din cazurile de cancer de sân, apar la femei purtătoare ale unor mutații germinale ale genelor BRCA1 sau BRCA2 (AD). Deci un set de bolnavi cu boli comune vor avea un determinism monogenic și riscuri de recurență mult mai mari decât cele calculate empiric. Acest lucru este foarte important de reținut pentru practica sfatului genetic.

## A. BOLILE COMUNE ALE ADULTULUI

### 1. BOALA CORONARIANĂ.

Boala coronariană reprezintă una din principalele cauze de morbiditate (3%) și mortalitate în țările dezvoltate, fiind expresia leziunilor aterosclerotice de la nivelul arterelor coronare.

Aceste leziuni încep să se producă foarte precoce în cursul vieții prin acumularea de lipoproteine în intima arterelor coronare și evoluează formând o placă de aterom ce conține țesut fibros, fibre musculare netede și lipide; aceasta îngustează lumenul arterelor coronare, reducând fluxul sanguin; uneori placa de aterom se poate rupe producând obstrucția vasului (infarct miocardic acut)

Riscul de producere a bolii coronariene este crescut de către o serie de factori de mediu: grăsimile din alimentație, fumatul, consumul de alcool și inactivitatea, precum și de o serie de boli ca hipertensiunea, diabetul zaharat, hiperlipidemiile. Numeroase studii efectuate în ultimele 3-4 decenii au arătat însă că factorii genetici au o contribuție importantă în etiologia bolii. Astfel agregarea familială este crescută iar concordanța bolii la gemenii MZ este semnificativ mai mare decât la gemenii DZ. Rudele de gradul întâi ale bolnavilor au un risc de 5-7 ori mai mare de a face boală coronariană<sup>1</sup> comparativ cu populația generală.

Un element care pledează pentru ereditatea multifactorială a bolii coronariene îl reprezintă faptul că bărbații sunt mai frecvent afecțați și fac forme mai grave (decesele prin IMA sunt mai frecvente); rudele de gradul întâi ale unei femei bolnave (sexul mai rar afectat) au un risc mai mare de boală coronariană comparativ cu rudele bărbaților bolnavi.

Pornind de la aceste constatări s-au cercetat genele<sup>2</sup> și produșii lor proteici care ar putea influența dezvoltarea și progresia aterosclerozei coronariene. În această categorie se includ gene ce codifică proteine implicate în transportul și metabolismul lipidelor<sup>3</sup>, sistemul renină-angiotensină, citokinele și moleculele de adeziune, sistemul de coagulare și fibrinoliză iar, mai recent, genele implicate în producerea oxidului nitric, în metabolismul homocisteinei și în inflamație (tabelul 11.2). Deși rolul multor polimorfisme nu a fost încă unanim confirmat, genele implicate în metabolismul lipidelor, cum ar fi apolipoproteina E (APOE) sau unele variante ale genei pentru receptorul LDL au un rol cauzal atât asupra nivelului plasmatic al LDL-colesterolului cât și asupra fenotipului clinic al bolii coronariene. De asemenea, varianta B2/B2 a genei pentru proteina de transfer a esterilor de colesterol (CETP) se asociază cu un nivel crescut al HDL-C care protejează persoana de boală coronariană. S-a mai stabilit că indivizii cu alela D (genotip DD sau DI) a genei pentru enzima de conversie a angiotensinei (ACE) au o activitate ACE mai mare și un prognostic mai rău. Au fost evidențiate și o serie de polimorfisme genetice care ar putea avea efect protectiv împotriva dezvoltării bolii coronariene, precum alelele mai rare ale polimorfismelor T715P la nivelul selectinei P sau V34L la nivelul factorului XIII al coagulării (alela cu prolină în cazul selectinei P și alela cu leucină în cazul factorului XIII al coagulării asociază o reducere a riscului de dezvoltare a infarctului miocardic acut).

---

<sup>1</sup> Riscul este și mai mare dacă boala apare la o vârstă mai tânără, înainte de 55 de ani la bărbat și 65 de ani la femeie

<sup>2</sup> Se estimează că peste 250 de gene intervin în patogenia bolii coronariene (Gambaro et al, 2000).

<sup>3</sup> În boala coronariană se întâlnește de obicei un nivel crescut al LDL-colesterolului, ApoB (fracția majoră a LDL), Lp(a) și un nivel scăzut al HDL

**Tabelul 13.1 Principalele gene implicate în boala coronariană**

Genă	Localizare cromosomică	EFECTE
LDLR (receptorul pentru LDL)	19p32	Gena codifică o proteină receptor care îndepărtează LDL din sânge; s-au descris peste 350 de mutații, responsabile de <i>hipercolesterolemia familială</i> . Circa o persoană la 500 are o mutație a acestei gene care duce la funcționarea deficitară a proteinei; LDL nu este îndepărtat eficient din circulație, concentrația sa plasmatică crește și se produce boală coronariană la o vârstă tânără
APOA1 (apolipoproteina A1)	11q23	Gena codifică APOA1 – o proteină care este legată de colesterol în HDL. Unele variante ale genei produc niveluri scăzute de APOA1. Rezultă o scădere a nivelului plasmatic de HDL și secundar, boală coronariană precoce.
APOB (apolipoproteina B)	2p24	Gena codifică APOB – o proteină care este legată de colesterol în LDL. Unele mutații ale genei produc niveluri crescute de LDL-C și secundar, boală coronariană precoce.
APOE (apolipoprotein E)	19q13.2	Gena codifică o proteină care este implicată în îndepărtarea LDL din sânge. Unele variante (în special E4) duc la niveluri crescute de LDL, în special dacă alimentația este bogată în colesterol.
LPA apolipoproteina(a)	6q27	Gena codifică o proteină care se combină cu colesterolul și formează particule numite "Lp(a)". Anumite alele se asociază cu niveluri crescute de Lp(a) și cresc riscul de producere a bolii coronariene.
CETP (proteina de transfer a esterilor de colesterol)	16q21	Gena codifică o proteină care ajută la degradarea HDL. Anumite variante ale genei se asociază cu o degradare mai puțin eficientă a HDL și nivelul plasmatic crește, nu este cert că purtătorii acestor variante sunt protejați de boală coronariană.
ITGB3 (integrina beta 3)	17a21	Gena codifică o proteină localizată pe suprafața plachetelor care au un rol critic în coagulare. Unele variante ale genei sunt prezente la jumătate din pacienții sub 60 de ani ce fac boală coronariană.
ELN (elastin)	7q11.2	Gena codifică elastina, o componentă a fibrelor elastice din structura arterelor. Deficitul în elastină se asociază cu îngroșarea pereților arteriali și îngustarea lumenului, fenomene ce favorizează ateroscleroza. Pierderea de elastină se produce o dată cu înaintarea în vârstă dar nu se știe încă dacă acest proces se corelează cu dezvoltarea bolii coronariene.
PTGIS (prostaglandinaI2 sintetaza)	20q13.11	Gena codifică o proteină, prostaciclina, care împiedică adeziunea unor componente chimice ale sângelui la pereții arteriali.
ACE (enzima de conversie a angiotensinei)	17q23	Gena codifică angiotensina, o proteină ce acționează asupra rinichilor, miocardului și pereților arteriali. Anumite variante ale genei au fost corelate cu un risc crescut de boală coronariană dar rezultatele investigațiilor nu sunt încă foarte clare.

O atenție particulară s-a acordat interacțiunilor dintre factorii de mediu și gene în producerea bolii coronariene. Astfel s-a evidențiat o interacțiune semnificativă între fumat (care prin produșii de combustie alterează endoteliul vascular, favorizând ateroscleroza și tromboza) și polimorfismul genelor APOE și lipoprotein lipazei (Humphries et al., 2001): persoanele cu alela E4 a genei<sup>4</sup> pentru apolipoproteina E sau cu alela D9N a genei pentru lipoprotein lipază sunt foarte vulnerabile la efectele adverse ale fumatului și au un risc foarte mare pentru boala coronariană. Aceeași corelație a fost identificată între aceste alele și activitatea fizică (care scade concentrația plasmatică de lipoproteine). De asemenea s-a stabilit că persoanele cu anumite genotipuri (E2/E3 pentru gena APOE sau B2/B2 pentru gena CETP) nu răspund la modificările dietei (reducerea grăsimilor).

În sfârșit trebuie să subliniem faptul că unii factori genetici influențează și răspunsul individual la tratament. Astfel răspunsul pacienților la tratamentul cu statine este mai mare la indivizii ce au genotipuri APOE și CETP asociate cu un prognostic mai defavorabil (alela E4 APO și alela B1 CETP). Bolnavii coronarieni cu genotipul D/D al genei ACE beneficiază mai

<sup>4</sup> E de la *epsilon*



mult de pe urma tratamentului cu beta-blocante decât indivizii cu genotipurile I/I sau I/D. Deși aceste date vor trebui mai amplu confirmate înainte de a le utiliza în practică, ele ne arată că în viitorul apropiat un tratament individualizat, bazat pe structura genetică a pacientului, ar putea să amplifice eficacitatea și să reducă toxicitatea potențială a medicamentelor. Odată ce un polimorfism este cert corelat cu răspunsul la un anumit medicament, pacienții vor fi evaluați genetic înaintea începerii unui tratament individualizat.

## 2. HIPERTENSIUNEA ARTERIALĂ

Hipertensiunea arterială (HTA) esențială (primară) este o boală frecventă (15% din populația țărilor dezvoltate) și o problemă importantă de sănătate publică (factor major de risc pentru boli cardiace, renale și accidente vasculare cerebrale). De aceea era firesc ca acest domeniu să fie amplu analizat pentru a stabili etiopatogenia HTA și, pe această bază, pentru a identifica cele mai bune soluții terapeutice.

Existența unei componente ereditare în producerea HTA a fost sugerată de incidența familială a bolii, chiar în condițiile în care diferiți membri ai aceleiași familii trăiesc în medii diferite, cu factori de risc variați. Ereditatea HTA a fost mulți ani un subiect de confruntare între două ipoteze:

- Pickering (1959) considera că tensiunea (presiunea) arterială (TA) – la fel ca și alte caractere umane (talie, inteligența, ș.a) – este un caracter cantitativ, cu o *distribuție continuă* în populație, și un determinism poligenic; HTA (valori mai mari de 140 mmHg pentru TA sistolică) ar reprezenta variația extremă (+2,5SD) a acestei distribuții;
- Platt (1947) credea că TA are o *distribuție bimodală* și un determinism monogenic.

În timp s-a dovedit că distribuția bimodală a TA era un artefact și că HTA esențială are o etiologie multifactorială (ca și multe alte boli comune ale adultului), fiind produsă de intervenția mai multor gene de susceptibilitate al căror efect este modulată de interacțiuni dintre diferite gene și dintre gene și mediu. Trebuie însă să precizăm că unele forme familiale de HTA sunt monogenice dar ele afectează o proporție mică din populație.

După stabilirea unui model etiologic multifactorial s-a încercat determinarea contribuției relative a genelor și a factorilor de mediu în determinismul bolii. Mai multe studii au stabilit că ereditabilitatea (fracția genetică din totalul variabilității interindividuale) HTA este de 30-60% iar rudele de gradul întâi ale bolnavilor au un risc de 3-4 ori mai mare de a face HTA comparativ cu populația generală. Totuși factorii de mediu (ingestia mai mare de sodiu, activitate fizică scăzută, stress psihoemoțional, obezitate, ș.a) au un rol causal important.

Problema esențială a eredității HTA rămâne identificarea multiplexelor gene de susceptibilitate și efectul diferitelor variante alelice în modularea TA. În principiu, anumite alele ale unor gene implicate în dezvoltarea HTA trebuie să fie mai frecvent prezente la hipertensivi decât la normotensivi și trebuie să segreghe/ să se transmită în familie împreună cu HTA.

La om, s-au realizat două tipuri de cercetări: *studii de înălțuire* bazate pe o alelă prezentă la perechi de rude afectate (de obicei frați) sau *studii de asociație*, comparând frecvențele genice între grupuri de hipertensivi și subiecți normali. În ambele cazuri se folosesc fie gene candidat specifice (sugerate de fiziopatologia bolii) fie markeri ADN anonimi cu care se *scanează genomul uman* (se folosesc mai multe sute de markeri distribuiți la intervale egale în întreg genomul).

Selecția genelor candidat s-a făcut pe baza cunoștințelor recente privind mecanismele și moleculele implicate în reglarea TA; rolul fundamental îl au rinichii, suprarenalele, sistemul nervos care participă la mecanismul presiune-natriureză controlat de sistemul renină-angiotensină (SRA)(**figura 13.1**).

Au fost identificate și localizate genele ce codifică diferite componente ale sistemului: gena ADD1 ( $\alpha$ -adducină, sensor al modificărilor presiunii hidrostatice), gena AGT (pentru angiotensinogen, situată pe cromosomul 1q42-q43), gena pentru renină (pe cromosomul 1q32), gena ACE (pentru enzima de conversie a angiotensinei, pe 17q23), gena AT1R (pentru

receptorul angiotensinei, pe 3q21), gena CYP11B2 (pentru aldosteron-sintetază pe cromosomul 8q21), gena SCNN1B (pentru subunitatea- $\beta$  a canalului de sodiu non-voltaj dependent tip 1 pe cromosomul 16p13-p12). Pentru fiecare dintre aceste gene s-au identificat mai multe variante alelice și s-a studiat efectul lor asupra concentrației plasmatice a produsului, asupra reabsorbției tubulare de sodiu sau asupra TA. Rezultatele obținute până în prezent – mai ales în studiul AGT și ACE – nu sunt totuși concludente iar atunci când există o asociație semnificativă cu HTA – de exemplu gena pentru angiotensinogen<sup>5</sup> – riscul atribuit genei este modest. Datele actuale permit totuși câteva concluzii (Barlassina et al., 2002):

- este puțin probabil ca o genă majoră să fie implicată în genetica HTA primare;
- intervin mai multe gene polimorfice, fiecare cu o contribuție de 2-5% din variația genetică, în funcție de caracteristicile (fondul) genetic și ecologic al unei anumite populații;
- între aceste gene există interacțiuni epistatice – organizate într-o rețea – ce duc la creșterea TA fără a se evidenția o anomalie evidentă a parametrilor umorali, hormonal sau structurali; prin urmare impactul unei anumite variante alelice asupra TA trebuie să fie evaluat în contextul interacțiunilor cu alte gene;
- efectul unor variante alelice ale unor gene implicate în SRA depinde de vârstă și de unii factori de mediu (de exemplu, alimentația, aportul de sodiu);
- efectul unor medicamente antihipertensive noi (inhibitori de ACE, blocați de receptori AT) poate fi influențat de polimorfismul genelor dar pentru moment nu există consecințe practice imediate (de exemplu, stabilirea „profilului alelic” al genelor pacientului); aceasta nu înseamnă că ele nu vor fi identificate în viitorul apropiat.

În acest context a revenit în actualitate studiul unor cazuri de HTA produse de boli monogenice rare<sup>6</sup>; bazele moleculare ale unora dintre aceste forme de HTA au fost elucidate și sunt sintetizate în **tabelul 13.2**;

**Tabelul 13.2 Forme monogenice de hipertensiune arterială**

Sindromul	OMIM	Gene implicate	Localizare cromosomică	Funcția normală a genei/ Mecanismul bolii
Deficiența de cortisol 11-beta-ketoreductaza	218030	HSD11B2	16q22	Pierderea funcției 11- $\beta$ -hidroxisteroid dehidrogenazei tip 2 permite activarea de către cortisol a receptorilor mineralocorticoizi renali
Hiperaldosteronismul familial tip I	103900	CYP11B1 CYP11B2	8p21	Fuziunea genelor CYP11B2 și CYP11B1 plasează producția aldosteronului sub controlul ACTH
Deficiența 17-alfa-hidroksilazei	202110	CYP17A1	10q24.3	17- $\alpha$ -hidroxilaza este necesară pentru sinteza cortisolului. Deficiența sa determină creșterea nivelului ACTH și a sintezei de deoxicortico-steron și corticosteron ce produc hipertensiune.
Sindromul Liddle (pseudohipoaldosteronismul tip I)	177200	SCNN1B SCNN1G	16p13-p12	Reabsorbția excesivă a sodiului la nivel renal este consecința activării constitutive a canalului epitelial de sodiu datorită unor mutații cu trunchierea proteinei fie la nivelul subunității $\beta$ , fie a subunității $\gamma$ a acestui canal.
Pseudohipoaldosteronismul tip II	145260	WNK1 WNK4	12p13 17q21-q22	Aceste gene codifică protein-kinaze care influențează reabsorbția paracelulară a ionilor în nefronii distali
Hipertensiunea AD cu debut precoce cu exacerbare severă în cursul sarcinii	605115	NR3C2	4q31.1	Gena codifică receptorul nuclear pentru mineralocorticoizi; mecanismul bolii este incomplet definit
Sindromul Bardet-Biedl tipurile 2 și 4	600374	BBS2 BBS4	16q21 15q22.3-q23	Genele codifică proteine din clasa nouă a chaperoninelor; mecanismul bolii nu este bine

<sup>5</sup> Gena AGT are două variante (T235M și T174M, în care treonina este înlocuită cu metionina în pozițiile 235 și 174) care se asociază semnificativ cu HTA; asocierea a fost demonstrată numai în anumite populații și nu a fost confirmată în alte populații datorită probabil unei diversități genetice ale acestor populații

<sup>6</sup> Cu certitudine, multe cazuri (mai ales prin mutații cu efecte mai puțin evidente) nu sunt diagnosticate în prezent

Sindromul	OMIM	Gene implicate	Localizare cromosomică	Funcția normală a genei/ Mecanismul bolii
				cunoscut

Au fost identificate peste 10 gene ce influențează reabsorbția apei și sodiului în rinichi și, firesc, a început studiul intervenției posibile a acestor gene în HTA esențială poligenică. Studiul genelor multiple care modifică TA va cunoaște cu certitudine în anii următori progrese majore ce vor crește eficiența diagnosticului, tratamentului și prevenției HTA.

### 3. DIABETUL ZAHARAT

Diabetul zaharat (DZ) reprezintă un grup heterogen de afecțiuni caracterizat prin hiperglicemie cronică; afectează (în țările dezvoltate) circa 6% din populație. Are o etiologie complexă și neclară, care implică acțiunea concomitentă a unor gene multiple – ce determină susceptibilitatea la diabet – și a unor factori de mediu care declanșează apariția bolii la bolnavii susceptibili; DZ este un prototip de boală multifactorială și un factor major de risc pentru boli cardio-vasculare, accidente cerebrale, nefropatie, cecitate.

Există două tipuri majore de DZ:

- tipul I – numit și diabetul insulino-dependent (IDDM) sau diabetul juvenil;
- tipul II – numit și diabetul noninsulino-dependent (NIDDM) sau diabetul adultului, de 6-10 ori mai frecvent decât tipul I.

Caracteristicile celor două tipuri de DZ sunt sintetizate în **tabelul 13.3**. Menționăm faptul că mai există un *diabet secundar* în diferite sindroame genetice sau în alcoolism, în care evident diabetul nu reprezintă unica manifestare a bolii; de asemenea există un *diabet gestațional* pe care unii autori îl consideră o formă de manifestare a riscului de a dezvolta un DZ ulterior, atât la mamă cât și la copil<sup>7</sup>.

**Tabelul 13.3 Caracteristicile majore ale DZ de tipul I și de tipul II**

Caracteristici	DZ tipul I	DZ tipul II
Prevalență	1 la 200 persoane	3 la 100 persoane
% din toate cazurile de DZ	15-25%	75-85%
Vârsta de debut	De obicei sub 40 de ani	De obicei peste 40 de ani (excepție tipul MODY)
Secreția de insulină	Zero	Prezentă dar redusă
Rezistența la insulină	NU	DA
Autoimunitate	DA	NU
Asocierea cu HLA	DA	NU
Obezitate	Foarte rar	Frecventă
Concordanța la gemenii MZ	35-50%	≥ 90%
Risc de recurență în fratrie	1-6%	10-15%

#### Diabetul zaharat tipul I

DZ tipul I este produs de către o deficiență absolută în secreția de insulină, ca rezultat al distrugerii autoimune a celulelor beta insulare ale pancreasului; prevalența DZ tipul I este de circa 1 la 200 persoane, fiind mai frecvent la copii și adolescenți.

În ultimii ani s-au acumulat probe convingătoare care demonstrează că DZ tipul I este o boală autoimună (sau cel puțin are o componentă autoimună importantă) produsă prin distrugerea (autoimună) a celulelor beta ale pancreasului. Dintre acestea menționăm:

- prezența unui infiltrat inflamator (insulită) în insulele Langerhans ale pancreasului;

<sup>7</sup> Expunerea *in utero* la hiperglicemie crește de circa 8 ori riscul ca noul-născut să facă, la adolescență, un DZ

- prezența unor anticorpi<sup>8</sup> ce reacționează cu autoantigenele din celulele insulare (GAD 65, IA-2, insulină);
- asociere puternică cu unele alele HLA de clasă II (DR3 și/sau DR4, DQ – prezente la circa 95% din bolnavii cu DZ tipul I din populațiile europene).

Procesele autoimune sunt declanșate de un factor de mediu (foarte probabil o infecție virală<sup>9</sup>) la persoane cu o anumită susceptibilitate

Există o componentă genetică certă, demonstrată de agregarea familială, concordanța de 35-50% la gemenii MZ și riscul crescut la rudele de gradul I ale bolnavilor (tabelul 13.4)

**Tabelul 13.4 Riscul de DZ al rudelor bolnavilor diabetici.**

Bolnav de DZ (tipul I sau tipul II)	Rude cu risc	Risc (în cazul DZ tipul I)	Risc (în cazul DZ tipul II)
Mama	Copii	3%	15%
Tatăl	Copii	6-9%	15%
Ambii părinți	Copii	30%	75%
Alt membru al familiei	Frații sau surorile sale	6-10%	10%
	Frate geamăn MZ	35-50%	90%
	Frațe geamăn DZ	20%	10%
	Frații sau surorile sale dacă sunt HLA DR3/DR4	20%	-
	Copii săi	10%	33%

Surse: Jorde et al, 1999, NHS (USA) 2002

Cel puțin 20 de gene au fost asociate cu DZ tipul I dar cu excepția genelor HLA de clasă II (DR3 și/sau DR4, DQ-beta<sup>10</sup>) – care realizează circa 40% din agregarea familială – celelalte asociații sunt slabe; de menționat totuși polimorfismul genei pentru insulină (localizată pe brațul scurt al cromosomului 11)

#### **Diabetul zaharat de tipul II**

DZ de tipul II este produs printr-un dublu defect: secreția inadecvată de insulină de către celulele beta și rezistența la acțiunea insulinei atât în țesuturile periferice (mușchi, adipocite) cât și în celulele beta determinată de modificări ale receptorilor de insulină sau ale altor molecule implicate în fixarea, transportul intracelular și metabolizarea glucozei.

Factorii de risc pentru DZ de tipul II sunt vârsta, alimentația, obezitatea, inactivitatea fizică precum și greutatea mică la naștere ș.a. Există însă și o vulnerabilitate genetică mai importantă decât în DZ de tipul I, demonstrată mai ales de concordanța  $\geq$  de 90% a DZ la gemenii MZ și riscul crescut de recurență la rudele de gradul I ale bolnavului (tabelul 13.4). Studiile genetice în DZ tipul II au relevat câteva elemente importante

- Existența unor diferențe etnice în prevalența DZ tipul II precum și a unor genotipuri diferite de vulnerabilitate în populații diferite (selectate ca răspuns la diferite presiuni evolutive).  
Astfel s-a identificat într-o populație de mexicani din America o genă de susceptibilitate, NIDDM1, localizată pe brațul lung al cromosomului 2 ce interacționează cu o genă de pe cromosomul 15; în populațiile finice din Nordul Europei s-au identificat genele NIDDM2 (pe cromosomul 12) și NIDDM3 (pe cromosomul 20).
- Un procent mic de cazuri de DZ tipul II este produs prin mutații monogenice; este vorba de DZ cu debut la maturitate (MODY – de la *Maturity-Onset Diabetes of Youth*) și alte forme produse prin defecte genetice ale funcției celulelor beta sau acțiunii insulinei;

<sup>8</sup> Autoanticorpii apar cu mulți ani înaintea simptomelor clinice și sunt un marker util pentru identificarea indivizilor cu risc de a face DZ tipul I

<sup>9</sup> In anumite cazuri pot interveni și alți factori din mediu sau structura individului; de ex., intoleranța la laptele de vacă în copilărie.

<sup>10</sup> De exemplu, haplotipul HLA DRB1\*0302-DQA1\*0301, în special când este combinat cu haplotipul DRB1\*0201-DQA1\*0501 crește de 10-20 de ori susceptibilitatea la dezvoltarea DZ tip 1.

MODY este responsabil de 2-5% din toate cazurile de DZ tipul II; se transmite autosomal dominant și este produs prin defecte primare în sinteza de insulină. Au fost descrise 5 tipuri de mutații: în gena pentru glucokinază (7p13) - MODY 2; în genele ce codifică factorii de transcripție hepatică ce stimulează celulele beta: HNF-1 $\alpha$  (MODY 3), HNF-1 $\beta$  (MODY 5), HNF-4 $\alpha$  (MODY 1); în gena pentru factorul de transcripție pancreatică ce stimulează celulele beta: IPF-1 (MODY 4). Studiile de genetică moleculară în MODY au permis elucidarea funcției celulelor beta și înțelegerea patogeniei altor forme de DZ.

- Preponderența maternă a DZ tipul II s-ar putea explica printr-o formă particulară de *diabet mitochondrial* produs de modificări ale ADNmt, moștenite sau câștigate, calitative (deleții sau mutații<sup>11</sup>) sau cantitative (scăderea nivelului plasmatic al ADNmt prin reducerea biogenezei mitocondriilor; mamele cu nivel scăzut al ADNmt nasc frecvent copii cu greutate mică și cu risc crescut de DZ tipul II)
- La bolnavii cu DZ tipul II există o susceptibilitate individuală clară la anumite complicații (nefropatie diabetică, neuropatii, retinopatii sau boli cardio-vasculare).

Heterogenitatea genetică a DZ tipul II contrastează cu patogenia asemănătoare a DZ tipul II în populații diferite, ce implică – așa cum am arătat – rezistența la acțiunea insulinei (în țesuturile țintă) și secreția inadecvată de insulină. Rezistența la insulină poate fi produsă de mutații sau polimorfisme ale genelor pentru receptorii de insulină sau pentru alte molecule implicate în calea de semnalizare (de exemplu IRS-1, molecula ce primește semnalul de la receptorul de insulină). Recent a fost implicată și gena pentru amilină, peptid cosecretat cu insulina de către celulele beta.

Studiile genetice în DZ au adus date prețioase pentru înțelegerea bolii și identificarea persoanelor cu risc dar nu au elucidat toate aspectele eredității bolii. Ele continuă și vor aduce cu siguranță elemente noi.

#### 4. ASTMUL BRONȘIC

Astmul bronșic este o boală pulmonară obstructivă reversibilă care se asociază cu hiperactivitate bronșică (bronhospasm) și cu inflamația căilor aeriene. Incidența astmului variază în diferite populații între 5-10% ) fiind mai frecvent la copii).

Etiologia astmului bronșic este multifactorială: factorii de mediu (alergenii, poluanți, infecții virale) declanșează boala la persoane susceptibile. Participarea unor factori genetici care determină predispoziția la astm și atopie, în general, este susținută de caracterul familial frecvent al bolii (astm sau alergii sau niveluri crescute de IgE), riscul crescut de boală la rudele pacientului (de 2-5 ori mai mare ca în populația generală) și incidența mai mare la gemenii MZ comparativ cu gemenii DZ (heritabilitatea bolii a fost estimată, în diferite populații, qa se situa între 30% și 70%). De menționat că atopia (predispoziție de a dezvolta un răspuns mediat de IgE) este cel mai puternic factor predispozant în astm iar nivelurile crescute de IgE se corelează cu expresia clinică a alergiei și astmului.

Identificarea genelor de risc – pentru astm sau fenotipurile intermediare (nivelul de IgE, hiperreactivitatea bronșică, atopie) – a fost și este dificilă deoarece genele responsabile de inițierea bolii pot fi diferite de genele responsabile de progresia și/sau severitatea ei. Prin studii de scanare a genomului uman (cu markeri ADN polimorfici) saupun analiza genelor candidat s-au identificat câteva regiuni cromosomice (5q23-31, 6p, 11q, 12q) ce conțin gene ce sunt implicate în patogenia astmului. Dintre acestea menționăm genele pentru citokine (în special IL-4 și IL-9) și receptorii lor, adrenoreceptorul 2, glucocorticoid receptorul – toate pe 5q – receptorul pentru IgE (pe 11q) precum și unele gene ale complexului HLA și TNF, pe cromosomul 6p.

---

<sup>11</sup> MIDD (de la *Maternally Inherited Diabetes and Deafness*) este o formă particulară de diabet mitochondrial prezentă la 1-3% din pacienții cu DZ tipul II caracterizat prin deficiență în secreția de insulină, surditate, transmisie maternă.

Efectul medicației anti-astmatice poate fi influențat de polimorfismul genelor pentru receptorul adrenergic<sup>2</sup> și receptorul pentru glucocorticoizi sau al genei pentru lipoxigenază; anumite variante alelice determină un răspuns redus la medicație.

## **5. BOLILE NEURODEGENERATIVE: BOALA ALZHEIMER ȘI BOALA PARKINSON**

Bolile neurodegenerative sunt afecțiuni neurologice cronice produse prin pierderea progresivă a neuronilor. În funcție de regiunea SNC afectată și de prezența unor markeri celulari și moleculari se deosebesc mai multe tipuri, care au o etiologie multifactorială și/sau monogenică. Cele mai frecvente afecțiuni sunt boala Alzheimer și boala Parkinson; alte forme mai rare sunt boala Huntington, ataxiile spinocerebeloase, scleroza laterală amiotrofică, atrofia musculară spinală ș.a.

### **BOALA ALZHEIMER**

Boala Alzheimer (5% din persoanele peste 65 de ani) se caracterizează prin atrofie corticală (pierderea neuronilor) și deteriorare intelectuală lentă dar progresivă (pierderea memoriei, afazie, agnozie, dezorientare temporo-spațială), până la demență. Aceste fenomene se asociază cu o disfuncție a neurotransmițătorilor (în special o deficiență marcată de acetilcolină). Modificările anatomopatologice specifice sunt plăcile senile de amiloid extraneuronale și agregatele neurofibrilare. Se cunosc și bazele moleculare ale acestor modificări. Amiloidul din plăcile senile se formează prin clivarea unei proteine mai mari (*β-amyloid precursor protein* sau, pe scurt APP) de către  $\gamma$ -secretază într-un peptid mai mic, insolubil, – *peptidul amiloid A42* – care se acumulează în plăci. Agregatele miofibrilare sunt formate prin hiperfosforilarea proteinei microtubulare *tau*.

Boala Alzheimer este o afecțiune cu heterogenitate genetică. Circa 6-10% din cazuri debutează precoce, înainte de 65 de ani, și sunt familiale; o parte dintre ele sunt determinate de mutații (transmise autosomal dominant) în genele APP – de pe cromosomul 21<sup>12</sup>, presenilină 1 (PSEN1)<sup>13</sup> – de pe cromosomul 14 și presenilină 2 – de pe cromosomul 1. Studiul acestor forme a permis înțelegerea unor mecanisme patogenice ale bolii Alzheimer.

Majoritatea pacienților cu boală Alzheimer sunt însă cazuri sporadice, cu determinism multifactorial; paradoxal, nu s-au identificat mutații ale genelor APP, PSEN sau TAU (decât în cazuri rare) deși mecanismul patogenic pare același ca și în formele precoce. În schimb s-a pus în evidență un alt factor de risc: APOE 4 – o alelă a genei pentru apolipoproteina E (constituent al LDL); aceasta este prezentă la 50-60% din bolnavi și dublează riscul purtătorilor de a face boală Alzheimer; printr-un mecanism necunoscut, APOE 4 modifică vârsta de debut cu 5-10 ani mai devreme (la heterozigoți) și 10-20 de ani (la homozigoți). Utilitatea determinării APOE 4 este limitată deoarece aproape 50% din bolnavii cu leziuni certe de boală Alzheimer nu au APOE 4. Descifrarea patogeniei moleculare a bolii Alzheimer continuă și sunt speranțe de identificarea a unor molecule terapeutice care ar putea încetini evoluția bolii. Un exemplu îl constituie inhibitorii de secretază care scad producția și depozitele de amiloid.

### **BOALA PARKINSON.**

Boala Parkinson (0,5-1% din persoanele peste 65 de ani) este, ca frecvență, a doua boală neurodegenerativă după boala Alzheimer. Se caracterizează prin distrugerea progresivă a neuronilor din sistemul extrapiramidal (în special substanța neagră și corpii striati), asociată

---

<sup>12</sup> Așa cum am mai precizat la bolnavii cu trisomie 21 prezența unei copii suplimentare a genei APP duce la instalarea precoce a boli Alzheimer.

<sup>13</sup> Ar putea fi secretaza sau un cofactor al acestei enzime.

cu prezența unor depozite de proteine ubiquitinate<sup>14</sup> în citoplasma neuronilor (corpi Lewy) sau prelungirile lor (neurite Lewy) și depleție de dopamină. Boala Parkinson se manifestă clinic prin: tremurături lente, caracteristice, ale mâinilor și capului (persistând în repaus), hipertonie extrapiramidală, bradikinezie, rigiditate, instabilitate posturală ș.a.

Studiul unor forme familiale cu debut precoce (autosomal dominante) a permis identificarea unor mutații în gena *sinucleinei*, o proteină cu funcție necunoscută, care se acumulează în corpii Lewy. Alte studii în sindromul arkinsonismului juvenil (autosomal recesiv) au pus în evidență mutații în gena *parkinei* (6q25), o proteină (din familia E3 ubiquitin-ligazei) sintetizată în SNC și implicată în metabolismul sinucleinei. În alte forme familiale rare s-au evidențiat mutații în alte gene (de ex., ubiquitin-C-hidrolaza)

Studiul acestor forme rare, monogenice, de boală Parkinson a adus date interesante pentru descifrarea etiopatogeniei formelor adultului; astfel, la circa 5% din aceste cazuri s-au identificat mutații în gena *parkinei*. Totuși, mecanismele acestei boli nu sunt încă elucidate. Singurul beneficiu concret este utilizarea unei terapii substitutive cu levo-dopa.

## 5. PSIHOZELE .

Numeroase studii genetice au demonstrat fără echivoc existența unei componente genetice importante în două dintre psihozele majore – schizofrenia și boala (psihoza) afectivă bipolară – cu determinism multifactorial și, foarte probabil, heterogenitate genetică.

### SCHIZOFRENIA.

Schizofrenia (1% din populația generală) se caracterizează (după DSM-IV, 1994) prin: ideeție incoerentă și delirantă, halucinații, disocierea personalității, izolarea socială și autism (repliere în sine însăși), comportament catatonie sau dezorganizat. Riscul empiric de recurență la rudele de gradul I ale bolnavului este de circa 9-12% (deci aproape de 10 ori mai mare ca în populația generală), crește cu numărul bolnavilor și scade la rudele de gradul II (circa 3%). (Kiney, 1997). Concordanța bolii la gemenii MZ este de 50% iar la gemenii DZ de numai 12% iar eritabilitatea a fost calculată la 17%. Toate acestea demonstrează existența unei componente genetice importante. Dar, în ciuda a numeroase studii moleculare și a identificării unor regiuni cromosomice (pe 6p, 8p și 10p) în care ar putea fi localizate genele schizofreniei, nu au fost încă identificate și clonate gene specifice.

### PSIHOZA AFECTIVĂ BIPOLARĂ

Psihoza afectivă bipolară sau psihoza maniaco-depresivă (0,5% din populația generală) se caracterizează prin episoade alternative de alterare a dispoziției și nivelului global de activate, fie în sensul unei dispoziții euforice și a hiperactivității (manie), fie în sensul unei depresii. Riscul empiric al rudelor de gradul I ale bolnavului este de 5-10%, concordanța la gemenii MZ este de 79% iar eritabilitatea (70%) arată o componentă genetică puternică. În unele familii, în care boala se transmite autosomal dominant, studiile de înlănțuire au arătat ca boala segregă împreună cu un marker polimorfic de pe cromosomul 11p. Totuși nu au fost încă identificate gene specifice.

## 6. CANCERUL

Cancerul este a doua cauză de mortalitate în țările dezvoltate, după bolile cardiovasculare. Etiologia bolii canceroase (la care ne vom referi în detalii în capitolul 17) este multifactorială implicând factori de mediu (fumatul, alimentația, diferiți cancerigeni chimici, unele infecții virale ș.a) care produc mutații somatice, precum și factori genetici care

---

<sup>14</sup> Ubicuitina este o proteină prezentă în toate celulele, cu rol în reglarea procesului de degradare proteolitică a altor proteine („marcate” prin fixarea ubiquitinei) într-un proteazom



determină susceptibilitatea la unele forme de cancer. Cele mai multe cazuri de cancer (circa 80%) se produc sporadic. Totuși, este bine stabilit că multe din formele principale de cancer (de sân, colon, prostată, ovarian) pot avea o agregare familială și riscul de recurență este de 2-3 ori mai mare la rudele de gradul I ale bolnavilor (comparativ cu populația generală); el crește cu numărul de bolnavi din familie și atunci când cancerul apare la o vârstă mai tânără. În majoritatea cancerelor s-au identificat gene specifice care, uneori (de exemplu în cancerul de colon sau de sân), determină și forme ereditare, monogenice. De aceea medicul practician trebuie să fie deosebit de atent la istoricul familial precum și la o serie de semne ce pot evoca o formă familială/ereditară de cancer. Acest lucru este important pentru sfatul genetic, supravegherea persoanelor cu risc și diagnosticul presimptomatic. Toate aceste date vor fi exemplificate prin prezentarea, succintă, a trei forme de cancer, care într-o proporție de 5-10% din cazuri, au o agregare familială și/sau sunt ereditare. Alte elemente vor fi discutate în capitolul 17.

**Cancerul de sân** afectează 10-12% din femeile care trăiesc până la 85 de ani. Poate prezenta o agregare familială rudele de gradul I având un risc dublu de a dezvolta un cancer de sân. Au fost identificate mai multe gene ce predispun femeile la apariția unui cancer de sân; cele mai importante sunt BRCA1 și BRCA2, două gene implicate în repararea ADN, gena p53 (ce determină sindromul Li-Fraumeni), gena PTEN (ce produce sindromul Cowden) și altele. Totuși, mai mult de 90% din toate cancerurile de sân nu sunt ereditare, fiind produse de mutații somatice multiple.

**Cancerul colorectal (CCR)** afectează circa 5% din populație și prezintă deseori un caracter familial. Formele familiale (10%) rezultă – cel mai frecvent – prin mutații ale genei supresoare a creșterii tumorale APC (pentru CCR polipozic) sau în genele de reparare a erorilor de împerechere a ADN (pentru CCR nonpolipozic ereditar sau HNPCC). Formele neereditare de cancer de colon (90%) sunt produse de mutații somatice multiple, determinate de factori de mediu, deseori în aceleași gene implicate în formele ereditare.

**Cancerul de prostată** este unul din cele mai frecvente tipuri de cancer diagnosticate la bărbat. Intervenția unor factori genetici este susținută de existența unor forme ereditare, monogenice (5-10% din toate cancerurile de prostată) precum și de polimorfismul unor gene situate pe cromosomul 1q sau pierderea heterozigotității pentru alte regiuni genomice. Până în prezent nu au fost identificate gene specifice implicate în patogenia acestei forme comune de cancer.

## 7. OBEZITATEA

Obezitatea (5-15% din populație) este o anomalie metabolică manifestată prin creșterea masei țesutului adipos și un exces ponderal de peste 20% în raport cu valorile normale pentru vârstă și sex. Obezitatea este mai curând un simptom decât o boală dar reprezintă un factor de risc major pentru mai multe boli comune, în special cardio-vasculare și diabet zaharat tipul II. Obezitatea are un determinism multifactorial, în care alături de factori exogeni (supraalimentație, inactivitate) sau endogeni (tulburări metabolice sau endocrine) intervin și factori genetici predispozanți. Studiile efectuate pe copii adoptați au arătat că greutatea corpului acestora se corelează semnificativ cu greutatea corpului părinților naturali iar studiile pe gemeni au evidențiat o concordanță mai mare la MZ și o heritabilitate de 60-80%.

Recent au fost identificate la animale și om câteva gene care prin producția lor sunt implicate în controlul apetitului și în susceptibilitatea la obezitate. Pe primul plan se situează gena pentru *leptină*, un hormon secretat de adipocite, care se fixează pe *receptori* în hipotalamus și reglează apetitul; nivelurile crescute de leptină produc sațietate și pierderea apetitului. Din păcate, în obezitatea umană nu au fost identificate (decât foarte rar, în obezități extreme, numite și morbide) mutații ale genelor pentru leptină și nici ale genei pentru receptorul leptinei. Probabil că există mutații ale altor gene (încă neidentificate) ce codifică



diferite molecule (neuropeptidul Y, receptorul pentru melanocortina-4) care intervin, în combinație cu leptina, în controlul apetitului.

## 8. ALCOOLISMUL

Alcoolismul cronic (3-10% din populație, de 2-3 ori mai frecvent la bărbați) reprezintă un complex de tulburări (psihice, nervoase, organice) provocat de ingestia repetată (ani de zile) a unor doze excesive de alcool. Se deosebesc două tipuri majore de alcoolism:

- Tipul I – (2/3 din cazuri) cu debut peste 25 de ani și mare dependență psihologică de alcool; profil psihologic introvertit, băutor solitar.
- Tipul II – (1/3 din cazuri) cu debut sub 25 de ani, predomină la bărbați și tinde să implice indivizi extrovertiți, cheflii, impulsivi/agresivi.

Alcoolismul este o boală care implică, obligatoriu, o cauză de mediu dar este posibil să intervină și o *susceptibilitate genetică la alcoolism*. Studiile familiale au evidențiat o agregare familială evidentă (mai mare în tipul II) și un risc de a dezvolta alcoolismul pentru indivizii cu un părinte afectat de 3.5 ori mai mare decât al celor fără părinți afectați. Pentru a exclude mediul și obiceiurile comune favorizante dintr-o familie, s-au efectuat studii pe copii adoptați; aceste studii au arătat că urmașii unor părinți alcoolici crescuți de părinți nealcoolici au un risc de 4 ori mai mare de a deveni alcoolici. În sfârșit studiile concordanței alcoolismului la gemenii MZ și DZ au permis calcularea unei heritabilități de 21% pentru tipul I și de 60-80% pentru tipul II, care are evident o susceptibilitate genetică mai mare.

## B. MALFORMAȚIILE CONGENITALE MULTIFACTORIALE

Anomaliile congenitale sunt modificări morfologice ale unui organ sau al unei regiuni anatomică produse de tulburări în dezvoltarea prenatală (erori de morfogeneză), prezente la naștere. Din punct de vedere patogenetic se clasifică în malformații, disrupții, deformații și displazii congenitale (vezi capitolul 14.B). *Malformațiile congenitale* sunt produse printr-un proces primar și intrinsec de morfogeneză anormală. Pot fi *izolate* (unice) sau *multiple* (asociate cu alte anomalii congenitale).

**Malformațiile congenitale izolate** sunt considerate boli multifactoriale deoarece pot avea o agregare familială, concordanța la gemenii MZ este mai mare decât la gemenii DZ iar rudele de gradul I ale bolnavilor au un risc de recurență mai mare decât în populația generală. Cele mai frecvente malformații congenitale multifactoriale sunt menționate în **tabelul 13.5** și la unele dintre acestea ne vom referi în continuare; alte probleme despre malformațiile congenitale sunt prezentate în capitolul 14.

**Tabelul 13.5. Incidența la nou-născuți, heritabilitatea și riscul empiric de recurență a unor malformații congenitale izolate, multifactoriale**

Tipul de malformație	Incidența (‰) la naștere	Heritabilitatea (%)	Riscul de recurență (%)
Defectele de tub neural	2-10	60	5 <sup>#</sup>
Anencefalia	variabilă		
Spina bifida	variabilă		
Hidrocefalia	0,7	42	2-4
Malformațiile congenitale de cord	4-8	35	1-4
Defectul septal ventricular	1,7		
Persistența canalului arterial	0,5		
Defectul septal atrial	1,0		
Stenoza aortică	0,5		
Despicăturile labiale	0,4-1,7	76	4
cu sau fără despicături palatine			
Despicături palatine	0,4		2

Stenoza pilorică	1,5-3	75	2-10*
Luxația congenitală de șold	1-5	60	2-11*
Piciorul strâmb congenital	1-3	68	3

Surse: Kingston, 2002; Nussbaum et al, 2001

\*Riscul de recurență depinde de sexul bolnavului și a rudei sale de gradul I

Ca și în alte boli multifactoriale *riscul empiric de recurență* al malformațiilor congenitale izolate este *specific* fiecărei boli în parte, dependent de *frecvența bolii în populație* și aproximativ egal cu rădăcina pătrată a incidenței generale în populație (vezi capitolele 5.E.4 și 9.C). Astfel, pentru malformațiile congenitale izolate, care au o incidență în populație de circa 1/1000, dacă doi părinți sănătoși, fără alte antecedente familiale, au un copil afectat, riscul de recurență la sarcinile următoare este de 1 la 32 sau 3%; același risc îl au și descendenții unui bolnav. Riscul la descendenți *crește peste 5%* dacă în familie sunt *mai multe persoane afectate* sau bolnavul prezintă *o formă mai gravă de boală*; în cazul în care *unul din sexe este mai frecvent afectat* (ex. sexul masculin pentru stenoza congenitală de pilor sau sexul feminin pentru luxația de șold), riscul de recurență este mai mare după nașterea unui copil care aparține sexului mai rar afectat. Astfel, în stenoza de pilor dacă tatăl a fost afectat, riscul de recurență este de 5,5% la băieți și de 2,4% la fete; dacă mama a fost afectată, riscul este de 19,4% pentru băieți și de 7,3% pentru fete.

În acordarea sfatului genetic trebuie să ținem cont de faptul că în anumite malformații congenitale izolate există și forme rare monogenice (de exemplu, unele cazuri de hidrocefalie pot fi recesive legate de X, autosomal dominante sau recesive) și mai ales trebuie să ne convingem – prin anamneză și evaluarea atentă și minuțioasă a pacientului – că anomalia este izolată și nu se asociază cu alte anomalii congenitale, uneori minore, într-un sindrom plurimalformativ specific (de exemplu, peste 40% din despicăturile palatine sunt sindromice); în această situație etiologia este heterogenă (cromosomică, monogenică, teratogenă) și riscul de recurență este diferit de la un caz la altul.

## 1. DEFECTELE DE TUB NEURAL

Defectele de tub neural (DTN) – anencefalia și spina bifida – au o patogenie comună<sup>15</sup> și, în cazurile familiale, se pot întâlni fiecare la diferiți membri ai familiei. Incidența este variabilă, 0,2-1% în diferite populații.

În **anencefalie** se produce un defect de închidere a polului anterior al tubului neural și encefalul, meningele, calota craniană și pielea capului sunt absente; se asociază frecvent cu anomalii faciale și auriculare, secundare. Malformația este letală, înainte sau imediat după naștere.

**Meningoencefalocelul** se produce printr-o herniere a conținutului cranian datorită lipsei de dezvoltare (breșă) a unor porțiuni din oasele craniului. Localizarea cea mai frecventă este occipitală (figura 13.2) sau fronto-nazală (figura 13.3). Când hernierea interesează numai meningele și LCR denumirea este de *meningocel*, când herniază atât meningele cât și creierul poartă denumirea de *meningoencefalocel*. Tratamentul este chirurgical, precoce. prognosticul depinde de gradul de afectare a encefalului.

În **spina bifida** se produce un defect de fuziune a arcurilor vertebrale, cel mai frecvent în regiunea lombară. Există grade variate de severitate, de la *spina bifida occulta*, în care defectul interesează numai arcurile vertebrale, la *spina bifida aperta* (deschisă), în care defectul osos se asociază cu *meningocel* (protruzia meningelui) sau **meningomielocel** (hernierea elementelor neurale și a meningelui) (figura 13.4). Când interesează întreaga coloană vertebrală poartă denumirea de *rahischizis*. Formele deschise se pot asocia frecvent cu hidrocefalie, picior strâmb congenital, paralizie a membrilor inferioare și incontinență

<sup>15</sup> O malformație înrudită cu DTN este encefalocelul posterior (occipital) produs printr-o herniere a meningelui (meningocel) și uneori a țesutului cerebral (meningoencefalocel) datorită lipsei de dezvoltare (breșă) a unor porțiuni din oasele craniului.

sfincteriană. Prognosticul este destul de sever: după tratament chirurgical 1/3 din cazurile de spina bifida deschisă supraviețuiesc cel puțin 5 ani, dar 85% dintre acestea vor avea un handicap neurologic grav și doar 5% vor fi fără handicap.

Majoritatea cazurilor de DTN sunt multifactoriale dar sunt și cazuri rare produse prin teratogeni (valproat, diabet matern), prin anomalii cromosomiale (trisomia 18) sau prin anomalii monogenice pleiotrope (sindromul Meckel, autosomal recesiv)

În cazurile multifactoriale, determinate de factori genetici și de mediu, s-a constatat că un rol major îl are deficiența maternă de acid folic: scăderea concentrației serice a acestei vitamine sub un prag de 200 μg/L crește semnificativ riscul de a se produce la făt un DTN. Concomitent cu reducerea nivelului sanguin de foliați, crește nivelul de homocisteină și scade concentrația metioninei; acest fapt a sugerat existența unei anomalii biochimice în reciclarea tetrahidrofoliaților și metilarea homocisteinei în metionină. Astfel s-a descoperit că aportul alimentar redus de acid folic are efecte mai ample la persoanele heterozigote pentru mutația C677T a genei MTHFR (metilentetrahidrofolatreductaza) care înlocuiește alanina din poziția 222 cu o valină și determină reducerea eficienței enzimei; circa 5-10% din populație este homozigotă pentru această mutație.

Important este faptul că introducerea unei *suplimentări de 400-800 μg/zi de acid folic periconcepțional* (o lună înainte de concepție și două luni după aceea) scade incidența DTN cu peste 75%. Această măsură preventivă poate fi asociată (mai ales în familiile cu risc crescut de recurență, datorită altor cauri de DTN) cu screeningul ecografic al gravidelor și dozarea alfa-fetoproteinei (AFP) în sângele matern și/sau lichidul amniotic (în sarcinile în care fătul are un DTN se găsesc valori foarte crescute ale AFP).

## 2. HIDROCEFALIA

**Hidrocefalia** (0,7% nou-născuți) reprezintă acumularea excesivă de lichid cefalorahidian în spațiile intracraniene, asociată cu creșterea presiunii intracraniene. Se datorează unor tulburări de producere sau/și de circulație a lichidului cefalorahidian, determinate de cauze diferite (spina bifida, hemoragii intracraniene, infecții fetale sau factori genetici).

Aspectul clinic este caracteristic: mărime enormă, uneori gigantă a creierului, în disproporție evidentă cu dimensiunile faciale și corporale, fontanelele foarte lărgite și dehiscenta oaselor craniene, privirea în "apus de soare" (figura 13.5), circulație colaterală la nivelul calotei craniene, atrofia nervului optic cu cecitate, retard psiho-motor important. Tratamentul chirurgical prin efectuarea unui șunt permanent între craniu și peritoneu sau vena cavă superioară dă rezultate bune, inteligența și comportamentul neurologic fiind normale în 80% din cazuri.

Majoritatea cazurilor de *hidrocefalie izolată* sunt determinate multifactorial și riscul de recurență este mic, de 2-4%. Există însă și forme monogenice de hidrocefalie – autosomal dominate sau recesive, precum și recesive legate de X<sup>16</sup> – care de obicei se asociază cu alte anomalii congenitale (10% din cazuri). În aceste cazuri examenul clinic atent și anamneza familială pot contribui decisiv la evitarea unor erori de sfat genetic.

Diagnosticul prenatal este uneori posibil prin ecografie.

## 3. MALFORMAȚIILE CONGENITALE DE CORD

Malformațiile congenitale de cord (MCC) sunt foarte frecvente (4-8% nou-născuți) și variate ca tip de defect, manifestare clinică și gravitate; oricum ele reprezintă o cauză majoră

---

<sup>16</sup> Formele de hidrocefalie legate de X – HSAS sau forma clasică, sindromul MASA și parapareză spastică complicată de tipul I (SPG1) – sunt determinate de mutații diferite în gena *LICAM* de pe Xq28, ce codifică molecula de adeziune L1.

de morbiditate și mortalitate infantilă. MCC reprezintă un grup heterogen de malformații putând fi produse de mutații monogenice, anomalii cromosomice sau expunerea gravidelor la teratogeni (infecția rubeolică, alcoolismul, diabetul matern). Majoritatea cazurilor izolate sunt însă de origine multifactorială. Există totuși o agregare familială redusă iar copiii afectați nu au exact același tip de MCC, ci mai curând anomalii care au un mecanism de producere similar.

Riscul de recurență la rudele de gradul I variază între 2% și 4% în funcție de tipul de MCC; la rudele de gradul II riscul se reduce foarte mult la niveluri apropiate de populația generală. Multe MCC pot fi în prezent evidențiate prenatal prin ecocardiografie.

Malformațiile congenitale de cord pot apare ca o componentă clinică majoră în cadrul unor sindroame genetice (precum tetralogia Fallot în cadrul sindromului velocardiofacial, defectul septal atrial în sindromul Holt-Oram determinat de mutații ale genei TBX5 sau defectul atrioventricular în cadrul sindromului Down) ori ca boli monogenice (precum stenoza aortică supravalvulară determinată de mutații ale genei pentru elastină). Au fost însă identificate și mutații ale unor gene care predispun la apariția unor malformații de cord izolate, nonsindromice, precum mutațiile JAG1 și NKX2E (ce determină tetralogie Fallot) sau mutațiile CRELD1 (implicate în producerea defectelor septale atrioventriculare izolate). De asemenea, studii de înlănțuire au evidențiat prezența unui locus major de susceptibilitate pentru persistența canalului arterial la nivelul cromosomului 12q24.

#### **4. DESPICĂTURILE LABIALE ȘI DESPICĂTURILE PALATINE**

Despicăturile labiale (uni- sau bilaterale) cu sau fără despicătură palatină – DL(P) – sunt malformații congenitale frecvente, cu o incidență medie de 1‰ de nou-născuți. Din punct de vedere patogenic DL(P) – produse (cam în a 35-a zi de gestație) printr-un defect de fuziune a mugurelui frontal cu mugurii maxilari – se deosebesc de despicăturile palatine (DP) fără despicături labiale, care rezultă printr-un defect de fuziune a lamelor palatine a oaselor maxilare. Ambele tipuri, DL(P) și DP, se prezintă ca malformații izolate sau se pot asocia cu alte anomalii congenitale; formele izolate sunt de regulă multifactoriale iar cele asociate (circa 2-11% din DLP și 20-50% din DP) formează peste 250 de sindroame monogenice, cromosomice sau teratogene. În aceste condiții evaluarea unui copil cu DL(P) și mai ales cu DP trebuie să fie completă și minuțioasă pentru a identifica posibile asocieri cu alte anomalii congenitale, fapt ce ar modifica prognosticul și sfatul genetic.

Au fost identificate o serie de mutații genice care pot crește riscul apariției DL(P). Astfel, mutațiile TGFA (factorul de creștere tumorală alfa) au fost primele asociate cu creșterea riscului pentru DL(P), dar rezultatele a numeroase studii au fost inconsistente. Se pare ca aceste mutații au rol numai în cazurile în care există o agregare familială evidentă. Alte mutații genice asociate cu creșterea riscului pentru apariția unor despicături labiopalatine interesează genele MSX1, TGFB3, GABRB3 și PVRL1.

Riscul de recurență a formelor izolate de DL(P) sau DP – considerate „prototipuri” de boli multifactoriale – crește o dată cu severitatea afectării, de la DL unilaterale (4%) la DL bilaterale (6,7%) și de la DL la DLP (8%); de asemenea riscul de recurență la rudele de gradul I crește paralel cu numărul persoanelor afectate în familie, de la 3-4% atunci când există un bolnav (un părinte sau un copil) la 12-14% când există doi bolnavi (un părinte și un copil sau doi copii afectați). În toate aceste cazuri izolate riscurile sunt „acceptabile” având în vedere mărimea, rezultatele foarte bune ale corecțiilor chirurgicale și posibilitățile de diagnostic prenatal, prin ecografie.

#### **5. ALTE ANOMALII CONGENITALE IZOLATE**

##### **Stenoza pilorică hipertrofică infantilă**

SPH a reprezentat pentru Carter (1960) modelul folosit pentru elaborarea conceptului de boală poligenică, multifactorială. Incidența medie în populația Europeană este 1:200 pentru băieți și 1:1000 pentru fete, deci malformația este de 4-5 ori mai frecventă la sexul masculin decât la cel feminin. Riscul de recurență depinde de sexul probandului, fiind mai mare atunci când sunt afectate persoane de sex feminin (tabel 13.6). Unele variante alelice ale genei NOS1 (care codifică oxidaza nitrică neuronală) par a crește riscul pentru apariția hipertrofiei pilorice izolate.

**Tabel 13.6 Riscul genetic în familiile cu stenoza pilorică (după Carter, 1983)**

Risc (%)	Cazul index	
	Sex masculin	Sex feminin
Rude de gradul I		
Farați	6,5	10,8
Surori	2,8	3,8
Fii	5,5	18,9
Fiice	2,4	7,0
Rude de gradul II		
De sex masculin	2,2	0,5
De sex feminin	4,3	1,7
Populația generală	0,5	0,1

#### **Luxația congenitală de șold**

Luxația congenitală de șold (LCS) reprezintă deplasarea capului femural în afara acetabulei, produsă înaintea sau în timpul nașterii. LCS are o incidență de 4-7:1000 nou născuți vii pentru formele temporare, instabile, (subluxații) și de 1:1000 pentru luxațiile propriu-zise. Sex-ratio este de 6F:1M.

LCS este de fapt o deformație congenitală cu determinism multifactorial; factorii genetici controlează conformația acetabulei și laxitatea articulară. Alți factori de risc sunt poziția intrauterină și prezența pelvină, primiparitatea și, desigur, sexul fătului (se crede că producția de estronă de către ovarul fetal și relaxina de către uterul fetal produc o creștere a laxității articulare).

Riscul de recurență în fratrie este, în medie, de 5% fiind puțin mai mare dacă probandul este de sex masculin.

#### **Piciorul strâmb congenital**

Piciorul strâmb congenital (PSC) este o anomalie congenitală relativ frecventă (1-3% nou-născuți). PSC poate fi o anomalie izolată sau o componentă a mai multor sindroame cu afectare nervoasă sau a țesutului conjunctiv. În formele izolate determinismul este cel mai probabil multifactorial deoarece studiile genetice relevă o agregare familială; în unele cazuri/familii se observă o segregare Mendeliană. Studiile mai vechi nu prea sunt valabile deoarece astăzi se știe cu certitudine că sub denumirea de PSC sunt incluse trei entități diferite: piciorul equinovarus (abducția și flexia plantară a labei piciorului), piciorul calcaneovalgus (flexia dorsală a labei piciorului; suprafața plantară privește lateral) și metatarsus varus (adducția și inversia labei piciorului). În practica sfatului genetic se folosesc încă riscurile empirice – de 1:50 pentru probandul de sex masculin și de 1:20 pentru probandul de sex feminin; pentru un părinte afectat de orice sex, riscul la urmași este de 1:33.

## **C. RETARDUL MENTAL**

Retardul mental (RM) este definit<sup>17</sup> ca o incapacitate de a dobândi capacitățile cognitive (QI sub 70) și adaptative corespunzătoare vârstei. Prevalența RM este de circa 2-3%; De fapt sub denumirea de RM sunt cuprinse numeroase boli cu etiologie diferită care produc oprirea dezvoltării mentale sau o dezvoltare mentală incompletă, în care este afectată inteligența în ansamblul ei. Asupra acestui subiect ne vom referi în detalii în capitolul 15; deoarece inteligența este un caracter poligenic, este firesc ca și cele mai multe din cazurile de RM ușor (QI=50-70) *nespecific* să aibe un *determinism multifactorial*; în formele severe de RM (QI sub 50) cauzele specifice (deseori genetice) sunt mult mai frecvente.

Coeficientul de inteligență al urmașilor este probabil în jurul mediei parentale. De aceea dacă unul sau ambii dintre părinți au un *RM ușor* riscul unor copii cu RM este mai mare. Riscul de recurență depinde de diagnostic dar în RM nespecific (fără o cauză identificată) este de circa 3% pentru rudele de gradul I. Riscul de recurență crește însă după nașterea a doi copii cu RM (25%), părinții sunt consanguini (15%) sau dacă probandul este de sex masculin (4-5%) (unele cazuri ar putea fi RMLX) .

## BIBLIOGRAFIE CAPITOL 13

### INTERNET

1. Geneclinics – bază de date despre bolile genetice : (<http://geneclinics.org>)
2. OMIM – catalogul bolilor mendeliene la om: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
3. Orphanet – bază de date pentru boli genetice(<http://orphanet.infobiogen.fr>)
4. Programul HELIX (sfat și teste genetice) al Universității și Spitalului de copii din Washington: <http://www.healthlinks.washington.edu/helix/>
5. Institutul național de cardiologie și pneumologie (USA): <http://www.nhlbi.nih.gov/>
6. Web site MedlinePlus web pentru boala coronariană: <http://www.nlm.nih.gov/>
7. Web site al universității din Michigan: <http://www.med.umich.edu/>

### Bibliografie specifică selectivă

1. Aitman TJ- *Genetic medicine and obesity* - N. Engl. J. Med. 2003 348(21):2138-2139.
2. Blumenthal JB, Blumenthal MN - *Genetics of asthma* - Med. Clin. North Am, 2002, 86: 937-950.
3. Cambien F, Tired L. – *Genetique et pathologie coronarienne* –in “Principes de genetique humaine”, ed. Feingold, Fellous, Solignac, Herman ed. Paris, 1998, pp 359-374.
4. Dick DM, Foroud T, Flury L, Bowman ES, Miller MJ et al.- *Genomewide Linkage Analyses of Bipolar Disorder: A New Sample of 250 Pedigrees from the National Institute of Mental Health Genetics Initiative* - Am. J. Hum. Genet., 2003, 73 (in press).
5. Gambaro G, Anglani F, D'Angelo A. - *Association studies of genetic polymorphisms and complex disease* - Lancet. 2000;355:308-11
6. Harrison PJ, Owen MJ – *Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications* – Lancet. 2003 Feb 1;361(9355):417-419.
7. Heilig M, Thorsell A: Brain neuropeptide Y (NPY) in stress and alcohol dependence. Rev. Neurosci. 2002,13: 85-94.
8. Humma L.M, Terra S.G. - *Pharmacogenetics and cardiovascular disease: impact on drug response and applications to disease management* –Am. J. Health Syst. Pharm, 2002; 59:1241-1252.
9. Kinney D.K. – *Schizophrenia* - in “Emery and Rimoin’s Principles and practice of Medical genetics”, 3<sup>rd</sup> ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, pp 1827-1840

---

<sup>17</sup> American Association of Mental Retardation, 1992.

10. Kuivenhoven J.A, Jukema J.W, Zwinderman, A.H., et al.- *The role of a common variant of the cholesteryl ester transfer protein gene in the progression of coronary atherosclerosis. The Regression Growth Evaluation Statin Study Group* – N. Engl. J.Med., 1998;338:86-93.
11. McInnis MG, DePaulo JR – *Major mood disorders* - in “Emery and Rimoin’s Principles and practice of Medical genetics”, 3<sup>rd</sup> ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, pp 1843-1849
12. Robinson SW, Morris CD, Goldmuntz E, Reller MD, Jones MA, Steiner RD, Maslen CL. – *Missense mutations in CRELD1 are associated with cardiac atrioventricular septal defects* – Am. J. Hum. Genet. 2003, 72: 1047-1052.
13. Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, Bjornsdottir S, Sigmundsson T, et al. – *Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia* – Am J Hum Genet. 2002 Oct;71(4):877-892.
14. Winkelmann B.R., Hager J., Kraus W.E., et al. - *Genetics of coronary heart disease: current knowledge and research principles* – Am. Heart J. 2000;140:S11-26.

## CAPITOLUL 14

# GENETICA DEZVOLTĂRII ȘI ANOMALIILE CONGENITALE

Anomaliile congenitale reprezintă o problemă majoră de sănătate publică prin frecvența lor ridicată, de 3-5% dintre nou-născuți, prin morbiditatea și mortalitatea infantilă care li se asociază. Pentru medici ele pun deseori probleme dificile de diagnostic, mai ales atunci când sunt multiple și se înscriu într-unul dintre cele peste 2000 de sindroame plurimalformative; pentru părinți problemele esențiale sunt îngrijirea și recuperarea copiilor afectați sau/și prevenirea/reducerea riscului malformativ la o nouă sarcină; pentru societate profilaxia anomaliilor congenitale și reducerea consecințelor malformative este, evident, obiectivul principal.

Etiologia anomaliilor congenitale este în mare parte necunoscută, dar se estimează că o bună parte dintre anomalii sunt determinate de mutații ale unor gene care sunt implicate în controlul proceselor de dezvoltare. De aceea, caracterizarea acestor gene a început să producă o profundă schimbare a înțelegerii bazelor moleculare ale anomaliilor congenitale. Ca urmare, acest capitol va începe printr-o introducere în procesele care coordonează dezvoltarea și va continua cu o discuție referitoare la perturbările acestor procese, care au ca rezultat apariția anomaliilor congenitale.

## A. GENETICA DEZVOLTĂRII

Procesul de dezvoltare poate fi definit ca fiind ansamblul mecanismelor prin care, pornind de la zigot, se ajunge la un organism matur, capabil de reproducere. Toate evenimentele din cursul dezvoltării – formarea diferitelor tipuri de celule, formarea organelor și aranjarea spațială caracteristică a acestora – se desfășoară conform unui *plan de dezvoltare* ale cărui instrucțiuni sunt codificate în materialul genetic. O definiție mai largă a dezvoltării ontogenetice include toate procesele care au loc între momentul fecundării și până la decesul individului.

Din motive etice și tehnice este dificilă studiarea evenimentelor care se produc în cursul dezvoltării embrionare la om. Ca urmare, au fost utilizate o serie de modele experimentale pe animale, care au permis obținerea unor informații ce pot fi extrapolate în mare măsură la om. Acest lucru este posibil deoarece cele mai multe dintre genele și căile implicate în procesele de dezvoltare prezintă un grad foarte înalt de conservare.

### 1. CATEGORII DE GENE IMPLICATE ÎN CONTROLUL DEZVOLTĂRII

Genele implicate în dezvoltarea embrionară codifică diverse componente ale unor căi de semnalizare intercelulară, precum factorii de transcripție, moleculele de semnalizare și receptorii acestora, componentele matricei extracelulare etc. Se cunosc șapte căi de semnalizare majoră implicate în procesele de dezvoltare: calea de semnalizare *wingless* (Wnt), calea *TGF- $\beta$*  (factorul de creștere transformant – beta), calea de semnalizare *Hedgehog* (Hh), calea *RTK* (receptor tirozin kinazic), calea *JAK/STAT* (Janus kinaza/transductor a semnalului și activator al transcripției), calea *Notch* și calea *receptorilor nucleari*. Aceste căi sunt implicate în mai multe



procese din cursul dezvoltării embrionare și acest lucru explică asocierea frecventă a mai multor anomalii congenitale ca urmare a mutației unei gene unice.

### 1.1. GENE CARE CODIFICĂ MOLECULE DE SEMNALIZARE PARACRINĂ ȘI RECEPTORII ACESTORA.

Interacțiunile dintre celulele vecine sunt mediate adeseori de molecule mici, capabile să difuzeze pe distanțe scurte și să inducă un răspuns (*semnalizare paracrină*). Se cunosc patru familii majore de molecule de semnalizare paracrină: familia *FGF* (factori de creștere fibroblastică), familia *Hedgehog*, familia *Wingless* și familia *TGF-β*.

- Factorii de creștere fibroblastică (FGF) sunt glicoproteine cu omologie înaltă care participă la realizarea unor procese biologice diverse: migrarea celulară, creșterea și diferențierea. Există cel puțin 23 FGF și 4 receptori (FGFR). FGFR sunt intens exprimați în cursul dezvoltării osoase, iar mutații lor determină o serie de boli autosomale dominante, caracterizate prin displazie osoasă (vezi **caseta 14.4**).
- Primul membru al familiei *Hedgehog* a fost izolat la un mutant de la *Drosophila* care prezintă țepi într-o zonă care este în mod normal netedă (de aceea a fost denumit *hedgehog* – arici). La vertebrate există câțiva omologi ai genei *hedgehog*, cel mai important fiind *Sonic hedgehog* (Shh). Shh participă la specificarea axelor embrionare (vezi mai jos), inducția plăcii neurale și modelarea membrului. Mutații ale SHH determină la om **holoprosencefalia** (vezi **caseta 14.1**). Unul dintre receptorii Shh este o proteină transmembranară codificată de o genă numită *patched*. Legarea Shh la receptorul *patched* determină supresia transcripției genelor care codifică membri ai familiilor Wnt și TGF-β, determinând inhibarea creșterii celulare. Mutațiile omologului uman, gena PTC, determină **sindromul Gorlin**, caracterizat prin anomalii ale coastelor, chisturi maxilare și dezvoltarea de carcinoame cutanate bazocelulare.
- Familia genelor Wnt este denumită astfel după gena *wingless* de la *Drosophila* și unul dintre omologii săi la vertebrate: gena *integrated*. Gena *wingless* este implicată în stabilirea polarității în cursul formării membrului la *Drosophila*, iar echivalenții săi la vertebrate joacă roluri similare. Membrii familiei Wnt (cel puțin 16 gene Wnt la om) codifică glicoproteine secretate care participă la o gamă largă de procese ale dezvoltării, precum specificarea axei dorso-ventrale (Wnt3), formarea creierului, mușchilor, gonadelor (Wnt4), cordului (Wnt11), scheletului (Wnt14) și rinichilor.
- Superfamilia genelor TGF-β este alcătuită dintr-un grup larg de gene înrudite structural care codifică proteine ce formează homo- sau heterodimeri. Membri ai acestei superfamilii sunt familia *TGF-β*, familia *proteinelor morfogenetice osoase* (BMP) și familia *activinelor*. Ele intervin în numeroase procese ale dezvoltării, precum specificarea axelor (BMP4), dezvoltarea scheletului etc. Un exemplu îl constituie proteina morfogenetică derivată din cartilagiile (CDMP1) ale cărei mutații produc diverse anomalii scheletice. De remarcat că mutații diferite ale aceleiași gene pot determina boli diferite (heterogenitate alelică). De exemplu, o mutație cu sens greșit este responsabilă de producerea **brahidactiliei** (degete scurte) transmisă AD. Indivizii care sunt homozigoti pentru o duplicație de 22 pb în aceeași genă asociază brahidactilia cu scurtarea oaselor lungi ale membrului (**displazia acromesomelică** – boală transmisă AR). În sfârșit, o mutație cu sens greșit care are efect dominant negativ determină în stare homozigotă **condrodisplazia Grebe**, boală autosomal recesivă caracterizată prin scurtarea severă a oaselor lungi și a degetelor.

Caseta 14.1.

#### **Holoprosencefalia și mutațiile SHH**

**Definiție și frecvență.** Holoprosencefalia reprezintă un spectrum de anomalii congenitale caracterizate prin tulburări ale dezvoltării creierului anterior și ale etajului mijlociu al fetei. Este cea mai frecventă tulburare de dezvoltare a creierului, având o incidență de 1 la 10000 până la 1 la 20000 de nou-nascuți. Boala este de două ori mai frecventă la sexul feminin.

**Manifestări clinice.** Semnele clinice cardinale ale holoprosencefaliei sunt despicătura labială și palatină, hipotelorismul (distanța interoculară redusă) și absența separării lobilor frontali. Severitatea manifestărilor clinice este însă extrem de variată, de la forme ușoare, caracterizate doar prin prezența unui incisiv central superior unic sau absența parțială a corpului calos, până la forme severe cu ciclopie (ochi unic pe linia mediană), nas cu narina unică (proboscis), absența completă a fisurii intercerebrale și microcefalie. Retardul mintal este prezent la aproape toți pacienții și este corelat cu severitatea malformațiilor SNC.

**Etiologie.** Holoprosencefalia este determinată de cauze multiple, de la anomalii cromosomice (25-50% din cazuri), la mutații monogenice și factori de mediu precum diabetul matern. Boala poate să apară izolat sau în cadrul unor sindroame diverse precum sindromul Smith-Lemli-Opitz. Formele nonsindromice de boală pot fi transmise autosomal dominant sau recesiv, ori legat de X. Mutațiile SHH (Sonic hedgehog), genă localizată pe cromosomul 7q36 au fost primele identificate drept cauza genetică a holoprosencefaliei. Ele sunt responsabile pentru aproximativ 30-40% din formele nonsindromice familiale, transmise autosomal dominant, dar pe ansamblu explică sub 5% din cazurile de holoprosencefalie.

**Patogenie și aspecte genetice.** SHH codifică o proteină secretată la nivelul notocordului și planșeului plăcii neurale, determinând un gradient de concentrație care dirijează dezvoltarea și organizarea diferitelor tipuri de celule și țesuturi la nivelul creierului și măduvei spinării. SHH este produsă de asemeni la nivelul unui mic grup de celule ale mugurilor membrilor, realizând așa-numita zonă de activitate de polarizare, care este responsabilă de dezvoltarea asimetrică a degetelor. Mutațiile SHH ce determină holoprosencefalia sunt mutații cu pierderea funcției. Transmiterea dominantă a bolii demonstrează haploinsuficiența care reflectă probabil alterarea magnitudinii gradientului de concentrație a proteinei, caracteristica cheie în funcționarea sa. Expresivitatea variabilă a bolii este explicată în parte de implicarea unor mutații diverse ale genei, dar asemenea diferențe fenotipice pot fi întâlnite și în cadrul aceleiași familii, ceea ce presupune intervenția unor gene modificatoare sau a unor factori de mediu.

**Sfat genetic și diagnostic prenatal.** Riscul mamei diabetice de a da naștere unui copil cu holoprosencefalie este de 1%. În cazul formelor asociate unor anomalii cromosomice, riscul de recurență depinde de prezența acelei anomalii la unul dintre părinți și de tipul particular al anomaliei citogenetice. În formele dominante de boală penetranța mutației este de aproximativ 70%. Trebuie insistat pe un examen clinic detaliat al părinților care pot prezenta forme subtile de boală, precum un incisiv central superior unic sau absența frenulei. În formele fără istoric familial sau anomalii citogenetice asociate riscul empiric de recurență este de 4-5%. Testarea genetică pentru analiza mutațiilor SHH nu este disponibilă în prezent în practica clinică. Formele severe de boală pot fi detectate prin ultrasonografie la 16-18 săptămâni de gestație.

## 1.2. GENE CARE CODIFICĂ FACTORI DE TRANSCRIPTIE.

Factorii de transcripție sunt ultima verigă din căile de semnalizare intracelulară care intervin în controlul dezvoltării. Așa sunt factorii de transcripție din familia *GLI* (calea de semnalizare *Hedgehog*) sau factorii de semnalizare *TCF* (calea de semnalizare *Wingless*). Există numeroase familii de factori de transcripție care îndeplinesc roluri majore în controlul dezvoltării, mutațiile lor determinând anomalii congenitale diverse (vezi bolile produse prin mutații ale unor factori de transcripție – tabelul 11.4). Exemple de gene care codifică factori de transcripție cu rol major în controlul dezvoltării sunt genele homeobox precum familiile *HOX* (39 gene la om), *PAX* (9 gene), *EMX* (2 gene) și *MSX* (2 gene), gene cu casetă *HMG* (high mobility group) precum

familia genelor *SOX* (20 gene) și gene cu caseta T, precum familia genelor *TBX* (15 gene la om).

Domeniul HMG al proteinelor *SOX* pare să activeze transcripția indirect, prin facilitarea contactului altor factori de transcripție cu regiunea promotor a genelor țintă. Genele *SOX* acționează în diverse căi ale dezvoltării. Astfel, gena *SOX9* este exprimată în creasta genitală la ambele sexe, dar este hiperexprimată la sexul masculin și inhibată la sexul feminin înainte de debutul diferențierii gonadelor. *SOX9* reglează de asemeni condrogeneza, controlând expresia genei pentru colagen *COL2A1*. Mutațiile *SOX9* determină o boală numită **displazia campomelică**, caracterizată prin defecte scheletice și inversiune sexuală (femei XY). Mutațiile într-o gena înrudită, *SOX10*, determină **sindromul Waardenburg-Shah**, caracterizat prin boală Hirschsprung (hipomotilitatea colonului cu megacolon congenital datorită reducerii numărului celulelor nervoase enterice), tulburări de pigmentare și surditate.

Genele *HOX* au un rol major în specificarea axei antero-posterioare. Ele vor fi discutate pe larg în cadrul subcapitolului referitor la specificarea axei antero-posterioare. Genele *PAX* au rol major în dezvoltarea unor organe (de exemplu gena *PAX6* în dezvoltarea ochiului). Genele *EMX* sunt importante în dezvoltarea creierului (mutații ale *EMX1* determină **schizencefalie**), în timp ce genele *MSX* sunt implicate în dezvoltarea scheletului. În sfârșit, genele *TBX* au rol major în dezvoltarea axei antero-posterioare a embrionului.

### 1.3.GENE CARE CODIFICĂ PROTEINE ALE MATRICEI EXTRACELULARE.

Proteinele matricei extracelulare sunt macromolecule secretate care îndeplinesc un rol major în organizarea tuturor țesuturilor și organelor. Tipurile de proteine ale matricii extracelulare au fost prezentate în capitolul 11.C.3. Aceste proteine nu sunt însă doar simple elemente de structură, ci pot media și o serie de procese extrem de importante în cursul dezvoltării, precum *migrarea celulară*. Așa se explică faptul că mutații ale unor gene care codifică asemenea proteine pot determina boli caracterizate prin apariția unor defecte de dezvoltare. Exemple sunt **sindromul Marfan**, produs prin mutații ale genei pentru fibrilina 1, sau **stenoza aortică supralvulară** produsă prin mutații ale genei care codifică elastina.

## **2. PROCESE MAJORE ÎN CADRUL DEZVOLTĂRII EMBRIONARE**

Din punct de vedere temporal se pot deosebi două perioade majore în cadrul dezvoltării embrionare.

- *Perioada embrionară precoce* se întinde între momentul *fertilizării* și *gastrulație* și se caracterizează prin dobândirea aspectului trilamelar al embrionului (ectoderm, endoderm și mezoderm). Această etapă este dominată de procesele de *diferențierea celulară precoce* precum și de *specificarea axelor*, ambele procese având un rol major în dezvoltarea planului organismului.
- *Etapa embrionară tardivă* este marcată de interacțiunile dintre progamele specifice ale diferitelor tipuri celulare, care vor avea ca rezultat procesele morfogenetice intense de *organogeneză*. Continuă, de asemenea, procesele de diferențiere celulară care vor conduce la formarea celulelor de tip adult.

### 2.1. ETAPA EMBRIONARĂ PRECOCE – DEZVOLTAREA PLANULUI ORGANISMULUI

#### **a. Diferențierea celulară precoce**

Toate celulele derivate, prin mitoză, din zigot vor avea *același genom*. Formarea – prin procesele de diferențiere celulară – a variatelor tipuri de celule specializate care alcătuiesc organismul uman, implică o serie de mecanisme complexe și ierarhizate de reglare a expresiei

genice<sup>1</sup>, prin care în celule diferite morfologic și funcțional se exprimă anumite *gene de specialitate*<sup>2</sup>. Expresia lor se află sub controlul unor *gene master* (de coordonare) care stabilesc *momentul ontogenetic al activării* diferitelor gene de specialitate și adeseori sunt responsabile și de menținerea celulei într-un anumit stadiu de diferențiere.

La zigot, înainte de prima diviziune, procesele necesare vieții celulare sunt realizate pe seama proteinelor provenite aproape în exclusivitate de la mamă. Ca urmare, o serie de factori materni (proteine prezente în citoplasma ovocitului) pot avea un rol esențial în cadrul unor procese precoce de reglare a expresiei genice, precum și în stabilirea unei *asimetrii* a zigotului. O dată cu prima diviziune a zigotului are loc *activarea genomului embrionar* care va conduce la sinteza de proteine necesare pentru diviziunile ulterioare de clivare. Prin aceste diviziuni se formează *blastomerele*, celule care vor alcătui *morula* (în stadiul de 16 celule).

**Morula** este formată dintr-un grup de celule externe, mai voluminoase, ce înconjoară un grup de celule interne mai mici. Celulele externe vor da naștere *celulelor trofoblastice* care vor forma *corionul*, porțiunea embrionară a placentei. Celulele interne vor constitui, în stadiul de embrion de 32 celule, așa numita *masă celulară internă*, din care va se va forma embrionul și anexelor sale (*sacul vitelin, alantoida și amniosul*). Distincția între trofoblast și masa celulară internă (embrioblast) reprezintă primul eveniment de diferențiere în cursul dezvoltării embrionare

**Blastocistul.** Celulele trofoblastice vor secreta un lichid care se acumulează în interiorul morulei, formând o cavitate (blastocel); în acest stadiu embrionul este numit **blastocist** și are loc procesul de implantare în mucoasa uterină (ziua a 6-a la om).

Până în acest moment al dezvoltării embrionare porțiuni semnificative ale embrionului pot fi îndepărtate fără afectarea dezvoltării normale a embrionului. De exemplu, separarea unui blastocist în două părți egale poate conduce la dezvoltarea unor *gemeni monoziгоși*. Mai mult, un embrion normal se poate dezvolta chiar dintr-o singură celulă a masei celulare interne. Această capacitate de compensare a unor regiuni care sunt alterate sau îndepărtate este denumită *dezvoltare reglabilă*. Acest fenomen are consecințe importante pentru reproducerea umană întrucât permite îndepărtarea fără consecințe a unor celule pentru *diagnosticul preimplantator* și protejează embrionii împotriva acțiunii teratogenilor în cursul primelor două săptămâni după concepție (răspuns de tipul "totul sau nimic").

**Gastrulația.** În a doua săptămână de dezvoltare începe procesul de gastrulație (zilele 14-28) prin care celulele blastocistului migrează și se rearanjează, formând în final embrionul trilaminar, cu cele trei păaturi germinative definitive – ectodermul, endodermul și mezodermul. Formarea acestor păaturi este o premiză obligatorie pentru etapa următoare de organogeneză. Gastrulația include și formarea țesuturilor extraembrionare, ce derivă din trofoblast.

- Gastrulația începe cu diferențierea celulelor embrioblastului în două straturi (discul germinativ bilaminar): unul intern, așa-numitul *hipoblast* (sau endodermul primitiv) și altul extern, denumit *epiblast* (care va genera în final întregul embrion) (**figura 14.1**).
- Evenimentul major al gastrulației (cu care începe săptămâna a treia a dezvoltării) este formarea *liniei primitive*, care apare ca o îngroșare a țesutului epiblastic, cu originea în porțiunea posterioară a embrionului (la nivelul nodului Hensen) și orientare antero-posterioară. De-a lungul acestei structuri au loc procese intense de *migrare* a unor celule epiblastice (**figura 14.2**) care vor forma mai întâi endodermul definitiv și apoi mezodermul; concomitent epiblastul este transformat în ectoderm și astfel se constituie *embrionul trilaminar*. Genele exprimate în timpul gastrulației codifică proteine care facilitează mișcările celulare.

---

<sup>1</sup> Mecanismele de reglare a expresiei genice acționează la mai multe niveluri ale expresiei genice și implică transcripția diferențială a genelor, procesarea selectivă a ARNm la nivel nuclear, translarea selectivă a ARNm în citoplasmă sau modificarea diferențială a proteinelor care le permit acestora să devină sau nu funcționale (vezi capitolul 4.D).

<sup>2</sup> Genele care asigură desfășurarea proceselor esențiale pentru viața celulară, numite și gene menajere (*housekeeping genes*) se exprimă în toate tipurile de celule.

- **Formarea mezodermului** este un element important al gastrulației. Mezodermul se împarte în cinci componente: notocordul, mezodermul dorsal, intermediar și lateral și mezenchimul capului. *Notocordul* este o structură tranzitorie situată pe linia mediană, care induce formarea tubului neural și este implicat în specificarea axelor. *Mezodermul dorsal* (paraxial) se segmentează în somite, care dau naștere elementelor ce formează scheletul axial, mușchii scheletici și țesutul conjunctiv al tegumentelor. *Mezodermul intermediar* va forma rinichii și aparatul genitourinar. *Mezodermul plăcii laterale* va constitui cordul, țesutul conjunctiv al viscerelor și elementele conjunctive ale amnionului și corionului. În sfârșit, *mezenchimul capului* va da naștere mușchilor capului și mușchilor extrinseci ai globilor oculari.

- **Endodermul** embrionar va forma tractul digestiv, ficatul și pancreasul, precum și aparatul respirator; endodermul produce, de asemenea, și pungile faringiene care, împreună cu celule migrate din crestele neurale vor da naștere urechii medii, timusului, paratiroidelor și tiroidei. Numeroase structuri derivate din endoderm se realizează prin înmugurire și ramificare; aceste procese sunt controlate de *factorii de creștere fibroblastică (FGF)* și *proteinele morfogenetice osoase (BMP)* împreună cu *receptorii lor*.

- **Ectodermul** embrionar va forma epidermul și anexele pielii, sistemul nervos central și periferic, adenohipofiza, glandele parotide și glandele mamare.

**Neurulația.** O dată ce s-a format embrionul trilamelar, mezodermul dorsal și ectodermul de deasupra vor interacționa și vor induce formarea tubului neural. Acest proces numit *neurulație* este un punct critic în dezvoltarea embrionară deoarece inițiază organogeneza și divide ectodermul în trei populații principale de celule: *tubul neural*, care va forma creierul și măduvă spinării, *epidermul* tegumentelor și *celulele crestei neurale*.

La om, tubul neural începe să se închidă la nivelul a cinci sedii separate, care corespund localizărilor cele mai frecvente ale defectelor de tub neural, cum sunt anencefalia, encefalocelul occipital și spina bifidă lombară. Celulele crestei neurale vor migra de la nivelul neuroepiteliului pe rute bine definite către țesuturile periferice unde se vor diferenția în diferite tipuri de celule precum neuronii senzoriali, melanocitele, neuronii ganglionilor intestinali sau celulele musculare netede. Afectarea celulelor crestei neurale va determina producerea de anomalii aparent necorelate, localizate la distanță, în structurile astfel diferențiate dar care pot fi grupate în aceeași categorie de afecțiuni numite neurocristopatii (vezi caseta 14.2)

#### Caseta 14.2

##### **Neurocristopatiile**

*In 1974, Bolande a introdus conceptul de neurocristopatii referitor la câteva tumori ce implică țesuturi cu aceeași origine embrionară (feocromocitom, neuroblastom etc); ulterior termenul a fost folosit pentru toate defectele de dezvoltare despre care se poate afirma cu certitudine că au la origine anomalii ale crestei neurale. Celulele crestei neurale sunt diseminate în tot embrionul și se diferențiază în structuri dintre cele mai diverse (melanocite, țesutul conjunctiv al feței, structuri cardiace, sistem nervos enteric etc) astfel încât neurocristopatiile pot fi încadrate în categoria defectelor de câmp politopic. Din punctul de vedere al dezvoltării embrionare, maladii extrem de variate ca aspect clinic și localizare sunt privite ca fiind generate de aceleași structuri embrionare tranzitorii, crestele neurale derivate din placa neurală. Derivatele crestei neurale, sindroamele asociate și genele implicate sunt următoarele:*

- *Rombomere: R2-R3 (primul arc branhial) – sindromul Goldenhar, sindromul Franceschetti (5q32); R4-R5 (al doilea arc branhial) – sindromul Moebius; R6-R8 (al treilea și al patrulea arc branhial) – secvența Pierre Robin, sindromul Velo-cardio-facial (microdeleții 22q11.2 sau 10p14)*
- *Melanoblaste: Piebaldism (cKIT), sindromul Waardenburg (PAX3, MITF)*
- *Neuroblaste : boala Hirschprung (cRET, EDN3, EDNRB, GDNF)*
- *Celule C ale tiroidei și suprarenalelor: MEN 2A, MEN2B, FMTC*
- *Tumori: feocromocitom, neuroblastom, cancer tiroidian medular*

**Caracteristicile esențiale ale dezvoltării embrionare precoce.** În acest proces un element important îl constituie *evoluția ierarhizată* a programelor de dezvoltare și *restricția progresivă* a potențialului de diferențiere (figura 14.3).

Așa cum am arătat, celulele din porțiunea externă a blastocistului vor da naștere la componenta fetală a placentei și la structurile extraembrionare, în timp ce celulele masei celulare interne vor forma embrionul. La fel, din ectodermul primitiv se formează neuroectodermul care va genera, printre altele, celulele crestei neurale (ce vor da naștere, de exemplu, melanocitelor și altor tipuri celulare). Cu alte cuvinte, fiecare celulă la un moment dat al dezvoltării se află într-o anumită etapă a programului său de dezvoltare, care îi va hotărî soarta sa (*cell fate*). Modul specific, previzibil și repetabil în care o anumită celulă sau regiune embrionară va evolua prin diferențiere pentru a da naștere anumitor structuri specifice se numește **predestinare** („*commitment*”); prima fază a procesului de atribuire a predestinării celulare, în care evoluția spre diferențiere a celulei este variabilă, în funcție de stimulii din mediu extern se numește *specificare*; a doua fază a procesului de atribuire a predestinării celulare, în care direcția de dezvoltare a celulei nu mai poate fi influențată din mediul embrionar exterior (autonomie celulară) se numește *determinare*.

Evoluția ierarhizată a programelor de dezvoltare este realizată în mare măsură prin intervenția unor *factori de transcripție cu specificitate tisulară*, care vor alcătui *combinații specifice* pentru anumite structuri. Ca urmare, mutații ale unor asemenea factori de transcripție vor determina anomalii congenitale care afectează preponderent țesuturile la nivelul cărora aceste gene sunt exprimate.

Un exemplu edificator pentru rolul factorilor de transcripție cu specificitate tisulară este mutația genei PAX3 care determină sindromul Waardenburg. PAX3 este un factor de transcripție exprimat în cursul dezvoltării la nivelul crestei neurale, precum și la nivelul mezodermului somitelor, ce va da naștere mușchilor scheletici și dermului. Mutațiile PAX3 cu pierderea funcției determină **sindromul Waardenburg** caracterizat prin deficiența dezvoltării structurilor derivate din creasta neurală, precum melanocitele de la nivelul firelor de păr, ochilor și urechii interne, ceea ce conduce la aspectele caracteristice ale bolii: prezența meșei albe de păr frontale, heterocromia iriană și surditatea senzorială. În plus pacienții cu mutații PAX3 prezintă hipertelorism și, ocazional, anomalii ale extremităților superioare ale membrelor (sindromul Waardenburg tip III).

*Menținerea diferențierii* presupune transmiterea stabilă a modelului de expresie genică în succesiunea generațiilor de celule; acest fenomen implică intervenția unor mecanisme de *reglare epigenetică* (modificări specifice ale conformației cromatinei și metilarea ADN).

Un alt fenomen foarte important în cursul dezvoltării embrionare precoce îl constituie *migrarea celulară* (de exemplu, migrarea celulelor crestei neurale, celulelor germinale sau celulelor hematopoietice). Bazele moleculare ale acestor fenomene de migrație sunt încă înțelese numai parțial, dar un rol major i s-a atribuit unei serii de molecule implicate în *semnalizarea paracrină* sau molecule care asigură *adeziunea celulară*.

### **b. Specificarea axelor**

La om, ca și la restul cordatelor, există trei axe a căror *specificare* joacă un rol major în orientarea planului corpului: axa antero-posterioară, axa dorso-ventrală și axa stânga-dreapta. Controlul acestor procese implică intervenția unor proteine care mediază adeseori și alte procese în cursul dezvoltării, precum organogeneza.

*Specificarea axei antero-posterioare* este declanșată odată cu formarea liniei primitive.

La extremitatea anterioară a liniei primitive există o structură numită *nodul Hensen* unde are loc expresia genei NODAL (membru al familiei TGF- $\beta$ ), care este necesară pentru inițierea și menținerea liniei primitive, iar mai târziu are un rol important în formarea axei stânga-dreapta.

Controlul *specificării* axei antero-posterioare este realizat de către o serie de gene care codifică factori de transcripție care au un domeniu de legare la ADN numit *homeodomeniu*. Aceste gene numite și **gene homeotice** sunt reprezentate la om de **genele HOX**. Anumite *combinații* ale genelor HOX marchează diferite regiuni în lungul axului antero-posterior al corpului și membrelor, determinând o evoluție specifică. Mutațiile genelor HOX determină anomalii în modul de dezvoltare a corpului, membrelor și diferitelor organe

Genele homeotice au fost descrise inițial la *Drosophila*<sup>3</sup> și numite gene HOM-C. Echivalentul lor la om sunt **genele HOX**. Cele 39 de gene sunt grupate în patru regiuni cromosomice care conțin fiecare până la 11 gene: 11 gene HOXA (1-7, 9-11 și 13, cromosomul 7p15-p14.2), 10 gene HOXB (1-9 și 13, cromosomul 17q21-q22), 9 gene HOXC (4-6 și 8-13, cromosomul 12q13) și 9 gene HOXD (1, 3, 4, și 8-13, cromosomul 2q31-

<sup>3</sup> Mutațiile genelor HOM-C determină înlocuirea antenelor cu formarea unor picioare, fenotip denumit *Antennepedia*.



q32). Genele sunt numerotate în funcție de omologia lor (genele cu numărul 1 aflându-se în extremitatea 3', iar genele cu numărul 13 în extremitatea 5'); astfel, genele HOXA13, HOXB13, HOXC13 și HOXD13 sunt omologe și numite *paralogi*. Paralogii au un grad mai crescut de omologie decât genele situate la nivelul aceluiași grup (*cluster*) de gene. Important este faptul că exprimarea acestor gene se realizează în direcția 3'-5' de-a lungul axei antero-posterioare a embrionului (*coliniaritate spațială*) precum și totodată faptul că genele situate 3' sunt exprimate mai precoce decât genele situate în poziția 5' (*coliniaritate temporală*). Astfel, expresia genei HOXA1 este mai precoce și într-o poziție anterioară față de expresia genei HOXA2 (figura 14.4). În realitate există o suprapunere parțială a regiunilor care exprimă un anumit set de gene HOX. Combinațiile particulare care rezultă *specifică*, determină, foarte probabil poziția celulelor și țesuturilor, determinând regiuni specifice de-a lungul trunchiului și ale membrilor.

*Specificarea axei dorso-ventrale* este un proces activ aflat sub controlul a doi centri de semnalizare: nodul Hensen și endodermul visceral anterior care produc semnalele de dorsalizare (*Noggin* și *Chordina*) și ventralizare (proteina *BMP4*).

Nodul Hensen conține o serie de celule ce formează *organizatorul Spemann-Mangold* care exprimă aproape în exclusivitate două proteine esențiale: *Noggin* și *Chordina*. *Noggin* este o proteină secretată care induce formarea țesutului neural din ectoderm și dorsalizarea mezodermului vecin. *Chordina* este o altă proteină secretată care previne ventralizarea mezodermului dorsalizat. În contrast, endodermul ventral anterior secretă proteina *BMP4* care induce ventralizarea mezodermului vecin, precum și *factorii de transcripție LIM1, OTX2, HESX1* sau factorul paracrin *Cerberus*.

În prezent se știe că *Noggin* și *Chordina* se leagă direct la *BMP4* și previn legarea sa la nivelul receptorului corespunzător. Ca urmare, organizatorul promovează dorsalizarea prin reprimarea semnalului de ventralizare codificat de către proteina *BMP4* (figura 14.5).

**Specificarea axei stângă-dreapta.** Poziția finală a organelor dispuse asimetric este dobândită prin mecanisme diferite.

Unele organe (cord, ficat) se dezvoltă inițial pe linia mediană, pentru a deveni lateralizate ulterior în cursul dezvoltării. Alte organe (precum unele vase sanguine) se dezvoltă inițial ca structuri pereche, iar ulterior, prin regresia unuia, lasă o structură lateralizată. În sfârșit, există organe (de exemplu plămâni drepte și stânga) care se dezvoltă de la început ca organe asimterice față de linia mediană. Înțelegerea mecanismelor moleculare care dirijează specificarea axei stânga-dreapta s-a realizat prin studii pe modele animale precum și prin studiul unor anomalii congenitale denumite **defecte de lateralitate** (1 la 10.000 de nașteri), în care acest proces este perturbat. Poziția normală a organelor în raport cu axa stânga-dreapta este numită *situs solitus*. Imaginea completă în oglindă a aranjării organelor în raport cu această axă este numită *situs inversus* (de obicei asimptomatică). Modificări în poziția unor organe asimterice, altele având o poziție normală, sunt denumite *situs ambiguus* (*heterotaxie*).

Procesul prin care este stabilită asimetrica stânga-dreapta poate fi împărțit în patru etape (figura 14.6). Evenimentul inițial pare a fi alterarea simetriei în apropierea nodului Hensen, proces care are loc în stadiul tardiv al formării șanțului neurale. Celulele din porțiunea ventrală a nodului sunt celule monociliate, cilii rotindu-se rapid (600 rpm) în sens orar (priviți din partea ventrală). Această mișcare de rotație determină un *flux nodal* către stânga al lichidului extraembrionar din apropierea nodului<sup>4</sup>, care ar putea fi implicat în transportul unor molecule cheie, precum factorul de diferențiere/creștere tip 1 (*GDF1*) sau proteina *Nodal*.

O legătură între mișcarea ciliară și determinarea axei stânga-dreapta a fost suspectată din momentul descoperirii faptului că **sindromul Kartagener** – o boală genetică relativ rară care include *situs inversus* (poziție în oglindă a organelor interne). În acest sindrom s-a observat pierderea motilității cililor epitelului respirator și al flagelului spermatozoizilor, datorită unor mutații ale dineinei, o proteină cu activitate motorie asociată microtubulilor. Dineina ar putea interacționa cu *ZIC3* (proteina cerebelară cu degete de zinc tip 3), un factor de transcripție din familia *GLI* localizat pe cromosomul X. Mutații ale acestei gene au fost identificate de asemeni la pacienți cu defecte de lateralitate.

Alterarea inițială a simetriei determină exprimarea exclusivă pe partea stânga a proteinei *Nodal*, moleculă din familia *TGF-β*. Acțiunea *Nodal* este inhibată de către o altă moleculă din familia *TGF-β*, proteina *Lefty2* (*LEFTB* la om), care acționează ca o moleculă de feedback negativ. Expresia stânga a *Nodal* și *Lefty2* începe, în stadiul de 2-3 somite, într-o mică regiune

<sup>4</sup> Fluxul nodal este afectat la șoareci mutanți care prezintă *situs inversus*, ceea ce susține implicarea fluxului nodal în determinarea axei stânga-dreapta.

din vecinătatea nodului, se extinde bidirecțional de-a lungul axei antero-posterioare și dispare către stadiul de 6-7 somite. Semnalul indus de *Nodal* este mediat de către un factor de transcriere, Pitx2 (la om PITX2, gena implicată în producerea sindromului Rieger). Genele situate în aval, responsabile de morfogeneza asimetrică, nu sunt încă cunoscute. În sfârșit, Nodal induce și expresia unei a treia molecule din familia TGF- $\beta$ , proteina Lefty1 (la om LEFTA), care acționează ca o barieră mediană a semnalelor ce determină specificarea părții stângi a corpului.

## 2.2. ETAPA EMBRIONARĂ TARDIVĂ – ORGANOGENEZA

Această etapă este dominată de procese intense de *morfogeneză* care au ca rezultat final constituirea organelor și sistemelor în forma lor finală. Continuă de asemenea procesele de *diferențiere celulară* inițiate în etapa precedentă, care vor conduce la formarea celulelor înalt diferențiate, de tip adult (precum melanocitele, fibroblaștii sau keratinocitele). Evoluția specifică a acestor celule a fost însă deja prestabilită în etapa de dezvoltare embrionară precoce (de exemplu, dezvoltarea melanocitelor are loc din celulele crestei neurale). Proceselor de diferențiere celulară li se adaugă procese intense de *proliferație celulară* care sunt responsabile de creșterea rapidă a dimensiunilor embrionului și ulterior a fătului. Între procesele de diferențiere celulară și cele de proliferație există însă adeseori o relație de inversă proporționalitate: pe măsura creșterii gradului de diferențiere scade potențialul de proliferație, celulele înalt diferențiate fiind frecvent lipsite complet de capacitatea de diviziune celulară. Ca urmare, asigurarea proceselor de creștere (inclusiv postnatale), precum și a celor de reparare celulară este posibilă în bună parte pe seama *celulelor stem*. Aceste celule își păstrează capacitatea de multiplicare de-a lungul întregii vieți (prin mecanisme complexe, precum menținerea activității telomerazei). În sfârșit, proceselor de proliferație li se adaugă și procese inverse, de *apoptoză* (sau moarte celulară programată). Acest proces este extrem de important în formarea organelor și va fi prezentat separat în cadrul subcapitolului 14.A.3.

Un fenomen important care precede organogeneza este *formarea modelelor*, procesul prin care celulele diferențiate sunt aranjate spațial formând țesuturi și organe. Specificarea regională are loc în mai multe etape: (1) definirea celulelor dintr-o regiune; (2) stabilirea centrelor de semnalizare care furnizează informații poziționale; (3) diferențierea celulelor din regiunea respectivă ca răspuns la semnale adiționale. Spre exemplu, celulele ce vor forma membrele superioare se diferențiază în condrocite, osteocite etc; aceste celule trebuie însă să fie aranjate într-un model temporo-spațial care să formeze un os funcțional. Alte informații vor stabili dacă acest os va deveni humerus, radius sau cubitus și va ocupa o poziție specifică. Pentru formarea modelelor, celulele și țesuturile *comunică* unele cu altele, folosind diferite căi de semnalizare

Așa cum se poate intui însă, o serie de gene care au fost inactive până în momentul inițierii organogenezei devin active în cursul acestor procese de dezvoltare. Mutațiile unor gene care au un rol determinant în această fază sau mutațiile cu efecte letale care perturbă evenimentele anterioare ale dezvoltării pot produce anomalii ale diferitelor structuri și organe.

În cele ce urmează vom prezenta câteva date succinte privitoare la controlul dezvoltării cordului și membrilor, anomaliile acestora fiind cele mai frecvente anomalii congenitale. Dezvoltarea organelor genitale, cea mai bine înțeleasă în prezent, va constitui subiectul subcapitolului 14.C.

### **a. Dezvoltarea cordului**

Formarea cordului implică o serie de evenimente precis orchestrate (care implică intervenția a numeroase și variate gene). Prezentarea reperelor embriologice și a genelor implicate în dezvoltarea cordului urmărește să demonstreze complexitatea moleculară a acestui proces, redat sintetic în **figura 14.7**, precum și corelația dintre mutațiile genelor și diferite



malformații cardiace (caseta 14.3). Malformațiile congenitale de cord sunt cele mai frecvente defecte de dezvoltare (6-8 la 1000 nou-născuți) și reprezintă principala cauză de deces la copii (excluzând bolile infecțioase)

Primul eveniment major în dezvoltarea cordului îl constituie *specificarea* celulelor cardiace – *cardiomiocitele*.

Aceste celule iau naștere la scurt timp după gastrulație, la nivelul mezodermului lateral anterior. Ele sunt produse ca răspuns la o serie de factori proteici precum *proteinele morfogenetice osoase* (BMP2 și BMP4) secretate de către endodermul adiacent. Semnalele rezultate determină *activarea unor gene* ce codifică factorul de transcripție NKX2.5 (echivalentul genei *tinman* de la *Drosophila*), factori de transcripție din familia GATA (GATA4, 5 și 6) și factori de transcripție cu caseta T (TBX1 și TBX5).

O parte dintre celulele cardiace evoluează divergent și vor da naștere *sistemului de conducere*; un rol major în acest proces îl au genele care codifică endotelina 1, conexina 40 și factorul de transcripție HF1B.

La scurt timp după specificare, celulele musculare cardiace converg de-a lungul liniei mediane ventrale a embrionului și formează, în săptămâna a patra, **tubul cardiac** (ce începe să pulseze); tubul cardiac prezintă o pătură miocardică și una endocardică, separate printr-o matrice extracelulară. Acest proces este guvernat de factori de transcripție din familia GATA. O dată format, tubul cardiac suferă o *încurbare către dreapta*, acest proces fiind ghidat de către căile moleculare implicate în stabilirea asimetriei stânga-dreapta (vezi mai sus). Încă înainte de încurbarea tubului cardiac acesta este *segmentat* de-a lungul axului antero-posterior în precursorii viitoarelor camere ale cordului: *sacul aortic, porțiunea conotruncală, ventriculii pulmonar și sistemic și atriile*.

Fiecare din aceste camere diferă prin caracteristicile sale morfologice și contractile, ca și prin tipurile de gene exprimate. *Formarea ventriculilor* este dependentă de expresia genei IRX4, aflată sub controlul genei NKX2.5. Factorul de transcripție HAND1 controlează formarea ventriculului stâng, în timp ce expresia HAND2 și a versicanului guvernează formarea ventriculului drept. Un cofactor pentru dezvoltarea ventriculilor este și proteina MEF2C. *Dezvoltarea atriilor* se află sub controlul receptorului nuclear orfanic COUP-TFII și a factorului de transcripție PITX2. Proliferearea cardiomiocitelor este controlată de neuregulină, receptorii ERBB2 și ERBB4 și factori angiogenici precum VEGF și angiopoietina 1. Defecte ale acestor factori asociază anomalii ale trabeculației ventriculare.

O altă etapă importantă în dezvoltarea cordului este *separarea celor patru camere* realizată prin dezvoltarea septurilor interatrial, interventricular și formarea valvelor.

Mediatori majori ai procesului de dezvoltare a septurilor interatrial și interventricular sunt NKX2.5 și TBX5, mutațiile acestor gene fiind descrise la pacienți cu DSA sau DSV (vezi caseta 14.2). Dezvoltarea valvelor atrioventriculare și ventriculoarteriale este mediată în parte de membri ai familiei TGF- $\beta$  care induc transformarea celulelor endoteliale precursorare în celule mezenchimale. Alți mediatorii sunt genele NFATC (factor nuclear dependent de calcineurină) și SMAD6 (mutațiile lor determină la șoareci valve îngroșate și cu aspect gelatinos, asemănătoare cu cele întâlnite în bolile umane).

În sfârșit, *separarea circulației sistemice de circulația pulmonară* este asigurată în parte pe seama migrării celulelor crestei neurale care vor separa trunchiul arterial în aorta și artera pulmonară și vor da naștere porțiunii conotruncale a septului ventricular.

Celulele crestei neurale au de asemeni rol în dezvoltarea *canalului arterial* și a porțiunilor proximale ale aortei, arterelor subclaviculare, carotide și pulmonare. Perturbări ale specificării sau migrării celulelor crestei neurale au drept consecință anomalii ale acestor regiuni care constituie circa 30% din toate anomaliile cardiace la om. Printre factorii care controlează migrarea și dezvoltarea celulelor crestei neurale se numără endotelina 1 (EDN1) și receptorul său tip A, precum și neuropilina 1. Dezvoltarea arcului aortic IV care va conduce la formarea crosii aortice se află sub controlul factorilor de transcripție MFH1 și PAX3 și a receptorilor pentru acidul retinoic, în timp ce factorul de transcripție TFAP2B controlează dezvoltarea arcului aortic VI care da naștere canalului arterial.

Formarea cordului se termină la sfârșitul săptămânii a zecea.

#### Caseta 14.3.

#### **Sindroame genetice asociate cu malformații cardiace**

Sindromul DiGeorge sau velocardiofacial (OMIM 188400) este determinat de o microdeleție de 3 Mb în regiunea 22q11. Aceasta produce anomalii de dezvoltare ale crestei neurale, care determină defecte conotruncale și ale arcului aortic, despicătură palatină, hipoplazia timusului și glandelor paratiroide. Este foarte probabil ca una dintre cele aproximativ 30 de gene prezente în această regiune să fie implicată în controlul dezvoltării crestei neurale.

Multe forme familiale de defecte septale atriale și tulburări de conducere (OMIM 108900) au fost identificate ca fiind determinate de mutații ale genei NKX2E. Mutații sporadice ale NKX2E au fost identificate de asemeni la pacienți cu tetralogie Fallot sau anomalii ale valvei tricuspide. Asocierea unor mutații specifice care determină pierderea funcției ale NKX2E cu anumite anomalii cardiace sugerează intervenția unor domenii funcționale diferite ale proteinei în diverse procese din cursul dezvoltării cordului.

Sindromul Holt-Oram (OMIM 142900) este caracterizat prin defecte septale atriale sau ventriculare asociate cu anomalii ale membrelor și este determinat de mutații ale genei TBX5. Mutațiile responsabile pentru producerea DSA și DSV sunt grupate în regiuni diferite ale genei, ceea ce sugerează asocierea în aval a unor cofactori diferiți, cu specificitate tisulară.

Sindromul Alagille (OMIM 118450) este o boală autosomal dominantă caracterizată prin atrezie biliară și anomalii cardiace, tipice fiind stenoza arterei pulmonare și tetralogia Fallot. Boală este determinată de mutații ale genei JAG1 (Jagged-1), un ligand pentru receptorul Notch. Forme izolate de stenoza pulmonară sau tetralogie Fallot au fost asociate de asemeni cu mutații ale JAG1.

Sindromul Char (OMIM 169100) este o boală autosomal dominantă caracterizată prin persistența canalului arterial, anomalii ale mâinilor și dismorfism facial. Este produs de mutații dominant negative ale genei pentru factorul de transcripție TFAP2B, exprimat în celulele crestei neurale.

Analiza familiilor cu stenoza aortică supravalvulară (OMIM 185500) și sindrom Marfan (OMIM 154700), ambele boli autosomal dominate, au ușurat înțelegerea bolilor aortice. Ambele sunt determinate prin mutații ale unor proteine structurale de la nivelul țesutului conjunctiv. Stenoza aortică supravalvulară, care este o caracteristică a sindromului Williams (OMIM 194050), este determinată de mutații ale elastinei, în timp ce sindromul Marfan, caracterizat prin dilatarea anevrismală a aortei ascendente, este determinat de mutații ale fibrilinei 1.

## **b. Dezvoltarea membrelor.**

Anomaliile membrelor sunt pe locul doi ca frecvență după anomaliile cardiace. Studiul sindroamelor care asociază anomalii de dezvoltare ale membrelor, ca și posibilitățile mai facile de studiu experimental au permis identificarea a numeroase gene care controlează dezvoltarea membrelor (casetă 14.4).

Originea membrelor este la nivelul unor muguri care iau naștere în mezodermul plăcii laterale și mezodermul somitic și care sunt acoperiți de ectoderm. Acești muguri cresc către exterior și își modifică forma iar celulele care îi alcătuiesc vor da naștere la diferitele țesuturi componente într-o secvență care evoluează în direcție proximo-distală.

Aspectul fundamental în cadrul dezvoltării membrelor este informarea celulelor mugurilor de origine asupra poziției lor de-a lungul celor trei axe și apoi interpretarea acestei informații în scopul de a da naștere structurilor corespunzătoare. Există trei regiuni (figura 14.8) care sunt implicate în semnalizarea poziției celulare: creasta ectodermală apicală mediază creșterea mugurilor membrelor de-a lungul axei proximo-distale, ectodermul dorsal guvernează modelarea dorso-ventrală a membrelor, în timp ce așa-numita regiune de polarizare a activității controlează dezvoltarea antero-posterioară. Fiecare dintre aceste regiuni își mediază efectul prin intermediul unor clase de molecule de semnalizare.

- Astfel, creasta ectodermală apicală exprimă intens proteine din familia factorilor de creștere fibroblastică: FGF8 și FGF10 sunt exprimate precoce la acest nivel, în timp ce FGF2, FGF4 și FGF9 sunt exprimate mai

târziu și doar în porțiunea posterioară a crestei, numită și *zona de progresie*. De asemeni are loc expresia receptorilor tip 1, 2 și 3 pentru acești factori. Mutațiile lor sunt implicate în producerea unor sindroame cu anomalii de dezvoltare a membrilor (vezi **caseta 14.3**).

- Anterior de diferențierea crestei ectodermale apicale, ectodermul dorsal exprimă intens proteina WNT7A care este responsabilă de dorsalizarea mezodermului vecin.
- Principalele componente ale căilor de semnalizare asociate regiunii de polarizare a activității sunt acidul retinoic, proteina SHH (*Sonic hedgehog*) și proteine din familia BMP, în particular BMP2.

Toate aceste componente ale căilor de semnalizare sunt coordonate între ele, astfel încât asigură dezvoltarea corectă a segmentelor membrilor de-a lungul celor trei axe. Ca urmare a acestor semnale de poziționare este indusă expresia spațială și temporală caracteristică a unor gene care sunt responsabile de dezvoltarea propriu-zisă a diferitelor structuri ale membrilor. Cei mai importanți mediatori sunt gene din familiile HOX, SALL, LMX și TBX, toate codificând factori de transcripție. Mutațiile acestor gene au fost descrise în diverse sindroame asociate cu anomalii de dezvoltare ale membrilor.

Astfel, genele HOXA9 – HOXA13 și HOXD9 – HOXD13 sunt exprimate în domenii suprapuse la nivelul mugurilor membrilor, genele din poziția 5' (vezi specificarea axei antero-posterioare) fiind exprimate mai târziu și mai distal. Genele din familia SALL par a fi implicate specific în modelarea degetelor. LMX1 este exprimată în mezenchimul dorsal, în timp ce genele din familia TBX par a fi implicate în modelarea dezvoltării antero-posterioare. Diferențierea între membrele superioare și inferioare este controlată prin intermediul unor gene precum cele din familia TBX: TBX5 este exprimată specific la nivelul membrilor superioare, în timp ce TBX4 este exprimată la nivelul membrilor inferioare. O problemă importantă este și diferențierea țesuturilor componente ale membrilor. O primă informație asupra mecanismelor implicate este expresia specifică a genei homeobox MEIS2 la nivelul celulelor care vor da naștere mușchilor membrilor.

#### Caseta 14.4

##### Cauze genetice ale anomaliilor membrilor la om

*Acondroplazia (OMIM 100800) este o boală caracterizată prin hipostatură disproporționată și macrocefalie. Majoritatea pacienților prezintă o substituție glicina-arginină la nivelul domeniului transmembranar al FGFR3. Mutațiile FGFR1 și FGFR2 sunt implicate de asemeni în producerea sindroamelor Pfeiffer (OMIM 101600: hipertrofia primului deget, hipertelorism), Apert (OMIM 101200: fuziuni ale degetelor, hipoplazia etajului mijlociu al feței) și Jackson-Weiss (OMIM 123150: hipoplazia etajului mijlociu al feței, anomalii ale piciorului).*

*Mutațiile GLI3, care codifică un factor de transcripție cu degete de zinc (identificată a fi gena țintă a căii de semnalizare Hedgehog) sunt implicate în producerea sindroamelor Greig (OMIM 175700: anomalii craniene și sindactilie) și Pallister-Hall (OMIM 146510: asocierea hamartoblastoame hipotalamice, hipopituitarism, imperforație anală și polidactilie postaxială)*

*Mutațiile genei HOXA13 sunt implicate în producerea sindromului mana-picior-organe genitale (OMIM 140000) caracterizat prin mâini și picioare scurte cu scurtarea primului metacarpian și metatarsian, clinodactilia degetului 5 și fuziuni ale unor oase metacarpiene, la care se adaugă la femei anomalii ale organelor genitale precum sept longitudinal vaginal sau uter bicorn. Mutațiile HOXD13 sunt implicate în producerea sindactiliei tip II (OMIM 186000), boală în care heterozigoții prezintă fuziuni ale falangelor și degete supranumerare. Formele homozigote de boală sunt mult mai severe și asociază malformații osoase mai importante ale mâinilor și picioarelor. Mutația cauzatoare a sindactiliei este o expansiune a unui tract polialaninic din domeniul amino-terminal al proteinei. Proteina normală conține 15 alanine, în timp ce forma mutantă conține 22 până la 24 de alanine.*

*Sindromul Townes-Brockes (OMIM 107480) asociază anomalii ale mâinilor și picioarelor (deget mare trifalangian și alte anomalii osoase), anus imperforat, anomalii ale urechilor și surditate neurosenzorială moderată. Boală este determinată de mutații ale genei care codifică factorul de transcripție SALL1.*

*Sindromul unghii-rotulă (OMIM 161200) asociază displazia sau absența unghiilor cu hipoplazia rotuliană la care se poate adaugă uneori nefropatie. Boală este determinată de mutații ale genei LIMX1B.*

*Defecte ale elementelor anterioare și posterioare ale membrilor superioare apar în sindromul Holt-Oram (OMIM142900) și respectiv sindromul mamaro-ulnar (OMIM 181450). Sindromul Holt-Oram este determinat de mutații ale genei TBX5, în timp ce sindromul mamaro-ulnar este rezultatul mutațiilor genei TBX3, care este strâns înlănțuită și puternic înrudită cu gena TBX5.*

### 3. ROLUL APOPTOZEI ÎN DEZVOLTARE

Termenul *apoptoză* a fost introdus de Kerr și colaboratorii săi în 1980 pentru a defini ansamblul fenomenelor asociate specific cu procesul *morții celulare programate* (MCP), adică al morții survenită în urma *activării autonome*, condiționată exclusiv temporal, a unui *program de autodistrugere* existent în genomul fiecărei celule. MCP reprezintă modalitatea eliminării populațiilor celulare din alcătuirea unor structuri embriofetale precursore care, după ce și-au încheiat misiunea, urmează a nu mai fi incluse în formațiunile din care au făcut parte.

Exemple ilustrative sunt rezorbția membranelor interdigitale, sculptarea cavităților, eliminarea organelor și țesuturilor tranzitorii (vestigiile filogenetice – pronefros, mezonefros), remodelarea tisulară, distrugerea neuronilor care, din cauza numărului lor excesiv, nu reușesc să stabilească conexiuni sinaptice.

La adult, apoptoza este esențială pentru menținerea homeostaziei mitotice și pentru păstrarea integrității organismului. Prin apoptoză mor celulele infectate cu virusuri, cele al căror genom a suferit leziuni produse de agenți injurianți ambientali: radiații ultraviolete și ionizante, substanțe chimice; celulele T autoreactive dotate cu potențialul de a ataca propriile structuri sunt omorâte apoptotic la încheierea răspunsului imun.

În prezent se acceptă, prin consens, că MCP este orice formă de moarte care nu se datorează unor cauze accidentale sau, mai exact, care nu reprezintă rezultatul intervenției intempestive și brutale a unor agenți din afara organismului. MCP se asociază cu o cascadă de evenimente morfologice și biochimice caracteristice, care se succed într-o ordine bine determinată. Succesiunea evenimentelor care definesc apoptoza este cu totul diferită de cea care corespunde morții traumatice – *necroza* (vezi **tabelul 14.2**).

Tabelul 14.2. Principalele caracteristici ale necrozei și apoptozei

Caracteristici	Necroză	Apoptoză
Tipul de moarte	Catastrofică	Programată
Cerințe de energie	Proces pasiv; nu necesită energie	Proces activ realizat cu consum de ATP
Modificarea volumului celular	Creștere	Scădere
Modificarea densității celulare	Scădere	Creștere
Liza membranei plasmatică	În etapa inițială	În etapa finală
Hidroliza ADN	În etapa finală	Curând după inițierea procesului
Desfășurarea procesului	Rapidă	Lentă
Modificarea organitelor celulare	Liză	Compactare
Cicatrizare	Cicatrice fibroasă	Fără cicatrice
Factori inductori	Tulburări nefiziologice: toxine, hipoxie, traumatisme, insultă tisulară masivă	Stimuli fiziologici: lipsa factorilor de creștere, semnale extracelulare.
Celule afectate	Grupuri de celule contigue, țesuturi în totalitatea lor	Celule individuale
Aspectul ADN	Fragmente ADN de dimensiuni variate	Fragmente ADN reprezentate de multipli de 200pb
Celulele care fagocitează	Macrofage	Celule adiacente sau macrofage

#### 3.1. DESFĂȘURAREA PROCESULUI DE APOPTOZĂ

Apoptoza este un proces activ prin care sunt eliminate celule individuale, dispersate în întreaga masă a țesuturilor și organelor. Procesul se desfășoară în mai multe etape (**figura 14.9**):

- Într-o primă etapă celulele destinate să moară își pierd contactul cu vecinele lor; zonele specializate ale membranelor plasmactice (complexe funcționale, microvili) dispar, iar organitele citoplasmactice se compactează, păstrându-și însă integritatea structurală; volumul celulelor se reduce ca urmare a pierderii apei, în condițiile în care permeabilitatea plasmalemei rămâne, totuși, nemodificată (celulele sunt capabile să excludă coloranți vitali). Densitatea de plutire a celulelor este crescută, fapt căruia i se datorează posibilitatea separării prin centrifugare a celulelor apoptotice. În această etapă se produce și deplasarea, de pe fața internă a plasmalemei pe cea externă, a unor molecule lipidice – fosfatidil-serină – încărcate negativ, ce vor servi ca *markeri ai inițierii apoptozei*. Celula apoptotică va fi astfel *recunoscută* de vecinele lor care se vor pregăti să o fagociteze și să o digere;
- În etapa următoare, pe suprafața celulelor apar numeroase pliuri și circumvoluții care includ porțiuni dilatate ale cisternelor aparatului Golgi și ale reticulului endoplasmatic neted. Fuziunea dilatațiilor cu membrana plasmatică creează o serie de cavități asemănătoare unor crater. În paralel se produc cele mai reprezentative alterări asociate cu apoptoza, și anume cele de la *nivelul nucleului*. *Cromatina se condensează* în mase granulare mari, dispuse pe fața internă a învelișului nuclear. De reținut că în nucleii celulelor angajate în procesul apoptozei se produce o *fragmentare intensă a moleculelor de ADN* la nivelul filamentelor internucleosomale. În consecință, lungimea minimă a fragmentelor va fi egală cu *180-200 nucleotide*. Fragmentele mai lungi sunt alcătuite din multipli ai acestor numere. Separate electroforetic în gel de poliacrilamidă, fragmentele – datorită diferențelor de lungime – se dispun într-o coloană al cărei aspect scalariform (*ladder*) este specific apoptozei.
  - Următoarea etapă debutează cu *fragmentarea nucleilor*. La scurt timp celulele se clivează în *corpuri apoptotice* alcătuiți din resturi nucleare și organite citoplasmactice, puternic condensate, înconjurate de un înveliș membranar;
  - Etapa finală o constituie *fagocitarea corpurilor apoptotice* de către macrofagele profesionale sau de către celulele adiacente; *degradarea completă* a corpurilor apoptotice sub acțiunea enzimelor lizozomale ale celulelor care i-au fagocitat durează câteva ore.

Definitiv pentru apoptoză este menținerea – până în stadiul final al procesului – a integrității structurale și funcționale a citomembranelor, condiție obligatorie a prevenirii lezării celulelor vecine de către enzimele hidrolitice conținute în lizozomii corpurilor apoptotice. Se explică astfel lipsa răspunsului inflamator, prezervarea arhitecturii țesutului și vindecarea necicatricială.

### 3.2. GENELE APOPTOZEI ȘI PRODUȘII LOR PROTEICI

Primele informații referitoare la controlul genetic al apoptozei au fost furnizate de cercetările întreprinse pe viermele nematod *Coenorhabditis elegans*. Dintre genele implicate în apoptoză la *C. elegans*, două participă direct la traducerea în fapt a deciziei sinuciderii: *ced-3* și *ced-4* (*ced* – *cell death defective or abnormal*). Mutațiile inactivatoare ale acestor două gene suprimă apoptoza și conduc la acumularea unui număr excesiv de celule. Acțiunea “ucigașă” a genelor *ced-3* și *ced-4* este antagonizată de gena *ced-9*, al cărei rol este acela de a proteja celulele de moartea programată.

Ulterior s-a constatat că moartea programată a celulelor umane este rezultatul intervenției succesive și coordonate a unui număr de *proteaze* – în mare măsură similare cu produșii genelor *ced* ale *C. elegans* - și ale căror trăsături unificatoare le reprezintă existența cisteinei în situsurile lor active și specificitatea acțiunii proteolitice exercitate exclusiv la nivelul reziduurilor aspartat ale proteinelor-țintă. Acestor trăsături li se datorează denumirea de **caspaze** (cysteinyl-aspartic – acid – proteases) care le-a fost atribuită.

*Caspazele umane* – în număr de 14 – sunt amplu exprimate în toate tipurile celulare, în care se află sub formă de precursori latenți (procaspaze). Proenzimele inactice sunt alcătuite dintr-un prodomeniu situat la capătul N-terminal, o subunitate mare (~ 20 kD) și una mică (~ 10 kD). După clivare, prodomeniul se elimină, iar subunitățile se heterodimerizează.

Familia caspazelor se împarte în două *subgrupuri*: unul care procesează citokinele, și altul implicat în apoptoză. Primul este alcătuit din caspazele 1, 4, 5, 11, 14. Al doilea include caspazele cu rol de *inițiator* (2, 8, 10) și pe cele cu rol de *efector* (3,6,7). Inițiatorii au prodomenii

N-terminale lungi, care se pot cupla, prin intermediul unor molecule-adaptor, cu receptorii de suprafață – ceea ce le permite să răspundă la stimulii tanatogeni proveniți din afara celulei.

Activarea caspazelor se realizează pe două căi: *extrinsecă* și *intrinsecă*.

*Calea extrinsecă* comportă activarea *caspazei 8* (și, posibil, 10). Această cale este mediată de receptorii familiei TNF (tumor necrosis factor) și NGF (neuronal growth factor). Familia mai include și receptorii CD95 (FAS, APO1), TNFR1, DR3 (APO3). După cuplarea cu ligandul, receptorii se trimerizează și recrutează proteine adaptor (FADD – *Fas receptor associated with death domain*) împreună cu care determină clivirea procaspazei 8. Aceasta va activa efectorii apoptotici (caspazele 3 și 7), inițiind apoptoza.

*Calea intrinsecă* implică eliberarea din mitocondrii a citocromului c și a AIF (*apoptosis inducing factor*), provocată de semnale tanatogene, similare sau diferite de cele primite de receptorii Fas/TNF. Efluxul de citocrom c este mediat de BAX, o proteină formatoare de canale în membranele mitocondriale. Citocromul c citosolic se cuplează cu APAF1 (*apoptotic protease activating factor*), și determină – în prezența ATP – activarea procaspazei 9. Formarea complexului activ – **apoptozomul** (citocrom c, APAF1, caspaza 9) – reprezintă evenimentul declanșator al cascadei caspazelor, care se va amplifica rapid clivând variate substraturi enzimatic și structurale și realizând astfel dezasamblarea sistematică și ordonată a celulelor muribunde. Câteva dintre caspazele umane sunt prezentate în tabelul 14.3.

Tabelul 14.3. Exemple de caspaze umane

Caspaza	Substraturi	Localizarea genei
Caspaza 1	Pro-IL 1	
Caspaza 3	PARP, U1 70kD, protein kinaza c, hungtintina, RB	4q33
Caspaza 8	Toate celelalte procaspaze	2q33
Caspaza 9	PARP, procaspaza 3	?
Caspaza 10	Toate celelalte procaspaze	2q33

O altă cale de autodistrugere, utilizată în special de neuroni, este cea care nu recurge la activarea caspazelor, ci la eliberarea - în momentul recepționării semnalului tanatogen – a unei proteine situată în spațiul intermembranar al mitocondriilor, denumită factorul inductor al apoptozei (AIF). Proteina AIF migrează în nucleu, unde se leagă la moleculele ADN cărora le produce rupturi bicatenare, incompatibile cu viața.

*Țintele caspazelor*, al căror număr este mai mare de 100, sunt extrem de variate:

- constituenți ai învelișului nuclear (lamina),
  - proteine care intră în alcătuirea citoscheletului (gelsolina, fodrina, actina),
  - enzime implicate în perceperea și repararea leziunilor ADN,
  - poli(ADP-riboza) polimeraza – PARP,
  - protein kinaza dependentă de ADN (DNA-PK),
  - ribonucleoproteina U1,
  - factorul DFF (*DNA fragmentation factor*) care mediază clivirea internucleozomală a ADN.
- Ca urmare a acțiunii caspazelor, celulele muribunde se detașează de vecinele lor, se sfericizează, ceea ce le facilitează ingestia de către macrofage.

### 3.3. REGLATORI AI APOPTOZEI

Modularea răspunsului celular la semnalele tanatogene extrinseci sau intrinseci comportă exprimarea diferențială și interacțiunea complexă a unor gene aflate în relații de antagonism: unele conferă rezistență, în timp ce altele cresc susceptibilitatea la apoptoză. În prezent se cunosc 18 gene cu rol pozitiv sau negativ în reglarea programului morții apoptotice a celulelor umane. Ele aparțin **familiei BCL2** și se împart, în funcție de structura și rolurile pe care le îndeplinesc, în trei subgrupuri, dintre care reprezentative sunt BCL2, BCLXL, cu rol antiapoptotic, BAX și BAK stimulatori ai apoptozei; acceleratori ai apoptozei sunt, de asemenea, BID și BAD.

Protooncogenă BCL2 a fost identificată prin clonarea și analiza regiunii cromosomice 18q21, implicată în



translocația t(14;18). Această translocație, prezentă în 85% din limfoamele foliculare cu celule B, plasează protooncogenul BCL2 în proximitatea locusului activator IGH (locusul genei lanțurilor grele ale imunoglobulinelor). În urma translocației, nivelul exprimării genei BCL2 în limfocitele B crește substanțial. Supraexprimarea genei BCL2 în celulele B foliculare determină capacitatea de a se sustrage controlului mecanismelor inductoare ale apoptozei și, o dată cu aceasta, rezistența sporită la agenții citotoxici. Consecința o reprezintă expansiunea populației de celule B purtătoare ale t(14;18), realizată nu prin intensificarea proliferării, ci pe seama creșterii duratei lor de viață.

Alți membri ai familiei BCL2 – proteinele BAX, BAK, BAD și BID – interferează cu BCL2 și cu BCLXL, facilitând inițierea apoptozei. BAX inactivează BCL2 intervenind astfel în modularea răspunsului apoptotic.

Factorii declanșatori ai apoptozei acționează din afara sau din interiorul celulei. Factorii externi sunt reprezentați de stresul oxidativ exogen; ischemia moderată, excitotoxine (glutamat, fluxuri ionice), carența factorilor trofici (reducerea gradului de ocupare a receptorilor), stimuli tanatogeni (TNF-alfa1, corticosteroizi), toxine (beta amiloidul). Factorii interni includ substanțele toxice rezultate din metabolismul celular, formele mutante ale SOD1, semnale celulare, stresul celular, creșterea permeabilității membranelor mitocondriale și efluxul subsecvent de citocrom c, cuplarea liganzilor la receptor, activarea caspazelor, exprimarea genelor tanatogene, depleția semnalelor pozitive (NGF, interleukina-2), recepționarea de semnale negative (creșterea nivelului intracelular al oxidanților), leziunile produse la nivelul moleculelor ADN.

### 3.4. APOPTOZA ȘI PATOLOGIA UMANĂ.

Diferite boli umane se asociază cu inhibiția apoptozei sau cu apoptoza excesivă.

- În unele **cancere**, expansiunea populațiilor celulare maligne se datorează, cel puțin în fazele de început, nu proliferării excesive, ci *prelungirii duratei de viață* a elementelor componente, devenite refractare la semnalele apoptotice. Activarea protooncogenei Bcl-2 se produce pe parcursul evoluției multora dintre tumorile umane. Alterările genei p53, prezente în 50-65% din cancerele umane, reduc susceptibilitatea la agenții genotoxici și abrogă răspunsul apoptotic.
- Înlăturarea limfocitelor potențial autoreactive și a surplusului de celule generat în cursul răspunsului imun se realizează prin apoptoză. Dereglările mecanismelor apoptozei și consecutiva persistență în organism a acestor populații limfocitare, pot antrena dezvoltarea unor **boli autoimune**.
- Apoptoza reprezintă un mecanism major de apărare a organismului împotriva **infecțiilor virale**. Integrarea provirusurilor în genomul nuclear declanșează semnale apoptotice în urma cărora celulele infectate își activează endonucleazele care vor produce, pe lângă clivarea propriului ADN, și pe cea a ADN viral. Sinucigându-se, celulele infectate împiedică propagarea virusurilor.
- Rata înaltă a pierderii apoptotice a unor seturi specifice de neuroni constituie trăsătura definitorie a unei serii de **boli neurologice**. În **boala Alzheimer**, deperdiția neuronală a fost considerată a se datora acumulării de beta amiloid cu acțiune proapoptotică. Recent s-a arătat însă că gena stm2 de pe cromozomul 1, înălțată cu forma familială a bolii Alzheimer, codifică o proteină care induce apoptoza neuronală indiferent de prezența peptidului beta-amiloid. Formele familiale cu debut la vârsta adultă ale **sclerozei laterale amiotrofice** se datorează mutațiilor genei care codifică Cu-Zn superoxid dismutaza citosolică (SOD1). În condițiile diminării activității SOD1 consecutivă alterării mutaționale a genei care o codifică, speciile reactive de oxigen vor provoca leziuni ireversibile care, acumulându-se în motoneuroni, îi vor determina să-și activeze programul apoptotic. Potrivit unor date foarte recente, în neuronii pacienților cu **boala Huntington** sunt prezente formele active ale caspazelor 8 și 9, precum și citocrom c citosolic.

Progresele recente în înțelegerea mecanismelor care guvernează moartea celulară programată creează premisele elaborării într-un viitor nu prea îndepărtat a strategiilor terapeutice prin care să se contracareze factorii determinanți ai inhibiției și excesului apoptozei.

## 4. SENESCENTA

Senescenta sau îmbătrânirea este considerată ultima etapă a procesului complex al dezvoltării tuturor organismelor. Senescenta este un proces inexorabil care se referă la o serie de modificări postmaturaționale ce determină diminuarea homeostaziei și creșterea vulnerabilității organismului.

În discuțiile despre senescentă doi parametri importanți sunt durata medie de viață (care se referă la vârsta până la care supraviețuiește 50% din populația studiată) și potențialul maxim de supraviețuire (care se referă la durata de viață maximă a oricărui membru din acea populație sau din cadrul speciei). De-a lungul timpului durata medie de viață a crescut continuu, dar, cu toate acestea, potențialul maxim de supraviețuire rămâne neschimbat. Potențialul maxim de supraviețuire pare să fie specific fiecărei specii, ceea ce implică intervenția unei componente genetice importante în controlul ratei de îmbătrânire.

Astfel, studiul fosilelor umane arată că, în urma cu 50000 de ani, oamenii depășeau rareori vârsta de 40 de ani. Datorită îmbunătățirii condițiilor sanitare care au redus marcat morbiditatea, durata medie de viață a depășit 50 de ani către 1900 iar în prezent este în jur de 80 de ani în țările dezvoltate (70 de ani în România). Femeia cu cea mai îndelungată supraviețuire documentată a fost Jeanne Calment care a murit în Franța la vârsta de 122 de ani în august 1997. Bărbatul cu cea mai îndelungată supraviețuire documentată a fost Cristian Mortensen care a murit în San Francisco în 1998 la vârsta de 115 ani.

Există mai multe teorii care încearcă să explice mecanismele implicate în procesele de îmbătrânire. Ele pot fi grupate în două mari categorii: teoriile evenimentelor stocastice și teoriile evoluționar-genetice. *Teoriile stocastice* consideră senescenta rezultatul unor alterări întâmplătoare ale unor molecule vitale, precum mutațiile ADN ori modificările post-translaționale ale proteinelor. *Teoriile evoluționar-genetice* consideră senescenta drept ultima etapă în cadrul unui program continuu de dezvoltare și maturare care începe în momentul formării zigotului și se finalizează prin decesul individului. Nici una dintre aceste teorii nu este însă capabilă să explice în întregime complexitatea proceselor care au loc în cursul senescentei. Cel mai probabil este că evenimentele genetice sunt dominante în cursul fazei inițiale a vieții, pentru ca ulterior să domine evenimentele stocastice (**figura 14.10**).

Din punct de vedere al evoluției speciei este necesară asigurarea supraviețuirii până la dobândirea capacității reproductive și, ulterior, a celei de a-și îngriji urmașilor, până când aceștia ating la rândul lor capacitatea de a procrea. În acest context există trei categorii de gene care ar putea fi implicate în senescentă: cele care reglează procesele de reparare la nivel somatic, gene cu pleiotropie antagonistă (care îmbunătățesc supraviețuirea sau reproducerea în faza inițială a vieții, dar au efecte dezavantajoase asupra longevității – exemplu genele implicate în sinteza testosteronului) și gene specifice fiecărei specii asupra cărora acționează mutații ce apar târziu în cursul vieții și pentru care există o presiune evolutivă redusă. Pe de altă parte, teoriile stocastice susțin că senescenta este determinată de acumularea unor leziuni întâmplătoare până la nivele suficiente pentru a determina declinul unor procese fiziologice, caracteristic îmbătrânirii.

### 4.1. MECANISMELE ÎMBĂTRÂNIRII

Următoarele mecanisme celulare și moleculare sunt considerate esențiale în generarea proceselor de îmbătrânire:

- *Scurtarea progresivă a telomerelor*, o dată cu fiecare diviziune, duce la oprirea ciclului celular după un anumit număr de duplicări, ca un mecanism de "numărare" a diviziunilor celulare. Scurtarea excesivă poate determina deleția unor gene esențiale pentru supraviețuire și ca urmare atingerea unei dimensiuni critice care nu mai permite ulterior proliferarea și care



determină moartea celulară (vezi capitolul 5).

- *Mutații ale genelor de inactivare a transcripției* duc la sinteza unor proteine ce nu se încadrează în economia celulară corespunzătoare aceluși moment (sunt sintetizate numai în anumite perioade ale vieții) sau chiar a unor proteine anormale ce determină pierderea funcției celulare.
- *Acumularea mutațiilor* în molecula ADN fie prin erori de replicare fie prin mutații induse, precum și defectele separării cromosomilor în cursul diviziunii pot duce la oprirea progresiei prin ciclul celular, deci a proliferării.
- *Modificări calitative și cantitative ale expresiei ADN ribosomal* ce duc la limitarea transcripției secvențelor repetitive ADN<sub>r</sub> sau la micșorarea secvenței respective copiate, datorită hiperrecombinărilor declanșate prin mutații ale topoizomerazelor sau helicazelor. Consecința este scăderea numărului de ribozomi și implicit a sintezei de proteine urmată de apariția unui fenotip senescent.

**Acumularea mutațiilor la nivelul ADN.** Pe parcursul vieții se produc numeroase mutații la nivel somatic. Aceste mutații au surse variate și sunt reparate prin intervenția unor mecanisme complexe (vezi capitolul 6). O parte dintre aceste mutații rămân însă nereparate, iar acumularea lor progresivă poate atinge un "prag" care corespunde apariției modificărilor morfo-funcționale caracteristice senescenței. În plus, este posibil ca însăși mecanismele de reparare ale leziunilor ADN să sufere un declin treptat, o dată cu îmbătrânirea.

O dimensiune cu totul particulară o prezintă *acumularea mutațiilor la nivelul ADN<sub>mt</sub>*. Principala sursă a mutațiilor la acest nivel sunt speciile reactive de oxigen care apar în cursul metabolismului aerob (radicalul superoxid, peroxidul de hidrogen și radicalul hidroxil). Mutațiile ADN<sub>mt</sub> au drept rezultat reducerea treptată a capacităților bioenergetice, ceea ce poate conduce eventual la senescența și moartea celulară. Pe de altă parte, restricția calorică sau o serie de agenți care reduc stress-ul oxidativ, precum coenzima Q10, tocoferolul, nicotinamida sau acidul ascorbic s-au dovedit în unele studii epidemiologice a avea efecte benefice asupra longevității. Există numeroase dovezi care atestă acumularea exponențială, în paralel cu înaintarea în vârstă, a mutațiilor ADN<sub>mt</sub> induse de radicalii liberi de oxigen, în special la nivelul mușchilor scheletici, cordului și creierului. Asemenea mutații par să aibă un rol important în patogenia unor boli asociate senescenței, cum sunt precum boala Alzheimer, boala Parkinson ori coreea Huntington, precum și în numeroase miopatii scheletice și cardiace.

Există unele date care atestă existența unei asocieri între anumite variante ale ADN<sub>mt</sub> și longevitate. Astfel, așa-numitul haplotip "J" a fost găsit într-un procent semnificativ mai mare la centenarieni decât la subiecții tineri. Același haplotip mitocondrial pare însă paradoxal a fi asociat și unor boli multifactoriale, ceea ce duce la ipoteza efectului pleiotropic antagonist al unor gene care exercită efecte defavorabile la indivizii tineri dar asigură o mai bună sănătate la vârste înaintate. Data fiind transmiterea exclusiv maternă a ADN<sub>mt</sub>, în prezent se derulează studii care testează ipoteza determinismului matern al longevității.

## 4.2. GENE ALE LONGEVITĂȚII

Așa cum am precizat deja, există dovezi numeroase că durata maximă de supraviețuire a fiecărei specii este sub control genetic. Cu toate acestea, eritabilitatea nu depășește probabil 35%. În pofida acestei ponderi relativ reduse, o serie de mutații genetice pot afecta însă dramatic procesul de senescență. Studiile efectuate pe organisme inferioare au permis identificarea unor asemenea gene ale longevității. Ele acționează pe diferite căi, precum modularea răspunsului la stres, a statusului nutrițional, creșterea capacității metabolice sau atenuarea genelor care promovează îmbătrânirea. Mutații experimentale ale unor asemenea gene au permis modificarea considerabilă a duratei de viață la aceste specii.

Studiile efectuate la mamifere au permis identificarea unor gene ale sistemului imunitar sau care reglează dezvoltarea glandei hipofizare drept determinanți ai longevității. În plus, o serie

de studii epidemiologice la om au permis asocierea unor variante alelice ale unor gene cu prelungirea supraviețuirii. Printre acestea se numără alela epsilon 2 a apolipoproteinei E sau alela D (deletie) a genei pentru enzima de conversie a angiotensinogenului care au fost găsite mult mai frecvent la centenarieni. O altă dovadă pentru contribuția genetică în determinismul longevității o constituie asocierea familială a indivizilor cu supraviețuire îndelungată. Studiile de înlănțuire în asemenea familii au permis identificarea unui locus la nivelul cromosomului 4 care este asociat în longevitatea excepțională.

Deși nu există nici o boală genetică care să reprezinte o fenocopie exactă a îmbătrânirii normale, sunt cunoscute câteva sindroame precum Hutchinson-Gilford (progeria "clasică" sau "a copilului"), sindromul Werner (progeria "adultului") ori sindromul Down (trisomia 21) care prezintă unele caracteristici de îmbătrânire accelerată (vezi caseta 14.5).

Caseta 14.5.

#### **Sindroame genetice cu îmbătrânire accelerată**

**Sindromul Hutchinson-Gilford** (OMIM 176670) este o afecțiune extrem de rară, transmisă autosomal recesiv, în care manifestările caracteristice îmbătrânirii precoce încep să se dezvolte la câțiva ani de la naștere. Acestea includ ridarea tegumentelor, tulburări de creștere și ateroscleroza avansată, care determină adeseori decesul prin infarct miocardic în jurul vârstei de 30 de ani. Recent, mutații punctiforme ale laminei A, o proteina localizată la nivelul membranei nucleare interne, au fost evidențiate drept cauză a bolii.

**Sindromul Werner** (OMIM 277700) este o afecțiune transmisă autosomal recesiv în care pacienții dezvoltă prematur ateroscleroza, cataractă, intoleranța la glucoză, osteoporoză, încălțunțire precoce, calviție, atrofie cutanată și menopauza. Cu toate acestea ei nu suferă de obicei de boală Alzheimer sau de hipertensiune arterială. Pacienții au de asemeni un risc crescut pentru dezvoltarea tumorilor sarcomatoase și dezvoltă cataracta pe suprafața posterioară a cristalinului și nu la nivelul nucleului pulpos, cum se întâlnește în mod normal la vârstnici. Se asociază și atrofie laringiană și ulceratii ale tegumentelor la nivelul antebratelor și picioarelor. Majoritatea pacienților decedează înaintea vârstei de 50 de ani. Gena responsabilă de producerea sindromului Werner a fost localizată la nivelul cromosomului 8p11-12 și pare a fi o helică implicată în replicarea și repararea ADN. Celulele pacienților cu sindrom Werner prezintă instabilitate cromosomică și rate crescute ale mutațiilor genice și ale recombinărilor cromosomice nonhomologe.

#### 4.3. CONTROLUL SENESCENTEI CELULARE.

Conceptul de senescență celulară a fost fundamentat prin studiile lui Hayflick (1965) pe culturi de fibroblaști umani. El a observat că după o perioadă inițială de proliferare intensă urmează invariabil un declin al capacităților de creștere și proliferare și în final o pierdere completă a acestora. Ca urmare autorul a propus un model conform căruia senescența este un fenomen ce are loc nu numai la nivelul întregului organism, ci și la nivelul fiecărei celule componente; pierderea capacităților funcționale ale individului în cursul îmbătrânirii ar reprezenta suma unor asemenea modificări critice ale celulelor individuale. Este însă important de precizat că celulele senescente, incapabile de replicare, nu mor în mod necesar, ci pot fi menținute în cultură perioade îndelungate de ani de zile. Numărul diviziunilor celulare pare să fie fix și independent de condițiile de cultură și de timpul scurs. Ca urmare, celulele par să aibă un mecanism intrinsec capabil să "numere" diviziunile pe care acestea le suferă.

Acest mecanism de "numărare" a diviziunilor celulare pare să fie strâns corelat cu fenomenul de scurtare a telomerelor cromosomilor (vezi capitolul 5). Odată cu fiecare diviziune celulară, telomerele celulelor care nu au activă telomeraza se scurtează progresiv până la

atingerea unei dimensiuni critice care nu mai permite ulterior proliferarea celulară. Un rol important în controlul senescentei celulare îl au de asemeni unele gene implicate și în controlul desfășurării ciclului celular precum TP53 și RB.

### **Apoptoza și senescenta.**

În prim-planul aspectelor biologice ale îmbătrânirii se situează depopularea progresivă a țesuturilor și organelor, evidentă cu precădere la nivelul pielii, mușchilor, oaselor și sistemului nervos central. La scăderea densității celulare a țesuturilor în reînnoire continuă (epiteliile cutanate și ale tubului digestiv, țesuturi hematoformatoare) sau ocazională (epiteliul hepatic, renal) contribuie atât declinul activității proliferative, cât și pierderile excesive datorate creșterii ratei apoptozei. De rarefierea organelor alcătuite din celule lipsite de competență replicativă (sistem nervos, miocard, mușchi scheletici) se fac răspunzătoare exclusiv pierderile prin apoptoză.

Cauzele activării programului apoptotic în celulele organismelor senescente sunt multiple. În vederea sistematizării lor este operațional ca apoptoza să fie clasificată în normală, abuzivă și aberantă.

*Apoptoza normală* înlătură celulele devenite disfuncționale sau potențial nocive datorită leziunilor ADN pe care le-au acumulat în cursul vieții. Leziunile rezultă din interacțiunea cu agenții genotoxici prezenți în mediul extern și intern, și la care celulele sunt expuse permanent dar, mai ales, din erorile inerente desfășurării proceselor de replicare, recombinare și reparare a ADN. În acest context este necesar să se insiste asupra faptului că nici unul dintre aceste procese nu este exceptat de greșeli. Ca urmare, în genom se acumulează leziuni spontane într-un număr care îl depășește de câteva ori pe cel al leziunilor induse de factorii ambientali. Dacă rămân nereparate, aceste leziuni determină eliminarea apoptotică a celulelor purtătoare și implicita depopulare a țesuturilor. Reparate greșit, ele pot fi convertite în mutații, dintre care unele, dotate cu potențial transformant, vor iniția dezvoltarea tumorilor.

*Apoptoza abuzivă* este termenul utilizat pentru a defini modalitatea eliminării din populația globală a unor cohorte din ce în ce mai numeroase de celule normale cărora organismul senescent nu le mai poate asigura necesarul de factori de creștere și supraviețuire. În condițiile de criză determinate de incapacitatea în continuă accentuare a furnizării unor cantități suficiente de factori indispensabili supraviețuirii, unele dintre celulele normale își activează programul apoptotic și mor. Celulele restante vor beneficia astfel de "rații" suplimentare care le vor permite să-și desfășoare, cel puțin pentru un timp, activitățile specifice. Comportamentul "altruist" al celulelor care aleg calea sinuciderii nu este însă de natură să rezolve criza ci, dimpotrivă, contribuie la agravarea ei, deoarece unele dintre aceste celule sunt, ele însele, producătoare de factori de supraviețuire pentru alte tipuri celulare.

Apoptoza abuzivă răspunde, de pildă, de involuția glandelor mamare și a uterului, inițiate în cursul menopauzei ca urmare a diminuării concentrației de sexosteroizi. Deficitul de androgeni la bărbații vârstnici antrenează moartea apoptotică în diferite țesuturi, ceea ce explică atrofierea organelor, a pielii și liza musculară. Declinul care are loc în paralel cu înaintarea în vârstă în sinteza unor factori cu efecte pleiotrope, cum sunt hormonul de creștere și tipul 1 al factorului de creștere similar insulinei, determină reducerea cantității de semnale necesare supraviețuirii și implicita depopulare prin apoptoza abuzivă a majorității țesuturilor.

Apoptoza consecutivă privării de factori trofici se face răspunzătoare de rarefierea progresivă, asociată cu senescenta, a țesutului nervos. Supraviețuirea neuronilor este condiționată de furnizarea continuă a factorilor neurotrofici (NGF), care acționează suprimând semnalul declanșator al apoptozei. Incapacitatea neuronilor senescenti de a elabora cantități suficiente de NGF va antrena moartea în lanț a elementelor de la care primesc aferențe prin intermediul sinapselor. Viabilitatea diferitelor tipuri de celule gliale depinde, la rândul ei, de prezența unor factori trofici. Diminuarea, pe măsura înaintării în vârstă, a cantității de factori neurotrofici

reprezintă, prin urmare, cauza și, totodată, efectul depopulării masive a organelor nervoase.

Senescența se însoțește de alterări ale funcțiilor imunitare exprimate prin scăderea răspunsului imun, pierderea memoriei imunologice și creșterea toleranței imunologice. Aceste disfuncționalități au fost atribuite, printre altele, apoptozei excesive a limfocitelor T, consecutivă carenței în interleukină-2 (IL-2). Deperdiția, prin apoptoză abuzivă, a limfocitelor T normale limitează posibilitatea organismului îmbătrânit de a răspunde adecvat la stimulii antigenici.

*Apoptoza aberantă* este rezultatul uzurii pe care o suferă, în timp, diferitele componente ale circuitelor de transducție a semnalelor extracelulare. Deteriorarea unui releu al acestor circuite poate bloca transmiterea semnalelor de supraviețuire sau poate determina activarea spontană, în lipsa stimulilor apoptotici a programului intrinsec al morții celulare. Mai mult decât atât, ca urmare a deteriorării releelor, un semnal stimulator al proliferării poate fi convertit în unul tanatogen; faptul este explicabil deoarece transducția semnalelor proliferării și apoptozei se realizează pe căi strâns intricate, alcătuite din elemente aflate sub controlul unor acelorași gene.

## B. ANOMALIILE CONGENITALE

De la concepție și până la naștere se pot produce la embrion și făt diferite defecte morfologice, funcționale și biochimice. Ele sunt reunite într-un grup patologic foarte larg denumit **defecte congenitale** (*“birth defects”*). Termenul *congenital* semnifică *“prezent la naștere”* indiferent dacă defectul este vizibil/identificat sau nu în această perioadă (OMS,1972). Categoria defectelor congenitale cuprinde: bolile genetice (inclusiv erorile înăscute de metabolism), anomaliile congenitale (ca defecte morfologice), întârzierea creșterii intrauterine idiopatice, fetopatiile tumorile congenitale, etc.

**Anomaliile congenitale** sunt modificări *morfologice* (structurale) ale unui organ, parte de organ sau regiune anatomică produse de tulburări de *dezvoltare prenatală* (erori de morfogeneză), *prezente la naștere*, evidente (depistate) sau nu în această perioadă.

Anomaliile congenitale sunt cauze comune de morbiditate și mortalitate, în special în copilărie. Datorită frecvenței ridicate (3-5% nou-născuți), consecințelor deseori grave și posibilităților reale de profilaxie, *anomaliile congenitale sunt o problemă majoră de sănătate publică*. În acest context este util de precizat că 25% dintre copiii cu anomalii congenitale decedază (majoritatea în primul an de viață), un sfert dintre ei vor avea un handicap fizic sau psihic major iar restul (50%) au un prognostic bun după intervenții chirurgicale „reparatorii”.

Abordarea practică eficientă a anomaliilor congenitale implică prevenția și diagnosticul lor precoce (prenatal sau neonatal), corect și complet. Ambele acțiuni necesită însă cunoștințe etiopatogenice, abilitate clinică și mijloace adecvate de explorare.

### 1. CLASIFICAREA ANOMALIILOR CONGENITALE.

#### 1.1 CLASIFICAREA PATOGENICĂ

Anomaliile congenitale se clasifică după *natura erorii de morfogeneză* în patru tipuri: malformații, disrupții, deformații și displazii congenitale (Spranger et al, 1982).

**a. Malformațiile congenitale**<sup>5</sup> sunt anomaliile congenitale produse printr-un proces *primar, intrinsec și precoce* de dezvoltare (morfogeneză) anormală. Organul nu se dezvoltă normal (dar țesuturile componente sunt normale) fie datorită unei *diferențieri incomplete*<sup>6</sup>

<sup>5</sup> De remarcat că termenul de “malformații congenitale” este mai restrictiv, mai limitat, decât cel de anomalii congenitale.

<sup>6</sup> Morfogeneza incompletă interesează procesele de: *închidere* (despicăturile), *separare* (sindactilia), *septare* (DSA,

(procesul de morfogeneză nu se termină; de exemplu, DSV, sindactilia etc) fie unei *diferențieri anormale* (morfogeneza decurge anormal; de exemplu, polidactilia).

Malformațiile congenitale se produc precoce în cursul dezvoltării embrionare (15-60 de zile<sup>7</sup>) (“*embrioptii*”) și pot fi izolate (unice sau complexe) – implicând un singur organ – sau multiple, afectând cel puțin două organe diferite. Foarte rar se produc în perioada fetală (de exemplu, despicăturile palatine) sau perinatală (de exemplu, persistența canalului arterial). În funcție de consecințele medicale și sociale sau cosmetice, malformațiile pot fi majore (2-3% nou-născuți) sau minore

**b. Disrupțiile congenitale** sunt anomaliile congenitale produse prin alterarea sau distrugerea *secundară, extrinsecă și tardivă* (fetopatii) a unei structuri fetale formată normal. (de exemplu, amputațiile digitale, atreziile). Procesele distructive produc modificări de formă, configurație, diviziuni sau fuziuni neobișnuite, pierderi ale unor părți componente.

Disrupțiile sunt determinate de agenți extrinseci – ischemie, infecții, forțe mecanice (bride amniotice) – care distrug structuri embrionare normale, prin compresie și/sau necroză (consecutivă unor tromboze, embolii, compresiuni). Prin definiție o disrupție nu este genetică deși uneori factorii genetici pot predispuce la evenimente disruptive (de exemplu, defecte ale colagenului care reduc rezistența amniosului și îl fac mai vulnerabil la rupturi spontane).

După naștere este dificil de stabilit dacă o anumită anomalie congenitală este o malformație (“primară”) sau o disrupție (“secundară”) (de exemplu, cataracta congenitală poate fi o malformație produsă de mutații diferite sau o disrupție, produsă de agenți teratogeni). De obicei disrupțiile se exprimă prin anomalii congenitale multiple.

**c. Deformațiile congenitale** sunt anomalii de formă sau poziție a unei părți a corpului produse prin compresia și deformarea unei regiuni normal formate ca morfologie și structură (fetopatie). Deformațiile interesează sistemul musculo-scheletic<sup>8</sup> și produc pierderea simetriei, alterarea alinierii, distorsionarea configurației, poziția anormală a unor structuri; sunt determinate de cauze multiple care produc *limitarea spațiului uterin și/sau inabilitatea de mișcare* (uter mic/malformat, făt mare sau sarcină gemelară, oligohidramnios). De obicei compresia este *extrinsecă* (de exemplu, picior strâmb prin oligohidramnios) dar mai rar, cauzele pot fi *intrinseci* (imobilitate fetală prin anomalii ale SNC sau boli musculare; de exemplu, picior strâmb prin meningocel); în această situație se asociază frecvent dar neobligatoriu cu *artrogripoză*. Spre deosebire de malformații și disrupții, deformațiile pot fi reversibile (dacă încetează compresia), spontan sau după manevre ortopedice

**d. Displaziile congenitale** sunt anomalii congenitale, localizate sau generalizate, determinate de organizarea celulară anormală a unui țesut (dishistiogeneză). De obicei, efectele displaziei se observă în toate structurile corpului în care se găsește țesutul respectiv. De exemplu, displaziile scheletice interesează frecvent toate piesele osoase iar displaziile ectodermale afectează toate țesuturile de origine ectodermică: piele, păr, unghii, dinți. Displaziile sunt determinate de obicei de mutații monogenice și au deci un risc mare de recurență.

Clasificarea anomaliilor congenitale în una din cele patru categorii patogenice este importantă pentru *evaluarea corectă a prognosticului* (malformațiile și disrupțiile sunt ireversibile, se corectează numai chirurgical și au o mortalitate ridicată; în schimb, majoritatea deformațiilor sunt reversibile, se corectează spontan) precum și pentru *stabilirea riscului genetic*

---

DSV), *migrare* (extrofia de cloacă), *rotație* (malrotația intestinală), *rezorbție* (atrezia coanală, diverticulul Mackel). În această categorie se includ și *agenesia* (absența unui mugure embrionar), *aplazia sau hipoplazia* (dezvoltarea / diferențierea incompletă a unui mugure embrionar)

<sup>7</sup> Pentru cele mai multe structuri organogeneza se încheie la 8 săptămâni după fecundare (excepție fac creierul, organele genitale externe, dinții)

<sup>8</sup> Deformațiile nu implică defecte tisulare dar țesuturile cu structură anormală sunt mai susceptibile la deformare.

de recurență (malformațiile unice au un risc mic, 3%; disrupțiile sau deformațiile produse de agenți externi au un risc practic nul, dacă se corijează cauza; displaziile fiind determinate monogenic, au un risc mare de recurență).

Din păcate, nu este întotdeauna posibilă încadrarea unei anomalii congenitale în una din cele patru categorii specifice, acestea putând a avea diferite grade de suprapunere:

- unele anomalii congenitale pot fi, în funcție de natura agentului inițiator, malformații sau deformații; de exemplu secvența Pierre-Robin este malformativă în trisomia 18 și deformativă, prin compresie mecanică extrinsecă; aplazia radială poate fi o malformație (asociată cu anomalii cardiace în cazul sindromului Holt-Oram, produs de mutația genei TBX5) sau o disrupție, cauzată de talidomidă;
- un același mecanism (de exemplu, ruptura amniotică) poate da anomalii congenitale diferite: malformații (despicătură palatină) sau disrupții (amputații digitale) – prin bride amniotice – și picior strâmb, prin oligohidramnios;
- o malformație poate produce secundar deformații (de exemplu, meningomielocele se poate asocia cu piciorul strâmb congenital);

Atunci când nu se poate face distincția între diferite categorii (de exemplu, între malformații și disrupții) sau nu se poate stabili exact tipul de anomalie se preferă termenul mai larg de anomalii congenitale.

## 1.2. CLASIFICAREA CLINICĂ

Clasificarea anomaliilor congenitale după manifestarea clinică este foarte importantă pentru un diagnostic corect și complet. În funcție de numărul și tipul erorilor ce se produc în morfogeneza se deosebesc anomalii congenitale izolate și multiple.

**a. Anomaliile congenitale izolate** (simple) se produc printr-o eroare unică și localizată în morfogeneza unui *câmp (unitate) de dezvoltare embrionară* (monotopic – când generează mai multe structuri adiacente, vecine, sau politopic – când produc structuri multiple situate la distanță unele de altele). Se împart în două categorii: *defecte de câmp de dezvoltare*<sup>9</sup> și *secvențe*.

- *Defectele de câmp monotopic* includ anomaliile congenitale *unice* (o singură manifestare, de exemplu DSV), precum și anomaliile congenitale *complexe* (mai multe anomalii într-un organ; de exemplu DSA+DSV sau tetralogia Fallot etc.
- *Defectele de câmp politopic* sunt anomalii congenitale multiple ce derivă totuși dintr-un singur câmp de dezvoltare; de exemplu defectele arcurilor branhiale 1 și 2 produc sindromul facio-auriculo-vertebral iar defectele arcurilor branhiale 3 și 4 determină sindromul velo-cardio-facial (ce include și varianta DiGeorge); alte exemple: holoprosencefalia (vezi caseta 14.1), neurocristopatiile etc.
- *Secvențele* sunt aparent anomalii congenitale multiple dar în aceste cazuri o anomalie primară determină în cascadă anomalii secundare. Secvențele pot fi malformative, deformative și disruptive:
  - *secvența malformativă* Pierre-Robin se caracterizează prin hipoplazia mandibulei (micrognație) care produce secundar ascensionarea poziției limbii, împiedecând închiderea palatului și producând despicătură palatină și glosoptoză;
  - *secvența deformativă* Potter este determinată de oligohidramniosul produs fie prin pierderea cronică de lichid amniotic, fie printr-o malformație urinară; acesta conduce secundar la o compresie fetală – cu dismorfie facială, luxație congenitală de șold, picior strâmb congenital –

---

<sup>9</sup> Trebuie să arătăm că folosirea noțiunii de câmp de dezvoltare, pentru a explica de ce mai multe malformații se întâlnesc împreună, este destul de dificilă și necesită cunoștințe solide de topografie embrionară; în plus, nu aduce prea multe clarificări patogenice. Pentru practician, termenii de malformații unice, complexe și secvențe sunt suficient de clari și utili.

și hipoplazie pulmonară;

- *secvența disruptivă* prin benzi amniotice care produc amputații digitale, despicăături faciale bizare, encefalocel asimetric etc).

**b. Anomaliile congenitale multiple** sunt produse prin erori multiple de morfogeneză. Se pot împărți în trei categorii:

- *Sindroamele plurimalformative* grupează mai multe anomalii congenitale majore și/sau minore *corelate* între ele printr-o etiopatogenie comună. Un sindrom dismorfic sau plurimalformativ este o combinație caracteristică de anomalii congenitale majore și minore observate împreună, într-un mod predictibil, la mai mulți pacienți în familii diferite și, uneori, în aceeași familie; ele au foarte probabil o cauză sau un mecanism comun de producere. Pe această bază se deosebesc *sindroame cromosomice* (sindromul Down), *monogenice* (sindromul Marfan), *teratogene* (sindromul alcool fetal); există și sindroame care pot fi “recunoscute clinic” printr-o combinație specifică de semne și simptome dar care, pentru moment, rămân neelucidate etiopatogenic (sindromul Brachmann de Lange, caracterizat prin hipostatură, micromelie, dismorfie facială caracteristică). Elementele componente ale unui sindrom sunt nespecifice (pot fi prezente și în alte sindroame și pot avea cauze diferite) și rareori una dintre anomalii duce la diagnostic; combinația este unică și nu părțile sale.
- *Asociații malformative* în care mai multe malformații tind să se întâlnească mai frecvent împreună decât ar rezulta prin „jocul” întâmplării, deci se asociază “nealeatoriu”, fără a putea fi (încă) corelate patogenic între ele (precum în cazul sindroamelor). Numele asociațiilor este adesea un acronim alcătuit prin alăturarea primelor litere ale organelor implicate sau anomaliilor asociate (denumite în limba engleză).
  - Asociația VATER reunește anomalii Vertebrale, Anale, Traheo-Esofagiene, Renale, – dar rareori sunt prezente toate aceste componente iar uneori se adaugă malformații Cardiace, ale membrelor (Limbs) sau arteră ombilicală unică (Single) astfel că acronimul poate deveni VACTERLS.
  - Asociația MURCS constă în asocierea neîntâmplătoare a următoarelor anomalii congenitale, denumite în engleză: müllerian ducts aplasia, renal aplasia, cervicothoracic somite dysplasia.
  - Asociația CHARGE include următoarele anomalii, denumite în engleză: coloboma, hear disease, atresia choanae, retarded growth and development, genital anomalies.

Probabil studiile viitoare vor putea identifica o bază comună pentru asocierea malformativă. Delimitarea lor într-un grup distinct are și rațiuni practice: identificarea unei (unor) malformații caracteristice asocierii implică căutarea prezenței celorlalte componente malformative.

- *Anomalii congenitale multiple* rezultat al combinației întâmplătoare a unor anomalii cu frecvență individuală mare. Dacă nu se poate face un diagnostic specific de sindrom sau asociere, în cazul unui pacient cu anomalii congenitale multiple este util a se folosi, simplu, această denumire (ACM ± retard mintal) în locul termenului de “sindrom plurimalformativ” atât de des uzitat.

### 1.3. CLASIFICAREA ANOMALIILOR CONGENITALE DUPĂ GRAVITATE

Acest tip de clasificare permite evaluarea corectă a prognosticului și nivelului îngrijirilor medicale. Se disting: anomalii congenitale *letale* (anencefalia), *majore* (omfalocelul), *medii* (testiculul necoborât) și *minore* (urechi jos implantate); primele trei categorii mai sunt denumite, împreună, anomalii majore pentru a fi deosebite de anomaliile minore.

**a. Anomaliile minore** nu au consecințe medicale sau cosmetice serioase pentru pacient și pot fi considerate variante populaționale (etnice), familiale sau individuale ale unui caracter

normal. Sunt numeroase (peste 60) și 2/3 interesează capul, fața și membrele (tabelul 14.4). Sunt frecvente la nou născuți (circa 15% au o anomalie minoră), mai ales la prematuri sau dismaturi (20-35%). Unele anomalii minore dispar în copilărie, ca urmare a creșterii structurilor.

Prezența mai multor anomalii minore poate fi însă un *indicator* prețios al perturbării nespecifice a morfogenezei (inclusiv a SNC, în debilitatea mintală idiopatică) și impun căutarea atentă a unei malformații viscerale majore. De altfel, multe sindroame plurimalformative sunt caracterizate prin *combinații specifice* de anomalii minore.

**Tabel 14.4. Anomaliile minore**

<p><b>Craniu și scalp</b>  <i>Vârtej pilar triplu</i>  <i>Vârtej pilar absent</i>  <i>Sutură metopică evidentă</i>  <i>Fontanelă sagitală</i>  <i>Fontanelă sagitală</i>  <i>Foramen parietal</i>  <i>Occiput turtit</i>  <i>Occiput proeminent</i>  <i>Bose frontale</i>  <i>Sprâncene plate</i></p> <p><b>Urechi</b>  <i>Tubercul Darwinian</i>  <i>Unghi Darwinian</i>  <i>Absența plierii helixului</i>  <i>Conca cu punți</i>  <i>Șanț pe lobul</i>  <i>Creastă pe lobul</i>  <i>Urechi "pleoștite"</i>  <i>Urechi în cupă</i>  <i>Urechi retroversate</i>  <i>Helix îngroșat</i></p>	<p><i>Helix rulat excesiv</i>  <i>Helix atașat la scalp</i></p> <p><b>Sinusuri</b>  <i>Branhial</i>  <i>Preauricular</i>  <i>Pe lobul</i>  <i>Helical</i>  <i>Pilonidal</i></p> <p><b>Față și gât</b>  <i>Sinofris</i>  <i>Epicantus</i>  <i>Iris pestriț</i>  <i>Fante palpebrale oblice în sus sau în jos</i>  <i>Fante palpebrale scurte</i>  <i>Hipertelorism</i>  <i>Hipotelorism</i>  <i>Ptoză</i>  <i>Rădăcina nasului turtită</i>  <i>Narine antevertate</i>  <i>Sept nazal lung</i>  <i>Filtrum scurt/lung</i></p>	<p><i>Filtrum neted</i>  <i>Microstomie</i>  <i>Macrostomie</i>  <i>Despicătură labială –</i>  <i>Microformă</i>  <i>Despicătură gingivală</i>  <i>Macroglosie</i>  <i>Microglosie</i>  <i>Uvulă bifidă</i>  <i>Creastă alveolară lată</i>  <i>Micrognatie</i>  <i>Piele redundantă pe ceafă</i>  <i>Pterigium coli</i></p> <p><b>Piele</b>  <i>Gropițe pe umăr</i>  <i>Gropițe scarate</i>  <i>Gropițe pe alte oase</i>  <i>Pliu palmar unic</i>  <i>Pliu unic pe degetul V</i>  <i>Pliu plantar</i>  <i>Apendici cutanați</i>  <i>Hemangioame</i></p>	<p><i>Nevi</i>  <i>Pete hiperpigmentate</i>  <i>Pete hipopigmentate</i></p> <p><b>Trunchi</b>  <i>Mameloane supranumerare</i>  <i>Arteră ombilicală unică</i>  <i>Hernie ombilicală</i>  <i>Diastasis al mușchilor dreپți abdominali</i>  <i>Hipospadias glandular</i>  <i>Scrot în șal</i>  <i>Apendice vaginal</i></p> <p><b>Membre</b>  <i>Cubitus valgus</i>  <i>Degete conice</i>  <i>Degete încălecate</i>  <i>Police/haluce lat</i>  <i>Clinodactilie</i>  <i>Unghii hipoplazice</i>  <i>Unghii hiperconvexe</i>  <i>Spații mari între degete la picior</i>  <i>Calcaneu proeminent</i></p>
--	---	---	--

## 2. CAUZELE ANOMALIILOR CONGENITALE.

Identificarea etiologiei anomaliilor congenitale este un obiectiv important pentru profilaxie și sfat genetic. Problema nu este de loc simplă deoarece:

- determinarea cauzelor este dificilă,
- există o *heterogenitate etiologică*,
- o anumită malformație congenitală poate avea cauze diferite,
- în circa 50% dintre anomalii congenitale nu se cunoaște, încă, determinismul cauzal.

Cauzele cunoscute sunt genetice (~45%) și negenetice (~5%). Rezultă că în mod contrar cu ceea ce se crede public *factorii mediului ambient au la om o contribuție mică* la producerea anomaliilor congenitale. Totuși, cunoașterea și identificarea lor are consecințe practice importante pentru profilaxie.

### 2.1. CAUZELE NEGENETICE

Un agent extern care produce o anomalie congenitală, prin interferarea dezvoltării embrionare și fetale este numit *teratogen*. Efectele potențiale ale oricărui agent teratogen vor depinde de *doză* și, mai ales, de *timpul* când a fost administrat în cursul sarcinii. Se știe că fiecare organ are o perioadă critică, de maximă vulnerabilitate, și că există un veritabil „orar embrionar”, ce corespunde perioadei de formare a organelor (figura 14.11). Un alt factor care influențează acțiunea teratogenilor îl reprezintă *susceptibilitatea* (reactivitatea) genetică a mamei și/sau



fătului, care explică de ce nu se produc întotdeauna malformații după o expunere teratogenă.

Agenții externi cu risc mare de teratogeneză, cum ar fi talidomida sau virusul rubeolic, pot fi identificați ușor. Din nefericire, mulți teratogeni cu efecte mici sunt mult mai greu de identificat. Iar studiile experimentale pe animale nu pot fi extrapolate la om, deoarece fiecare specie are susceptibilități diferite.

**a. Agenții biologici** sunt reprezentați în special de: virusurile rubeolic, citomegalic, herpetic, varicela; parazitul *Toxoplasma gondii* și spirocheta *Treponema pallidum*. Toți sunt cert teratogeni dar efectul lor este variabil (tabelul 14.5). Se apreciază că, global, infecțiile sunt responsabile de circa 2% din anomaliile congenitale. Intervenția unor posibili agenți infecțioși în geneza malformațiilor congenitale se poate explora prin testul TORCH (de la *Toxoplasmosis; Other – de ex., sifilis; Rubella; Cytomegalovirus; Herpes*).

**Tabelul 14.5. Infecții cu efecte teratogene certe**

Infecție	Efecte
Rubeola	Microcefalie, cataractă, retinită, malformații cardiace
Citomegalovirus	Corioretinită, surditate, microcefalie
Herpes simplex	Microcefalie, microftalmie
Varicela zoster	Microcefalie, malformații oculare, digitale, defecte cutanate
Treponema	Hidrocefalie, osteite
Toxoplasmoza	Microcefalie / hidrocefalie, cataractă, corioretinită, surditate

**b. Agenții chimici.** Deși se cunosc peste 50.000 de substanțe chimice, numai 25 s-au dovedit a fi teratogene (tabelul 14.6) la om și ele produc circa 2% din toate anomaliile congenitale. Dintre drogurile teratogene cităm: alcoolul, anticonvulsivantele (fenitoina, carbamazepina), citostaticele, unele anticoagulante (warfarina), androgenii și progestinele sintetice, retinoizii, litiul, talidomida etc. Am plasat pe primul loc alcoolul deoarece alcoolismul cronic matern este încă relativ frecvent și efectele nocive fetale sunt certe (caseta 14.6); după unii autori alcoolismul fetal este una din cauzele majore ale retardului mental și ale tulburărilor de comportament. Mai subliniem faptul ca deseori părinții unui copil cu anomalii congenitale invocă în producerea defectului expunerii din mediul înconjurător dar ei pot fi asigurați că numai un singur agent chimic – mercurul metilic – s-a dovedit a fi teratogen.

**Tabelul 14.6. Droguri cu efecte teratogene certe**

Drog	Efecte
Inhibitori ECA	Disgenezie renală, oligohidramnios, defecte de osificare ale craniului
Alcool	Dismorfie cranio-facială, malformații cardiace, microcefalie și anomalii ale SNC,
Aminopterina	Dismorfie cranio-facială, DTN, craniosinostoză, malformații membre
Androgeni/norprogesteron	Masculinizare organe genitale externe
Carbamazepina	Spina bifida
Diethylstilbestrol	Malformații uterine, adenocarcinom vaginal, infertilitate masculină
Fluconazol (doze mari)	Malformații craniofaciale, membre

Hidantoina	Malformații cardiace și digitale
Litium	Malformații cardiace (anomalie Ebstein)
Methotrexat	Craniosinostoză, malformații membre
Penicilamina	Cutis laxa
Fenitoina	Malformații cardiace, despicătură palatină, hipoplazie digitală
Retinoizi	Hidrocefalie, malformații auriculare și oculare, absența timus
Streptomicina	Surditate
Tetraciclina	Hipoplazia emailului dentar
Talidomida	Focomelie și alte malformații membre, malformații cardiace
Acidul valproic	DTN, dismorfie cranio-facială
Warfarina	Hipoplazie nazală, epifize punctate

(Surse: Jorde et al, 2000; Wilson, 2000)

**c. Agenții fizici** – radiațiile ionizante, hipertermia prelungită și conformația anormală a uterului – pot avea efecte teratogene.

**d. Starea mamei** – fiziologică (vârsta peste 35 ani, starea de nutriție, deficitul în foliați, echilibrul hormonal) sau patologică (diabet zaharat, fenilcetonurie, lupus eritematos sistemic, boală Graves) – este implicată în circa 1% din anomaliile congenitale.

Deși numărul agenților cert teratogeni este redus iar contribuția lor la producerea unor anomalii congenitale este mică (circa 5%) se recomandă ca orice gravidă să cunoască și să evite în primele 2-3 luni de sarcină orice factor de mediu – biologic, chimic sau fizic – care ar putea interfera morfogeneza normală. Medicii care evaluează un copil cu anomalii congenitale trebuie să acorde o atenție specială istoricului gestațional, mai ales în perioada embrionară de producere a defectului observat la pacient.

Caseta 14.5.

### Sindromul alcool-fetal

*Unul dintre cei mai frecvenți teratogeni la om este alcoolul consumul excesiv. Deși pericolul acestui drog la femeile gravide este cunoscut din antichitate, primul studiu documentat despre alcoolismul fetal apare abia în 1960. Cercetările experimentale pe fetuși de rozătoare și primat au demonstrat că alcoolul administrat în cursul sarcinii produce anomalii cerebrale și microftalmie, a căror gravitate este direct proporțională cu doza și momentul administrării. La om consumul cronic de alcool poate afecta sever nou-născuții – sindromul alcoolismului fetal (FAS de la „Fetal Alcohol syndrome”) – sau parțial (FAE de la „Fetal Alcohol Effect”), care împreună au o incidență de 1-2 la 1000 de nou-născuți.*

*FAS se caracterizează printr-o întârziere a creșterii pre- și postnatale, microcefalie, facies sugestiv (cu fante palpebrale scurte, rădăcina nasului turtită, filtrum neted și scurt, buza superioară subțire și anomalii ale urechii). La aceasta se adaugă inconstant malformații cardiace, renale, oculare. Cei mai mulți copii cu FAS au probleme neuro-comportamentale incluzând un deficit mintal ușor sau moderat (QI=40-65), dificultăți de învățare, hiperactivitate, impulsivitate, deficite neurosenzoriale.*

*Diagnosticul neonatal este dificil și numai 50% din bolnavi sunt diagnosticați până la 3-4 ani. Nu există un marker biochimic sau molecular al expunerii prenatale la alcool și numai istoricul gestațional rămâne o „șansă” de diagnostic, care se validează în mai puțin de 40% din cazuri; anamneza sarcinii este însă dificilă și necesită o abilitate deosebită: discuții cu ambii părinți, evitarea întrebărilor directe, conturarea contextului socio-economic; mama va fi întrebată succesiv dacă a consumat ape minerale carbonatate, bere și/sau vin (deseori considerate a nu fi „băuturi”) și dacă a fumat în cursul sarcinii.*

*Multe probleme legate de folosirea dozelor moderate de alcool în sarcină, predispoziția genetică la FAS, criteriile comportamentale de diagnostic nu sunt încă soluționate dar este cert faptul că expunerea la alcool în cursul gravidității poate fi prevenită*

## 2.2. CAUZELE GENETICE

Cauzele genetice ale anomaliilor congenitale sunt mult mai numeroase (circa 45%) decât cele ecologice și progresele cunoașterii mecanismelor de control genetic al embriogenezei (vezi subcapitolul 14.A) vor duce cu certitudine la amplificarea cunoștințelor în acest domeniu.

- Anomaliile cromosomice neechilibrate (trisomii sau monosomii complete sau parțiale) se întâlnesc la circa 6% din anomaliile congenitale dar foarte probabil aceasta este o subevaluare a fenomenului real determinată de nivelul tehnicilor folosite.
- Mutațiile monogenice sunt responsabile de aproximativ 7,5% dintre anomaliile congenitale izolate (de exemplu: microcefalia – AR, hidrocefalia prin stenoza apeductului Sylvius – XR; polidactilia sau brahidactilia – AD) sau sindromice [de exemplu, sindromul Apert (craniosinostoză, sindactilie) – AD, sindromul Roberts (focomelie, despicătură labială/palatină)– AR].
- Ereditatea multifactorială este implicată în producerea a 20-30% din anomaliile congenitale, în special formele izolate, “non-sindromice”, ale malformațiilor cardiace (DSA, DSV; persistență canal arterial etc), SNC (anencefalie, encefalocel, spina bifida), sistemului genito-urinar (agenezie renală, hipospadias etc) și altele (despicături labio-maxilo-palatine, LCS etc). Anomaliile congenitale multifactoriale au fost tratate pe larg în capitolul 13.B

Cert este că la orice pacient cu anomalii congenitale trebuie făcută o evaluare atentă și cât mai completă a cauzelor genetice (anamneză familială, explorări genetice – vezi capitolul 9.A) deoarece numai pe această bază se poate determina riscul genetic de recurență.

În circa 50% din toate anomaliile congenitale nu se poate stabili în mod clar o cauză precisă; aceasta nu înseamnă că nu pot fi implicați factori genetici, ci numai ca ei nu pot fi identificați. Astfel unele malformații izolate sau sindroame “neexplicabile” pot fi consecința unor mutații noi, a microdelețiilor submicroscopice sau a disomiei uniparentale (vezi capitolele 5.D.3 și 6.B.3); foarte probabil studiile moleculare vor elucidă în curând “enigmele” producerii unui procent mult mai mare de anomalii congenitale. În toate aceste cazuri riscul de recurență este însă foarte mic.

## **3. CONDUITA PRACTICĂ ÎN DIAGNOSTICUL ANOMALIILOR CONGENITALE**

Nașterea unui copil cu dismorfii /anomalii congenitale este pentru părinți un șoc, o dramă. De aceea medicul practician trebuie să dovedească multă compasiune, înțelegere și disponibilitate; el trebuie să rezolve patru probleme: 1) ce are copilul? (diagnostic clinic); 2) din ce cauză (diagnostic etiologic); 3) ce se poate face pentru pacient (tratament) și care este prognosticul lui; 4) ce risc există în familie ca la o altă sarcină evenimentul să se repete (sfat genetic). Elucidarea lor presupune un ansamblu de competențe pe care unii medici de familie sau pediatri nu le au. Prin prioritatea abordării patologiei malformative ei sunt însă obligați să dețină informațiile referitoare la modul general de abordare a celor patru probleme, să le rezolve progresiv în limitele lor de competență și să dirijeze cazurile corect spre alți specialiști. Fără a diminua importanța și sarcinile “medicilor din prima linie” este necesară formarea unor specialiști și a unor Centre specializate de diagnostic care pot rezolva mai competent problemele de diagnostic și sfat genetic (toate aceste probleme au fost discutate pe larg în capitolul 9).

**Conduita diagnostică** se particularizează la fiecare tip de anomalie congenitală dar credem că se pot aplica câteva reguli generale.

1) *Anamneza* (materno-fetală, neonatală și postnatală, familială) va fi detaliată iar *examenul clinic* se va realiza metodic, minuțios și complet. Se vor examina cu atenție toate segmentele, regiunile și organele, înregistrând orice dismorfie și încercând obiectivarea unor semne (prin măsurători, fotografiere). Este necesară cunoașterea perfectă a normalului și variantelor sale, descrierea precisă a tuturor anomaliilor, minore sau majore, folosind o terminologie adecvată (semeiologie malformativă).

2) *Consultarea* altor specialiști (“de organ”) va precede *investigațiile* paraclinice (imagistice, biochimice, hormonale etc) și genetice (cromosomice, moleculare). În final se vor sintetiza și ordona informațiile și rezultatele obținute din diferite surse și se vor analiza pentru a ajunge la un diagnostic corect și complet.

3) *Evaluarea datelor* impune luarea în discuție a unor probleme:

- anomaliile pacientului (inclusiv talia) au debut *prenatal sau postnatal* ?
- pacientul are *una sau mai multe* anomalii congenitale, *majore și/sau minore*?
- anomalia/anomaliile pacientului se încadrează în: *malformații, disrupții, deformații sau displazii*?
- există concomitent o tulburare importantă de creștere (hipostatură, asimetrie), afectare a SNC, visceromegalie, afectare scheletică sau senzorială?
- în cazul unor *anomalii multiple* se poate identifica o *corelație* între ele (anomalii primare sau secundare, localizate sau sistemice) sau un element patogenetic comun (de exemplu, momentul embriologic în care s-au produs)?
- în care din cele șase categorii diagnostice s-ar putea încadra pacientul: 1) malformație izolată sau secvență malformativă; 2) sindrom malformativ; 3) deformație sau secvență deformativă; 4) disrupție sau secvență disruptivă; 5) displazie sau secvență displazică; 6) asociație malformativă;
- anomalia poate avea un determinism genetic sau ar putea fi un sindrom teratogen?

4) *Diagnosticul* este deseori dificil, mai ales în cazul anomaliilor congenitale multiple, deoarece există un număr mare de boli, anomalii și sindroame malformative, greu de cunoscut; în aceste cazuri se va recurge la cărți, algoritmi (vezi caseta 9.3), chei sau scoruri de diagnostic, baze de date accesibile pe CD (POSSUM, LDDDB) sau prin Internet (Orphanet, GeneClinic, OMIM). La aceste dificultăți se adaugă și faptul că fenotipul pacientului poate evolua în timp, făcând mai dificil diagnosticul la adult (în acest caz “albumul din copilărie” ar putea fi un document foarte util).

Un diagnostic corect și complet cere timp, nu trebuie să ne grăbim, chiar dacă părinții sunt nerăbdători. În fond puține cazuri sunt urgente iar diagnosticul nostru este o “sentință” pentru o boală cronică, de “o viață”. De aceea medicul trebuie să aibă opinii rezervate după examenul clinic, să explice părinților elementele cert anormale și semnificația lor și să-i îndemne la răbdare, pentru analiza completă a cazului.

5) Destul de des *nu se poate pune un diagnostic specific*. Desigur că în aceste situații contează experiența clinică, capacitatea de investigare și nivelul de informare al medicului; dar, în cazul bolilor genetice intervin și alte motivații, în primul rând expresivitatea variabilă a bolii la un anumit moment precum și în timp. *Urmărirea* ulterioară a pacientului și cunoașterea cât mai completă a statusului familial se impun cu necesitate în aceste condiții.

6) Evaluarea diagnostică trebuie să se completeze cu evaluarea *prognosticului*, a capacităților de recuperare precum și a *riscului* genetic de recurență.

**Comunicarea datelor** este o etapă importantă pentru familia pacientului. Medicul trebuie să explice simplu dar clar ce are pacientul, natura genetică a bolii, evoluția ei, posibilitățile de recuperare și eventual tratament. Deseori este nevoie de mai multe “ședințe” și este foarte bine ca

datele să fie comunicate și în scris. Problema riscului genetic de recurență și a opțiunilor reproductive se va pune de regulă mai târziu.

#### 4. PROFILAXIA ANOMALIILOR CONGENITALE

**Profilaxia primară** a anomaliilor congenitale se adresează cauzelor cunoscute, negenetice sau genetice. Deși factorii teratogeni din mediu au o contribuție mică (5%) la producerea anomaliilor congenitale, evitarea lor este, în principiu, posibilă. Aceasta presupune o educație sanitară adecvată a cuplurilor tinere și o activitate susținută a medicilor de familie.

Concepția unui copil trebuie să se facă pe baza unui planning familial, de preferat până la 35 de ani, în deplină stare de sănătate a genitorilor. Atunci când acest lucru nu este posibil și femeia suferă de o boală cronică cu risc teratogen (epilepsie, diabet zaharat insulino-dependent, fenilcetonurie ș.a) trebuie luate măsuri adecvate pentru a minimiza efectele teratogene potențiale (modificarea sau reducerea medicației anticonvulsivante, controlul perfect al glicemiei, restricție alimentară de fenilalanină).

O atenție deosebită se acordă în prezent unei suplimentări periconcepționale cu acid folic (400-800  $\mu\text{g}/\text{zi}$ , o lună înainte de concepție și două luni după aceea) care scade incidența DTN cu peste 75%.

Vaccinarea antirubeolică sistematică a tinerelor fete și evitarea agenților infecțioși teratogeni în trimestrul I de sarcină ar putea fi o măsură benefică. La aceasta se adaugă renunțarea la fumat, evitarea băuturilor alcoolice, precum și a administrării neautorizate a oricărui medicament.

În familiile în care există persoane cu anomalii congenitale și boli genetice cuplurile tinere vor fi îndrumate spre un medic genetician ce poate stabili mărimea riscului și posibilitățile reducerii sale. Sfatul genetic este în multe țări o componentă de rutină a sfatului premarital sau preconcepțional.

**Profilaxia secundară** vizează evitarea nașterii unui făt anormal – în special prin diagnostic prenatal (vezi capitolul 18) – precum și depistarea precoce, neonatală, a defectelor congenitale, în scopul prevenirii complicațiilor și realizării unor măsuri medicale adecvate de recuperare.

#### C. SEXUALIZAREA NORMALĂ ȘI PATOLOGICĂ

Unul dintre cele mai fascinante subiecte ale biologiei dezvoltării îl reprezintă procesul de sexualizare. El a fost descifrat în mare măsură reprezentând poate cel mai clar model al geneticii dezvoltării. Cunoștințele actuale privind mecanismele diferențierii sexuale sunt importante teoretic și utile practic pentru diagnosticul corect și managementul eficient al stărilor intersexuale.

Prin sexualizare se înțelege realizarea unui ansamblu de caractere morfologice, funcționale și psiho-comportamentale care contribuie la formarea și fecundarea gameților, dezvoltarea și nașterea unui copil.

Procesul normal de sexualizare se desfășoară în mai multe etape precis coordonate și reglate genetic și umoral (**figura 14.12**). Prima etapă este stabilirea sexului genetic sau cromosomic (XX sau XY), în momentul fecundării. Apoi, prin acțiunea unor gene de sexualizare de pe cromosomii X și Y dar și de pe autosomi, au loc o serie de transformări embriologice secvențiale complexe care, schematic, pot fi grupate în două procese distincte și succesive:

- determinismul sexual (sau diferențierea sexuală primară) care constă în *formarea gonadelor* printr-o serie de evenimente determinate de sexul genetic;
- diferențierea sexuală (sau diferențierea sexuală secundară) care urmează după dezvoltarea gonadelor și duc la formarea *fenotipului sexual*, deci a caracterelor sexuale primare (căile genitale interne, organele genitale externe).

Dezvoltarea sexuală se încheie în cursul vieții fetale. Cu toate acestea, dobândirea capacităților reproductive necesită o serie de modificări fenotipice suplimentare care au loc în cursul pubertății, sunt dependente de hormonii gonadali și vor avea ca rezultat realizarea *caracterelor sexuale secundare*. În același timp, hormonii gonadali sunt responsabili, încă din cursul vieții intrauterine și ulterior în cursul pubertății, de producerea unor modificări morfologie și funcționale la nivel cerebral, care vor conduce la dobândirea sexualității sau a identității și comportamentului sexual.

Înainte de a descrie sintetic procesele embriologice prin care se realizează sexualizarea normală, precum și determinismul lor, considerăm important să subliniem că numeroase date experimentale (la mamifere) și clinice (la om) au demonstrat că *planul embrionar de bază al sexualizării la mamifere și om este înăscut și spontan feminin*. La ambele sexe, toate componentele genitale – de la gonade, la organele genitale externe – se dezvoltă din structuri inițiale ambivalente, *bipotențiale*. La embrionul XY, diferențierea sexuală (primară și secundară) masculină este un proces *activ*, ce implică numeroase molecule (factori de transcripție, hormoni, receptori) care ”comută” programul standard – feminin – al sexualizării pe direcție masculină; la embrionul XX sexualizarea este un proces *spontan și pasiv*, ce se desfășoară fără intervenții biochimice și hormonale majore.

Ar mai fi de remarcat faptul că formarea caracterelor sexuale primare determină un potențial reproductiv ce face posibilă reproducerea numai în cadrul unei sexualități normale (figura 14.12); la specia umană *sexualitatea, ca proces psiho-comportamental, este însă mai importantă ca sexualizarea morfo-funcțională*, deoarece determină o serie de atitudini și aptitudini care influențează decisiv viața fiecărui om.

În fine, trebuie să înțelegem că *diferențierea sexuală are un sens mai larg* decât cel definit mai sus deoarece numeroase fenomene biologice din organism sunt asociate sau influențate de un sex sau altul: de la dezvoltarea embrionară, unele procese metabolice sau formarea și funcționarea unor structuri cerebrale (non-dependente de hormoni), până la ratele diferite de recombinări sau mutații la cele două sexe sau la fenomenul de amprentare genomică.

## 1. EMBRIOLOGIA APARATULUI GENITAL

### 1.1 DETERMINISMUL SEXUAL: FORMAREA GONADELOR

Prima etapă a dezvoltării gonadale este independentă de sexul genetic și constă în formarea **gonadelor primitive, nediferențiate**; aceste structuri bipotențiale au o conformație identică la ambele sexe. Procesul implică parcurgerea a două faze distincte și succesive:

- *formarea primordiilor gonadale* (crestele genitale), în săptămânile 3-4 de gestație, prin condensarea mezodermului situat medial față de mesonefros<sup>10</sup> (precursorul rinichiului) (figura 14-13) și îngroșarea și proliferarea epiteliului celomic, care pătrunde în mezenchimul subiacent, formând *cordoanele sexuale primare*;

<sup>10</sup> Dezvoltarea embrionară reno-urinară, mai ales în primele stadii, este strâns corelată cu dezvoltarea genitală, implicând structuri comune și intervenția unor gene ce influențează ambele procese.

- *migrarea celulelor germinale primordiale* (CGP); acestea se formează, în săptămâna a doua de dezvoltare embrionară, din ectodermul primar al embrionului; apoi, ele se desprind din ectoderm și migrează, prin mișcări ameboide, în aria extraembrionară (sacul galben). În săptămâna a patra, CGP încep să migreze înapoi în embrion, prin mezenterul dorsal al intestinului primitiv, și în săptămâna a cincea populează gonada nediferențiată, unde invadează cordoanele sexuale primare, în curs de formare.

La sfârșitul săptămânii a șasea, gonadele primitive sunt formate dintr-un *cortex extern și o medulară internă*. Ele conțin patru linii celulare (bipotențiale) care vor evolua diferit la cele două sexe.

Cele patru linii celulare sunt: 1) *celulele germinale primordiale* (CGP) – care vor forma spermatogoniile sau ovogoniile; 2) *celulele de susținere a CGP* – care vor genera celulele Sertoli, la embrionul XY, sau celulele foliculare, la embrionul XX; 3) *celulele steroidogene* – care vor produce hormoni sexuali și vor forma celulele Leydig (la embrionul masculin) sau celulele tecale (la embrionul feminin); 4) *celulele conjunctive* – care vor contribui la formarea organului ca întreg, alcătuind celulele mioide peritubulare și vascularizația testiculelor sau celulele stromale în ovare.

Tot în săptămâna a șasea, concomitent cu gonadele primitive, se formează prin invaginarea epiteliului celomic canalele paramesonefrice (Mülleriene), care se plasează lateral față de canalele excretorii ale mesonefrosului (Wolffiene) și se unesc prin capetele lor caudale.

După această fază indiferentă sau ambisexuală, din săptămâna a șaptea evoluția sistemului genital se face pe căi diferite la embrionii XY și XX. Astfel, sub influența unui *factor de transcripție codificat de gena SRY*, începe imediat formarea testiculelor; acest proces este rapid și, la sfârșitul săptămânii a opta, testiculul fetal produce deja hormoni. Dezvoltarea ovarelor se face *în absența proteinei SRY* (sau atunci când aceasta este anormală) și debutează mult mai tardiv, în săptămâna a zecea de gestație. Deci, *planul de bază al dezvoltării gonadale este înăscut și spontan feminin*.

**Formarea testiculelor.** Primul eveniment observabil în dezvoltarea testiculelor este apariția *celulelor primordiale Sertoli*; sub acțiunea proteinei SRY, celulele pre-Sertoli din regiunea medulară a cordoanelor sexuale primitive încep să prolifereze, se adună în jurul celulelor germinale primitive și se diferențiază în celule Sertoli (în acest timp partea corticală a cordoanelor sexuale degenerează) (figura 14.14); celulele Sertoli încep să secrete *hormonul anti-müllerian*<sup>11</sup>, o glicoproteină care acționează paracrin, inducând inhibiția canalelor Müller și stimulând, probabil, formarea celulelor Leydig.

*Celulele germinale primordiale* nu sunt o condiție necesară pentru dezvoltarea testiculelor dar izolarea celulelor germinale în cordoane și contactul direct cu celulele Sertoli le obligă spre *evoluție spermatogenetică*: multiplicarea mitotică este inhibată și astfel se previne (până la pubertate) intrarea celulelor germinale în meioză.

În săptămâna șaptea, celulele Sertoli formează *cordoanele testiculare* (ce vor deveni ulterior tubuli seminiferi); acestea proliferează profund în tesutul conjunctiv din jur, fuzionează între ele la extremitatea lor distală, formând *rete testis* și, în final, vor pierde contactul cu epiteliul de suprafață, fiind separate de acesta prin intermediul tunicii *albuginee* (figura 14.14. A). Cordoanele testiculare sunt necanalizate pe tot parcursul vieții fetale și până la pubertate. În săptămâna a opta celulele mezenchimale din jurul cordoanelor se diferențiază în *celulele Leydig* care vor începe sinteza de testosteron. Dezvoltarea testiculelor este completă la sfârșitul săptămânii a opta de gestație.

**Formarea ovarelor** începe tardiv, după săptămâna a 10-a; până atunci, singurul element care caracterizează ovarul este... absența caracterelor testiculare. Apoi, cordoanele sexuale primare degenerează și din mezoteliul crestei germinale se formează *cordoanele sexuale*

<sup>11</sup> Celulele Sertoli secretă de asemeni inhibina, protejează și hrănesc celulele germinale, sintetizează un factor de legare a androgenilor și inhibă meioza în cursul vieții fetale.

*secundare corticale* (figura 14-14.B). În săptămâna a 16-a, aceste cordoane se fragmentează în grămezi, înglobează celulele germinale primordiale diploide, diferențiate în ovogonii, devenind *foliculi primordiali*<sup>12</sup>; celulele epiteliale din jurul celulelor germinale se vor diferenția în celule granuloase iar celulele mezenchimale externe devin *celulele tecale*, echivalentul celulelor Leydig.

La fetele, celulele germinale primordiale *continuă să prolifereze* prin mitoză și se diferențiază în ovogonii; apoi (săptămâna 11-12) ele intră în prima diviziune meiotică ca *ovocite primare*; atunci când sunt înconjurate de celulele pregranuloase, formând foliculii primordiali, contactul strâns cu celulele foliculare duce la *oprirea meiozei* (în diploten), până la pubertate; o parte din ovogonii nu vor fi incluse în foliculi și mor prin *apoptoză*. Formarea foliculilor primordiali se termină la 6 luni după naștere.

De subliniat două aspecte:

- spre deosebire de fetele XY, la fetele XX formarea ovarelor este dependentă de prezența celulelor germinale; în absența lor, gonada nediferențiată degenerază într-un țesut nefuncțional, fibros, "*streak gonad*".
- dezvoltarea ovarelor este cronologic mai tardivă decât a testiculelor, se termină în luna V-a și nu influențează diferențierea sexuală (care are loc aproape concomitent cu dezvoltarea gonadală) pentru că nu produc hormoni.

În timpul vieții fetale, testiculele și ovarele *coboară* din poziția lor inițială (de la nivelul vertebrei T10), tractate de un cordon ligamentos numit *gubernaculum*. În săptămânile 12-24, testiculele migrează (prin scurtarea gubernaculumului, sub acțiunea androgenilor și a unui factor proteic înrudit cu insulina – vezi mai jos) și ajung la nivelul *inelului inguinal intern*, deasupra scrotului; în săptămâna 28 ele încep să coboare în scrot și, la majoritatea fetușilor, ajung în această poziție la termen. La fetele nu se produce scurtarea gubernaculumului și ovarele rămân în poziție pelvină.

## 1.2 DIFERENȚIEREA SEXUALĂ

**Sexul gonadic** induce dezvoltarea **sexului fenotipic** adică formarea ductelor genitale și a organelor genitale externe de tip feminin sau masculin, prin modificări caracteristice ale ductelor Wolf și Müller, respectiv ale sinusului urogenital. Formarea structurilor de tip masculin este dependentă de secreția activă a hormonilor produși de testiculii fetali, în timp ce formarea structurilor de tip feminin nu necesită prezența nici unui hormon.

**Formarea căilor genitale interne.** Indiferent de sexul genetic, fetele prezintă două structuri canaliculare: *ductele mesonefrice (Wolffiene)* și *ductele paramesonefrice (Mülleriene)* din care se vor dezvolta, în luna a treia, căile genitale interne (CGI).

- *Formarea CGI masculine* este un proces *activ* care se desfășoară sub acțiunea hormonilor testiculului fetal: *testosteronul* (acționând local) determină, în săptămânile 8–13, stabilizarea ductelor Wolffiene și diferențierea lor în epididim, vase deferente și vezicule seminale; canalele Mülleriene regresează (în săptămânile 8-10), prin acțiunea locală a hormonului anti-müllerian (AMH), secretat de celulele Sertoli (singurul rest din canalele Mülleriene este utricula prostatică).
- *Formarea CGI feminine* are loc în săptămânile 9-13, în mod *spontan*, în absența secrețiilor endocrine ale ovarelor (care nici nu sunt încă formate!): ductele Wolffiene regresează iar ductele Mülleriene se dezvoltă în trompe, uter și treimea superioară a vaginului.

**Formarea organelor genitale externe (OGE)** se realizează, în lunile a patra și a cincea, pe seama *sinusului uro-genital* – o structură ambivalentă, bipotențială, prezentă la ambele sexe,

---

<sup>12</sup> La fetele de 5 luni există aproximativ 7 milioane de foliculi primordiali; mulți degenerază însă până la naștere (700.000 – 2.000.000) și apoi până la pubertate, când rămân numai circa 400.000 foliculi.



și alcătuită dintr-o protuberanță mediană numită *tuberculul genital*, două pliuri mediale sau *pliurile uretrale* (sau urogenitale), ce flanchează *șanțul urogenital*; la exteriorul lor se formează două pliuri mai mari, numite *pliurile (bureletele) labioscrotale*.

- *Formarea OGE masculine.* Sub influența androgenilor, în special a *dihidrotestosteronului (DHT)*, tuberculul genital se alungește și formează *penisul*<sup>13</sup>, pliurile uretrale *fuzionează*, dinapoi spre înainte, formând *uretra peniană*, iar pliurile labioscrotale cresc și se unesc, formând *scrotul*.
- *Formarea OGE feminine.* În absența androgenilor, la fetusul feminin normal, tuberculul genital crește puțin, formând *clitorisul*, sinusul urogenital (SUG) rămâne deschis și se formează *septul vezicovaginal* între porțiunea genitală și urinară a SUG, astfel că uretra se deschide anterior iar vaginul posterior; vestibulul SUG este mărginit lateral de pliurile urogenitale, care nu fuzionează și formează *labiile mici*; lateral, pliurile labioscrotale se dezvoltă, formând *labiile mari* (unite posterior și anterior).

**Formarea identității și comportamentului sexual.** După naștere, pe baza configurației OGE, se declară sexul civil și apoi copilul este crescut ca fată sau băiat, într-un mediu socio-cultural adecvat. La vârsta de 2-3 ani se stabilește *identitatea sexuală* definită prin conștientizarea apartenenței la un anumit sex. La pubertate, sub acțiunea hormonilor sexuali, se formează caracterele sexuale secundare (*sexul pubertar*) și se edifică *comportamentul sexual* sau expresia publică / socială a identității sexuale. Așa cum am subliniat la început, acest proces, numit și sexualitate, este la om mai important decât sexualizarea morfo-funcțională.

## 2. CONTROLUL GENETIC ȘI HORMONAL AL SEXUALIZĂRII

### 2.1 REGLAREA GENETICĂ A DEZVOLTĂRII GONADELOR

Se știe de câteva decenii că sexualizarea masculină este determinată de cromosomul Y: în prezența cromosomului Y, indiferent de numărul cromosomilor X, se formează testicule; în absența cromosomului Y se formează ovare (care însă nu au o structură și funcție normală decât în prezența ambilor cromosomi X). Efectul *dominant* al cromosomului Y este determinat de prezența unei/unor gene situate într-o mică regiune de pe brațul scurt, numită TDF (de la *Testis Determining Factors*). Studiul molecular a unor cazuri de *inversiuni sexuale* (în care sexul fenotipic este discordant față de cel genetic: bărbați XX, unele femei XY, ș.a) a dus, în 1990, la identificarea genei SRY (de la *Sex-determining Region on the Y chromosome*) prezentă la toate mamiferele și capabilă să inducă formarea testiculelor (introducerea genei SRY la un embrion XX de șoarece determină apariția de testicule și diferențierea masculină)

Gena SRY – pentru gonade și hormonii testiculelor fetale – pentru CGI și OGE, nu sunt însă singurii “actori” ai procesului de dezvoltarea sexuală, un proces secvențial, ordonat și extrem de complex. Studiile din ultimii ani au început descifrarea mecanismelor genetice care sunt responsabile de etapele sexualizării și au permis înțelegerea unor aspecte din patologia acestor procese. Cert este faptul că determinismul și diferențierea sexuală sunt reglate de un complex de gene, factori de transcripție, hormoni și receptori (tabel 14.7).

**Tabelul 14.7. Principalele gene implicate în dezvoltarea gonadelor masculine și feminine**

<i>Gena</i>	<i>Localizare cromosomică</i>	<i>Proteina codificată</i>	<i>Funcția proteinei</i>	<i>Fenotipul asociat mutației</i>
-------------	-------------------------------	----------------------------	--------------------------	-----------------------------------

<sup>13</sup> Penisul crește în lungime cu circa 0,7 mm/săptămână atingând la termen dimensiunea normală de 3,5 cm

<i>Gena</i>	<i>Localizare cromosomică</i>	<i>Proteina codificată</i>	<i>Funcția proteinei</i>	<i>Fenotipul asociat mutației</i>
WT1	11p13	Proteina cu degete de zinc	Dezvoltarea gonadelor primitive și a rinichilor; reglarea expresiei SRY	Pseudohermafroditism masculin și disgenezie gonadică XY
SF1	9q33	Receptor nuclear	Dezvoltarea gonadelor primitive; reglarea sintezei de hormoni steroidieni	Mutațiile heterozigote: disgenezie gonadică și insuficiența suprarenaliană
LIM1	11p12-13	Proteina homeobox	Dezvoltarea precoce a gonadelor și a extremității cefalice	?
LHX9	1q31-32	Proteina homeobox	Dezvoltarea precoce a gonadelor și creierului anterior	?
EMX2	10q26.1	Proteina homeobox	Dezvoltarea precoce a gonadelor și a neocortexului	Schizencefalia tip II
SRY	Yp11	Proteina HMG	Inițiază dezvoltarea testiculară	Disgenezie gonadică XY (inversiune sexuală)
SOX9	17q24	Proteina HMG	Inițiază dezvoltarea testiculară; diferențierea celulelor Sertoli	Displazie campomelică cu disgenezie gonadică
DMRT1	9p24.3	Proteina DM	Menținerea tubilor seminiferi după naștere	Disgenezie gonadică XY
FGF9	13q11-12	Factor de creștere	Proliferarea în gonada masculină și dezvoltarea plămânilor	Inversiune sexuală
CBX2	17q25	Proteina cromobox	Dezvoltarea testiculară	?
DHH	12q13.1	Proteina cu rol în semnalizare	Reglator al celulelor Sertoli	Disgenezie gonadică XY și neuropatie minifasciculară
DAX1	Xp21.3	Receptor nuclear	Antagonizează efectele SRY	Duplicația: disgenezie gonadică XY; hipoplazie suprarenaliană congenitală
WNT4	1p32-36	Glicoproteina secretată	Represia diferențierii celulelor Leydig în gonadele feminine; Stimulează activitatea DAX1.	Duplicația: disgenezie gonadică XY

**a. Formarea gonadelor primordiale** reprezintă prima etapă în dezvoltarea gonadelor. Așa cum am arătat, acest proces începe cu *formarea primordiilor gonadale nediferențiate, bipotențiale* din mezodermul intermediar și *migrarea celulelor germinale primordiale*, care populează cordoanele sexuale primare din gonada nediferențiată.

- Studiul mutațiilor în diferite stări intersexuale au identificat câteva gene care sunt esențiale pentru dezvoltarea *primordiilor gonadale*. Printre acestea se numără genele **SF-1**, **WT1**, **LIM1**, **LHX9** și **EMX2** (tabelul 14.7); aceste gene, care codifică factori de transcripție generali, *nu sunt specific sexuale* și intervin și în alte procese embrionare; dar *o combinație specifică* de acțiuni este probabil critică pentru formarea gonadelor primordiale. Mutațiile acestor gene pot avea drept consecință absența dezvoltării gonadelor, alături de alte anomalii (absența suprarenalelor în cazul genei SF1 sau absența rinichilor în cazul mutațiilor genei WT1 și LIM1).
  - *Gena SF-1* codifică *factorul de transcripție steroidogenic 1 (FS1)*, un receptor nuclear (cu ligand necunoscut) care se fixează la ADN (pe secvența AGGTCA) și activează genele implicate în steroidogeneză; dar SF1 intervine și în dezvoltarea embrionară a regiunilor cu funcție endocrină: gonade primordiale la ambele sexe, suprarenale, hipofiză și nucleii hipotalamici implicați în producerea de gonadotropine. SF-1 reglează probabil și alte gene ce acționează în etapele următoare ale dezvoltării gonadale: AMH, WT1, DAX-1 și poate chiar SRY, fie direct sau indirect (printr-o etapă intermediară).
  - *Gena WT1* – codifică (prin matisare alternativă) mai multe proteine cu funcții diferite, ce funcționează ca factori de transcripție ce activează alte gene (încă necunoscute) implicate în formarea rinichilor și gonadelor primordiale; mutațiile genei WT1 determină sindromul Denys-Drash și sindromul Frasier, afecțiuni în care pacienții XY nu au gonade iar OGE sunt ambigue sau feminine.

- *LIM1, LHX9, EMX2* – codifică proteine homeobox implicate în dezvoltarea gonadelor primordiale dar și a altor structuri embrionare
- *Migrarea celulelelor germinale și colonizarea gonadei primordiale* este controlată (la șoarece și probabil la alte mamifere) de genele *c-Kit* și *slf* ce codifică un receptor nuclear (c-Kit) și, respectiv, factorul Steel, ligandul pentru acest receptor.

După formarea gonadei primordiale, sexualizarea evoluează diferit la cele două sexe.

**b. Formarea testiculelor.** La embrionul XY, diferențierea gonadelor primordiale în testicule este inițiată de expresia **genei SRY** (localizată pe cromosomul Yp11.3) la nivelul liniei precursorilor celulelor de susținere care, sub acțiunea SRY, se *diferențiază în celule Sertoli* (în absența SRY această linie formează celule foliculare); acesta este primul eveniment al diferențierii testiculare.

Expresia genei SRY este declanșată<sup>14</sup> la circa 7 săptămâni de gestație și este tranzitorie, deci SRY nu este implicată în *menținerea* diferențierii celulelor Sertoli, acest proces fiind realizat de alte gene, activate de SRY. Gena SRY este alcătuită dintr-un singur exon, care codifică o proteină (204 aminoacizi) cu rol de factor de transcripție – printr-un un domeniu HMG (*high motility group*) de legare la ADN, puternic conservat la toate mamiferele.

Gena SRY este o *genă master* care reglează transcripția altor gene (încă necunoscute) ce acționează *în aval* de SRY; se presupune că SRY reprimă *gena DAX-1* (situată pe cromosomul X și implicată în formarea ovarelor) și prin aceasta activează *gena SOX9*.

Alături de gena SRY sunt implicate și o serie de gene autosomale (tabelul 14.7 și **figura 14-15**). Printre acestea, **gena SOX-9** pare a avea un rol major, fiind considerată efectul principal ce acționează *în aval* de SRY.

Gena SOX9, localizată pe cromosomul 17, codifică o proteină înrudită cu SRY, având un domeniu HMG de legare la ADN, puternic conservat. Mutațiile acestei gene sunt implicate în producerea displaziei campomelice, o boală care asociază anomalii scheletice cu inversiune sexuală (femei XY).

Gena SOX9 dirijează procesul de *organizare cordoanelor testiculare*, din care se vor forma tubii seminiferi, de către celulele Sertoli; în acest proces de interacțiuni celulă-celulă intervin probabil și molecule de semnalizare celulară din familia WNT.

Gena SOX9 intervine și activează **gena AMH** (un membru al familiei TGFβ) în celulele Sertoli. Această genă codifică *hormonul anti-Müllerian* care determină regresia ductelor Mülleriene și, probabil, controlează transformarea celulelor interstițiale nediferențiate în celule Leydig, precum și coborârea testiculelor. Efectul genei SOX9 este potențat de genele SF1, WT1 și GATA4 care se fixează pe promotorul genei AMH.

O etapă importantă în formarea testiculelor este *diferențierea celulelor germinale primordiale în spermatogonii*. CGP sunt programate să se multiplice prin mitoză, să intre apoi în meioză și să se oprească în profază (așa cum se întâmplă în ovare); celulele Sertoli produc însă un factor, încă necunoscut, care le oprește în mitoză și determină astfel evoluția lor spermatogenică.

Un ultim proces din formarea testiculelor este *diferențierea celulelor Leydig* din celulele mezenchimale din jurul cordoanelor; acest proces este controlat de mai multe gene, printre care AMH și SF1.

Alte gene implicate în dezvoltarea testiculelor, ale căror mutații produc inversiune sexuală, sunt **DMRT1, FGF9 și CBX2**; locul lor de acțiune nu este încă precizat. Se știe doar că DMRT1 este exprimată, ca și SOX9 la începutul dezvoltării testiculare iar mutațiile genei **DHH** produc absența spermatogenezei.

**c. Formarea ovarelor.** Reglarea genetică a formării ovarelor este mai puțin cunoscută. Se cunosc doar câteva gene cu rol major în acest proces precum genele **DAX-1 și WNT4**.

<sup>14</sup> Activarea genei SRY ar putea fi produsă sau potențată de către gena WT1 deoarece în regiunea promotor a SRY a fost descris un situs de fixare a unui factor de transcripție produs de WT1

Dezvoltarea normală a ovarelor necesită funcționarea ambelor alele ale genei DAX1 (dovezi: disgenezia ovariană la fetele cu 45,X sau sindrom Turner ori formarea de ovare în bandeletă la fetele XY purtătoare ai duplicației regiunii în care se află DAX-1). La fetusul XX gena DAX-1 inhibă gena SOX9 (la embrionul XY gena SRY reprezintă DAX1 și astfel activează gena SOX9). Gena WNT4 are drept rol inhibarea căilor de semnalizare care conduc la diferențierea celulelor Leydig.

## 2.2. CONTROLUL DIFERENȚIERII SEXUALE

Formarea CGI și OGE masculine sau feminine depinde de *prezența sau absența țesutului testicular funcțional*.

La sexul masculin, după formarea testiculelor, la circa 8 săptămâni, acestea determină un fenotip sexual masculin prin producerea de **hormoni, enzime și receptori** care mediază acțiunea lor<sup>15</sup>: hormonul luteinizant fetal (LH), receptorul LH și HCG, enzimele implicate în biosinteza testosteronului, hormonul anti-müllerian (AMH) și receptorul de AMH, steroid 5 $\alpha$ -reductaza 2 (implicată în conversia testosteronului în dihidrotestosteron), receptorul de androgen.

- Diferențierea ductelor Wolffiene în CGI masculine necesită *testosteron*, secretat de celulele Leydig, după activarea receptorului LH/CG de pe suprafața lor de către HCG în trimestrul I de sarcină și apoi de LH fetal; acțiunea testosteronului este mediată de *receptorul nuclear de androgeni* (AR), un factor de transcripție care după fixarea hormonului interacționează cu promotorul unor gene țintă incomplet cunoscute (una din ele este gena pentru receptorul AMH).
- Regresia ductelor Mülleriene este indusă de *hormonul anti-müllerian* (AMH)<sup>16</sup>, un hormon glicoproteic (din clasa TGF- $\beta$ ) secretat de celulele Sertoli; secreția de AMH este indusă de factori incomplet cunoscuți (probabil de producția genelor SF-1 și SRY). Acțiunea AMH necesită un *receptor specific*, AMHR (o proteină transmembranară cu activitate serin-treonin kinazică a cărei sinteză este reglată în parte de gena AR); receptorul este situat în mezenchimul ce înconjoară canalele Mülleriene; interacțiunea AMH-AMHR induce involuția lor prin apoptoză. Mutațiile genei pentru AMF sau pentru receptorul său au ca rezultat sindromul persistenței canalelor Müller.
- Masculinizarea OGE nediferențiate (sinusul urogenital) se face prin acțiunea *dihidrotestosteronului*, produs prin conversia testosteronului de către 5 $\alpha$ -reductaza 2; el are o mare afinitate pentru *receptorii de androgeni* (AR), codificați de o genă situată pe Xq11. Complexul DHT-AR se fixează pe promotorii unor gene țintă ce controlează masculinizarea OGE. Mutațiile la nivelul acestei gene au ca rezultat sindromul de insensibilitate la androgeni.
- Un alt hormon produs de către celulele Leydig este *insulin-like hormone 3* (InsL3) care este implicată în controlul inițial al coborârii testiculilor fetali de la nivelul de formare până în punga scrotală. Insulina 3 este exprimată la nivelul gubernaculum-ului care dirijează descendența testiculilor fetali. Mutațiile la nivelul acestei gene au drept rezultat criptorhidia bilaterală. Alte gene implicate în coborârea testiculară sunt HOX10 și HOX11.

La sexul feminin se produce în mod normal regresia canalelor Wolf și diferențierea canalelor Müller și a sinusului urogenital în structuri feminine. Aceste procese se produc *spontan și pasiv*, fără nici o intervenție hormonală deoarece ovarele nu sunt încă complet formate.

Unul dintre aspectele importante dar cele mai puțin înțelese din cadrul dezvoltării sexuale

---

<sup>15</sup> Trebuie precizat că influența testiculilor fetali asupra dezvoltării căilor genitale este exercitată exclusiv unilateral; dacă unul din testiculii nu se dezvoltă sau este îndepărtat precoce în cursul vieții fetale (experimente la animale), are loc dezvoltarea normală a oviductului ipsilateral, asociată cu involuția controlaterală a ductului Muller.

<sup>16</sup> AMH a mai fost denumit și MIF, de la *Mullerian inhibiting factor*

este *determinismul comportamentului sexual* specific fiecărui sex. O serie de date experimentale cât și unele observații derivate din studiul unor stări patologice la om susțin însă rolul major al hormonilor sexosteroizi în dezvoltarea comportamentului sexual. Hormonii sexuali par să acționeze în cursul vieții fetale și în cursul perioadei neonatale asupra unor structuri specifice de la nivelul sistemului nervos central (hipotalamusul anterior și sistemul limbic) determinând o organizare neuronală caracteristică fiecărui sex, care reprezintă astfel "substratul anatomic" al comportamentului sexual. Interesant este faptul că hormonul principal responsabil de organizarea de tip masculin a creierului la bărbați este *estradiolul*, produs prin conversia locală a testosteronului, sub acțiunea *aromatazei*<sup>17</sup>. La fetele de tip feminin există desigur estradiol circulant dar acesta este legat de alpha-fetoproteină, o componentă majoră a serului fetal. Această proteină nu poate însă lega testosteronul, care va atinge astfel țintele cerebrale.

Alterarea acestei organizări specifice a creierului în cursul vieții fetale și în perioada neonatală este considerată a fi implicată în etiologia homosexualității.

### 3. TULBURĂRI ALE DEZVOLTĂRII SEXUALE

Fiecare etapă din cadrul determinismului și diferențierii sexuale poate fi perturbată producând tulburări variate de sexualizare<sup>18</sup> (tabelul 14.8). Cauzele unor asemenea afecțiuni sunt multiple, de la factori de mediu, precum administrarea unor medicamente cu efect virilizant în cursul sarcinii, la anomalii cromosomice (monosomia X), mutații monogenice (sindromul testiculului feminizant) sau cauze multifactoriale precum în majoritatea cazurilor de hipospadias. Există dificultăți reale de clasificare a acestor boli și, ca urmare, categoriile descrise mai jos prezintă adeseori suprapuneri parțiale.

**Tabelul 14.8. Clasificarea tulburărilor de dezvoltare sexuală**  
(după Wilson JD și Griffin JE, 2001)

<p><b>Anomalii ale cromosomilor sexuali</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Sindromul Klinefelter</li> <li>▪ Bărbații XX</li> <li>▪ Sindromul Turner</li> <li>▪ Disgenezia gonadică mixtă</li> <li>▪ Hermafroditismul adevărat</li> </ul>
<p><b>Anomalii ale formării sexului gonadic</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Disgenezia gonadică pură</li> <li>▪ Disgenezia testiculară</li> <li>▪ Sindromul testiculilor absenți</li> </ul>
<p><b>Anomalii ale diferențierii sexuale</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Pseudohermafroditismul feminin</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Hiperplazia congenitală suprarenaliană</li> <li>– Pseudohermafroditismul feminin nonadrenalian</li> <li>– Anomalii ale dezvoltării ductelor mulleriene</li> </ul> </li> <li>▪ <b>Pseudohermafroditismul masculin</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Anomalii ale sintezei androgenilor</li> <li>– Anomalii în acțiunea androgenilor</li> </ul> </li> </ul>

<sup>17</sup> Șoarecii XY cu deficit de aromatază sau receptori de estrogeni nu au comportamentul masculin specific.

<sup>18</sup> Clasificările tulburărilor de sexualizare folosite de diferiți autori prezintă unele mici diferențe; noi am optat pentru o clasificare recentă și simplă.

#### **Anomaliile ale cromosomilor sexuali**

- Sindromul Klinefelter
  - Bărbații XX
  - Sindromul Turner
  - Disgenezia gonadică mixtă
  - Hermafroditismul adevărat
- 
- Sindromul de persistență a ductelor mülleriene
  - Defecte în dezvoltarea organelor genitale masculine

### 3.1. ANOMALIILE CROMOSOMILOR SEXUALI

Acest grup frecvent de boli cuprinde tulburările de dezvoltare sexuală care sunt rezultatul unor anomalii cromosomice de număr sau de structură, omogene sau în mozaic. Deoarece sindroamele Klinefelter și Turner au fost discutate pe larg în capitolul 10, aici vor fi prezentate celelalte entități din tabelul 14.8.

**a. Sindromul bărbaților XX** este o afecțiune întâlnită la circa 1 la 20000 nou-născuți cu fenotip masculin. Trăsăturile clinice seamănă cu cele ale unui sindrom Klinefelter.

Testiculi sunt mici și fermi (sub 2 cm), ginecomastia este frecventă, penisul are dimensiuni normale sau scăzute; alte elemente caracteristice sunt hialinizarea testiculară cu azoospermie și absența oricăror structuri urogenitale de tip feminin. Identitatea psihosocială este de tip masculin, nivelele plasmatiche ale testosteronului sunt scăzute iar nivelele estradiolului și gonadotropinelor plasmatiche crescute. Bărbații XX au talia sub nivelul mediu al bărbaților normali, nu prezintă probleme cognitive, iar incidența hipospadiasului este crescută.

Majoritatea bărbaților XX au translocatii ale unui mic segment din Yp (ce conține gena SRY) pe Xp; există însă și cazuri produse de mutații ale unor gene autosomale implicate în dezvoltarea testiculară.

**b. Disgenezia gonadică mixtă** este determinată cel mai adesea de mozaicisme 45,X/46XY care apar prin pierderea cromosomului Y în una din primele diviziuni postzigotice. Indivizii afectați au de regulă un testicul pe o parte și un ovar fibrozat de cealaltă parte, dar pot exista și testiculi disgenetici sau ovare fibrozate bilateral. Incidența afecțiunii nu este cunoscută, dar este considerată a doua cauză de ambiguitate a organelor genitale externe la nou-născuți după hiperplazia congenitală suprarenaliană.

Fenotipul depinde de proporția și distribuția în organism a celulelor XY. La două treimi din cazuri domină fenotipul feminin, dar cu hipertrofie clitoridiană, sinus urogenital și fuziune parțială labioscrotală. Testiculul este localizat cel mai adesea intraabdominal, dar poate fi prezent și intrainghinal. Aproape invariabil sunt prezente uterul, vaginul și cel puțin o trompă uterină. Postpubertar testiculul, care conține numeroase celule Leydig și tubi seminiferi numai cu celule Sertoli, va secreta androgeni, determinând fenomene de virilizare.

**c. Hermafroditismul adevărat**<sup>19</sup> este o condiție în care sunt prezente ambele tipuri de gonade la același individ. Afecțiunea are o incidență necunoscută, până în prezent fiind descrise circa 400 de cazuri. Există mai multe variante: forme laterale (testicul pe o parte și ovar de cealaltă parte – 40%), forme unilaterale (un ovotestis pe o parte și testicul sau ovar controlateral – 40%) și forme bilaterale (ovotestis de fiecare parte – 20%). OGE sunt de obicei sub formă de peno-clitoris (hipospad) și labio-scrot.

Circa două treimi din cazuri prezintă cariotip 46,XX, 10% au cariotip 46,XY iar restul sunt himere (XX/XY produse printr-o dublă fecundare) sau mozaicuri cu cel puțin o linie celulară cu un cromosom Y prezent. Mecanismul dezvoltării anormale a gonadelor nu este cunoscut. Doar 10% din cazurile 46,XX prezintă gena SRY ca urmare a translocăției unei porțiuni a cromosomului Y. Restul sunt considerate a fi rezultatul unor mutații cu câștig de funcție ale unor

<sup>19</sup> Denumirea de hermafroditism care provine de la imbinarea numelor zeului Hermes și a zeiței Afrodita.

gene situate în aval față de SRY în calea de dezvoltare testiculară.

### 3.2. ANOMALII ALE FORMĂRII SEXULUI GONADIC

Aceste afecțiuni sunt caracterizate prin prezența unui cariotip normal, dar cu anomalii în structura gonadelor.

**a. Disgenezia gonadică pură** cuprinde un grup de afecțiuni în care persoanele bolnave au un cariotip normal XX sau XY, sunt fenotipic femei și prezintă gonade cu structură anormală, adesea sub forma unor bandele fibrozate. Se asociază frecvent o dezvoltare redusă a uterului și a trompelor uterine precum și a caracterelor sexuale secundare.

Disgeneziile gonadice pure sunt determinate de mutații la nivelul unor gene esențiale pentru dezvoltarea gonadelor. Există chiar forme familiale care sugerează o transmitere autosomal recesivă sau legată de X. În formele cu cariotip 46,XY pot exista mutații punctiforme sau deleții la nivelul genei SRY sau a altor gene care influențează expresia SRY.

**b. Disgenezia testiculară** cuprinde un grup de tulburări ale dezvoltării testiculare care sunt prezente la indivizi cu cariotip 46,XY. Anomaliile testiculare pot merge de la unele foarte severe, asemănătoare cu cele din disgenziile gonadice pure, care conduc la inversiune sexuală, până la unele mai puțin severe. Deoarece genele implicate în producerea acestor boli (WT1, SF1, SOX9, DAX1, WNT4) controlează și dezvoltarea altor țesuturi, acestor anomalii li se asociază frecvent și alte afectări sistemice.

**c. Sindromul testiculelor absente (agenzia gonadică)** cuprinde un spectru larg de manifestări fenotipice prezente la indivizi 46,XY cu testicule rudimentare sau absente, dar cu dovadă neechivocă că funcția testiculară endocrină (precum regresia ductelor Muller sau sinteza de testosteron) a existat cândva în cursul vieții embrionare. În contrast, în disgenezia gonadică pură XY nu există nici o dovadă a activității testiculare endocrine în cursul vieții embrionare. Cauzele regresiei funcției testiculare pot fi diverse, precum mutații ale unor gene, factori teratogeni sau traumatisme.

În forma pură de agenzie testiculară indivizi 46,XY sunt fenotipic femei, dar nu prezintă deloc structuri derivate din ductele Muller, și nici organe accesorii ale aparatului reproductiv de tip masculin. În aceste cazuri eșecul testicular a apărut după dezvoltarea celulelor Sertoli capabile să secrete hormon antimullerian, dar înainte de debutul funcției celulelor Leydig. La extrema cealaltă sunt indivizi fenotipic bărbați dar cu anorhie bilaterală (cu organe genitale externe masculine, dar adeseori microfalus, absența structurilor mulleriene și prezența celor wolffiene).

### 3.3. ANOMALII ALE DIFERENȚIERII SEXUALE

Acest grup de boli cuprinde pseudohermafroditismele (PH) feminine și masculine, afecțiuni în care există o discordanță între sexul genetic și gonadic, normale și concordante, și OGE ambigue. În funcție de sexul genetic se deosebesc două forme: PH feminine (XX, ovare și diferite grade de masculinizare a OGE) – 85% din stările intersexuale și PH masculine (XY, testicule și OGE incomplet masculinizate) – 14% dintre stările intersexuale.

**a. Pseudohermafroditismele feminine** apar la femei 46,XX cu ovare bilaterale, dar cu grade variabile de virilizare a tractului genital, datorită excesului de androgeni în cursul vieții fetale.

**Hiperplazia congenitală suprarenaliană** este cauza cea mai frecventă de pseudohermafroditism feminin și este consecința unor anomalii în căile de sinteză a hormonilor steroidieni la nivelul glandei suprarenale (figura 14-16). Cea mai frecventă formă de este cauzată de deficitul de 21 hidroxilază (prezentată pe larg în caseta 3.2), dar pot fi implicate și deficitul de 11-beta-hidroxilază ori 3-beta-hidroxisteroid dehidrogenază izomerază 2 (tabelul 14.9).

**Tabelul 14.9. Forme de hiperplazie congenitală de suprarenală**

<i>Deficiența</i>	<i>Cortisol</i>	<i>Aldosteron</i>	<i>Grad de virilizare la femei</i>	<i>Esecul virilizării la bărbați</i>	<i>Hormonul steroidian dominant</i>	<i>Alte caracteristici</i>
21-hidroxilază - parțială - severă (cu pierdere de sare)	Normal Redus	Exces Redus	++++ ++++	Absent Absent	17-hidroxiprogesteron 17-hidroxiprogesteron	95% cazuri 5%
11-beta-hidroxilaza	Redus	Redus	++++	Absent	11-deoxicortisol și 11-deoxicorticosteron	Hipertensiune arterială
3-beta-hidroxisteroid dehidrogenaza izomeraza 2	Redus	Redus	+	++++	dehidroepiandrosteron	Deseori pierdere de sare. A doua ca frecvență.
17-alfa-hidroxilaza	Redus	Redus	Absent	++++	corticosteron și 11-deoxicorticosteron	Hipertensiune arterială

**Pseudohermafroditismul feminin nonadrenalian** poate fi determinat de mutații la nivelul genei care codifică *aromataza placentară* (CYP19) care cauzează virilizarea embrionilor feminini datorită conversiei deficitare a androgenilor în estrogeni. Pseudohermafroditismul feminin poate apărea, de asemenea, ca urmare a unor *tumori ovariene virilizante* (precum areoblastoame sau luteoame) sau mai rar ca urmare a unor *tumori virilizante suprarenaliene*. De asemenea, administrarea unor *compuși progesteronici* cu efecte secundare androgenice (precum 17-alfa-19-nortestosteronul) pentru prevenirea avorturilor poate determina masculinizarea feteșilor feminini.

**Anomaliile dezvoltării ductelor mulleriene** (sindromul Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser) reprezintă a doua cauză de amenoree ca frecvență după sindromul Turner. Majoritatea pacientelor sunt identificate ca urmare a absenței menstruațiilor la vârsta pubertară. Înălțimea este normală, ca și caracterele sexuale secundare. Uterul poate varia de la aproape normal până la forma bicornuată rudimentară cu sau fără lumen. Se poate asocia cu anomalii renale (agenzie, ectopie, rinichi în potcoavă) sau scheletice (vertebre supranumerare, asimetrice sau fuzionate – sindromul Klippel-Feil).

**b. Pseudohermafroditismele masculine** (defecte în virilizarea embrionilor 46,XY) pot apărea ca urmare a unor defecte în sinteza androgenilor, defecte în acțiunea androgenilor, defecte în regresia ductelor mulleriene sau ca urmare a unor cauze incerte.

**(1) Anomaliile în sinteza hormonilor androgeni** sunt responsabile doar de aproximativ o cincime din cazurile de pseudohermafroditism masculin. În această categorie se încadrează agenezia celulelor Leydig sau hipoplazia lor produsă printr-un defect al receptorilor hCG/LH precum și deficite enzimatice ce afectează biosinteza androgenilor. Fiecare dintre aceste defecte blochează o etapă în conversia colesterolului către testosteron (vezi **figura 14-16**):

- mutația genei STAR (care codifică regulatorul steroidogenetic) afectează transportul colesterolului din citoplasmă către interiorul mitocondriei la nivelul glandelor suprarenale și a gonadelor; produc hiperplazia lipidică congenitală de suprarenală);
- deficiența 3 beta hidroxisteroid dehidrogenazei izomeraza 2 alterează transformarea dehidroepiandrostendionului în androstendion;
- deficiența de 17 alpha hidroxilază (CYP17) alterează hidroxilarea în poziția 17 a pregnenolonului și progesteronului;
- deficiența 17,20 liazei alterează transformarea 17 OH steroizilor în 17 cetosteroizi;
- deficiența 17 beta hidroxisteroid dehidrogenazei 3 – cea mai frecventă formă – afectează ultima etapă în sinteza testosteronului, reducerea grupării 17-ceto a androstendionului.



Toate aceste boli cu defecte în sinteza testosteronului sunt caracterizate prin regresia normală a ductelor Müller. Masculinizarea tractului urogenital este variabilă, de la aspect masculin cu hipospadias moderat până la aspect feminin, în funcție de severitatea defectelor enzimatice și existența unor căi alternative.

(2) **Anomaliile în acțiunea androgenilor** se caracterizează prin sinteza normală a testosteronului și regresia normală a canalelor Muller, prezența anomaliilor în dezvoltarea fenotipului masculin fiind determinată de tulburări în acțiunea androgenilor la nivelul țesuturilor țintă.

**Deficiența 5 alpha reductazei 2** este o boală transmisă autosomal recesiv caracterizată prin: hipospadias sever perineoscrotal, sac vaginal de dimensiune variabilă deschis fie în sinusul urogenital, fie în uretră, testicule normal dezvoltate cu canalele ejaculatorii deschise în fundul de sac vaginal, pilozitate de tip feminin după pubertate, dar fără dezvoltarea sânilor, absența uterului și a trompelor uterine și nivel normal al testosteronului. Enzima 5 alpha reductaza 2 este responsabilă de conversia testosteronului în *dihidrotestosteron*, hormon care după cum am precizat controlează dezvoltarea organelor genitale externe și a sinusului urogenital. În schimb, organele derivate din canalele Wolf, a căror dezvoltare este dependentă de testosteron, au aspect normal.

**Anomalii ale receptorului androgenic.** Receptorul androgenic face parte din familia receptorilor nucleari, fiind codificat de o genă localizată pe cromosomul X. Mutațiile acestei gene alterează acțiunea hormonilor androgeni la nivelul organelor țintă perturbând, ca urmare, dezvoltarea fenotipică de tip masculin și virilizarea.

- **Sindromul de feminizare testiculară completă** (sindromul Morris) este o formă frecventă de pseudohermafroditism masculin (1/20.000 nou născuți). Este a treia cauză de amenoree primară după sindromul Turner și absența congenitală a vaginului. Diagnosticul este pus prepubertar datorită identificării unei hernii inghinale care conține un testicul sau postpubertar datorită amenoreei. Majoritatea cazurilor au aspect feminin normal cu caractere sexuale secundare normale, exceptând reducerea /absența pilozității axilare și pubiene (*“femeile manechin”*). Vaginul este închis în fund de sac și adesea rudimentar iar trompele și uterul sunt absente, datorită hormonului antimullerian care a fost secretat în cursul vieții fetale. Testiculi pot fi localizați intraabdominal sau inghinal și trebuie extirpați chirurgical datorită riscului de malignizare.
- **Feminizarea testiculară incompletă** este întâlnită mult mai rar. OGE sunt ambigue, cu fuziune parțială labioscrotală și hipertrofie clitoridiană, la care se adaugă adeseori dezvoltarea incompletă a canalelor Wolf. La pubertate se poate asocia o virilizare accentuată, ceea ce indică efectuarea gonadectomiei prepubertar.
- **Sindromul Reifenstein** este datorat unor mutații ale receptorului androgenic<sup>20</sup> care afectează doar parțial funcția acestor proteine. Ca urmare, predomină fenotipul și dezvoltarea psihologică de tip masculin, dar cu hipospadias perineoscrotal, ginecomastie frecventă, criptorhidism și azoospermie.

(3) **Sindromul persistenței ductelor Müller** este o boală rară întâlnită la indivizi cu gonade și fenotip de tip masculin, dar care asociază în plus și prezența uterului și a trompelor uterine, adeseori vestigiale și situate în canalele inghinale. Afecțiunea, transmisă autosomal recesiv, este determinată de mutații fie la nivelul genei care codifică hormonul antimullerian, fie al genei pentru receptorul acestuia, ceea ce afectează regresivitatea structurilor derivate din canalele Müller.

**c. Defecte în dezvoltarea organelor genitale masculine** sunt reprezentate de hipospadias

---

<sup>20</sup> Există mutații ale receptorului androgenic care determină boli ce nu fac parte practic din categoria pseudohermafroditismelor masculine, fiind manifestate doar prin infertilitate sau hipovirilizare la indivizi cu fenotip masculin.

și criptorhidie.

- **Hipospadiasul** este o anomalie congenitală frecventă (0,5-0,8% din băieți) în care deschiderea uretrei are loc într-o poziție anormală pe fața ventrală, într-un punct situat intermediar între sediul normal și perineu. În funcție de poziția orificiului uretral, hipospadiasul este clasificat în glandular, penian sau perineoscrotal. Adeseori se asociază contracția și incurbarea ventrală a penisului (cordee). Deoarece dezvoltarea penisului este dependentă de androgeni, hipospadiasul este considerat a fi rezultatul unor anomalii în formarea sau acțiunea acestora. Cu toate acestea, cauzele cunoscute (boli monogenice, boli cromosomice, ingestia unor droguri în cursul sarcinii) sunt responsabile doar de 25% din cazuri, în restul etiologia fiind necunoscută.
- **Criptorhidismul** (testiculul necoborât congenital – TNC). Aproximativ 3% din nou-născuții la termen și 30% din nou-născuții de sex masculin prematuri prezintă cel puțin un testicul necoborât în scrot în momentul nașterii, dar coborârea este adeseori completată în următoarele luni, astfel că la vârsta de un an incidența TNC este de circa 0,6 – 0,7%. Deși au fost identificați câțiva factori care controlează descendența testiculară, cauzele criptorhidismului sunt încă puțin cunoscute. Cele două complicații majore ale criptorhidismului sunt afectarea spermatogenezei și transformarea malignă.

#### 4. CONDUITA PRACTICĂ ÎN TULBURĂRILE DE SEXUALIZARE

Depistarea unei ambiguități sexuale la naștere este o *urgență psihosocială*. Problema esențială pentru medic este un *diagnostic corect, cât mai precoce posibil*. Medicul neonatolog trebuie să recunoască orice *incertitudine* privind „sexul adevărat” al copilului examinând minuțios OGE. Ținând cont de vârsta gestațională, el trebuie să fie atent la orice mici modificări în structura genitală, mai ales la hipertrofiile clitoridiene, micropenisul (<2,5 cm) sau testiculii mici, hipospadiasul cu sau fără TNC. În aceste situații, ca și în ambiguitățile sexuale mai pronunțate, neonatologul trebuie să facă un *examen local și general complet*, evaluând orificiile perineale, mărimea penisului/clitorisului, prezența sau absența gonadelor în poziția lor anatomică sau pe traiectul inguinal, prezența unor anomalii congenitale asociate. În funcție de aceste date, care se adugă la o *anamneză corectă a sarcinii și istoricului familial*, el va recomanda părinților să nu stabilească imediat numele copilului; eliberarea certificatului de naștere poate fi întârziată până la stabilirea definitivă a sexului și, implicit, a numelui ce va fi dat copilului. Cel mai bine ar fi ca pacientul să fie îndrumat către o echipă completă (pediatru, endocrinopediatru, genetician, chirurg pediatru, psiholog) și antrenată în diagnosticul și managementul stărilor intersexuale.

*Analiza cromosomică* este primul pas important pentru stabilirea sexului genetic; în această acțiune se vor evalua un număr suficient de metafaze pentru a exclude un mozaic, se va analiza, prin marcaj G sau R și Q morfologia cromosomului Y și în unele cazuri se va recurge la FISH, pentru identificarea unor anomalii structurale ale cromosomilor sexuali. Copiii cu cariotip XX pot avea PHF – prin HCS sau forme nonadrenale – sau hermafroditism adevărat (HA); copiii cu cariotip XY – se încadrează în grupul heterogen și complex al PHM.

În etapele următoare se vor întreprinde *studii imagistice* (US, CT, RMN) – pentru a decela sau nu structuri mulleriene – *hormonale* (17-hidroxiprogesteronul și steroizii gonadali, în plasmă și urină) și *biochimice* (electroliții serici). Pe baza acestor date se va face un *diagnostic de etapă*, care, în principiu, permite o decizie fermă privind sexul în care va fi crescut copilul (rolul sexual).

Acesta este momentul unei discuții ample, simple și lucide (a întregii echipe) cu ambii părinți, pentru a se stabili sexul în care va fi declarat și crescut copilul. Este un moment dificil în

care se va ține cont de anxietățile părinților, concepțiile lor religioase, morale și culturale, precum și de nivelul de înțelegere. Opțiunea finală va depinde în mare măsură de posibilitățile care există pentru *realizarea unor structuri genitale neambigue și funcționale sexual*. O mare importanță va fi dată (în PHM și HA) mărimii penisului și glandului precum și potențialului lor de a crește (după testul cu testosteron parenteral). Celelalte elemente contează mai puțin deoarece chirurgia actuală permite o reconstrucție corespunzătoare, tratamentul hormonal de substituție – o sexualizare cvasinormală iar „tratamentul” psihologic – o inserție socială adecvată.

Decizia informată a părinților, înțelegerea și cooperarea lor sunt decisive pentru stabilirea cu succes a sexului adecvat al pacientului. O dată luată hotărârea de a crește copilul ca fată sau băiat nu trebuie să mai existe nici o indecizie din partea medicilor sau a părinților.

Gama explorărilor se va continua cu *endoscopie și urogenitografie* (în cazurile cu persistența SUG) iar uneori *laparotomie și biopsie gonadică* (în PHM, HA și unele cazuri de PHM nonadrenal), *investigații hormonale complete*; scopul lor este un diagnostic etiologic cât mai bun cu putință.

Echipa de medici va asigura apoi o *îngrijire continuă corespunzătoare* prin care rolul sexual stabilit va fi amplificat de folosirea unor măsuri adecvate de reparare chirurgicală precoce, tratamente hormonale și susținere psihologică.

Tot acest scenariu este însă unul normal, perfect, într-o medicină performantă (prin calitatea medicilor și dotări); din păcate se mai produc uneori erori de diagnostic și stabilirea a sexului civil adecvat sau diagnostice tardive. Și în aceste cazuri nefericite, ideal ar fi ca să se facă „o corecție” și eventual să se decidă schimbarea sexului până la vârsta de 18 de luni (unii spun până la maximum 30 de luni).

## INTERNET

1. Asociația națională pentru boli rare (SUA)- NORD : <http://www.NORD~rdb.com/~orphan>
2. Atlas cu imagini tridimensionale de embriologie umană: <http://embryo.soad.umich.edu>
3. Biologia dezvoltării (Developmental Biology- Scott F. Gilbert, ediția 7) - probabil cea mai buna carte in domeniu: <http://www.devbio.com>
4. Dezvoltarea umana de la concepție la naștere - imagini si informatii foarte explicite, excelenta pentru studenti, <http://www.visembryo.com>
5. Geneclinics – bază de date despre bolile genetice : <http://geneclinics.org>
6. Genecards – bază de date genele umane și bolile genetice : : <http://www.bighost.area.ba.cnr.it/GeneCards>
7. OMIM – catalogul bolilor mendeliene la om: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
8. Orphanet – bază de date pentru boli genetice : <http://orphanet.infobiogen.fr>
9. Programul HELIX (sfat și teste genetice) al Universității și Spitalului de copii din Washington: <http://www.healthlinks.washington.edu/helix/>
10. Web site al Universității din Michigan: <http://www.med.umich.edu/>
11. Web site-uri de patologie umană:
  - <http://www.emedicine.com>,
  - <http://www.umm.edu/ency/>,
  - <http://healthcenters.healthanswers.com/library/MedEnc>,
  - <http://NetDoctor.co.uk>,
  - <http://www.icondata.com/health/pedbase>,

## Bibliografie specifică selectivă

1. Boorman CJ, Shimeld SM – *The evolution of left-right asymmetry in chordates* - Bioessays

- 2002, 24: 1004-1011.
2. Dubrulle J, Pourquie O – *From head to tail: links between the segmentation clock and antero-posterior patterning of the embryo* – *Curr Opin Genet Dev*, 2002, 12: 519-523.
  3. Eriksson M, Brown WT, Gordon LB et al – *Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome* - *Nature*, 2003, 423: 293-298.
  4. Freeman M, Gurdon JB – *Regulatory principles of developmental signaling* - *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2002, 18: 515-539.
  5. Goodfellow PN, Camerino G – *DAX-1, an “antitestis” gene* – *Cell.Mol.Life.Sci*, 1999;55:857-863
  6. Hackett BP – *Formation and malformation of the vertebrate left-right axis* – *Curr Mol Med*. 2002, 2: 39-66.
  7. Hamada H, Meno C, Watanabe D, Saijoh Y – *Establishment of vertebrate left-right asymmetry* - *Nat. Rev. Genet.*, 2002, 3: 103-113.
  8. Hiort O., Holterhus P.M. - *The molecular basis of male sexual differentiation* - *Eur. J. Endocrinol.*, 2000;142: 101-110.
  9. Huang B et al – *Autosomal XX sex reversal Cosed by duplication os SOX9* – *Am.J.Med. Genet* 1999;87:349-353
  10. Kirkwood TB - *Human senescence* - *Bioessays*, 1996, 18: 1009-1016.
  11. Koopman P. - *SRY and SOX9: mammalian testis-determining genes* - *Cell.Mol.Life.Sci* 1999;55:839-856
  12. Lecuit T, Pilot F - *Developmental control of cell morphogenesis: a focus on membrane growth* - *Nat Cell Biol.*, 2003, 5: 103-108.
  13. McElreavey K, Fllous M. - *Sex determination and the X chromosome*- *Am. J. Med. Genet.*, 1999;89: 176-185.
  14. Meier P, Finch A, Evan G - *Apoptosis in development* - *Nature*, 2000; 407: 796-801.
  15. Quigley C.A. – *Disorders of Sex Determination and Differentiation* – in “Principles of molecular medicine” – Ed. Jameson J.L. - Humana Press Totowa, New Jersey, 1998.
  16. Parker KL, Schedl A, Schimmer BP – *Gene interactions in gonadal development* - *Annu.Rev.Physiol.* 1999;61:417-433.
  17. Rodda SJ, Kavanagh SJ, Rathjen J, Rathjen PD - *Embryonic stem cell differentiation and the analysis of mammalian development* - *Int J Dev Biol.*, 2002, 46: 449-458.
  18. Simpson J.L, Rajkovic A. - *Ovarian differentiation and gonadal failure*. *Am. J. Med. Genet.*, 1999;89: 186-200.
  19. Srivastava D, Olson EN - *A genetic blueprint for cardiac development* - *Nature*, 2000, 407: 221-226.
  20. Swain A, Lovell-Badge R – *Mammalian sex determination: a molecular drama* - *Genes & Development*, 1999;13:755-767
  21. Tickle C - *Molecular basis of vertebrate limb patterning* - *Am. J. Med. Genet.* 2002;112: 250-255.
  22. Tilmann C., Capel B. - *Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination* - *Recent Progress. Horm. Res.*, 2002;57: 1-18.
  23. Troen BR -*The biology of the aging* - *Mount Sinai J. Med.*, 2003, 70: 3-22.
  24. Wedlich D - *The polarising role of cell adhesion molecules in early development* - *Curr Opin Cell Biol.*, 2002;14: 563-568.
  25. Zaffran S, Frasch M - *Early signals in cardiac development* - *Circ. Res.* 2002;91: 457-469.

## CAPITOLUL 16

# GENETICA SISTEMULUI IMUN

### A. GENERALITĂȚI DESPRE SISTEMUL IMUN

Rolul sistemului imun, despre care s-a crezut că ar fi doar acela de a apăra organismul împotriva agenților patogeni, este de fapt mult mai complex, bazându-se pe capacitatea de a face distincție între self (propriu organismului) și non-self (străin).

Sistemul imun prezintă două componente, complet diferite din punct de vedere al percepției antigenelor (structuri non-self): sistemul imun nespecific (înnăscut) și cel specific (adaptativ).

- **Imunitatea înnăscută** se referă la toate elementele pe care organismul le posedă încă de la naștere și care trebuie să reprezinte *prima linie de apărare* împotriva antigenelor. Aceste elemente includ componente externe și interne începând de la piele (și secrețiile acide ale glandelor sudoripare și sebacee), mucoase (și mucusul care le acoperă), reflexul de tuse și strănut, secreția lacrimală, mișcarea cililor, creșterea temperaturii corporale, oxigenarea de la nivelul plămânilor, lizinele eliberate de către microorganismele comensale și până la componentele sistemului complement, fagocitele sau celulele NK (natural killer – celule care răspund la unele infecții virale sau prezența celulelor tumorale). Celulele implicate în fagocitoză sau uciderea extracelulară. Nici una dintre acestea nu ține cont de tipul antigenului (de specificitatea sa) și intră în acțiune *rapid*, într-un timp remarcabil de scurt.
- **Imunitatea adaptativă** (specifică, dobândită<sup>1</sup>) reprezintă apanajul exclusiv al vertebratelor și se bazează pe existența limfocitelor. Răspunsul acestor celule este mai *lent* și este *dobândit* doar prin contactul cu antigenul; în plus, răspunsul este caracteristic, *specific* doar celui antigen. Acest lucru este posibil datorită unui fenomen extraordinar care înzestrează limfocitele cu receptori pentru antigene.

Sistemul imun ar putea fi descris prin prisma funcțiilor sale: **supraveghere** (distincția self/non-self), **apărare** (declanșarea unui răspuns, natural sau dobândit, în scopul eliminării sau neutralizării antigenului), **reglare** (controlul răspunsurilor imune prin mecanisme reglatorii în scopul menținerii homeostaziei sau prevenirii distrugerilor tisulare), **memorie imunologică** (capacitatea de a răspunde optimizat la un nou contact cu același antigen) și **toleranță** (inducerea unei stări de nerresponsivitate față de anumite antigene). O dată declanșat un răspuns față de un antigen (răspuns imun), vor fi implicate atât imunitatea specifică cât și cea nespecifică, ca un sistem integrat.

Limfocitele derivă din celulele stem limfoide. În funcție de locul unde se vor maturiza în continuare (timus sau măduvă osoasă) vor rezulta limfocite T, respectiv limfocite B. Înainte de a părăsi timusul, limfocitele T suferă o diferențiere suplimentară în limfocite T helper și limfocite T citotoxice. Chiar dacă maniera lor de acțiune, precum și consecințele sunt foarte diferite, activarea limfocitelor T va conduce la un răspuns imun denumit **“celular”**. Activarea limfocitelor B va conduce la diferențierea lor în plasmocite; aceste celule secretă anticorpi,

<sup>1</sup> Acest termen istoric, poate induce o serie de confuzii. Multe dintre componentele sistemului imun dobândit sunt, de asemenea, prezente de la naștere.

molecule capabile să recunoască antigenele (noțiunea de anticorp va fi discutată ulterior). Acest tip de răspuns imun este denumit “**umoral**”. Deși fiecare tip de răspuns prezintă caracteristici distincte, între ele există o strânsă interdependență (figura 16.1).

Practic, noțiunea de **receptor** implică automat noțiunea de **specificitate**: legarea dintre receptor și ligandul său nu poate fi decât una specifică. Ideea unei astfel de interacțiuni a apărut încă din 1897, o dată cu studiile lui Ehrlich cu privire la legarea dintre toxina difterică și antitoxina difterică. Paul Ehrlich este cel care avansează “Teoria catenelor laterale” în care se postulează genial nu numai existența receptorilor (catene laterale) pentru antigen dar și caracterul *pre-format* (receptori produși încă de dinaintea pătrunderii antigenului în organism).

Specificitatea implică faptul că fiecare receptor își leagă ligandul său, sau altfel spus, un receptor nu poate fi utilizat decât de un singur ligand. Numărul extrem de mare de structuri care se pot constitui în antigene implică faptul că în interiorul organismului ar trebui să existe un număr corespunzător de receptori pentru aceste antigene. Astfel, numărul de antigene existente în natură (cifra teoretică avansată se ridică la circa  $10^9$ ) și deci al receptorilor pentru antigen care trebuie să existe în mod corespunzător, depășește numărul total al genelor existente în genom. Această constatare se afla în totală contradicție cu dogma geneticii care postula: “*o genă – o proteină*”.

Contestată tocmai pentru ideea de receptori pre-formați, teoria lui Ehrlich a revenit în atenție datorită probelor experimentale de netăgăduit. Mai întâi, Niels Jerne demonstrează existența anticorpilor naturali, cu care organismul se naște (deci pre-formați), iar apoi Burnet, Talmage și Lederer contribuie la conturarea “*Teoriei selecției clonale*”, teorie pe care se bazează întreaga imunologie modernă. Dar dacă receptorii sunt într-adevăr pre-formați, înseamnă că *organismul dispune de capacitatea de a produce receptori pentru toate antigenele existente*, inclusiv pentru cele cu care organismul s-ar putea să nu se întâlnească niciodată. Devenea astfel tot mai evident faptul că mecanismul genetic de formare al **receptorilor pentru antigene** este unul cu totul special și că organismul a elaborat o strategie particulară pentru formarea lor, astfel încât să se poată ajunge la această enormă diversitate, necesară pentru a face față întregii game de antigene.

## B. MECANISMELE GENETICE CARE STAU LA BAZA GENERĂRII DIVERSITĂȚII IMUNOGLOBULINELOR

Receptorul pentru antigen al **limfocitului B** este molecula de imunoglobulină (Ig). (figura 16.2) Studiile enzimatiche efectuate în anii '60 au condus la elucidarea structurii sale, formată din două lanțuri grele (H – de la *Heavy*) identice și două lanțuri ușoare identice (L – de la *Light*). Încă de pe atunci devenise evident că cele două capete ale acestei glicoproteine posedă funcții diferite. Recunoașterea antigenului este efectuată cu ajutorul capătului amino-terminal, în timp ce capătul carboxi-terminal este implicat în ceea ce denumim funcții “biologice”. Lanțurile au fost împărțite ca atare într-o *porțiune variabilă* (N-terminală) și o *porțiune constantă* (C-terminală). Fiecare moleculă de imunoglobulină posedă două situsuri identice de legare a antigenului, iar la formarea fiecăruia participă atât partea variabilă a lanțului L cât și partea variabilă a lanțului H. Astăzi știm că porțiunea din imunoglobulină dedicată legării antigenului, numită **paratop**, este extrem de redusă ca dimensiuni, fiind alcătuită din doar câțiva aminoacizi, localizați în așa numitele *regiuni hipervariabile*. Nici antigenul nu participă la legare în întregul său, ci cu o porțiune corespunzătoare din punct de vedere dimensional, numită **epitop**.

Adâncirea studiilor de structură a relevat organizarea moleculei în domenii “globulare”, formate din câte două straturi opuse, unite prin intermediul unei legături disulfidice intra-lanț și a unei legături hidrofobe (figura 16.3). Fiecare dintre straturi este format dintr-un număr de foi  $\beta$  plisate, antiparalele, unite prin bucle de conexiune. Totodată,

analiza comparativă a unui număr mare de lanțuri a evidențiat că diferențele dintre acestea nu se regăsesc dispuse aleatoriu în structura primară a proteinei, ci sunt restrânse la nivelul câtorva porțiuni înguste, numite regiuni hipervariabile. La nivelul domeniului globular, regiunile hipervariabile se regăsesc în regiunea buclelor de conexiune dintre foile  $\beta$  plisate<sup>2</sup>.

În organism este descris un număr mare de molecule care conțin una sau mai multe regiuni homologe cu domeniile globulare ale imunoglobulinelor. Împreună ele alcătuiesc "*superfamilia imunoglobulinelor*". Cu siguranță că această formă de organizare a peptidelor reprezintă o manieră de evoluție către o structură mai stabilă, mai avantajoasă pentru organism. Prezența domeniilor globulare în atât de multe molecule diferite sugerează că genele care le codifică s-au format, cel mai probabil, dintr-o genă ancestrală comună, care a fost ulterior multiplicată (și modificată în același timp), iar apoi distribuită în genom. Cei mai proeminenți membri ai superfamiliei imunoglobulinelor (pe lângă imunoglobuline) sunt reprezentați de:  $Ig\alpha$ ,  $Ig\beta$ , TCR, lanțurile  $\gamma$ ,  $\delta$  și  $\epsilon$  ale CD3, CD4, CD8, HLA I, HLA II.

Fiecare limfocit B posedă pe suprafața sa imunoglobuline cu o specificitate unică, astfel că fiecare limfocit B este capabil să răspundă unui epitop unic. Acest aspect a fost înțeles și acceptat o dată cu **teoria selecției clonale**. Antigenele pătrunse în organism vor *selecta* acele clone de limfocite care au specificitățile potrivite, le vor *activa* și vor *induce proliferarea* lor. O parte din aceste limfocite se vor diferenția în **plasmocite**, celule care nu mai exprimă imunoglobuline pe suprafață deoarece sintetizează lanțuri grele mai scurte și sunt astfel incapabile de a mai insera aceste molecule în membrană. În schimb, plasmocitele vor secreta imunoglobulinele, iar această variantă solubilă a receptorului pentru antigen al limfocitului B capătă numele de **anticorp**. Anticorpii sunt și ei capabili să recunoască antigenele în mod specific și să se cupleze cu acestea formând complexe antigen-anticorp (**complexe imune**).

Imunoglobulinele reprezintă componentul central al receptorului pentru antigen al limfocitului B (BCR – *B cell receptor*), căruia i se alătură moleculele constante  $Ig\alpha$  și  $Ig\beta$ , cu rol în transmiterea intracelulară a semnalului interceptat de receptor (**figura 16.2**).

Se estimează că sistemul imun al mamiferelor este capabil să sintetizeze mai mult de  $10^{10}$  imunoglobuline (*anticorpi*) diferite<sup>3</sup>, un număr imens de molecule, care depășește cu mult numărul de gene pe care genomul uman îl poate pune la dispoziție. Se pune firesc întrebarea: cum este posibilă sinteza numărului imens de imunoglobuline. O primă teorie (*germ-line theory* – teoria liniei germinale) estima că doar aproximativ 15% dintre genele unui genom haploid sunt alocate codificării imunoglobulinelor, fără să poată oferi însă nici o explicație pentru modalitatea formării, cu un număr limitat de gene, a unui număr atât de mare de structuri diferite. Alte teorii ulterioare (*somatic variation theories* – teoriile variației somatice) susțineau că, într-adevăr, din totalul genelor din genom, doar un număr limitat erau alocate sintezei imunoglobulinelor, dar că, prin *recombinări și mutații*, acestea erau capabile să ducă la diversitate. Din păcate însă, nici aceste teorii nu au reușit să răspundă la întrebarea ridicată de studiile structurale, care au evidențiat că moleculele de anticorpi manifestă nu numai diversitate la capătul N-terminal dar și constanță către capătul C-terminal. Astfel, a apărut pentru prima oară (Dreyer și Benett, 1965) ideea că există *gene separate pentru regiunea variabilă și respectiv regiunea constantă*, iar aceste gene reușesc să fuzioneze formând o secvență continuă. Mai mult decât atât, Dreyer și Benett au intuit ceea ce astăzi este demonstrat și anume că pentru partea variabilă există disponibile sute de gene, în timp ce pentru partea constantă este necesară doar una.

Au trebuit să treacă însă mai bine de 10 ani pentru ca progresul tehnologic să poată evidenția (Susumu Tonegawa, 1976) existența unor gene separate pentru regiunea variabilă și

<sup>2</sup> Existența regiunilor hipervariabile a fost pusă în evidență de către Wu și Kabat în diagramele care le poartă numele. Analiza regiunilor variabile a relevat că, din punct de vedere al structurii primare, diferențele dintre lanțuri se regăsesc la nivelul unor porțiuni înguste, denumite CDR (complementarity determining region), în timp ce, în afara acestora (regiuni cadru), diferențele dintre lanțuri nu sunt nici pe departe la fel de marcate.

<sup>3</sup> Totalitatea specificităților diferite pe care le poate produce sistemul imun este cunoscută sub numele de *Repertoriu Imunologic*.



constantă, ca și *rearanjarea genelor* în cursul diferențierii limfocitelor B. Pe măsură ce a devenit posibilă clonarea și secvențierea genelor, s-a dovedit că procesul este și mai complex.

## 1. FORMAREA LANȚURILOR UȘOARE

Imunoglobulinele pot utiliza două tipuri de lanțuri L, denumite kappa ( $\kappa$ ) și, respectiv, lambda ( $\lambda$ ), în funcție de partea constantă. Partea constantă și partea variabilă a lanțurilor ușoare sunt aproximativ egale din punct de vedere al dimensiunii. O moleculă de imunoglobulină poate folosi fie lanțuri  $\kappa$ , fie lanțuri  $\lambda$  (dar nu ambele simultan), fără ca aceasta să afecteze în vreun fel funcționalitatea receptorului sau a anticorpului.

Fiecare dintre cele două lanțuri ușoare este codificat de gene distincte, situate pe cromosomi diferiți: setul de gene care codifică lanțul  $\kappa$  este situat pe cromosomul 2 (figura 16.4) iar genele lanțului ușor  $\lambda$  sunt localizate pe cromosomul 22.

Prima opțiune a limfocitului B este reprezentată întotdeauna de **lanțul ușor  $\kappa$** . Partea variabilă a lanțului  $\kappa$  (începând de la capătul N-terminal) are o lungime de 108 aminoacizi și este codificată de două gene distincte: *gena V* (variabilă) codifică primii 95 de aminoacizi și *gena J* (*joining* – unire) codifică aminoacizii 96-108.

- Analiza genică a relevat că în genomul celulelor germinale umane există aproximativ 40 de *gene  $V_k$  diferite*, fiecare dintre ele putând codifica un segment inițial distinct al domeniului variabil  $\kappa$ . Aceste gene variabile sunt aranjate în mod *liniar*, separate prin introni și precedate (în plus față de promotori) de o secvență exonică denumită Leader (conducătoare), situată în aval față de promotor și care va codifica un scurt peptid care are rolul de a introduce și ghida lanțul ce se sintetizează în reticulul endoplasmatic. Acest peptid leader va fi însă clivat de la nivelul lanțului sintetizat, înainte să aibă loc asamblarea lanțurilor ușoare și grele.
- La o oarecare distanță de grupul genelor *V*, spre capătul telomeric al ADN-ului, se găsește grupul celor 5 *gene  $J_k$* , după care, separată printr-un intron foarte lung, se găsește *singura genă pentru regiunea constantă  $C_k$* , care codifică întreaga porțiune constantă a lanțului  $\kappa$ .

Formarea lanțului  $\kappa$  începe prin aducerea unei gene  $V_k$  și a unei gene  $J_k$  în imediata vecinătate una față de alta, fenomen numit **rearanjare genică** (figura 16.5). Genele sunt rearanjate și unite datorită existenței la cele două capete a unor secvențe intronice denumite RSS (*Recombination Signal Sequences* – secvențe semnal de recombinare). Procesul este mediat de enzimele codificate de genele RAG-1 și RAG-2 (*recombination activation genes* – gene de activare a recombinării). Aceste enzime acționează exclusiv la nivelul limfocitelor, iar prezența lor simultană este indispensabilă desfășurării adecvate a procesului.

În cursul procesului de rearanjare, cele două gene *V* și *J*, *alese în mod complet aleatoriu*, vor fi unite, dând naștere unei secvențe genice continue; totodată, întregul material genetic care se găsea între cele două gene va fi excizat și îndepărtat. Astfel, ADN-ul limfocitului B care a suferit o rearanjare a genelor lanțului  $\kappa$  va conține următoarele regiuni, începând dinspre centromer către telomer: toate genele  $V_k$  de dinaintea celei selectate, promotor-ul și exonul Leader (L) al genei  $V_k$  alese, un intron, segmentul genic continuu  $V_k J_k$  urmat de genele  $J_k$  neselectate, un intron și gena pentru regiunea constantă.

Secvența rearanjată a lanțului ușor este apoi transcrisă de către o ARN-polimerază, începând de la segmentul L până la semnalul stop de după gena pentru regiunea constantă, generând astfel un transcript ARN primar. Urmează apoi un proces de incizare a joncțiunilor exon-intron aște moleculei de ARNm precursor, prin care sunt îndepărtate secvențele necodante (matisare) și un proces de poliadenilare a genei constante. Rezultă astfel ARNm matur care va părăsi nucleul și se va lega ulterior la nivelul ribosomilor. Aici are loc translația și proteina ce se sintetizează va fi dirijată, de către segmentul Leader de la nivelul capătului N-terminal, în interiorul lumenului reticulului endoplasmatic rugos (RER). În RER, secvența Leader este îndepărtată iar lanțul ușor va putea, abia acum, să se asocieze cu un lanț greu.



Genele **lanțului ușor**  $\lambda$  sunt situate la om pe cromosomul 22. Locusul  $\lambda$  uman conține aproximativ 40 de gene  $V_\lambda$  și 4 gene  $J_\lambda$  despre care se știe că sunt funcționale (pe lângă altele nefuncționale, numite pseudogene). Organizarea locusului  $\lambda$  este diferită de cea pentru  $k$ , fiecare genă  $J_\lambda$  fiind asociată cu câte o genă  $C_\lambda$  distinctă. (figura 16.4). Sinteza lanțului  $\lambda$  este similară în principiu cu cea a lanțului  $k$ : printr-o rearanjare aleatorie, mediată de RAG1 și RAG2, o genă  $V_\lambda$  (care codifică primii 97 de aminoacizi) este unită cu o genă  $J_\lambda$  (care codifică următorii 13 aminoacizi ai regiunii variabile), dar ADN-ul rearanjat va utiliza mai departe aceea genă  $C_\lambda$  asociată genei  $J$  alese.

## 2. FORMAREA LANȚURILOR GRELE

Genele lanțului greu (H) sunt situate la om situate pe cromosomul 14. Organizarea acestor gene este mai complexă decât cea a genelor ce codifică lanțurile ușoare (L) deoarece *există o genă suplimentară D*, care codifică o porțiune a regiunii variabile. Astfel, segmentul genic  $V_H$  codifică primii 94 de aminoacizi iar segmentul genic  $J_H$  – secvența curprinsă între aminoacizii 98-113; secvența intermediară, extrem de scurtă (95-97), este codificată de o genă denumită  $D_H$  (Diversitate) (figura 16.4). Prin secvențializarea directă a genelor de pe cromosomul 14, astăzi știm că există, începând de la telomer spre centromer, un grup de 51 de gene  $V_H$ , urmate de un grup de 27 de gene  $D_H$ , apoi, la o oarecare distanță, 6 gene  $J_H$  funcționale.

O altă caracteristică ce particularizează genele lanțurilor grele este prezența în genomul celulelor germinale a unor *gene multiple ce codifică regiunea constantă*. Partea constantă a lanțului greu este responsabilă pentru conferirea așa numitelor *funcții "biologice" ale anticorpilor*, iar conservarea acestor importante funcții efectorii este realizată prin menținerea unui număr limitat de gene pentru regiunea constantă.

Spre deosebire de partea constantă a lanțurilor ușoare, regiunea situată spre capătul C-terminal a lanțurilor grele este cea care hotărăște încadrarea întregii imunoglobuline într-una din cele 5 clase (**izotip**)<sup>4</sup>. Grupul genelor  $C_H$  (fiecare dintre ele este flancată de introni) este separat de genele  $J_H$  printr-un intron lung. În plus, fiecare genă  $C_H$  este formată din mai mulți exoni și introni. Fiecare dintre exoni codifică câte un domeniu distinct al regiunii constante. Genele regiunii constante sunt aranjate într-o anumită ordine, iar acest aranjament secvențial nu este întâmplător, fiind în directă legătură cu ordinea exprimării claselor de imunoglobuline în cursul diferențierii limfocitului B și a răspunsului inițial în IgM la contactul cu un antigen.

Pentru a genera o genă transcriptibilă pentru lanțul greu sunt necesare rearanjări distincte. În aceeași manieră întâmplătoare descrisă anterior, un segment genic  $D_H$  oarecare este adus în imediata proximitate a unei gene  $J_H$ . Lângă segmentul  $D_H J_H$  care rezultă astfel este adusă una din genele  $V_H$  (figura 16.5). Rearanjările de la nivelul ADN-ului cromosomului 14 vor conduce la următoarea succesiune, dinspre telomer către centromer: promotor-ul genei  $V_H$ , exonul Leader, un scurt intron, segmentul continuu VDJ, un alt intron și întreaga serie de gene constante. O dată rearanjările finalizate, o ARN polimerază se va lega la promotor și va transcrie întreaga secvență (inclusiv intronii). În acest proces de transcripție sunt antrenate și *primele două gene constante*, care sunt  $C_\mu$  și  $C_\delta$ . Rezultă astfel un transcript ARN primar care va urma un proces de matisare și poliadenilare diferențiată. Matisarea ARN-ului va conduce în acest caz nu numai la eliminarea intronilor ci și la separarea genelor  $C_\mu$  și  $C_\delta$ . Dacă într-o primă etapă, segmentul VDJ va fuziona cu  $C_\mu$  și astfel primul lanț greu sintetizat de limfocitul B va fi un lanț greu  $\mu$  (iar prima imunoglobulină produsă va fi IgM), în etapa imediat următoare, segmentul VDJ se va asocia, într-o manieră cvasialternativă, atât cu gena  $C_\mu$  cât și cu gena  $C_\delta$ . Consecința acestui proces particular va fi exprimarea simultană, pe suprafața

<sup>4</sup> Partea constantă a lanțului greu, codificată de o anumită genă constantă, permite încadrarea întregii imunoglobuline într-una din cele 5 clase (isotipuri): A, D, E, G, M. De fapt, există 9 tipuri distincte de lanțuri grele, ceea ce permite distincția unor clase și subclase: IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>, IgM, IgD, IgE.

aceleiași celule B, atât a IgM, cât și a IgD, având însă aceeași specificitate, determinată de aceeași combinație distinctă VDJ.

### 3. MECANISMUL REARANJĂRILOR GENELOR CARE CODIFICĂ REGIUNEA VARIABILĂ

Rearanjările genelor decurg așa cum au fost descrise mai sus, dar se pot pune firesc două întrebări: cum este realizată asamblarea corectă (întotdeauna o genă  $V_H$  se asociază cu o genă  $D_H$  și nu direct cu gena  $J_H$ ) și cum se produce asocierea genelor prin unirea segmentelor genice în ordinea corectă 5'-3', rearanjarea a două gene din același grup (V, D sau J) veavând loc niciodată. Înțelegerea mecanismului a devenit posibilă o dată cu identificarea a două secvențe conservate la nivelul ADN-ului din genomul celulelor germinale, fiecare dintre ele constând dintr-un heptamer palindromic și un nonamer bogat în A și T, separate de către o secvență neconservată, formată fie din 12, fie din 23 de perechi de baze azotate. Lungimea acestor “distanțieri” corespunde fie unei spire, fie a două spire complete a helix-ului ADN. Aceste secvențe sunt intronice și se găsesc după fiecare genă V, înaintea fiecărei gene J și la ambele capete ale genelor D. Intronii descriși funcționează ca ținte de recunoaștere – *secvențe semnal* – pentru enzimele responsabile pentru rearanjarea genelor și sunt denumite RSS (*Recombination Signal Sequence*) (figura 16.6).

Rearanjarea genelor este rezultatul acțiunii mai multor enzime, denumite generic “*recombinaze*”. Primele astfel de recombinaze responsabile pentru procesele care au loc în limfocite au fost descrise în 1990: genele RAG1 și RAG2 (*Recombination Activating Gene*) codifică proteine care, doar dacă acționează împreună, sunt capabile să inducă rearanjarea VDJ sau VJ<sup>5</sup>.

Rearanjările genelor V(D)J – destinate părților variabile a imunoglobulinelor – pot fi “productive” sau “non-productive”. O *rearanjare productivă* este aceea care va conduce la o secvență VJ sau VDJ care să poată fi transcrisă și apoi translată în întregime. O *rearanjare neproductivă* decalează cadrul de lectură generând codoni stop care vor bloca translația iar celulele vor fi eliminate prin apoptoză. Deși se consideră că tăierea ADN-ului se face în mod precis la joncțiunea dintre exon și intronul RSS, procesul ulterior de fuziune a segmentelor genice este adesea imperfect. Această imprecizie reprezintă o sabie cu două tăișuri. Pe de o parte, conferă un imens avantaj limfocitelor, conducând la generarea unui surplus de diversitate, dar, pe de altă parte, poate conduce la rearanjări neproductive.

Limfocitele sunt celule somatice diploide și conțin deci atât cromosomi materni cât și paterni. Toate genele implicate în codificarea lanțurilor pentru imunoglobuline (ca și cele pentru TCR – T cell receptor, receptorul pentru antigen al limfocitului T) sunt *gene dominante*. Cu toate acestea, limfocitelor nu li se permite decât utilizarea alelelor de pe un singur cromosom. Fenomenul (unic limfocitelor), a fost denumit “**excluzie alelică**”. Singura rearanjare care are loc simultan pe ambii cromosomi este cea dintre genele  $D_H$  și  $J_H$ , toate celelalte desfășurându-se fie pe un cromosom, fie pe cel pereche. În acest fel, fiecare limfocit va reține doar câte o rearanjare productivă VDJ și respectiv VJ, astfel încât vor fi produse lanțuri ușoare și grele având o parte variabilă identică. Asamblarea lor va conduce în final la obținerea de receptori pentru antigen cu o specificitate unică.

### 4. FACTORI CARE CONTRIBUIE LA GENERAREA DIVERSITĂȚII IMUNOGLOBULINELOR

Analizând retrospectiv către primele două teorii emise cu privire la diversitatea receptorilor pentru antigen, teoria liniei germinale și teoria somatică, constatăm că fiecare

<sup>5</sup> Recombinazele codificate de către RAG1 și RAG2, alături de enzima TdT (Terminal deoxinucleotidil Transferaza) sunt singurele care se găsesc doar în limfocite.

dintre ele conține elemente validate ulterior experimental. Prezentăm în continuare o sinteză a mecanismelor care determină, în ultimă instanță, obținerea acestui număr remarcabil de receptori pentru antigene:

- (1) În primul rând trebuie remarcat că, spre deosebire de oricare alte proteine sintetizate în organism, codificarea lanțurilor imunoglobulinelor este asigurată *de mai multe gene*, care, ulterior, vor fi asamblate într-o secvență contiguă.
- (2) Fiecare dintre aceste gene este aleasă dintr-un *rezervor genic* alcătuit din mai multe gene, perfect individualizate. Cel mai bine reprezentat, din acest punct de vedere, este grupul genelor V, destinat atât sintezei lanțurilor grele cât și a celor ușoare.
- (3) Mecanismul cel mai important, care creează el însuși diversitate și oferă, în plus, posibilitatea intervenției ulterioare a unor mecanisme adiționale, este reprezentat de *rearanjările aleatorii*, guvernate de recombinaze. Faptul că aceste reasortări genice se produc într-o manieră întâmplătoare, fără să existe reguli care să impună combinații particulare, lasă practic posibilitatea formării oricărei combinații de gene<sup>6</sup>.
- (4) *Paratopul* imunoglobulinelor este format din combinația *părții variabile a unui lanț greu și a părții variabile a unui lanț ușor*. Asocierea dintre un lanț greu și unul ușor este de asemenea *aleatorie*; într-o celulă B oarecare, întâmplarea poate conduce la sinteza unor lanțuri H și L oarecare, iar acestea, odată asamblate, vor conduce la o combinație particulară<sup>7</sup>.
- (5) Imprecizia unirii genelor conduce la ceea ce a fost denumită «*diversitate joncțională*» sau «*flexibilitate joncțională*». Așa cum menționam anterior, tăierea dintre RSS și secvența codantă pare să fie precisă, în schimb, unirea secvențelor codante este, cel mai adesea, imprecisă. *Joncțiunea genelor* va deveni în acest fel un loc major de generare a diversității, dat fiind faptul că acest proces este unul practic necontrolabil.
- (6) *Regiunea P de adiție* apare după tăierea ADN-ului. Dacă prima clivare apare la joncțiunea RSS-exon, în etapa următoare, nucleotidele de la acest capăt vor face în așa fel încât, în momentul tăierii complete a ambelor catene, acestea să fie unite între ele printr-o buclă, așa numitul «*ac de păr*». Fenomenul se produce la capetele ambelor gene care urmează să fie fuzionate și, pentru ca unirea acestor gene să poată avea loc, «*acele de păr*» trebuie ulterior și ele tăiate. Această a doua tăiere de către o endonuclează se face, cel mai adesea, asimetric, astfel încât una dintre catene va deveni mai lungă decât cealaltă. Este necesară intervenția unor enzime de reparare care să adauge nucleotide complementare celor prezente la nivelul catenei mai lungi. Se creează astfel o secvență palindromică la nivelul joncțiunii, motiv pentru care această regiune a fost denumită «*regiune P de adiție*».
- (7) *Regiunea N de adiție* este creată cu ajutorul unei enzime numite TdT (*terminal deoxinucleotidil transferase*). Rolul TdT este acela de a adăuga nucleotide la capetele genei D în cursul unirii acesteia la gena J sau la gena V. Numărul maxim de baze azotate pe care enzima le poate alipi genei D este de 15, dar numărul de nucleotide transferat este aleatoriu și astfel se formează secvențe complet diferite. Ceea ce este important de subliniat în acest moment este că *diversitatea joncțională*, adiția în regiunea P și în regiunea N conduc la apariția unor secvențe genice complet noi, care nu existau inițial în genomul celulelor germinale. Aceste mecanisme sunt cele care reușesc să ridice diversitatea Ig până la cifra avansată anterior, de aproximativ  $10^{10}$  specificități diferite.

<sup>6</sup> Un calcul simplu ne arată că în cazul lanțurilor grele, dacă orice gena D se poate combina cu orice gena J și apoi cu orice genă V, numărul de combinații posibile pe care îl putem obține este de  $51(V_H) \times 27(D_H) \times 6(J_H) = 8262$ . În cazul lanțurilor ușoare de tip k, calculul ne conduce la  $40(V_k) \times 5(J_k) = 200$  de combinații, respectiv  $30(V_\lambda) \times 4(J_\lambda) = 120$  de combinații pentru lanțurile ușoare  $\lambda$ .

<sup>7</sup> Astfel, un calcul simplu ne arată că putem obține, în cazul asocierii unui lanț greu cu un lanț ușor k un număr de  $8262 \times 200 = 1\ 652\ 400$  de variante. Această sumă, deși impresionantă, este totuși departe de numărul de specificități existente în organism, care alcătuiesc repertoriul imunologic și care este estimat între  $10^{10}$  și  $10^{11}$ . Surplusul de diversitate este oferit însă de *mecanisme suplimentare*, care nu s-ar fi putut, totuși, manifesta în absența acestui sistem cu totul deosebit prin care gene, situate la distanță între ele, sunt alese întâmplător, alăturate și unite pentru a forma o genă hibrid.

- (8) Un alt mecanism implicat în generarea diversității este constituit de *mutațiile somatice* ce se produc întâmplător, printr-un mecanism încă neelucidat, la nivelul genelor rearanjate (VJ sau VDJ). Un element deosebit este reprezentat de *frecvența crescută* (hipermutații) cu care aceste mutații apar, de cel puțin o sută de mii de ori mai înaltă decât frecvența cu care apar mutațiile spontane la nivelul oricăror alte gene<sup>8</sup>

## 5. ASOCIEREA GENEI CONSTANTE ȘI COMUTAREA DE CLASĂ

Organizarea genelor ce codifică partea constantă a lanțurilor este diferită de cea responsabilă pentru partea variabilă. În cazul lanțurilor ușoare, există o singură genă  $C_k$  și mai multe gene  $C_\lambda$ , dar partea constantă a lanțurilor ușoare nu influențează nici paratopul și nici clasa imunoglobulinei respective. De mult mai mare importanță este însă partea constantă a lanțurilor grele, responsabilă pentru determinarea **izotipului** și a funcțiilor numite “biologice” ale anticorpilor. Genele pentru regiunile constante sunt mult mai lungi decât cele pentru regiunile variabile, fiind alcătuite dintr-o serie de exoni distincți ce codifică fiecare în parte domeniile extracelulare, regiunea “balama” (acolo unde este cazul), domeniul transmembrantar și coada intracitoplasmatică.

O caracteristică a genelor  $C_H$  este prezența unor gene multiple în genomul celulelor germinale, corespunzătoare fiecărei clase și subclase de imunoglobuline. Ultima genă  $J_H$  este separată de prima genă  $C_H$  printr-un intron foarte lung. În plus, fiecare genă  $C_H$  este precedată nu numai de promotor, dar și de un *amplificator* al transcripției (enhancer) precum și de câte o secvență intronică denumită “switch” (comutare), caracteristică fiecărei gene în parte; o excepție notabilă este reprezentată de gena  $C_\delta$ , lipsită de secvența de comutare. Secvențele de comutare sunt destul de lungi, fiind alcătuite din mai multe motive repetitive. Rolul acestor introni este acela de a permite asocierea la acest nivel a unor recombinaze care sunt diferite pentru fiecare clasă în parte.

În timpul diferențierii limfocitului B, genele  $C_\mu$  și  $C_\delta$ , cele mai apropiate de genele J, sunt primele transcrise. Ca un element particular, ambele gene sunt transcrise simultan, probabil tocmai datorită absenței secvenței de comutare din fața genei  $C_\delta$ , precum și a distanței de numai 5 kb dintre cele două gene. Astfel, transcriptul primar, cu o lungime de aproximativ 15 kb, conține genele  $VDJC_\mu C_\delta$ . Dintre cele patru situsuri de poliadenilare, primele două sunt asociate genei  $C_\mu$ , iar celelalte două genei  $C_\delta$ . Dacă transcriptul primar este clivat și poliadenilarea are loc la nivelul situsului 2, atunci ARN-ul mesager va conține întreaga secvență a genei  $C_\mu$  și va rezulta astfel forma membranară a lanțului. Dacă însă poliadenilarea se face la nivelul situsului 4, atunci, prin tăierea ARN-ului, secvența  $C_\mu$  va fi înlăturată și se va ajunge la ARNm care codifică forma membranară a lanțului  $C_\delta$ . Acest proces se produce simultan, astfel că secvența VDJ are posibilitatea să se unească, de o manieră alternativă și cu gena  $C_\mu$  și cu gena  $C_\delta$ . În consecință, limfocitele B mature dar *naive* vor exprima simultan pe suprafață atât IgM cât și IgD, dar cu aceeași specificitate, determinată de către aceeași combinație VDJ.

După stimularea antigenică însă, expresia IgD este pierdută, iar IgM tinde să fie înlocuită, în cele mai multe cazuri, cu un alt isotip, fenomen denumit “**comutare de clasă**”. Astfel, gena  $C_\mu$  va fi înlocuită cu o alta, situată spre capătul 3’ al ADN-ului. Trebuie subliniat însă că acest proces are loc în timpul vieții adulte a limfocitului B, noi rearanjări genice ne

<sup>8</sup> Se pare că anumite motive nucleotidice și secvențe palindromice de la nivelul genelor rearanjate (VJ sau VDJ) sunt în mod particular susceptibile în fața acestui mecanism, în limfocitele B mature fiind afectate preferențial acele secvențe care codifică regiunile hipervariabile (CDR). În mod normal, hipermutațiile somatice au loc în centrul germinal (deci în organele limfoide secundare), ca o consecință a expunerii la antigen; acele limfocite B care au receptorul cu cea mai mare afinitate pentru antigenul respectiv vor fi selectate în mod preferențial, vor supraviețui și tot dintre acestea se vor diferenția și celulele cu memorie. Procesul a fost denumit “*maturație de afinitate*”.

mai fiind posibile; o dată ce limfocitul a ajuns la o anumită reasortare productivă, aceasta va deveni permanentă pentru celula în cauză. Astfel, comutarea de clasă nu influențează specificitatea imunoglobulinei respective (figura 16.7).

De asemenea, trebuie precizat că procesul de comutare de clasă are loc în contextul unui răspuns imun față de un antigen T-dependent, cu alte cuvinte, un răspuns imun în care sunt implicate și limfocitele T helper, prin intermediul anumitor seturi de citokine și molecule de suprafață<sup>9</sup>.

În cazul în care limfocitul B s-a diferențiat în plasmocit, sinteza imunoglobulinelor de suprafață este înlocuită cu cea de **anticorpi**. Diferența nu se regăsește la partea variabilă (în mod esențial, specificitatea anticorpilor este aceeași cu a imunoglobulinelor de pe suprafața limfocitelor B stimulate inițial) ci la nivelul secvenței situată spre capătul C-terminal al părții constante. Posibilitatea sintezei unei forme sau a alteia se datorează existenței unor exoni suplimentari, denumiți M1 și M2, localizați în aval de exonul responsabil pentru ultimul domeniu extracelular constant. Exonul M1 codifică porțiunea transmembranară, iar M2 porțiunea intracitoplasmatică. Dacă poliadenilarea se produce la nivelul situsului 1 de la nivelul transcriptului primar, atunci exonii M1 și M2 sunt pierduți și se va ajunge la forma secretată a lanțului greu respectiv

În concluzie, formarea imunoglobulinelor este consecința unui proces genetic absolut distinct, unic receptorilor pentru antigene, cu o mulțime de excepții de la regulă. Astfel, un singur peptid va trebui codificat de mai multe gene, iar elementul principal al întregului proces este reprezentat de rearanjarea la întâmplare a mai multor gene destinate regiunii variabile. În plus, genele care codifică regiunile constante sunt fuzionate doar la nivel de ARN, ceea ce va crea premisele asocierii alternative ale genelor C $\mu$  și C $\delta$ , într-o primă instanță și apoi ale comutării de clasă. În ciuda faptului că genele implicate în formarea imunoglobulinelor sunt dominante, datorită exclusiei alelice vor putea fi exprimate doar alele de pe un cromosom sau altul.

## C. MECANISMELE GENETICE CARE STAU LA BAZA GENERĂRII DIVERSITĂȚII TCR

Între imunoglobuline și receptorul pentru antigen al celulei T (TCR) există multe asemănări din punct de vedere structural. Domeniile extracelulare care alcătuiesc cele două lanțuri sunt, ca și la Ig, constante și variabile, întreaga porțiune extracelulară a TCR seamănă cu fragmentul Fab al anticorpilor<sup>10</sup>, iar componenta care asigură recunoașterea este asociată cu molecula constantă CD3 (analogă Ig $\alpha$  și Ig $\beta$ , cu rol în transmiterea intracelulară a semnalului) (figura 16.8).

Mecanismul formării receptorului pentru antigen al limfocitelor T prezintă foarte multe aspecte extrem de asemănătoare cu cel al formării imunoglobulinelor, implicând, în esență, rearanjări genice V(D)J și diversitate joncțională. Analiza lanțurilor TCR demonstrează de asemenea existența regiunilor hipervariabile, responsabile pentru formarea efectivă a situsului de interacțiune al receptorului.

Din aceste motive, am ales să ne concentrăm în special asupra diferențelor de formare a celor două categorii de receptori. O primă deosebire notabilă este reprezentată de existența a două tipuri de TCR: TCR 1 ( $\gamma\delta$ ) și TCR 2 ( $\alpha\beta$ ). Indiferent de tipul de TCR, acesta este asociat la nivel transmembranar, prin legături electrostatice, cu aceeași moleculă CD3.

<sup>9</sup> Răspunsul față de antigenele T independente, în absența intervenției limfocitelor T helper, nu conduce nici la memorie imunologică și nici la comutare de clasă.

<sup>10</sup> Domeniul C $\alpha$  nu este organizat ca un domeniu globular. Conformația TCR pare să fie mai rigidă decât a Ig datorită interacțiunilor dintre domeniile fiecărui lanț, posibil și datorită diferenței dintre sistemul de recunoaștere a Ag propriu al fiecărui receptor.

Există 4 familii de gene la nivelul ADN-ului din genomul celulelor germinale, dedicate câte unui anumit tip de lanț (**figura 16.9**). Genele care codifică lanțurile  $\alpha$  și  $\delta$  sunt grupate pe cromosomul 14 (în altă regiune decât genele pentru lanțul greu al imunoglobulinelor), iar genele lanțurilor  $\beta$  și  $\gamma$  pe cromosomul 7. Localizarea particulară a genelor  $\delta$  nu este întâmplătoare. Atunci când celula reușește să ajungă la o rearanjare productivă a genelor pentru lanțul  $\alpha$ , genele lanțului  $\delta$  sunt deletate; astfel, la nivelul unui anumit limfocit T, nu poate exista o exprimare simultană de TCR  $\alpha\beta$  și TCR  $\gamma\delta$ .

Reasortarea genelor se face sub influența enzimelor codificate de aceleași RAG1 și RAG2, sistemul de recunoaștere a genelor este reprezentat de aceeași secvență heptamer/distanțier/nonamer, fuziunea secvențelor genice conduce la imprecizie joncțională, la care se adaugă imprecizia inserțională. Existența mai multor gene D sau J, grupate distinct, poate conduce la unele diferențe de rearanjare<sup>11</sup>. *Repertoriul TCR* este, se pare, cel puțin la fel de mare ca și al imunoglobulinelor, mai ales datorită unei enorme variabilități joncționale și inserționale (regiune N de adiție, regiune P de adiție). Aceleași mecanisme reprezintă, în același timp, și un factor de risc, putând conduce la rearanjări neproductive care fie fac produsul nefuncțional, fie fac ca secvența de ADN să nu mai poată fi citită (introducerea unor codoni stop).

O diferență importantă între procesele de formare ale celor doi receptori este aceea că, în urma activării antigenice, genele TCR nu suferă hipermutații somatice. Absența mutațiilor întâmplătoare reprezintă o măsură de siguranță împotriva apariției limfocitelor autoreactive, cu atât mai importantă cu cât limfocitele T au un sistem de recunoaștere particular, care vizează nu doar antigenul - non-self - ci și molecula de MHC (Major Histocompatibility Complex – Complex Major de Histocompatibilitate) –self - care prezintă acest antigen.

Formarea TCR începe în corticala timusului, într-o etapă de dezvoltare a timocitelor<sup>12</sup> în care acestea și-au dobândit capacitatea exprimării moleculei CD3, enzima TdT este de asemenea prezentă, dar nici una dintre moleculele co-receptor (CD4 și CD8) nu au apărut încă – motiv pentru care celulele sunt denumite dublu negative (DN).

Primele gene care încep să se rearanjeze, mai mult sau mai puțin simultan, sunt cele pentru lanțurile  $\beta$  și  $\gamma$ . Dacă genele  $\gamma$  suferă o reasortare productivă, începe și rearanjarea genelor  $\delta$ . Dacă atât genele pentru lanțurile  $\gamma$  cât și cele pentru lanțurile  $\delta$  sunt rearanjate productiv, cu alte cuvinte transcripția poate avea loc și poate începe sinteza lanțurilor, alte rearanjări nu vor mai avea loc și acele timocite vor rămâne  $\gamma\delta$  și se vor dezvolta, pe o cale diferită, în celule DN, CD3+  $\gamma\delta$ . Acestea vor reprezenta aproximativ 5% din totalul timocitelor la adult.

Majoritatea timocitelor dublu negative aleg însă o altă cale de dezvoltare. Dacă rearanjările  $\gamma$  și/sau  $\delta$  nu sunt funcționale, vor continua rearanjările  $\beta$ . O dată ce celula a ajuns la o rearanjare TCR $\beta$  productivă sunt suprimate alte rearanjări ale lanțurilor  $\beta$ -TCR (componentă a fenomenului de excludere alelică). Astfel sunt selectate acele timocite care exprimă lanțul  $\beta$  pentru o expansiune și maturare ulterioară. Din acest moment, pot fi declanșate rearanjările pentru lanțul  $\alpha$ , iar acele timocite care vor ajunge la rearanjări productive vor fi capabile să exprime pe suprafață un TCR  $\alpha\beta$  complet format, chiar dacă la nivele scăzute. Timocitele sunt în continuare dublu pozitive și se găsesc la nivelul corticalei profunde a timusului. De aici încolo, aceste celule vor suferi o serie de procese complexe, cunoscute sub numele de selecție pozitivă și negativă.

**Selecția pozitivă** are loc la nivelul corticalei profunde, sub influența celulelor epiteliale corticale. Acele timocite care sunt capabile să recunoască prin intermediul TCR-ului moleculele MHC (cu o afinitate medie) sunt selectate pozitiv, vor supraviețui și vor primi

<sup>11</sup> Astfel, dacă în cazul genelor lanțului  $\beta$  este aleasă gena D<sub>2</sub>, aceasta se va putea asocia doar cu o genă J din al doilea grup. Dacă este aleasă însă gena D<sub>1</sub>, rearanjarea va putea asocia, într-o manieră aleatorie, fie o genă J din primul grup, fie din al doilea.

<sup>12</sup> Limfocitele T din timus, aflate în plin proces de diferențiere, sunt denumite timocite.



semnale care le vor determina să prolifereze. Consecința acestui fenomen este ceea ce se numește ”restricție MHC”, sau, cu alte cuvinte, capacitatea limfocitelor T de a recunoaște antigenul doar în contextul moleculelor MHC proprii organismului respectiv. Celulele care nu corespund acestui criteriu sunt eliminate prin apoptoză.

Excluzia alelică funcționează cu maximă strictețe în cazul formării imunoglobulinelor. În cazul TCR-ului însă, dacă pentru lanțul  $\beta$  excluzia alelica pare să reprezinte regula, în cazul lanțurilor  $\alpha$  este mai puțin strictă. În cazul în care se produc rearanjări productive pe ambii cromosomi, cele două lanțuri  $\alpha$  diferite vor conduce la existența simultană a două TCR-uri cu specificități antigenice diferite. Deși nu există un consens asupra numărului de astfel de limfocite T mature circulante, se pare că în astfel de situații doar unul dintre cei doi receptori reușește să treacă de procesele de selecție (în special de selecția pozitivă și ca urmare să fie MHC-limitat).

Numărul celulelor care posedă un receptor corespunzător din acest punct de vedere este mic și, ca urmare, o serie din celulele care nu au fost selectate pozitiv au posibilitatea să își *reia rearanjările* pentru lanțul  $\alpha$ . Dacă noua rearanjare va fi productivă, există potențialul de a conduce la o nouă specificitate. Acest fenomen este denumit ”editare” iar timocitul căruia i se oferă această șansă va trebui să treacă din nou prin procesul de selecție pozitivă.

La nivelul joncțiunii cortico-medulare, unde se găsesc celule cu origine hematogenă (macrofage și celule dendritice) și mai departe în corticala medulară, sub influența celulelor epiteliale de la acest nivel, are loc procesul de **selecție negativă**<sup>13</sup>. Eliminarea prin procesul de selecție negativă a timocitelor care poartă receptori de mare afinitate pentru molecule MHC self singure sau pentru antigenul self prezentate de MHC, conduce la toleranță față de self. Deoarece procesul are loc în timus, este denumit **toleranță centrală**. Sunt astfel practic eliminate fizic un număr important de limfocite autoreactive<sup>14</sup>.

Recunoașterea unui tip de MHC sau altul are o consecință suplimentară: acele timocite care au recunoscut un MHC I se vor diferenția în continuare în **limfocite T citotoxice** (CD8+ CD4-), iar cele care au recunoscut MHC II se vor diferenția în **limfocite T helper** (CD4+ CD8-).

## D. COMPLEXUL MAJOR DE HISTOCOMPATIBILITATE

Complexul major de histocompatibilitate (MHC) este un sistem multigenic și polimorfic, situat pe brațul scurt al cromosomului 6, cu rol fundamental în activarea și reglarea răspunsului imun. Rolul proteinelor codificate de genele MHC, în special al celor exprimate ca molecule membranare, a fost pus inițial în legătură cu rejețul grefelor, de unde și numele de ”histocompatibilitate” atribuit de către George Snell (premiul Nobel în 1980)<sup>15</sup>.

### 1. GENELE MHC

CMH se întinde pe o lungime de aproximativ 2-3 centimorgani (aproximativ  $4 \times 10^6$  kilobaze), în interiorul căreia au fost identificate peste 300 de gene (**figura 16.10**). Pe baza diferențelor structurale și funcționale genele ce alcătuiesc CMH sunt împărțite în trei categorii; două dintre acestea, genele de clasă I și de clasă II, conțin gene ce codifică *antigenele leucocitare umane (HLA)*, molecule situate pe suprafața celulară care joacă un rol important în inițierea răspunsului imun, prin prezentarea antigenelor limfocitelor T helper

<sup>13</sup> Selecția pozitivă a limfocitului B are altă semnificație (exprimarea unui receptor intermediar); selecția negativă se referă însă de asemenea la eliminarea limfocitelor B autoreactive

<sup>14</sup> Acest proces nu este perfect; va continua în periferie, dar aici vor fi implicate mai degrabă alte mecanisme decât inducerea apoptozei celulelor.

<sup>15</sup> În afară de complexul major, există și un grup denumit minor (mHC), a cărui importanță a devenit evidentă în contextul supraviețuirii pe termen lung a organelor grefate.

CD4<sup>+</sup> și limfocitelor T citotoxice CD8<sup>+</sup>, care nu pot recunoaște antigenul dacă acesta nu este asociat cu o moleculă HLA pe suprafața celulelor prezentatoare de antigen. Deci, moleculele HLA sunt implicate în recunoașterea antigenului, interacțiunile dintre limfocite, dezvoltarea toleranței la self și rejetul transplantelor. A treia categorie de gene MHC nu sunt gene HLA și codifică alte proteine.

**a) Genele de clasă I** sunt reprezentate de genele HLA clasice: HLA-A, HLA-B și HLA-C, care codifică molecule (antigene) de clasă I exprimate pe membrana tuturor celulelor nucleate. Fiecare din aceste gene prezintă, în populație, mai multe alele. În acord cu O.M.S., în nomenclatura lor este identificat mai întâi locusul, urmat de numărul de identificare al alelei, eventual de un număr care să indice subtipul: de exemplu HLA-A\*0201.

În afară de genele HLA I clasice, există o mulțime de gene ce codifică pentru produși “non-clasici”, denumite la om HLA-E, F, G, H, J și X, la care se adaugă o familie recent descoperită, denumită MIC (MHC I chain-related): A, B, C, D, E.

Moleculele (antigenele) de clasă I sunt alcătuite din două subunități polipeptidice: lanțurile  $\alpha$  polimorfice (codificate de genele HLA) și un polipeptid nepolimorfic,  $\beta_2$  microglobulina (codificată de o genă situată pe cromosomul 15) (figura 16.11).

Lanțul  $\alpha$  este format din trei domenii extracelulare ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  și  $\alpha_3$ ), un domeniu transmembranar și un domeniu intracitoplasmatic, fiecare dintre acestea fiind codificate de exoni distincți.  $\beta_2$  microglobulina interacționează cu toate domeniile extracelulare ale lanțului  $\alpha$ , fiind un element esențial pentru plierea corectă a acestuia și stabilitatea sa structurală. Domeniile  $\alpha_1$  și  $\alpha_2$  reprezintă domeniile *variable* ale moleculei și participă la formarea unei structuri speciale, care are forma unei “cupe”, formată dintr-un planșeu alcătuit din 8 foi  $\beta$  plisate antiparalele și 2 margini sub formă de  $\alpha$  helix-uri (figura 16.12). Funcția cupei este aceea de a prezenta peptide antigenice limfocitelor T citotoxice – CTL).

Proteinele endogene sunt degradate de o protează endogenă (LMP) în fragmente peptidice care apoi sunt transportate de către un transportor special (TAP) la suprafața celulei și fixate de molecule de clasă I care prezintă peptidul antigenic limfocitelor Tc (CTL) (figura 16-13).

**b) Genele de clasă II** sunt grupate în câteva subregiuni care codifică antigene de suprafață celulară – *HLA-DP*, *HLA-DQ*, *HLA-DR*. În general, fiecare subregiune conține una sau mai multe gene  $\alpha$  și  $\beta$  pentru lanțurile corespunzătoare ale moleculelor HLA de clasă II, exprimate de obicei în macrofage, limfocitele B, limfocitele T activate, dar în anumite condiții și de către alte tipuri celulare. În afară de genele HLA II clasice au fost identificate, atât la om cât și la șoarece, **gene HLA II non-clasice** (*HLA-DM*, *DN*, *DO*). Funcția acestor produși este de reglare a moleculelor clasice. Tot în regiunea HLA II a fost identificată prezența **genelor LMP2 și LMP7** - care codifică două dintre subunitățile proteasomului (cu rol în procesarea proteinelor endogene), a **genelor TAP1, TAP2, DM** care codifică subunități ale transportorului de peptide antigenice.

Moleculele HLA de clasă II sunt heterodimeri glicoproteici membranari, alcătuiți dintr-un lanț  $\alpha$  și un lanț  $\beta$  (figura 16.11), ambele fiind codificate de gene care aparțin complexului genic HLA.

Lanțurile sunt asociate între ele necovalent, fiecare fiind alcătuit din câte 2 domenii extracelulare ( $\alpha_1$  și  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  și  $\beta_2$ ), un domeniu transmembranar și unul intracelular. Domeniile  $\alpha_1$  și  $\beta_1$  reprezintă domeniile *variable* ale moleculei și, împreună, participă la formarea unei cupe asemănătoare celei a moleculei HLA I. Moleculele de clasă II sunt sintetizate în reticulul endoplasmic și apoi eliberate în endosomi; ele au fixată o proteină Ii care este îndepărtată (de către proteina DM) pentru a fixa peptidul antigenic, produs în endosomi prin digestia antigenelor exogene (figura 14-2 Thompson). Moleculele de clasă II sunt apoi exprimate pe suprafața celulelor implicate în răspunsul imun pentru a prezenta peptidul antigenic limfocitelor T helper

**c) Genele de clasă III** nu sunt gene HLA; unele dintre ele codifică proteine serice și receptori membranari implicați în funcția imună (factorul Bf, proteinele complementului C2 și C4); altele au funcții heterogene (gene ce codifică proteine de șoc termic, factori de necroză tumorală –  $\text{TNF}_\alpha$  și  $\text{TNF}_\beta$ , gena pentru 21-hidroxilază, implicată în *hiperplazia congenitală de suprarenală* sau gena HFE ce produce, prin mutație, *hemocromatoza ereditară*)

## 2. PROPRIETĂȚILE ȘI FUNCȚIILE SISTEMULUI HLA



### a) Proprietățile sistemului HLA.

Caracteristicile distinctive ale sistemului HLA sunt reprezentate de:

- polimorfism,
- codominanță,
- transmiterea strâns înlănțuită (în bloc, ca un haplotip) de la părinți la descendenți,
- asocierea preferențială.

Poate cel mai remarcabil aspect al al genelor HLA este **polimorfismul** lor înalt, adică existența a multiple alele pentru un anumit locus.

Aceste alele diferă, la nivelul secvenței ADN, cu procente cuprinse în medie între 5 și 10% și, ca urmare, produșii genelor exprimați de diferiți indivizi prezintă diferențe structurale unice. Nu întâmplător, aceste diferențe se regăsesc în special la nivelul domeniilor variabile, implicate în formarea cupelor și astfel în legarea antigenului. Sursa diversității moleculelor HLA este diferită de cea a moleculelor de imunoglobuline sau TCR, mecanismele care conduc la obținerea polimorfismului, a acestui număr impresionant de variante alelice pentru genele HLA, fiind dintre cele mai diverse: mutații punctiforme, recombinări genetice, conversii genice, crossing-over homolog dar inegal etc.

Sistemul HLA posedă un număr absolut remarcabil de alele diferite pentru aproape fiecare dintre locii enumerați anterior. Cu siguranță este cel mai polimorfic complex genetic cunoscut la vertebrate. Până în prezent, analiza moleculelor HLA I a revelat 133 de alele pentru HLA-A, 277 de alele pentru HLA-B și 77 de alele pentru HLA-C. Moleculele HLA II sunt la fel de polimorfice, pentru lanțurile DR $\beta$  fiind raportate până în prezent 222 de alele. În plus, există 9 gene distincte DR $\beta$ , iar un individ poate să posedă un număr variabil (cuprins între 2 și 5) de astfel de gene. Frecvența acestor alele diferă în funcție de grupul etnic și localizarea geografică a populației. Cu siguranță că cifrele pe care le avem astăzi la dispoziție cu privire la polimorfismul genelor HLA reprezintă subestimări și, o dată cu trecerea pe scară largă la secvențierea genelor, vor fi caracterizate multe alte alele.

Conform calculelor bazate pe cifrele pe care le avem la dispoziție în prezent, numărul de combinații astfel posibile (diversitatea teoretică) este de circa  $10^{12}$ . Acest calcul se bazează însă doar pe numărul incomplet de alele cunoscut până în prezent, astfel că diversitatea teoretică reală este mult mai mare. Pe de altă parte însă, diversitatea observată în realitate este mai mică. Faptul că nu se manifestă o distribuție chiar întâmplătoare și că anumite combinații de alele apar mai frecvent decât ar rezulta din calculul probabilităților a condus la noțiunea de asociere preferențială sau "**dezechilibru de înlănțuire**". De exemplu, frecvența cu care gena HLA-A1 apare în populația caucaziană este de 16%, iar a genei B8 este de 10%. Conform calculului teoretic, frecvența asocierii HLA-A1 cu HLA-B8 ar trebui să fie de 16% x 10%, adică de 1,6% ; totuși, datorită dezechilibrului, frecvența A1 + B8 este de 8,8%.

În ciuda acestui fenomen, care restrânge diversitatea teoretică, numărul de combinații posibile care pot rezulta ca urmare a exprimării diverselor alele HLA rămâne enorm, ceea ce face să nu existe două persoane identice (excepție făcând gemenii monoziagoți); genele HLA reprezintă un "*veritabil buletin molecular de identitate*". Astfel, moleculele HLA reprezintă una dintre cele mai serioase bariere în calea efectuării unui alotransplant (între membri diferiți ai aceleiași specii).

Toate genele HLA, indiferent de varianta alelică, sunt **dominante**, iar exprimarea lor este **codominantă**, deci ambele gene alele de pe cromosomii omologi se exprimă pe suprafața celulelor. Deși acest tip de exprimare este cel normal, este important de subliniat că exprimarea simultană a alelelor prezente pe cromosomii omologi reprezintă o importantă diferență față de excluzia alelică ce apare în cazul genelor Ig și ale TCR. Mai mult decât atât, unele celule (cum ar fi limfocitele de exemplu) încearcă să exprime cât mai multe tipuri de molecule HLA, astfel că, per ansamblul organismului, avem de a face cu un set complet de molecule, expresie a tuturor genelor din complexul major de histocompatibilitate.

O altă proprietate a genelor ce alcătuiesc sistemul HLA este înlănțuirea strânsă și *transmiterea în bloc* de la părinți la copii a genelor alele ce formează pe fiecare cromosom 6 un anumit **haplotip**. Notând haplotipurile parentale, corespunzătoare celor doi cromosomi 6

omologi, cu **a b** și **c d** la copii sunt posibile următoarele combinații genotipice (fiecare părinte transmite, prin gameți, unul din cele două haplotipuri): **a c**, **a d**, **b c** și **b d**– fiecare cu o probabilitate de 25%. De aici rezultă că fiecare dintre copii va fi semi identic cu fiecare dintre părinți iar în fratrie există probabilitatea teoretică ca frații și surorile să fie: semi identici (50%), identici (25%), diferiți (25%) (figura 16.14).

### **b) Funcțiile sistemului HLA**

Moleculile HLA au fost identificate inițial ca urmare a rolului lor în respingerea grefelor. Acestea erau rețutate în primul rând datorită răspunsului limfocitelor T față de moleculele HLA străine. În ciuda contextului în care au fost descoperite, *funcția primordială a moleculelor HLA este aceea de a prezenta antigenele limfocitelor T.*

Chiar dacă sunt implicate în legarea antigenului, interacțiunea HLA-peptid antigenic nu este una strict specifică, așa cum este cea dintre Ig/TCR și antigen. S-a demonstrat, de exemplu, că două variante alelice diferite ale aceleiași molecule HLA I pot prezenta mai mult de 2000 de peptide diferite; în plus, fiecare tip de moleculă HLA leagă un set diferit de peptide. În această manieră pot fi prezentate simultan pe suprafața celulei respective un număr enorm de peptide antigenice diferite și activate astfel un număr corespunzător de limfocite T diferite.

Posibilitatea sau imposibilitatea prezentării unui anumit antigen dictează astfel răspunsul față de acesta și, ca urmare, rezistența sau susceptibilitatea la boală. Deci diferite haplotipuri HLA au o eficiență diferită în inducția răspunsului imun la diferiți antigeni. Aceasta ar explica de ce *puterea de apărare a fiecărui organism la diferite agresiuni ale patogenilor este diferită de la o persoană la alta.*

Prin interacțiunea directă cu TCR și moleculele co-receptor (CD4 și CD8), moleculele HLA sunt o componentă importantă în *activarea limfocitelor T* și astfel în *reglarea și desfășurarea răspunsului imun*. Celulele prezentatoare de antigen captează, procesează și apoi prezintă peptide antigenice pe suprafața lor, asociate moleculelor HLA de clasă II. Limfocitele Th recunosc antigenul prezentat în această manieră și se activează, ceea ce conduce la proliferarea și diferențierea lor. Ele vor fi astfel capabile să stimuleze limfocitele Tc (care recunosc la rândul lor antigenul dar prezentat împreună cu moleculele HLA de clasă I), limfocitele B (care se vor putea diferenția în plasmocite și secreta anticorpi), dar și alte celule aparținând apărării nespecifice.

S-a demonstrat că moleculele HLA pot fi implicate în lume animală și într-o serie de fenomene neimunologice (diferențierea structurală, atingerea greutateii corporale optime, producția de ouă, alegerea partenerului etc), multe din aceste fenomene având o bază hormonală. Moleculele MHC de clasă I ar putea funcționa și ca niște componente ale unor receptori hormonal sau factori de creștere.

Sistemul HLA a intrat practic în atenția cercetătorilor odată cu primele experimente de transplant, dar această intervenție este una pe care sistemul imun nu a avut-o în vedere. Genele și moleculele HLA au fost concepute, așa cum menționam anterior, în scopul prezentării antigenelor și activării limfocitelor T. Diversitatea acestui sistem a fost creată nu pentru a ridica o barieră în calea transplantării, ci pentru a oferi cât mai multe șanse de supraviețuire în fața agresiunii patogenilor organismului respectiv. Dacă astăzi alotransplantul a devenit o manevră terapeutică uzuală, cu un grad relativ ridicat de succes, este și pentru că s-a ajuns la un anumit nivel de înțelegere al sistemului imun. Astfel, suntem perfect conștienți că nu putem realiza o potrivire perfectă între un donator și un primitor, iar potrivirea (*match*) dintre cei doi vizează doar anumite alele și molecule HLA. În plus, chiar și în condițiile în care terapia imunosupresoare a crescut semnificativ supraviețuirea organului transplantat, riscul rețelut acut nu a fost încă eliminat.

## **3. SISTEMUL HLA ȘI ASOCIEREA CU DIVERSE AFECȚIUNI**

Diverse studii statistice au reușit să demonstreze că anumite afecțiuni autoimune, boli determinate ca o consecință a infecțiilor virale sau bacteriene, afecțiuni ale sistemului complement sau afecțiuni alergice par să fie asociate mai frecvent cu anumite alele MHC. Această asociere dintre alelele HLA și o anumită boală a condus la noțiunea de “risc relativ”, sintagmă care semnifică probabilitatea ca persoana prezentând o anumită alelă (sau constelație

de alele) HLA, să dezvolte afecțiunea respectivă<sup>16</sup>. Un risc relativ de 1 înseamnă că alela HLA vizată este prezentă, la individul afectat, cu aceeași frecvență ca în populația generală. Un risc relativ (substanțial) mai mare decât 1 avertizează însă asupra potențialei susceptibilități a individului de a dezvolta o anumită afecțiune. Astfel, o persoană care posedă alela HLA-B27 prezintă o probabilitate de 90 de ori mai mare să dezvolte spondilită anchilozantă decât o persoană care nu are această alelă (tabelul 16.1).

Un risc relativ înseamnă o vulnerabilitate crescută în fața bolii. Sistemul HLA nu este însă nici pe departe singurul care intervine în determinismul unei afecțiuni. Cu siguranță că cel mai elocvent exemplu este dat de situațiile în care doar unul dintre gemenii monoziagoți dezvoltă boala. Asocierea unei alele HLA particulare cu o anumită boală este cu atât mai dificilă în contextul dezechilibrului de înlănțuire și trebuie interpretată cu precauție.

Explicațiile pentru asocierea dintre HLA și o serie de boli sunt multiple. În ceea ce privește bolile infecțioase și afecțiunile autoimune, cea mai plauzibilă ipoteză se referă la capacitatea sau incapacitatea unui anumit produs MHC de a prezenta sau nu un antigen particular. Reducerea polimorfismului HLA în cadrul unui grup populațional antrenează predispoziția către boli infecțioase. Pe de altă parte, moleculele MHC însele pot servi drept ținte/receptori pentru agenți patogeni virali sau bacterieni. De asemenea, un mecanism de evaziune a imunității din partea agenților patogeni implică mutații care conduc la codificarea unor epitopi majori ce mimează moleculele MHC ale organismului infectat. În aceste condiții polimorfismul MHC va face ca măcar o serie de indivizi ai speciei respective să poată supraviețui agresiunilor și va permite selecția în continuare a anumitor alele.

În cazul hemocromatozei ereditare și hiperplaziei suprarenaliene congenitale este vorba mai curând de o *înlănțuire genetică* între alele patogene și anumite alele HLA, determinată de situarea acestor gene de boală în regiunea HLA. La aceasta se poate adăuga un dezechilibru de înlănțuire (de exemplu, între hemocromatoză și HLA-A3).

În alte afecțiuni nu este clar dacă asocierea cu o anumită genă HLA este determinată de variații în răspunsul imun sau de un dezechilibru de înlănțuire. De exemplu asocierea dintre narcolepsie și HLA-DQ6 sau asocierea dintre diabetul zaharat insulino-dependent și HLA-DQ8 sau HLA-DQ6.

Tabel 16.1 Exemple de asocieri ale alelelor HLA cu o serie de afecțiuni.

*Se remarcă faptul că majoritatea sunt autoimunități.*

Boala	Alelele HLA asociate	Riscul relativ
Spondilita anchilozantă	B27	90
Sindromul Goodpasture	DR2	16
Enteropatia glutenică	DR3	12
Hemocromatoza ereditară	A3	9,3
	B14	2,3
	A3/B14	90
Diabetul zaharat insulino-dependent	DR3/DR4	20
	DQ8	14
Scleroza multiplă	DR2	5
Miastenia gravis	DR3	10
Narcolepsia	DR2	130
Artrita reactivă ( <i>Yersinia</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Gonococcus</i> )	B27	18
Sindrom Reiter	B27	37
Artrita reumatoidă	DR4	10

<sup>16</sup> Riscul relativ (RR) se calculează după următoarea formulă:  $RR = ad/bc$ , unde a = proporția de pacienți care prezintă alela respectivă, b = proporția de pacienți care nu prezintă alela respectivă, c = frecvența alelei în grupul de control, f = frecvența absenței alelei în grupul de control.

Sindromul Sjögren	Dw3	6
Lupusul eritematos diseminat	DR3	5
Tiroidita subacută	B35	14
Psoriazisul vulgar	Cw6	7
Boala Grave	DR3	4
Hiperplazia congenitală suprarenaliană (deficiența de 21-hidroxilază)	Bw47	80-140
Pemfigusul vulgar	DR4	24
Carcinomul cervical cu celule scuamoase	DQw3	7

## D. IMUNODEFICIENȚELE

Eficiența apărării organismului împotriva agenților patogeni și ai produșilor toxici ai acestora depinde de funcționarea normală a sistemului imun. De aceea, lipsa sau funcționarea anormală a componentelor acestui sistem, fie că aparțin imunității specifice sau nespecifice, conduce la o serie întreagă de afecțiuni, denumite generic imunodeficiențe. O primă clasificare poate împărți imunodeficiențele în *primare* (când deficiența este chiar cauza bolii) și *secundare* (care apar ca o consecință a altor afecțiuni). Imunodeficiențele primare pot fi, la rândul lor, *ereditare* și *dobândite*. Imunodeficiențele pot fi de asemenea definite în funcție de componentul afectat: deficiențe ale limfocitelor B, ale limfocitelor T, deficiențe B și T combinate, ale fagocitelor sau procesului de fagocitoză și ale sistemului complement. Indiferent în care categorie se încadrează, principala consecință este reprezentată de o susceptibilitate crescută față de o serie de agenți patogeni (dintre care se remarcă microorganismele oportuniste) și apariția de infecții a căror severitate poate pune chiar în pericol viața pacientului. Alte consecințe sunt reprezentate de frecvența crescută a apariției unor afecțiuni maligne, sau de posibilitatea declanșării unor afecțiuni autoimune.

*Imunodeficiențele limfocitelor B* afectează (cantitativ sau calitativ) producția de anticorpi și conduc la infecții recurente cu bacterii piogene, ca și la o sensibilitate crescută față de anumite virusuri. Originea imunodeficiențelor ereditare se regăsește fie în cursul maturării limfocitului B, fie în cursul răspunsului limfocitului B față de un antigen. Dată fiind dependența limfocitelor B de ajutorul limfocitelor T helper, anormalități ale acestora din urmă vor conduce, de asemenea, la afectarea secreției de anticorpi.

*Imunodeficiențele limfocitelor T* vor afecta în primul rând imunitatea celulară, dar, așa cum menționam, imunitatea umorală va avea de asemenea de suferit. Va apărea astfel o susceptibilitate crescută la infecțiilor cu virusuri, fungi, protozoare și bacterii intracelulare. Aceste imunodeficiențe pot fi rezultatul unei tulburări de maturare a limfocitelor T ca urmare a unei aplazii/hipoplazii timice, sau ale unor anormalități ale activării și funcționării limfocitelor în urma activării antigenice.

Afectarea ambelor tipuri de limfocite conduce la SCID (*Severe Combined Immune Deficiency* – Imunodeficiențe Severe Combinate). Acesta este un grup heterogen de imunodeficiențe, în care indivizii sunt practic susceptibili la infecții cu oricare patogen. Sunt descrise 3 subgrupuri:

- T- B+ în care este afectată fie gena de pe cromosomul X care codifică lanțul  $\gamma$  al receptorilor pentru interleukinele-2, 4, 7, 9 și 15, fie gena care codifică Jak 3 tirozin-kinaza, o moleculă responsabilă pentru transducerea intracelulară a semnalului recepționat de acești receptori (transmitere recesiv autosomală);

- T- B- în care se manifestă fie o deficiență în ADA (adenosin dezaminază)<sup>17</sup>, fie deficiențe ale recombinazelor RAG;
- T+ B+ în care limfocitele nu se pot activa în special ca urmare a absenței moleculelor MHC (sindromul limfocitelor goale).

Principala imunodeficiență care afectează fagocitele este *boala granulomatoasă cronică*, denumită astfel ca urmare a formării de leziuni inflamatorii cronice. Celulele sunt capabile să internalizeze patogenul dar nu reușesc să îl ucidă intracelular. Afecțiunea poate fi transmisă autosomal recesiv, dar cel mai frecvent este implicată o genă de pe cromosomul X care codifică o subunitate a citocromului b. La acest nivel are loc asamblarea NADPH oxidazei, responsabilă pentru activarea mecanismelor oxigen dependente de ucidere intracelulară.

*Deficiențele sistemului complement* (care pot afecta atât căile de activare cât și sistemul reglator) sunt caracterizate printr-o susceptibilitate crescută la infecțiile cu piogeni și bacterii intracelulare, dar și prin tendința de persistență a complexelor imune circulante și, implicit, de apariție a unor autoimunități sistemice.

Imunodeficiențele pe care le-am menționat pot fi încadrate totodată și în categoria bolilor care apar ca o consecință a afectării unei singure gene. Aceste afecțiuni sunt numeroase (tabel 16.2) și suntem conștienți că nu avem încă o imagine completă asupra acestora. Sistemul imun reprezintă însă un angrenaj extrem de complex, astfel încât un anumit defect genetic poate conduce la efecte surprinzătoare, cu grade foarte diferite de severitate. Cu atât mai mult, tratarea unor astfel de boli va depinde tot mai mult de izolarea și caracterizarea genelor care stau la baza unor astfel de afecțiuni.

**Tabelul 16.2 Exemple de imunodeficiențe monogenice**  
(după Nussbaum, McInnes, Willard, 2001)

<i>Boala</i>	<i>Genă</i>	<i>Localizare cromosomică</i>	<i>Defectul genic/patogenia bolii</i>	<i>Numărul L<sub>T</sub></i>	<i>Numărul L<sub>B</sub></i>	<i>Nivelul Ig</i>	<i>OMIM</i>
<b>Defecte combinate ale limfocitelor T și B</b>							
Imunodeficiența combinată severă (SCID) legată de X	IL2RG	Xq13.1	Defectul lanțului γ al receptorului pentru IL-2	Redus	Normal sau crescut	Redus	300400
SCID autosomal recesiv tipul T-negativ/B-pozitiv	JAK3	19p13.1	Defecte ale semnalizării intracelulare pe calea JAK	Redus	Normal sau crescut	Redus	600802
Deficiența adenzin dezaminazei	ADA	20q13.11	Tulburare selectivă la nivelul limfocitelor a metabolismului purinic	Scade progresiv	Scade progresiv	Redus	102700
Deficiența nucleozid fosforilazei	NP	14q13.1	Tulburarea metabolismului purinic la nivelul limfocitelor	Scade progresiv	Normal	Normal sau redus	164050
Sindromul limfocitelor goale tip II	MHC2TA RFX5	16p13 1q21.1-q21.3	Mutații ale factorilor de transcripție ce reglează expresia genelor MHCII	CD4 reduse	Normal	Normal sau redus	209920
Imunodeficiența dată de defectul selectiv al limfocitelor T	ZAP70	2q12	Blocarea maturării limfocitelor T	CD8 reduse	Normal	Normal	176947
Imunodeficiența combinată severă fără limfocite B	RAG1 RAG2	11p13	Blocarea dezvoltării limfocitelor; absența rearanjamentelor	Redus	Absent	Absent	601457

<sup>17</sup> ADA este o enzimă folosită pentru degradarea purinelor. În absența ei, celulele acumulează cantități excesive de adenzină și deoxiadenzină, toxice în mod particular pentru limfocite. O altă enzimă, PNP (purin nucleotid fosforilaza) degradează guanozina la inozină. Absența sa conduce la acumularea excesivă de metaboliți ai guanozinei (GMP, GDP și GTP) și ai deoxiguanozinei (dGMP, dGDP și dGTP), care, ca și metaboliții adenzinei, sunt toxici pentru limfocite.

<i>Boala</i>	<i>Gena</i>	<i>Localizare cromosomică</i>	<i>Defectul genic/patogenia bolii</i>	<i>Numărul <math>L_T</math></i>	<i>Numărul <math>L_B</math></i>	<i>Nivelul Ig</i>	<i>OMIM</i>
			receptorilor $L_T$ și $L_B$				
Sindromul Omenn	RAG1 RAG2	11p13	Rearanjamente deficitare ale receptorilor $L_T$ și $L_B$	Redus	Redus	Redus	603554
Imunodeficiența cu hiper IgM, tip 1	TNFSF5	Xq25-q26	Defecte ale ligandului CD40 exprimat pe suprafața $L_T$ ; blocarea comutării isotipului $L_B$	Normal	Normal	IgM crescut; IgA, IgG redus	308230
Sindromul DiGeorge	multiple	22q11.2	Defecte ale dezvoltării timusului; anomalii cardiace, faciale, paratiroidiene	Normal sau redus	Normal	Normal sau redus	188400
<b>Deficite ale sintezei anticorpilor</b>							
Agamaglobulinemia legată de X (sindromul Bruton)	BTK	Xq21.3-q22	Defecte ale tirozin kinazei Bruton specifice $L_B$	Normal	Foarte redus	Redus sau absent	300300
Agamaglobulinemia autosomal recesivă	IGHM	14q32.3	Defecte ale expresiei lanțului $\mu$ pe suprafața celulelor B	Normal	Absent	Absent	147020
<b>Boli ale fagocitelor</b>							
Boala granulomatoasă cronică	CYBB CYBA NCF1 NCF2	Xp21.1 16q24.1 7q11.23 1q25	Defecte ale enzimelor sistemului citocrom oxidazei care conduc la anomalii ale fagocitozei	Normal	Normal	Normal	306400 233690 233700 233710
Deficiența adeziunii leucocitelor	CD18	21q22.3	Defecte ale CD18 sau alte molecule de pe suprafața leucocitelor necesare pentru motilitate, aderență și endocitoză	Normal	Normal	Normal	116920
Sindromul Chediak-Higashi	CHS1	1q42-q44	Defecte ale asamblării lizozomilor ce conduc la granule citoplasmice gigantice	Normal	Normal	Normal	214500
<b>Boli ale sistemului complement</b>							
Deficiențe ale unor componente individuale	multiple	multiple	Deficiențele C1, C2, C4, C3 sunt asociate cu boli autoimune și infecții piogene; deficiențele C3, C5-9 și pierderii asociază infecții cu <i>Neisseria</i>	Normal	Normal	Normal	multiple
<b>Alte sindroame distincte cu defecte imune</b>							
Sindromul Wiskott-Aldrich	WAS	Xp11.23	Defecte ale citoscheletului ce determină eczemă, trombocitopenie, infecții recurente	Normal sau redus	Normal	Uneori IgM redus	301000
Ataxia telangiectazia	ATM	11q22-q23	Defecte ale reparării ADN; ataxie, cancere, neurodegenerare progresivă, radiosensibilitate	Normal	Normal	Normal	208900
Sindromul Bloom	BLM	15q26.1	Defecte ale reparării ADN; neurodegenerare, cancere, radiosensibilitate	Normal	Normal	Normal	210900
Sindromul limfoproliferativ	TNFRSF6	10q24.1	Tulburări ale apoptozei $L_T$ și $L_B$ mediată de $L_T$ CD4-/	Creșterea	Crescut	Crescut	601859

<i>Boala</i>	<i>Gena</i>	<i>Localizare cromosomică</i>	<i>Defectul genic/patogenia bolii</i>	<i>Numărul <math>L_T</math></i>	<i>Numărul <math>L_B</math></i>	<i>Nivelul Ig</i>	<i>OMIM</i>
autoimun tip IA			FAS; limfadenopatie, autoimunitate	CD8-			

## BIBLIOGRAFIE CAPITOL 16

### INTERNET

1. Asociația națională pentru boli rare (SUA)- NORD : <http://www.NORD~rdp.com/~orphan>
2. Kuby's Immunology – Goldsby R., Kindt TJ, Osborne B., W. H. Freeman, New York, 2000; [www.whfreeman.com/immunology](http://www.whfreeman.com/immunology)
3. Geneclinics – bază de date despre bolile genetice : <http://geneclinics.org>
4. Genecards – bază de date genele umane și bolile genetice : : <http://www.bighost.area.ba.cnr.it/GeneCards> –sau <http://www.bioinformatics.weizman.ac.il/cards>
5. Genetest – bază de date despre teste genetice : <http://www.genetest.org>
6. OMIM – catalogul bolilor mendeliene la om : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
7. Web site-uri de patologie umană:
  - <http://www.emedicine.com>,
  - <http://www.umm.edu/ency/>,
  - <http://healthcenters.healthanswers.com/library/MedEnc>,

### Bibliografie specifică selectivă

1. Abbas AB, Lichtman AH, Pober JS, WB – *Cellular and Molecular Immunology* – Saunders, Philadelphia, 2000
2. Benjamini E, Coico R, Sunshine G – *Immunology, a short course* – Wiley-Liss, New York, 2000
3. Fugmann SD, Lee, AI, Shockett PE, Villey IJ, Schatz DG – *The RAG proteins and V(D)J Recombination: Complexes, Ends and Transposition* – Annu. Rev. Immunol. 2000, 18: 495-527
4. Honjo T, Kinoshita K, Muramatsu M – *Molecular Mechanism of Class Switch and Recombination: Linkage with somatic Hypermutation* – Annu. Rev. Immunol. 2002, 20: 165-196
5. Janeway CA jr., Travers P, Walport M., J. Capra JD – *Immunobiology* – Current Biology Ltd., Elsevier, New York, 1999
6. Goldsby R, Kindt TJ, Osbirne B - *Kuby's Immunology* – Freemanand Co, New York, 2000.
7. Nemazee D – *Receptor Selection in B and T Lymphocytes* – Annu. Rev. Immunol. 2000, 18: 19-51
8. Paul W.E – *Fundamental Immunology* – Raven Press, New York, 1993
9. Puck JM – *Primary immunodeficiency diseases* – JAMA, 1997;278:1835-1841
10. Roitt I. – *Essential Immunology* – Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1998

## CAPITOLUL 17

# GENETICA BOLII CANCEROASE

Cancerul este un termen generic pentru o gamă extrem de largă de boli caracterizate prin alterarea proceselor de creștere și proliferare celulară.

În prezent cancerul este a doua cauză de deces după bolile cardiovasculare (circa 25%) dar, o dată cu creșterea duratei medii de viață, se estimează că peste jumătate din populație ar putea fi diagnosticată cu o formă de cancer într-un anumit moment al vieții.

Proliferarea celulară necontrolată are ca rezultat formarea unei mase celulare numite **tumoră** sau *neoplasm* (gr. neo = nou, plasein = a forma). Procesul de formare a unei tumori este denumit *tumorigeneză*. Neoplasmelor *maligne* invadează țesuturile învecinate și adesea *metastazează* (diseminează) colonizând teritorii aflate la distanță, trăsături care le disting pe acestea de tumorile *benigne*. Tumorile sunt clasificate în funcție de țesuturile din care se formează, principalele tipuri fiind: *carcinoamele* (tumori derivate din celulele epiteliale) - categoria cea mai frecventă, *sarcoamele* (derivate din țesuturile conjunctive), *limfoamele* (țesuturile limfatice) și *leucemiile* (ce afectează organele hematopoietice).

Celulele care formează o tumoră au originea într-o *singură celulă precursoră*, care se multiplică activ și formează o **clonă**. Celulele din clona neoplazică în formare *acumulează o serie de modificări genetice și epigenetice* care conduc la schimbări în activitatea unor gene și, datorită acestora, la modificări fenotipice. Celulele sunt supuse selecției și, în final, o populație a celulelor clonale acumulează suficiente modificări fenotipice pentru ca acel teritoriu să devină un cancer. Aceste trăsături sunt:

- autosuficiența factorilor de creștere,
- insensibilitatea la semnalele care blochează creșterea,
- capacitatea de proliferare necontrolată,
- sustragerea de sub controlul mecanismelor apoptotice,
- capacitatea de invazie,
- metastazare și angiogeneza susținută.

*Cauzele* care conduc la apariția cancerelor sunt numeroase și variate și includ *factorii de mediu, predispoziția genetică și vârsta*. Acești factori determină sau contribuie la transformarea celulelor normale în celule canceroase prin perturbarea unui spectru larg de căi fiziologice. Această complexitate a mecanismelor fiziopatologice este principala piedică în dezvoltarea unor mijloace terapeutice specifice și eficiente.

Factorii de mediu sunt considerați a fi principala cauză în dezvoltarea cancerelor (aproximativ 75% din cazuri). Indiferent de etiologie însă, toate cancerelor apar ca urmare a unor evenimente genetice și epigenetice. Majoritatea acestor evenimente se produc în cursul vieții individului, la nivelul celulelor somatice. În absența reparării lor, aceste *mutații somatice* sau *dobândite* se vor transmite la celulele fiice, conducând la formarea unei clone. Deoarece apar la nivelul celulelor somatice, asemenea mutații nu pot fi însă transmise în succesiunea generațiilor de organisme; ele nu sunt ereditare.

Uneori, anumite mutații care predispun la apariția cancerului apar la nivelul celulelor germinale. asemenea *mutații germinale* se transmit de la o generație la alta și au ca rezultat agregarea familială a unor cancerelor specifice.



Indiferent dacă un cancer apare spontan la un singur individ sau se produce la mai multe persoane dintr-o familie, ca un caracter ereditar – *cancerul este considerat o boală genetică* deoarece inițierea și dezvoltarea unei tumori implică producerea în cascadă a unor mutații multiple, în diferite gene care controlează proliferarea celulară, repararea ADN, ciclul mitotic și moartea celulară.

## A. CLASE DE GENE IMPLICATE ÎN DEZVOLTAREA CANCERULUI

Cancerul se dezvoltă ca urmare a mutațiilor la nivelul genelor care controlează proliferarea și moartea celulară. Aceste gene pot fi separate în două categorii majore: *oncogenele* și *genele supresoare de tumori*.

- **Oncogenele** reprezintă variantele mutante (activate) ale unei clase de gene normale numite **protooncogene**. Activarea acestor gene este rezultatul unor mutații *cu câștig de funcție*. Oncogenele au efect *dominant* la nivel celular; ca atare, o singură alelă mutantă (activată) este suficientă pentru modificarea fenotipului celular.
- **Genele supresoare de tumori** sunt gene care blochează dezvoltarea neoplaziilor maligne prin reglarea creșterii și proliferării celulare. Mutații *cu pierderea funcției* acestor gene conduc la proliferare și creștere celulară necontrolate și la apoptoza ineficientă. Genele supresoare de tumori se manifestă ca gene *recesive* la nivel celular, pentru convertirea fenotipului fiind necesară pierderea sau mutația ambelor alele (inactivarea alelică).

### 1. ONCOGENELE

Primele date despre existența oncogenelor au fost aduse la sfârșitul anilor '60 prin studiul unor *virusuri* capabile să inducă dezvoltarea unor tumori la diverse specii animale. Ulterior s-a demonstrat că o singură genă din structura acestor virusuri poate fi responsabilă de această transformare. Primul exemplu a fost gena *src* a virusului sarcomului avian Rous<sup>1</sup>. Asemenea gene au fost denumite **oncogene virale** (*v-onc*). Gene înrudite ca secvență cu cele ale retrovirusurilor oncogene au fost însă identificate și în ADN-ul celulelor umane normale. Aceste gene îndeplinesc funcții în controlul creșterii și diferențierii celulare, iar *activarea* lor necorespunzătoare, ca moment și ca loc, poate conduce la apariția cancerului. Genele celulare normale au fost denumite **protooncogene**, iar variantele lor activate – **oncogene celulare** (*c-onc*).

Au fost identificate și virusuri oncogenice umane. Printre acestea se numără atât virusuri ARN (precum virusul HTLV1 implicat în etiologia leucemiilor adulte cu celule T sau virusul hepatitic tip C care determină cancere hepatocelulare), cât și virusuri cu genom ADN (cum sunt, de exemplu, virusul *Papilloma* – HPV – implicat în producerea cancerelor tractului genital, virusul hepatitic tip B – hepatocarcinoame, virusul Epstein-Barr – limfomul Burkitt, virusul HV40 – mezoteliom sau virusul herpetic tip 8 – sarcomul Kaposi).

La sfârșitul anilor '70 a fost dezvoltată o modalitate complet diferită de identificare a oncogenelor, bazată pe metode de *transformare celulară*. Asemenea experimente au permis introducerea prin **transfecție**<sup>2</sup> a unor fragmente de ADN provenite din celule canceroase umane în culturi de celule non-neoplazice (linia de fibroblaști NIH-3T3). Prima genă care a indus transformarea tumorală prin această tehnică a fost o variantă mutantă a genei HRAS, o protooncogenă deja cunoscută din studiile retrovirale.

<sup>1</sup>Denumirea oncogenelor identificate prin studiul virusurilor oncogene a fost bazată pe numele acestora. De exemplu, SRC este o oncogenă a virusului sarcomului Rous (Rous șarçoma virus), SIS o oncogenă a virusului sarcomului simian (Simian șarçoma virus), RAS este virusul sarcomului șobolanilor (rat șarçoma virus) și așa mai departe.

<sup>2</sup>Transfecția reprezintă introducerea unei gene într-o celulă, permițând celulei transfectate să sintetizeze proteina corespunzătoare.

În sfârșit, o altă sursă de identificare a oncogenelor a fost analiza punctelor de ruptură din *translocațiile cromozomice* asociate constant cu anumite forme de cancer. Asemenea exemple sunt gena MYC în limfomul Burkitt<sup>3</sup> ori gena ABL în leucemia mieloidă cronică.

În prezent sunt cunoscute peste 100 oncogene (vezi **tabelul 17.1**). În funcție de nivelul celular unde acționează proteinele codificate de acestea, oncogenele pot fi clasificate în mai multe categorii (**figura 17.1**):

- (1) oncogene care codifică *factori de creștere* (de exemplu PDGFB);
- (2) oncogene care codifică *receptori ai factorilor de creștere* (de exemplu EGFR, RET);
- (3) oncogene care codifică *componente ale căilor de semnalizare intracelulară* (de exemplu familia RAS, gena ABL);
- (4) oncogene care codifică *proteine nucleare*, în special factori de transcripție (de exemplu MYC);
- (5) oncogene care codifică proteine implicate în *controlul ciclului celular* (de exemplu MDM2).

**Tabelul 17.1. Exemple de oncogene activate în cancerle umane**

Oncogena	Localizarea cromosomică	Funcția proteinei codificate
ABL	9q34.1	tirozin kinaza citoplasmatică
CCND1	11q13	ciclina D1 implicată în controlul ciclului celular
EGFR (ERBB1)	7p12.3-p12.1	receptorul pentru factorul de creștere epidermal
ERBB2 (HER2/neu)	17q21.1	receptor membranar tirozin kinazic înrudit cu EGFR
MDM2	12q14.3-q15	reglator al activității proteinei p53
MET	7q31	receptor transmembranar pentru factorul de creștere hepatocitar (HGF)
MYC	8q24.1	factor de transcripție
MYCN	2p24.1	factor de transcripție
MYCL1	1p34.3	factor de transcripție
PDGFB	22q13.1	subunitatea β a factorului de creștere derivat din plachete
HRAS	11p15.5	proteina G citoplasmatică
KRAS2	12p12.1	proteina G citoplasmatică
NRAS	1p13.2	proteina G citoplasmatică
RET	10q11.2	receptor transmembranar tirozin kinazic pentru factorul neurotrofic derivat din celulele gliale (GDNF) și pentru neurturina

Fiind gene *dominante*, majoritatea mutațiilor responsabile de *activarea* oncogenelor apar la nivelul celulelor somatice. Mutațiile germinale sunt considerate a fi, foarte probabil, incompatibile cu dezvoltarea embrionară. Sunt cunoscute totuși două excepții în care mutațiile oncogenelor pot fi transmise de la o generație la alta, determinând forme ereditare de cancer:

- neoplaziile endocrine multiple tip 2 determinate de mutațiile oncogenei RET (vezi subcapitolul 17. D 1.1);
- cancerul renal papilar ereditar produs prin mutația oncogenei MET.

**Activarea oncogenelor** în celulele somatice se poate realiza prin mai multe mecanisme:

1) *Activarea oncogenelor prin mutații punctiforme.*

Acest mecanism este întâlnit în cazul unor oncogene care codifică receptori transmembranari sau proteine citoplasmatică (exemple: gena RET, familia genelor RAS etc.). De pildă, genele RAS codifică proteine G (care leagă guanozin-trifosfat – GTP) implicate în căile de transducție ale semnalelor. Mutațiile punctiforme ale acestor gene conduc la sinteza unor proteine RAS anormale, capabile să semnalizeze continuu, chiar în absența GTP. Rezultatul este

<sup>3</sup>Limfomul Burkitt este o forma agresivă de limfom cu origine în celulele tip B.

stimularea creșterii celulare și transformarea tumorală. Mutațiile RAS sunt observate în aproximativ 15% din toate cancerurile (al doilea eveniment mutațional ca frecvență după mutația genei TP53), dar mult mai adesea în unele forme de cancer, cum sunt cele de colon, sân, plămâni și vezica urinară. În plus, genele RAS au fost documentate experimental a fi ținta mutațională a diverși carcinogeni.

2) *Activarea oncogenelor prin translocații cromozomice.*

Uneori protooncogenele pot fi activate prin mutații cromozomice, cel mai adesea translocații. Au fost descrise peste 40 asemenea translocații cu potential activator al unor oncogene, în special în leucemii și limfoame, dar și în unele sarcoame (vezi tabelul 17.2).

Există două mecanisme prin care translocațiile cromozomice pot conduce la activarea oncogenelor. În unele cazuri punctele de ruptură sunt localizate la nivelul intronilor a două gene, rezultatul rearanjării cromozomice fiind producerea unei proteine *himerice*, cu proprietăți noi (mutație cu câștig de funcție). Cel mai cunoscut exemplu este translocația între cromosomii 9 și 22 întâlnită în **leucemia mieloidă cronică** (vezi **caseta 17.1**). Alterori translocația activează o oncogenă prin plasarea acesteia în apropierea unui promotor puternic din structura altei gene. Un asemenea exemplu îl constituie activarea oncogenei MYC în limfomul Burkitt prin plasarea acesteia din poziția sa normală (8q24) în proximitatea promotorului genei pentru lanțul greu al imunoglobulinelor (14q32), foarte activ în celulele B care sintetizează Ig.

3) *Activarea oncogenelor prin amplificare genică.*

Amplificarea genică este un fenomen care are ca rezultat producerea mai multor copii ale unor oncogene normale structural. Fenomenul este responsabil de activarea unor oncogene precum cele din clasa MYC și ERB (vezi subcapitolul 17.B.).

4) *Activarea oncogenelor prin inserție virală.*

Retrovirusurile oncogene, ca de exemplu HTLV1, îndeplinesc rolul unor vectori, transportând oncogene activate de la un organism la altul. Virusurile ADN acționează însă prin inserția în genomul gazdă a unor oncogene fără corespondent uman (ca, de pildă, gena pentru antigenul T al virusului SV40 – implicat în etiologia mezoteliomelor, ori antigenele E6 și E7 ale papilomavirusului tip 16 – implicat în producerea cancerelor de col uterin).

**Caseta 17. 1.**

**Leucemia mieloidă cronică (LMC)**

*LMC este o boală caracterizată prin expansiunea clonală a celulelor stem hematopoietice transformate malign, ceea ce are drept rezultat o creștere a numărului celulelor mieloide, eritroide și al plachetelor circulante. Transformarea celulelor circulante are loc ca rezultat al expresiei oncogenei himerice BCR-ABL.*

*Aproximativ 95% din pacienții cu LMC au un cromozom Philadelphia, produs prin translocația t(9;22), iar restul au translocații complexe sau variante ale translocației principale. Protooncogenul ABL (Abelson) care codifică o tirozin kinază citoplasmatică este localizată pe cromozomul 9q34, iar gena BCR (breakpoint cluster region), ce codifică o fosfoproteină, este localizată pe cromozomul 22q11. În cursul formării cromosomului Philadelphia gena ABL este ruptă la nivelul intronului 1, iar gena BCR cel mai adesea la nivelul intronului 11. În urma translocației, la nivelul cromosomului 22 se formează gena himerică BCR-ABL alcătuită din exonii 1-11 ai genei BCR și 2-11 ai genei ABL (vezi **figura 17.1**).*

**Figura 17.2. Translocația t(9;22) care conduce la formarea cromosomului Philadelphia în LMC**

*Până în prezent nu se cunosc pe deplin funcțiile proteinelor BCR și ABL. Proteina ABL se găsește în citoplasmă, nucleu și la nivelul membranei celulare și intervine în multiple procese: controlul ciclului celular, semnalizarea integrinică și dezvoltarea neurală. Proteina BCR este implicată în reglarea activității proteinelor din familia RAS și a GTP-azelor RAC și RHO. Spre deosebire de proteina ABL normală, proteina himerică are activitate tirozin kinazică constitutivă și este localizată în principal în citoplasmă, unde se leagă intens de microfilamentele de actină. BCR-ABL*

fosforilează câteva substraturi citoplasmatică și activează, probabil, o serie de cascade de semnalizare care controlează creșterea și diferențierea, precum și adeziunea celulelor hematopoietice. Proliferarea necontrolată a celulelor stem hematopoietice conduce la eliberarea în circulație a unor celule imature, generând LMC.

In cursul progresiei LMC pot apare modificări cromosomice noi, precum trisomia 8 sau 19, i(17q) ori un al doilea cromozom Philadelphia. Apariția acestor modificări are ca rezultat debutul crizei blastice.

Din punct de vedere clinic LMC se caracterizează prin evoluție trifazică. Stadiul inițial (sau cronic) este caracterizat prin debut insidios cu manifestări precum fatigabilitatea, pierderea ponderală, splenomegalia minimă sau moderată. În timp, LMC evoluează spre o fază accelerată și apoi spre criza blastică caracterizată prin leucocitoză progresivă, anemie, trombocitoză sau trombocitopenie, febră, accentuarea splenomegaliei și leziuni osoase, cu evoluție fatală rapidă.

Metodele de tratament utilizate constau în transplantul medular sau administrarea de alpha interferon pentru cei fără donori compatibili. Administrarea altor citostatice are efecte numai pe scurte perioade de timp. Identificarea proteinei de fuziune BCR-ABL a condus la sinteza unui inhibitor specific (Imatinib mesylate – Gleevec) capabil să inducă moartea prin apoptoză exclusiv a celulelor care exprimă proteina anormală. Imatinib mesylate-ul este un medicament extrem de eficient și a devenit rapid agentul terapeutic de elecție pentru cazurile noi de LMC pentru care nu este indicat transplantul medular alogenic.

## 2. GENELE SUPRESOARE DE TUMORI

Experimentele de fuziune celulară au evidențiat faptul că fenotipul transformant al unei celule tumorale poate fi adesea corectat prin fuziunea celulei maligne cu una normală. Aceasta arată că tumorigeneza implică nu numai activarea dominantă a unor oncogene, dar și mutații *cu pierderea funcției* ale altor gene. Aceste gene au fost denumite **gene supresoare de tumori**<sup>4</sup> (“*tumor-suppressor genes*”). Deoarece celulele rezultate în urma acestor fuziuni sunt cu certitudine heterozigote, genele supresoare de tumori au efect *recesiv* la nivel celular.

Conceptele și metodele de cercetare ale genelor supresoare de tumori au fost definite prin studiul retinoblastomului, o formă rară de tumoră oculară (vezi subcapitolul 17.D.1.2). Circa 60% din cazurile de **retinoblastom** apar ca tumori sporadice și unilaterale, iar 40% în cadrul unei boli ereditare cu transmitere autosomal dominantă, neoplazia fiind adeseori bilaterală, multicentrică și cu debut mai timpuriu. Pentru a explica diferențele între cele două forme de boală, Knudson a propus în 1971 *ipoteza celor două evenimente* (“two hits”) necesare pentru transformarea unei celule normale într-o celulă tumorală. În cazurile de retinoblastom ereditar prima mutație este moștenită și prezentă la naștere în toate celulele organismului. A doua mutație poate apărea la nivelul uneia sau mai multor celule retiniene, ceea ce explică frecvența relativ crescută a retinoblastomelor bilaterale în forma familială de boală. De asemenea, moștenirea primei mutații explică debutul mai timpuriu al bolii.

Deși genele supresoare de tumori au efecte recesiv la nivel celular, posibilitatea apariției unei mutații care să inactiveze a doua alelă în cel puțin o celulă a organismului este crescută și, ca urmare, retinoblastomul ereditar (ca și alte boli genetice produse de moștenirea unor asemenea mutații ale genelor supresoare de tumori) au un model de *transmitere dominant*. Există însă și forme ereditare de cancer determinate prin transmiterea unor mutații germinale dar în care modul de transmitere a bolii este unul *recesiv* (vezi tabelul 17.4).

Cavenee și colaboratorii săi (1983) au demonstrat validitatea ipotezei lui Knudson și au evidențiat o serie de mecanisme răspunzătoare de inactivarea celei de-a doua alele a unei gene supresoare de tumori la nivel somatic. Autorii au comparat rezultatele obținute în urma tipării

<sup>4</sup> Probabil, mai corectă ar fi denumirea “gene supresoare a creșterii tumorale”; oricum, termenul de “antioncogene”, folosit inițial, este impropriu

unor markeri polimorfici de pe cromosomul 13q (identificat a fi purtătorul genei RB – responsabilă de producerea retinoblastomului ereditar) al celulelor sanguine și al celulelor tumorale. Ei au observat unele cazuri în care probele din sânge prezentau heterozigotitate pentru asemenea markeri, în timp ce celulele tumorale erau aparent homozigote. Concluzia a fost aceea că fenomenul se datorează unuia dintre evenimentele Knudson: pierderea unei copii funcționale a unei gene supresoare de tumori. Fenomenul a fost denumit *pierderea heterozigotității* (“*loss of heterozygosity*” - LOH).

Studiile citogenetice au permis identificarea mai multor mecanisme de inactivare a celei de-a doua copii a unei gene supresoare de tumori în cancererele ereditare (figura 17.3):

- deleții;
- recombinări somatice – prima dovadă a existenței acestui fenomen la nivelul celulelor somatice;
- pierderea unui cromozom;
- pierderea unui cromozom asociată cu duplicația cromozomului restant;

*Pierderea heterozigotității* este mecanismul cel mai frecvent de inactivare a celei de-a doua alele în cancererele ereditare produse prin moștenirea unei gene supresoare de tumori mutante. Când pierderea heterozigotității nu este observată, cel de-al doilea eveniment mutațional este de regulă o *mutație punctiformă* sau inactivarea transcripțională a celei de-a doua alele printr-un *eveniment epigenetic* (vezi subcapitolul C.2).

Identificarea genelor supresoare de tumori a fost realizată prin două categorii de studii:

- clonarea pozițională a genelor implicate în producerea unor forme rare de cancerere ereditare (vezi subcapitolul 17.C.);
- analiza fragmentelor cromozomice care suferă frecvent deleții în cancererele sporadice (prin studii de pierdere a heterozigotității ori hibridizare genomică comparativă).

Genele supresoare de tumori codifică proteine cu funcții extrem de diverse: receptori membranari (precum PTCH); proteine citoplasmice (de exemplu: APC, NF1); proteine nucleare (TP53, RB1, VHL, WT1, ATM, BRCA1 etc.).

Genele supresoare de tumori au fost clasificate de către Vogelstein și Kinzler în 1996 în două categorii majore: gene *gatekeeper* (portar) și gene *caretaker* (ingrijitor)<sup>5</sup>.

- **Genele gatekeeper** sunt gene care codifică proteine implicate direct în *controlul creșterii celulare* (de exemplu inhibând mitoza sau promovând apoptoza). Funcția acestor gene este critică pentru supresia tumorală. Exemple de gene gatekeeper sunt APC, VHL, TP53, NF1 sau PTEN. Mutațiile germinale ale tuturor acestor gene determină producerea unor boli genetice cu risc crescut de dezvoltare a cancerului care au o transmitere dominantă (vezi sindromul Li-Fraumeni (vezi subcapitolul D 1.3);
- **Genele caretaker** sunt gene care codifică proteine implicate în *menținerea stabilității genomului*. Alterările acestor gene au drept consecință creșterea frecvenței mutațiilor la scara întregului genom, inclusiv a protooncogenelor și a genelor supresoare de tumori, și determină instabilitate cromosomică.

Toate căile de *reparare ale leziunilor ADN* (vezi capitolul 6) pot fi implicate în producerea cancerelor, dar consecințele sunt diverse. Astfel, alterările componentelor implicate în repararea leziunilor ADN prin excizia nucleotidelor (*nucleotide excision repair* - NER) sunt întâlnite în special în cancererele cutanate deoarece această cale este răspunzătoare de repararea leziunilor induse de radiațiile UV. Mutațiile genelor care codifică proteinele implicate în calea de

<sup>5</sup>Inițial genele *caretaker* au fost denumite gene ale controlului integrității genomului și au fost considerate o categorie separată față de genele supresoare de tumori. Trăsăturile lor comune (precum caracterul recesiv al mutațiilor) și lipsa unei departajări clare între funcțiile lor au condus la reunirea acestora într-o singură clasă, cea a genelor supresoare de tumori.

reparare a erorilor de împerechere (*mismatch repair* - MMR) determină **instabilitatea microsateiților**, fenotip întâlnit în cancerul colorectal nonpolipozic ereditar (HNPCC – vezi subcapitolul 17.D.1.4). Alterările componentele implicare în repararea rupturilor ADN au drept consecință creșterea frecvenței anomaliilor cromozomice structurale, caracteristică în special pentru neoplaziile din sfera hematologică, dar și pentru unele cancere solide. În sfârșit, alterările genei O6 MGMT care protejează împotriva mutațiilor A – G preced adeseori unele mutații punctiforme de acest tip întâlnite la nivelul genelor RAS în cancerele colorectale sau cu alte localizări.

Genele a căror dereglare poate conduce la **instabilitate cromozomică** controlează procese precum condensarea cromozomică, activitatea centromerilor (CDK2, STK15, PLK1), kinetocorilor (APC), ori a punctelor de control care previn separarea prematură a cromatidelor până ce cromosomii sunt corect aliniați la nivelul fusului de diviziune (securina, separina, MAD2L1, BUB1 – vezi subcapitolul 17.B).

Între genele *gatekeeper* și genele *caretaker* nu există o delimitare precisă. Astfel, genele BRCA1 și BRCA2 sunt gene *gatekeeper* prin activitatea lor de control a transcripției și gene *caretaker* prin intervenția lor în calea de reparare a rupturilor ADN bicatenare. De asemenea, gena APC pare a fi implicată și în controlul stabilității genomice.

Pe lângă implicarea lor în producerea unor cancere ereditare, genele supresoare de tumori sunt inactivate adesea și în cazul cancerelor sporadice. Inactivarea genei TP53<sup>6</sup> este, de exemplu, cel mai frecvent eveniment mutațional întâlnit în cancerele sporadice (circa 50% din acestea, dar cu frecvențe mai mari în anumite localizări: cancerele mamare, colorectale, vezicale, pulmonare, cervicale etc.).

Alte gene supresoare de tumori care sunt frecvent inactivate în cancerele sporadice sunt APC (în aproximativ 70% dintre cancerele colorectale), NF1 (în cancerele cu origine în celulele nervoase), genele MMR în circa 15% dintre cancerele colorectale, în timp ce mutațiile BRCA1 și BRCA2 sunt întâlnite relativ rar în cancerele de sân și ovar sporadice.

## B. ANOMALII CITOGENETICE ÎN CANCER

Anomaliile citogenetice sunt consecința instabilității genomice - caracteristică tuturor cancerelor și responsabilă de creșterea numărului mutațiilor care conduc la dezvoltarea neoplaziilor. Există trei categorii majore de anomalii cromozomice care pot fi întâlnite în cancer: anomalii numerice, anomalii structurale și amplificări genice.

### 1. ANOMALII CROMOZOMICE NUMERICE

Anomaliile cromozomice numerice implică pierderea sau câștigul unor cromozomi în întregime – *aneuploidie*<sup>7</sup>. Numărul cromozomilor poate fi redus – *hipoploidie*, crescut – *hiperploidie* sau aparent normal – *pseudodiploidie*. Asemenea modificări sunt întâlnite în majoritatea tipurilor tumorale. În general nu există anomalii numerice specifice pentru un anumit tip tumoral, deși unele variante pot fi întâlnite mai frecvent în unele forme de cancer. Asemenea exemple sunt pierderea cromozomului 10 în glioblastoame (reflectând adesea inactivarea genei supresoare de tumori PTEN), ori adiția unui cromozom 7 în carcinoamele renale papilare (reflectând duplicația oncogenei MET).

<sup>6</sup> Rolul central al proteinei TP53 în supresia tumorală a condus la desemnarea acesteia ca "molecula anului" de către revista Science în 1993 (vezi și caseta 17.5).

<sup>7</sup> Aneuploidia este definită ca fiind orice număr al cromosomilor care nu este un multiplu exact al unui set haploid de cromosomi.

Existența anomaliilor cromozomice în celulele canceroase a fost evidențiată pentru prima dată de Boveri în 1914 care a postulat teoria aneuploidiei ca baza a dezvoltării cancerelor. Lipsa unor anomalii cromozomice specifice în anumite tipuri de cancere și evidențierea mutațiilor genice a condus la abandonarea în mare parte a acestei teorii. Oricum, unele cercetări recente încearcă să readucă în actualitate această ipoteză. Câteva dintre argumentele aduse în favoarea acestei teorii sunt:

- existența unor carcinogeni capabili să inducă aneuploidie fără a produce mutații genice (prin alterarea fizică sau chimică a elementelor componente ale fusului de diviziune);
- incapacitatea cercetătorilor de a demonstra clar existența unor mutații capabile să conducă la transformarea canceroasă a celulelor normale;
- existența obligatorie a aneuploidiei în toate liniile celulare imortalizate pe care au fost studiate oncogenele sau genele supresoare de tumori.

Conform acestei teorii, dezvoltarea cancerului se realizează în două stadii:

- stadiul inițial în care aneuploidia este generată prin alterarea fizică sau chimică a elementelor aparatului mitotic ori prin mutația unor gene care controlează activitatea acestor elemente;
- stadiul ulterior în care aneuploidia se propagă autocatalitic datorită dezechilibrului indus între proteinele fusului de diviziune, proteinele centromerelor și numărul cromosomilor.

Aneuploidia poate explica mai bine decât mutațiile unor gene izolate modificările fenotipice dramatice ale celulelor canceroase (deoarece sunt implicate sute sau mii de gene) și poate explica de asemenea, mai bine, latența acțiunii unor carcinogeni ori dobândirea rapidă a rezistenței multiple a celulelor tumorale la agenții citostatice.

Una dintre direcțiile majore de cercetare în cancer este identificarea genelor care controlează aparatul mitotic, ținte în generarea instabilității cromozomice.

O asemenea gena poate fi TP53. Inactivarea sa în culturile celulare este asociată cu apariția aneuploidiei, anomalii ale fusului de diviziune și cu blocarea progresiei prin ciclul celular la nivelul punctului de control G2/M. Pe de altă parte, există însă și linii celulare cu mutații ale genei TP53 care sunt diploide. Mai mult, mutația TP53 este un eveniment tardiv în evoluția majorității cancerelor, în timp ce aneuploidia apare precoce. Toate aceste rezultate sugerează că TP53 poate exacerba instabilitatea cromozomică, dar este puțin probabil să fie o cauză primară a acesteia.

Teoretic, genele implicate în producerea aneuploidiei pot controla condensarea cromozomilor, coeziunea cromatidelor surori, funcția și structura kinetocorilor și centrosomilor, ori dinamica microtubulilor.

Un prim punct de control este reglarea activității *fusului de diviziune* care preîntâmpină separarea cromatidelor surori înainte de alinierea corespunzătoare a cromozomilor la nivelul fusului mitotic. Astfel, reducerea expresiei genei MAD2L1 (cromosomul 4q27) – evidențiată în numeroase cancere mamare – este asociată cu instabilitate cromozomică tradusă prin aneuploidie.

MAD2L1 codifică o proteina cu 205 aminoacizi care se atașează la nivelul cromosomilor nefixați pe fibrele fusului de diviziune, inhibând activitatea complexului de promovare a anafazei. Mutațiile BUB1 și BUBR1 care controlează activitatea fusului de diviziune induc aneuploidie în unele cancere colorectale. În sfârșit, mutațiile securinei și separinei, două proteine implicate în prevenirea separării premature a cromatidelor surori în cursul mitozei, pot conduce la instabilitate cromozomică.

O a doua cauză potențială a aneuploidiei implică funcția anormală a *centrosomilor*. În multe tipuri de cancere umane, cum sunt cele de sân, plămân, colon sau prostata au fost evidențiate fusuri de diviziune multipolare sau un număr anormal de centrosomi. Până în prezent au fost identificate câteva gene care controlează activitatea centrosomilor și anume cele care codifică kinazele CDK2, STK15 ori PLK1.

Recent au fost aduse dovezi care susțin rolul proteinei APC în inducerea instabilității cromozomice. Domeniul C-terminal al acestei proteine interacționează cu proteina EB1 asociată extremităților citoplasmice ale microtubulilor fusului de diviziune. Complexul APC-EB1 pare a fi crucial pentru captarea kinetocorilor și stabilizarea interacțiunilor microtubuli-kinetocori.

În pofida acestor date, bazele moleculare ale instabilității cromozomice rămân necunoscute în cazul majorității cancerelor umane. Este evident caracterul heterogen al substratului acestui fenotip, cu numeroase gene implicate fiecare într-o mică parte a cancerelor.



## 2. ANOMALII CROMOZOMICE STRUCTURALE

Cea mai frecventă categorie de anomalii cromozomice structurale întâlnite în cancerele umane este cea a translocațiilor. Pot fi evidențiate două categorii majore de anomalii structurale: tipul complex și tipul simplu.

*Tipul complex* este observat în special în tumorile solide și constă în rearanjări complicate ce interesează mai mulți cromozomi. Caracterizarea lor este posibilă adeseori numai prin metode bazate pe hibridizarea fluorescentă in situ (FISH) ori hibridizarea genomică comparativă (CGH). O consecință frecventă a unor asemenea rearanjări complexe este apariția *cromosomilor marker*, întâlniți frecvent în tumorile solide. De asemeni, pot rezulta adeseori pierderi ale unor fragmente cromosomice mari (traduse la nivel molecular prin pierderea heterozigotității), câștiguri de material genetic ori generarea unor noi produși genici.

Bazele moleculare ale apariției anomaliilor cromosomice de structură sunt încă incomplet înțelese. O ipoteză atractivă este însă apariția acestora ca urmare a declanșării premature a mitozei, înaintea reparării rupturilor ADN bicatenare care promovează recombinarea. Gene candidate a media această formă de instabilitate cromosomică sunt ATM, ATR, BRCA1, BRCA2, TP53, NBS, KU70, KU80 și alte componente implicate în repararea rupturilor ADN bicatenare sau care reglează punctele de control ale calității acestui proces.

*Tipul simplu* de anomalii cromosomice de structură este caracterizat prin apariția unor rearanjări care implică segmente cromozomice adeseori specifice pentru anumite tipuri de neoplazii. Ele apar mai frecvent în leucemii și limfoame ca și în unele tipuri de sarcoame sau forme rare de cancer (tabelul 17.2.). Datorită specificității lor, identificarea acestor forme de anomalii cromosomice poate fi utilizată pentru clasificarea neoplasmelor și pentru predicția răspunsului lor terapeutic. Analizele moleculare ale unor asemenea anomalii cromosomice au condus la identificarea unor noi gene, implicate în dezvoltarea cancerelor, în special oncogene. Aceste rearanjări conduc în general la activarea oncogenelor prin re poziționarea lor lângă un promotor puternic sau prin fuziunea cu o altă genă activă. asemenea rearanjări specifice par să fie esențiale pentru dezvoltarea sau progresia cancerelor în care apar.

**Tabelul 17.2. Anomalii cromosomice de structură specifice pentru unele cancere umane**

Neoplazia	Anomalia cromosomică	Genele implicate
leucemia mieloidă cronică	t(2; 22)(q34; q11)	BCR-ABL
leucemia acută limfoblastică	t(1;19)(q23; p13.3)	E2A-PBX1
leucemia acută promielocitară	t(15; 17)(q22; q12)	PML-RARA
limfomul Burkitt	t(8; 14)(q24; q32)	MYC
sarcomul Ewing	t(11; 22)(q24; q12)	EWS-FLI1
liposarcomul mixoid	t(12; 16)(q13; p11)	FUS-CHOP
rabdomiosarcomul alveolar	t(2; 13)(q35; q14)	PAX3-FKHR

Spre deosebire de tipul complex, tipul simplu de rearanjări cromosomice nu pare să fie rezultatul unei instabilități genetice care să promoveze apariția lor cu o frecvență mai crescută decât în celulele normale. De fapt, multe dintre aceste anomalii structurale reprezintă aberații ale unor procese normale de recombinare, precum cele promovate de proteinele RAG care intervin în rearanjări genelor ce codifică imunoglobulinele sau receptorii TCR.

## 3. AMPLIFICĂRILE GENICE

Amplificările genice sunt evidențiate citogenetic sub forma *regiunilor colorate omogen* (*homogeneously stained regions* - HSR) ori a *cromosomilor minusculi* (*double minutes* - DMIN) (figura 17.4). Ampliconii rezultați conțin 0,5 - 10 megabaze ADN. Rezultatul îl reprezintă apariția a zeci sau sute de copii ale unei singure gene, în general protooncogene sau gene



implicate în rezistența la agenți antitumorali. Amplificarea genică este un fenomen întâlnit în numeroase tipuri de cancere: colorectale, de sân, cancerul capului și gâtului sau în neuroblastoame. Fenomenul este asociat în special fazelor avansate de boală și implică un prognostic nefavorabil. Câteva exemple sunt amplificarea N-MYC în 30% din neuroblastoamele avansate, ori amplificarea ERBB2 (HER2/neu) în cancerul mamei avansate.

Mecanismele care conduc la apariția amplificărilor genice sunt în cea mai mare parte necunoscute. O cauză potențială este mutația genei TP53, deoarece amplificările genice apar mult mai frecvent în celulele cu această genă inactivată. Oricum, bazele moleculare sunt cu siguranță mai complexe, întrucât fenomenul poate apare și în celulele tumorale cu gena TP53 integrită.

## C. EVOLUȚIA MULTISTADIALĂ A CANCERELOR

Cu puține excepții, cancerul se dezvoltă dintr-o singură celulă somatică și din urmașii acesteia. În cursul evoluției neoplazice clona acumulează o serie de modificări genetice și epigenetice care determină modificări fenotipice majore, în final luând naștere o populație de celule care scapă mecanismelor de control al creșterii și proliferării celulare, rezultatul fiind dezvoltarea unui cancer.

Conform modelului Weinberg, transformarea unei celule normale într-o celulă canceroasă necesită 6-7 mutații succesive. Rata tipică a mutațiilor este însă  $10^{-7}$  per genă și per celulă. Ca urmare, probabilitatea apariției a 7 mutații succesive într-o singură celulă din cele circa  $10^{13}$  ale unui organism uman ar fi extrem de redusă:  $10^{13} \times 10^{-42} = 10^{-29}$ . Frecvența crescută a cancerelor poate fi explicată prin intervenția a două mecanisme:

- unele mutații exacerbează capacitatea de proliferare celulară, determinând nașterea unei populații crescute de celule țintă pentru mutațiile următoare (figura 17.5);
- unele mutații determină instabilitatea întregului genom, crescând rata globală a mutațiilor.

*Exacerbarea capacității proliferative* este consecința mutațiilor proto-oncogenelor ori a genelor supresoare de tumori (subclasa *gatekeeper*), care permit:

- producerea autosuficientă a semnalelor necesare creșterii celulare;
- insensibilitatea la stimulii care se opun creșterii;
- sustragerea de sub controlul mecanismelor apoptozei;
- potențial replicativ nelimitat.

*Instabilitatea genetică* îmbracă cele două forme majore discutate anterior:

- instabilitatea microsateleților (MIN) determinată de mutații ale genelor implicate în repararea erorilor de împerechere;
- instabilitatea cromosomică (CIN) determinată de mutații ale genelor care controlează diverse componente ale aparatului mitotic.

Între cele două forme de instabilitate genetică există o corelație inversă așa cum se observă de exemplu în cancerul colorectal sau endometrial. Cancerul cu MIN este în general diploid, iar cancerul aneuploid este în general mecanisme eficiente de reparare a erorilor de împerechere. Ambele forme de instabilitate genetică par a fi însă evenimente precoce în dezvoltarea tumorală.

În cadrul *evoluției multistadiale* a cancerelor unele evenimente sunt întâlnite aproape obligatoriu. Acestea sunt: imortalizarea (dobândirea capacității de proliferare nelimitată), apariția unor modificări epigenetice, mutații ale genomului mitocondrial, angiogeneza, invazia și metastazarea.

### 1. IMORTALIZAREA CELULELOR TUMORALE

Celulele normale ale organismului uman pot suferi un număr limitat de diviziuni (limita

Hayflick) după care intră într-un stadiu numit senescența replicativă. Acest fapt se datorează scurtării progresive a telomerelor, care este rezultatul caracterului asimetric al replicării celor două catene ale ADN.

Telomerele umane sunt alcătuite dintr-o repetiție hexanucleotidică (TTAGGG)<sub>n</sub>. Fiecare replicare este asociată cu pierderea a aproximativ 35 perechi de baze ale acestei repetiții ADN. Pentru a evita acest fenomen și a permite numărul imens de diviziuni celulare necesar în cursul embriogenezei, organismul uman este prevăzut cu un sistem special de replicare a telomerelor care implică activitatea unui complex ARN-proteine numit *telomeraza*. Principala componentă proteică a acestui complex este TERT (cromosomul 5p15.33). După perioada embrionară telomeraza este inactivată în majoritatea țesuturilor, rămânând activă numai în celulele cu replicare intensă cum este linia celulelor germinale.

S-a constatat că aproximativ 90% din cancerurile umane au însă telomeraza reactivată. Reactivarea telomerasei poate fi indusă de către oncogenele MYC sau de către oncogenele E6 a *virusului Papilloma*. Reactivarea telomerasei nu este însă suficientă pentru imortalizare, un alt eveniment necesar fiind inactivarea căii P16-RB-E2F1 de control a ciclului celular.

Aproximativ 10% din cancerurile umane sunt însă capabile să mențină lungimea normală a telomerelor și capacitatea de proliferare necontrolată în absența reactivării telomerasei. Recent s-a stabilit că această trăsătură poate fi rezultatul mutației genelor care intervin în repararea erorilor de împerechere (MMR). Aceste gene sunt necesare pentru evitarea mutațiilor și pentru represia recombinării omologe. Cum secvențele telomerice nu sunt perfect omologe, alterarea funcției acestor gene poate conduce la recombinări între capetele cromosomice care pot avea ca rezultat menținerea lungimii telomerelor și, ca urmare, a capacității de proliferare. Pe de altă parte, deoarece mutațiile genelor MMR cresc rata mutațiilor, creșterea capacității de proliferare telomeraza-independentă poate fi secundară apariției unor mutații la nivelul genelor care influențează recombinarea telomerelor. De exemplu, unele mutații ale ADN-polimerazei  $\delta$  pot avea consecințe asemănătoare.

Una dintre caracteristicile constante ale liniilor celulare imortalizate este aneuploidia. Semnificația și bazele moleculare ale acestei asocieri sunt însă incomplet cunoscute.

## 2. MODIFICĂRI EPIGENETICE ÎN CANCER

Expresia genelor poate fi reglată nu numai prin evenimente genetice cum sunt mutațiile ori delețiile, ci și prin modificări epigenetice. Principala modificare epigenetică răspunzătoare de alterarea expresiei genice este *metilarea regiunilor promotor*. Metilarea ADN uman apare la nivelul poziției 5' a citozinei din cadrul dubletelor CpG<sup>8</sup>. Hipermetilarea este asociată cu un proces de dezacetilare a histonelor, iar rezultatul este modificarea conformației structurale a cromatinei. Hipermetilarea aberantă este o caracteristică frecvent întâlnită în cadrul cancerelor umane și este asociată adeseori cu inactivarea unor gene supresoare de tumori.

Acest mecanism de inactivare este frecvent în mod particular în cazul unor gene precum: APC, BRCA1, CDH1, LBK1, MLH1, P16 ori VHL, dar nu în formele familiale de boala ci în cele sporadice. Lista genelor hipermetilate în cancer include, de asemenea, o serie de gene care nu au activitate pe deplin documentată de supresie a creșterii tumorale (de exemplu, pierderea expresiei genei O6-MGMT care protejează împotriva mutațiilor G-A).

Cum hipermetilarea se poate accentua o dată cu proliferarea celulară, aceasta poate conduce la grade diferite de inactivare a expresiei genice, spre deosebire de inactivarea produsă de mutațiile genice. Pe de altă parte, hipermetilarea poate fi potențial reversibilă și acestui fapt i se atribuie semnificații particulare în cazul unor gene. De exemplu, în unele forme de cancer inactivarea prin hipermetilarea promotorului genei CDH1 (care codifică caderina E – o proteină implicată în adeziunea celulară) este un eveniment precoce care ar favoriza invazia tumorală. Pe de altă parte, formarea unor agregate celulare care să permită supraviețuirea celulelor metastazate

<sup>8</sup>Metilarea ADN poate apare, mai rar, în cadrul altor secvențe precum CpNpG ori CmC[A/T]GG.

poate necesita reexprimarea caderinei E, obținută prin reducerea regională a metilării promotorului său.

Modificarea epigenetică a expresiei genice în cancerle umane este întâlnită, de asemenea, în cazul unor *gene amprentate*. Aceste gene sunt exprimate în mod normal monoalelic și cu specificitate parentală (fie numai de pe cromosomii paterni – de exemplu IGF2, fie numai de pe cromosomii materni – de exemplu H19), iar tulburările metilării unor regiuni bogate în dinucleotide CpG din structura lor pot conduce la exprimarea aberantă, bialelică. Acest fenomen denumit *pierderea amprentării* (“*loss of imprinting*” - *LOI*) este întâlnit frecvent în cazul genei IGF2 în unele cancere, cum sunt tumorile Wilms ori tumorile colorectale. În cancerle colorectale LOI pentru gena IGF2 este asociată în mod particular cu inactivarea prin hipermetilare a genei MLH1 și, ca urmare, cu instabilitatea microsateliților (MIN).

Deși hipermetilarea promotorului este clar implicată în inactivarea genelor supresoare de tumori, există și alte mecanisme prin care metilarea anormală poate fi implicată în tumorigeneza. Astfel, modelele experimentale au arătat că statusul heterozigot pentru gena DNMT1, răspunzătoare de menținerea metilării ADN, se asociază cu creșterea frecvenței mutațiilor somatice.

### 3. MUTAȚII ALE ADN MITOCONDRIAL

Genomul mitocondrial este mai vulnerabil la alterările oxidative și suferă o rată mai înaltă a mutațiilor decât genomul nuclear. Tumorile prezintă adeseori mutații ale ADNmt. Asemenea alterări au fost identificate în cancerle de vezică urinară, sân, colon, cap și gât, rinichi, ficat, stomac, în leucemii și limfoame.

Rata crescută a mutațiilor la nivelul genomului mitocondrial poate fi explicată prin trei factori:

- localizarea în apropierea lanțului de transport al electronilor care generează o concentrație crescută a speciilor reactive de oxigen;
- existența unor capacități limitate de reparare a leziunilor ADN-ului mitocondrial în raport cu cel nuclear;
- absența protecției asigurate de histone și de organizarea sub forma fibrelor de cromatină.

Deoarece ADNmt nu conține introni, majoritatea mutațiilor apar la nivelul secvențelor codante.

Fiecare tip de cancer analizat pare să conțină un model caracteristic al mutațiilor ADNmt. Aceasta conduce la ideea ca aceste mutații ar putea fi un component esențial în evoluția tumorilor.

Există mai multe explicații posibile ale modului în care aceste mutații ar putea interveni în evoluția multistadială a cancerelor:

- una dintre consecințe ar putea fi creșterea producției radicalilor liberi de oxigen care sporește și mai mult rata mutațiilor;
- accentuarea capacității de glicoliză anaeroba care este o caracteristică comună tuturor celulelor tumorale. Cantitatea de ATP astfel produsă este însă mai mică decât în celulele normale, ceea ce ar avea consecințe asupra capacității acestor celule de a traversa ciclul celular și de a-și repara leziunile ADN;
- inserția unor fragmente ale ADNmt în interiorul genelor nucleare ar putea fi o cauză a activării unor oncogene. Astfel de fragmente ale genelor ND4, citocromului c, oxidazelor I, II și III au fost identificate în mai multe cazuri în interiorul unor gene nucleare.

### 4. ANGIOGENEZA TUMORALĂ

În organismele mature angiogeneza este suprimată în cea mai mare parte și numai 0,01% din celulele endoteliale suferă procese de diviziune celulară. Celulele tumorale secretă multipli factori angiogenetici, dar și numeroase enzime care facilitează eliberarea unor factori

angiogenetici situați în matricea extracelulară. Printre factorii angiogenetici secretați de celulele tumorale, cei mai importanți sunt VEGF (vascular endothelial growth factor), FGF1 și FGF2 (fibroblast growth factor). Ei sunt inhibați de către o serie de factori antiangiogenetici precum trombospodinele 1 și 2 (TSP1 și TSP2) ori interferonul  $\beta$  (IFN $\beta$ ).

Toți acești factori se află sub controlul unor oncogene și gene supresoare de tumori. De exemplu, pierderea funcției TP53 care apare în majoritatea tumorilor poate determina reducerea nivelelor trombospodinei-1. De asemeni, activarea oncogenei RAS sau pierderea funcției genei supresoare de tumori VHL în anumite tipuri tumorale conduce la hiperexprimarea VEGF.

## 5. INVAZIA ȘI METASTAZAREA

Aceste procese sunt mediate de proteine care determină modificări ale interacțiunilor fizice ale celulelor la nivelul micromediului lor specific (receptori și liganzi) și activarea unor proteaze extracelulare. Acești factori sunt extrem de diverși, câțiva dintre cei mai studiați fiind: CD44 – esențial pentru apariția metastazelor în osteosarcoame, osteospondina în cancerele mamare, fosfataza PRL3 în cancerele colorectale, ICAM1 în melanoamele maligne etc.

Au fost evidențiate de asemeni gene care inhibă potențialul de metastazare al unor tumori. Cea mai intens studiată a fost gena NM23 care codifică o proteină cu activitate de nucleozid difosfat kinaza. Reducerea expresiei acestei proteine este asociată cu creștere a agresivității cancerelor de sân și a melanoamelor. Alte asemenea proteine sunt caderina E în cazul cancerelor de cap și gât, prostata sau a cancerelor tractului genital feminin, gena KISS1 în melanoamele maligne, gena BRMS1 în cancerele mamare etc.

Expresia ambelor categorii de gene mai sus amintite se află de asemeni sub controlul oncogenelor și a genelor supresoare de tumori, dar aceste mecanisme de reglare sunt în cea mai mare parte necunoscute. De exemplu, activitatea CD44 poate fi stimulată de către expresia unei oncogene RAS, osteospondina poate fi stimulată de către oncogenele SRC, MOS, RAF, FES etc.

## 6. MODELE DE EVOLUȚIE MULTISTADIALĂ A CANCERELOR

Nu există seturi specifice de gene ale caror mutații să conducă la dezvoltarea unui anumit tip de cancer. Cu toate acestea, necesitatea expansiunii clonale și a instabilității genetice impune o anumită regularitate a modificărilor întâlnite. Mutațiile genetice întâlnite în etapa inițială (de inducție) pot fi în mod particular mult mai specifice decât cele ulterioare, din cadrul progresiei tumorale.

Uneori relația cauzală dintre o anumită modificare genetică și tipul particular de cancer în care apare aceasta este una logică. De exemplu, translocațiile oncogenei MYC la nivelul unui locus Ig este logic să inducă perturbări ale celulelor care exprimă imunoglobulinele la un nivel foarte crescut. Alteori însă, nu există nici o asemenea conexiune aparentă. De exemplu, cauzele care conduc la dezvoltarea unor forme particulare de cancer ca urmare a mutațiilor unor gene ce codifică proteine esențiale pentru activitatea tuturor celulelor (precum retinoblastoamele în cazul mutației RB) sunt încă obscure. O posibilă explicație se găsește în ipoteza genelor *gatekeeper* (Kinzler și Vogelstein, 1996), conform căreia fiecare tip celular este caracterizat printr-o genă particulară răspunzătoare de controlul proliferării și de menținerea homeostaziei tisulare. Mutația acestei gene *gatekeeper* conduce la un dezechilibru între rata diviziunilor și a morții celulare, în timp ce mutațiile altor gene nu au nici un efect pe termen lung dacă gena *gatekeeper* este integra funcțional.

Genele supresoare de tumori identificate prin studiul cancerelor ereditare sunt astfel de gene *gatekeeper* pentru țesuturile respective: NF1 pentru celulele Schwann, VHL pentru celulele renale, APC pentru celulele epiteliale intestinale etc. Motivul pentru care gene larg exprimate sunt *gatekeeper* numai pentru un anumit tip celular

rezidă probabil în diferențele care există între rețelele complexe de semnalizare ale variatelor tipuri celulare, diferențe care fac ca o anumită genă să aibă un rol dominant într-un anumit tip celular. Pentru cancerul care nu are echivalent mendelian este posibilă și existența mai multor gene *gatekeeper*.

Prima formă de cancer pentru care a fost postulată secvența evenimentelor genetice răspunzătoare de evoluția multistadială a fost cancerul colorectal (modelul Fearon și Vogelstein, 1990 – figura 17.6). Acestea nu sunt singurele modificări genetice întâlnite în cancerul colorectal, dar sunt cele mai frecvent asociate cu un anumit stadiu evolutiv. Modele asemănătoare au fost construite și pentru alte forme de cancer.

## D. PREDISPOZIȚIA GENETICĂ ÎN CANCER

Principala trăsătură care permite recunoașterea clinică a existenței unei predispoziții genetice este istoricul familial pozitiv. Cancerul este însă o afecțiune frecventă și, ca urmare, în unele familii se pot înregistra câteva cazuri, aparenta agregare familială fiind întâmplătoare. Predispoziția genetică poate îmbrăca un spectru larg, de la existența unor forme rare de cancer ereditare până la cancerul cu predispoziție genetică, dar fără istoric familial sugestiv (tabelul 17.3).

În mod paradoxal cea mai largă categorie de cancer cu predispoziție genetică în ceea ce privește incidența globală este cea fără agregare familială evidentă. De exemplu, în cazul cancerelor de sân și ovar, formele ereditare asociate mutațiilor genelor BRCA1 și BRCA2 (care induc un risc de 60-80% până la vârsta de 70 de ani) reprezintă sub 5% din total. În schimb, o alelă care ar induce un risc relativ egal cu 2 față de populația generală și care ar avea o frecvență de circa 20% în populație ar putea fi răspunzătoare de până la 20% din incidența acestor cancer.

**Tabelul 17.3. Tipuri de predispoziție genetică în cancer**

Tipul	Incidența globală	Trăsături clinice	Frecvența alelelor	Riscul indus
Cancere ereditare	1-2%	Cancere rare sau combinații specifice de cancer. Uneori asocierea unor anomalii congenitale sau modificări fenotipice nonneoplazice. Transmitere mendeliană dominantă sau, mai rar, recesivă.	Rară: ~1 la 1000 sau mai puțin	Crescut: 50-80% sau chiar mai mare.
Cancere familiale	~ 10%	Familii cu câteva cazuri de cancer comune adeseori asociate specific (de exemplu: sân + ovar, colon + endometru + tract urinar). Există un spectru larg de situații, de la familii cu numeroase cazuri și debut precoce (dovada unei predispoziții puternice) până la familii cu 2-3 cazuri cu debut la vârste mai înaintate. Transmiterea îmbracă în general modelul unei boli dominante cu penetranță incompletă.	Rară până la frecventă.	Moderat sau redus.
Predispoziție genetică fără dovada unei agregări familiale	Nu poate fi apreciată exact. Posibilă în multe cazuri de cancer	Cazuri singulare ce pot apărea în orice sediu, uneori cu una sau două rude afectate. Distribuția acestor cazuri în populație este determinată probabil de combinarea efectelor unor factori de risc genetici și de mediu.	Multiple alele comune	Redus

### 1. CANCERELE EREDITARE

Se cunosc aproximativ 50 de afecțiuni cu transmitere mendeliană care se asociază un risc foarte crescut pentru dezvoltarea unor forme specifice de cancer (tabelul 17.4). Studiul acestor boli a permis identificarea unor gene care sunt implicate și în formele sporadice de cancer.

Majoritatea acestor boli sunt transmise dominant, dar există și sindroame cu transmitere recesivă. Se cunosc doar două boli determinate de moștenirea unei mutații germinale la nivelul unor oncogene, celelalte fiind asociate mutațiilor unor gene supresoare de tumori.

**Tabelul 17.4. Sindroame cu transmitere ereditară a riscului de dezvoltare a cancerelor**

Sindromul	Tumora primară	Alte cancere sau modificări fenotipice asociate	Gena	Localizare	Funcția produsului genic
<b>Cancere transmise AD produse de mutații germinale cu activarea unor oncogene</b>					
Carcinomul renal papilar ereditar	cancer renal		MET	7q31	receptor transmembranar pentru factorul de creștere hepatocitar (HGF)
Neoplaziile endocrine multiple tip 2 (MEN2)	cancer medular tiroidian	Tipul 2A: feocromocitoame; hiperplazia paratiroidelor Tipul 2B: feocromocitoame; hamartoame ale mucoasei bucale și linguale	RET	10q11.2	receptor transmembranar tirozin kinazic pentru GDNF, artemina, neurturina și persefina
<b>Cancere transmise AD produse de mutații germinale ce inactivează gene supresoare de tumori</b>					
Retinoblastom familial	Retinoblastoame	osteosarcoame	RB1	13q14.3	reglator al ciclului celular și al transcripției
Sindromul WAGR	tumori Wilms	anomalii genitale, aniridie, retard mintal	WT1	11p13	represor al transcripției
von Hippel-Lindau	cancere renale cu celule clare	feocromocitoame, angioame retiniene, hemangioblastoame	VHL	3p25	reglator al translației
Carcinoamele nevoide bazocelulare	carcinoame cutanate bazocelulare	chisturi bucale, pistrui palmo-plantari, meduloblastoame, fibroame ovariene	PTCH	9q22.3	receptor transmembranar pentru semnalizarea prin moleculele <i>Hedgehog</i>
Boala Cowden	cancer de sân, tiroidian	polipi intestinali	PTEN	10q23.3	fosfataza
Sindromul Peutz-Jeghers	cancere intestinale	cancere ovariene, cancere testiculare	STK11	19p13.3	serin-treonin kinaza
Polipoza colonică juvenilă	cancere gastro-intestinale	cancere pancreatice, malformații cardiace, despicături labiale sau palatine, macrocefalie	SMAD4 BMPRI1A	18q21.1 10q22.3	mediator citoplasmatic al semnalizării pe calea TGF-β receptor serin-treonin kinazic
Melanomul familial	melanoame	cancere pancreatice, nevi displazici, mole atipice	CDKN2A CDK4	9p21 12q14	inhibitor al kinazelor CDK4/6 ce promovează tranziția G1-S a ciclului celular proteîn kinaza ce stimulează diviziunea celulară
Neurofibromatoza tip 1	Neurofibromatoame	neurofibrosarcoame, tumori cerebrale	NF1	17q11.2	reglarea proteinelor G RAS-like
Neurofibromatoza tip 2	neurinoame acustice, meningioame	glioame, ependimoame, mezoteliome	NF2	22q12.2	legătura între proteinele membranare și proteinele citoscheletului
Scleroza tuberoasă	hamartoame cancere renale, astrocitoame	rabdomioame, autism, epilepsie	TSC1 TSC2	9q34 16p13	reglarea ciclului celular și a apoptozei, menținerea citoscheletului
Polipoza adenomatoasă familială	cancere colorectale	tumori duodenale și gastrice, anomalii retiniene, tumori ale cavității bucale, osteoame și tumori desmoide, meduloblastoame și glioblastoame (in sdr. Turcot)	APC	5q21	reglarea cateninei β, component al citoscheletului celular

Sindromul	Tumora primară	Alte cancere sau modificări fenotipice asociate	Gena	Localizare	Funcția produsului genic
Cancerul gastric familial	cancer gastric		CDH1	16q22	caderina E implicată în adezivitatea celulară
Neoplaziile endocrine multiple tip 1 (MEN 1)	tumori pancreatice (insulele Langerhans)	hiperplazia paratiroidelor, adenoame pituitare	MEN1	11q13	menina interacționează cu factorul de transcripție JUND pe care îl reprimă
Sindromul Li-Fraumeni	sarcoame, cancere de sân	tumori cerebrale, leucemii	TP53 CHK2		factor de transcripție, răspuns la alterările ADN și rol în inducerea apoptozei proteîn kinaza activată ca răspuns la alterările ADN
Cancerul de sân și ovar ereditar	cancere de sân	cancere ovariene cancere pancreatice, cancere de sân la bărbați	BRCA1 BRCA2	17q21 13q12	repararea rupturilor ADN bicatenare, controlul transcripției repararea rupturilor ADN bicatenare
Cancerul colorectal nonpolipozic ereditar (HNPCC)	cancere colorectale	cancere endometriale, ovariene, hepatobiliare și vezicale, glioblastoame (sindromul Turcot)	MSH2 MLH1 PMS2 PMS1 MSH6 MSH3 MLH3	2p21 3p21 2q31.1 7p22 2p16 5q11-q12 14q24.3	repararea erorilor de împerechere ADN; menținerea stabilității repetițiilor simple în tandem ale ADN
<b>Cancere transmise AR produse de mutații ce inactivează gene supresoare de tumori</b>					
Ataxia-telangiectazia	limfoame	degenerare cerebelară, sterilitate, imunodeficiența	ATM	11q22	semnalizarea erorilor ADN
Sindromul Bloom	tumori solide	imunodeficiența, hipostatură, anomalii pigmentare, fotosensibilitate, infertilitate, instabilitate cromosomică	BLM	15q26.1	ADN-helicaza
Xeroderma pigmentosum	cancere cutanate	fotosensibilitate, hipogonadism, uneori neurodegenerare și retard mintal	XPB XPD XPA XPC XPF XPE XPG	2q21 19q13 9q22.3 3p25 16p13 11p11-p12 13q33	componente ale mașinării de reparare ale leziunilor ADN induse de radiațiile UV, prin mecanismul de excizie a nucleotidelor (NER)
Anemia Fanconi	leucemii	pancitopenie, hipoplazia radiusului, instabilitate cromosomică, uneori anomalii cardiace și renale	FANCA FANCC FANCD FANCE FANCG FANCF	16q24.3 9q22.3 3p25.3 6p22-p21 9p13 11p15	componente ale mașinării de reparare a legăturilor ADN încrucișate

În prezent testarea genetică pentru identificarea persoanelor cu risc din cadrul acestor familii este parte a managementului standard pentru unele dintre aceste sindroame (neoplaziile endocrine multiple tip 2, boala von Hippel-Lindau, retinoblastomul familial sau polipoza adenomatoasă familială (vezi subcapitolul D 1.5) . Pentru alte sindroame, cum sunt cancerele de sân și ovar ereditare (vezi subcapitolul D 1.6), cancerul colorectal nonpolipozic ereditar ori sindromul Peutz-Jeghers testarea genetică este probabil benefică. În sfârșit, în alte sindroame, ca de exemplu sindromul Li-Fraumeni ori melanomul ereditar testarea genetică fie nu este disponibilă, fie nu este de natură să modifice managementul medical.

Două trăsături importante ale cancerelor din cadrul acestor sindroame sunt specificitatea

tisulară și expresia variabilă. Toate cancerile ereditare par să prezinte un grad crescut de *specificitate tisulară*, deși nu există nici o explicație fiziologică bine fundamentată pentru aceasta (vezi și subcapitolul 17.C). De asemenea, pare să existe o variabilitate substanțială în ceea ce privește vârsta de debut și tipul specific de cancer ce predomină în cadrul unor familii. Aceste variații pot fi datorate unor mutații diferite în cadrul aceleiași gene (de exemplu în boala von Hippel-Lindau, polipoza adenomatoasă familială, MEN2), dar și intervenției unor gene modificatoare ori a unor factori de mediu. Un interes particular îl au genele modificatoare care reduc penetranța mutațiilor genelor cauzatoare, atât pentru aprecierea corectă a riscului, cât și pentru dezvoltarea posibilă a unor noi metode de prevenție și tratament.

### 1.1 NEOPLAZIILE ENDOCRINE MULTIPLE TIP 2 (MEN2)

MEN2 (OMIM 171400) este o boală genetică transmisă autosomal dominant, care prezintă două variante clinice. *Varianta A* este cea mai frecventă și este caracterizată printr-o incidență crescută a carcinoamelor medulare de tiroidă (cu originea în celulele parafoliculare C care produc calcitonina), asociate adeseori cu feocromocitoame și/sau adenoame paratiroidiene benigne. *Varianta B*, mai rară, este caracterizată printr-un status marfanoid și prin dezvoltarea tumorilor descrise în varianta A (în general cu debut mai precoce), dar și a unor tumori benigne cu origine neurală (neurinoame) la nivelul mucoasei bucale și al buzelor.

Mutațiile responsabile de producerea MEN2 interesează gena RET care codifică un receptor tirozin-kinazic pentru patru liganzi: factorul de creștere derivat din celulele gliale (GDNF), neurturina, artemina și persefina. Legarea acestor liganzi produce dimerizarea receptorului care suferă o serie de modificări conformaționale răspunzătoare de activarea proprietăților kinazice. Rezultatul este fosforilarea altor proteine intracelulare, cu declanșarea unei cascade de interacțiuni interproteice și ADN-proteine. Mutațiile aceleiași gene RET sunt responsabile de producerea bolii Hirschprung (megacolonul congenital). Spre deosebire de mutațiile cu pierderea funcției responsabile de producerea bolii Hirschprung, mutațiile RET din cadrul MEN2A și MEN2B sunt mutații punctiforme care activează receptorul și permite acestuia să fosforileze tirozinele proteinelor țintă în absența cuplării liganzilor.

Indivizii care au moștenit o mutație activatoare a RET au un risc de aproximativ 60% de a dezvolta carcinoame medulare de tiroidă simptomatice. În MEN2B peste 95% din mutații sunt localizate la nivelul exonului 16 (M918T) sau a exonului 15 (A883F). În MEN2A mutațiile sunt diferite și interesează codonii pentru reziduurile cisteinice din porțiunea extramembranară a RET. MEN2 este un exemplu de boală genetică în care *testarea genetică precoce* se impune cu necesitate. Aceasta trebuie efectuată înaintea vârstei de 6 ani. Indivizii cu mutații prezente trebuie să beneficieze, începând cu aceeași vârstă, de screening biochimic pentru identificarea feocromocitomului și a hiperparatiroidismului, precum și de tiroidectomie profilactică. În varianta MEN2B tiroidectomia trebuie efectuată chiar mai precoce.

### 1.2. RETINOBLASTOMUL FAMILIAL

Retinoblastomul este o formă rară de tumoră embrionară cu origine în celulele retiniene. Incidența sa variază între 1 la 18.000 și 1 la 30.000. Retinoblastoamele se dezvoltă ca tumori sporadice în 60% din cazuri sau ca o boală genetică în 40% din cazuri. În forma familială de boală (OMIM 180200) diagnosticul este de regulă mai timpuriu (în primele luni de viață față de 24-30 de luni pentru formele sporadice) și cel mai adesea tumorile sunt bilaterale. Pacienții care supraviețuiesc tumorii primare, ca urmare a unui diagnostic și tratament precoce, au un risc crescut pentru dezvoltarea unor neoplazii secundare, cele mai frecvente fiind osteosarcoamele, sarcoamele de părți moi sau melanoamele.



Forma familială de boală este rezultatul transmiterii unor mutații germinale ale genei supresoare de tumori RB1 localizată pe cromosomul 13q14. Această genă codifică o proteină cu rol major în controlul ciclului celular, pe calea P16-RB-E2F1 (figura 17.7).

Activitatea de reglare a ciclului celular este realizată prin intermediul proteinei E2F1, un factor de transcripție cu care interacționează proteina RB. În faza G1 a ciclului celular proteina RB este hipofosforilată și aceasta permite interacțiunea sa cu E2F1, blocând activitatea de factor de transcripție a acesteia. Sub acțiunea complexelor ciliinei D - CDK4/6 (activate pe căi de stimulare induse de factori de creștere) proteina RB este fosforilată, ceea ce determină eliberarea factorului E2F1 ce își poate exercita astfel funcția de promovare a fazei S. Activitatea de fosforilare a complexului CDK4/6 este inhibată la rândul ei de către proteina P16. Genele țintă ale proteinei E2F1 codifică proteine implicate în replicare (ADN polimeraza  $\alpha$  și PCNA - antigenul nuclear de proliferare celulară, timidil kinaza, timidilat kinaza, ribonucleotid reductaza), repararea ADN (RAD51) sau controlul fazei S a ciclului celular (ciclina E, CDK2). Pe lângă activitatea de control a ciclului celular, RB intervine și în căile de declanșare a apoptozei. Astfel, E2F1 este capabilă să inducă expresia P14 care blochează funcția MDM2, principalul inhibitor al proteinei P53. Rezultatul este acumularea P53 care poate declanșa apoptoza.

Calea P16 - RB - E2F1 este una dintre căile majore de control al ciclului celular și, ca urmare, o țintă frecventă a evenimentelor mutaționale în majoritatea cancerelor umane. Astfel, mutații ale RB au fost evidențiate în diverse cancere umane: osteosarcoamele, cancerul pulmonar microcelular, cancerul de sân etc. Mutații ale P16 sunt întâlnite frecvent în melanoamele maligne și alte forme de cancer. În sfârșit, amplificări ale ciclinei D, ca și ale CDK4 sunt întâlnite în sarcoame sau în gliome.

### 1.3. SINDROMUL LI-FRAUMENI

Sindromul Li-Fraumeni (OMIM 151613) este o boală genetică autosomal dominantă foarte rară (incidența 1 la 500.000 indivizi) caracterizată printr-un risc crescut de dezvoltare a unor cancere, în special sarcoame, cancerul mamei, cerebrale, adrenocorticale, leucemii și limfoame. Clasic, sindromul Li-Fraumeni este diagnosticat clinic atunci când: a) un pacient diagnosticat cu sarcom înainte de 45 de ani are: b) o rudă de gradul I afectată de orice formă de cancer care a debutat înainte de 45 de ani, plus c) o rudă de gradul I sau II de pe aceeași linie parentală diagnosticată cu orice formă de cancer înainte de 45 de ani sau cu sarcom la orice vârstă. Peste 75% dintre acești pacienți dezvoltă cancer înainte de 45 de ani. De asemenea, incidența cancerelor multiple sincrone sau metacrone este foarte crescută, atingând 57% la 30 de ani de la diagnosticul primei neoplazii. Alte forme de cancer care pot fi diagnosticate în cadrul acestui sindrom sunt cele de stomac, plămân, colon sau melanoamele maligne.

Mutațiile germinale ale genei supresoare de tumori TP53 (17p13) sunt responsabile de 70-85% din cazurile clasice de sindrom Li-Fraumeni. Frecvența acestor mutații atinge până la 100% în familiile în care există cel puțin un caz de carcinom adrenocortical. Mutațiile genei CHEK2 sunt responsabile de o mică parte din cazurile de sindrom Li-Fraumeni.

Genă TP53 este probabil una dintre cele mai intens studiate datorită faptului că suferă mutații în peste 50% din toate cancerul umane. Proteina codificată de această genă are un rol major în supresia tumorală. Activarea P53 poate fi realizată de diverși stimuli precum hipoxia, radiațiile ionizante, depleția nucleotidelor, alterări ale fusului mitotic, ori hiperexpresia unor oncogene. P53 este caracterizată drept un factor de transcripție, activitate esențială pentru rolul său de supresie tumorală. Câteva dintre genele-țintă răspunzătoare de blocarea ciclului celular și inducerea apoptozei sunt: gena pentru proteina P21 care inhibă activitatea kinazelor ciclului dependent ce promovează tranziția G1-S, gena pentru proteina 14-3-3( $\sigma$ ) care induce blocarea ciclului celular la nivelul fazei G2 prin sechestrarea fosfatazei promitotice CDC25C, ori gena BAX responsabilă de inducerea apoptozei. În absența stimulilor de stres, nivelul P53 este menținut la nivele reduse prin intervenția MDM2 (vezi figura 17.3) care promovează degradarea acesteia pe calea ubiquitinării. Stimulii de stres, ca de exemplu, radiațiile ionizante induc fosforilarea serinei 20 a P53 prin intervenția kinazei CHEK2, ceea ce conduce la stabilizarea P53 și creșterea activității sale transcripționale. La rândul său, MDM2 este inhibată de către proteina P14 care formează cu aceasta un complex sechestrat la nivel nucleolar. Calea de control P14-MDM2-P53 este a două cale majoră de control a ciclului celular.

Diagnosticul sindromului Li-Fraumeni este clinic, deși există teste genetice disponibile. Impactul acestor teste genetice în managementul clinic al pacienților este considerat însă redus, datorită multiplelor sedii în care se poate dezvoltă un cancer. Totuși, unele studii au evidențiat anumite corelații genotip-fenotip. Astfel, mutațiile codonului 248 par a induce un risc mai crescut pentru dezvoltarea cancerelor de sân, în timp ce mutația R175H este asociată frecvent cu dezvoltarea leucemiilor acute. În condițiile în care diagnosticul nu s-a pus prin investigații moleculare este indicată o examinare clinică minuțioasă anuală începând cu vârsta de 20-25 de ani. Atunci când în familie apar cu predilecție anumite forme de cancer, monitorizarea trebuie să se adreseze organelor frecvent afectate.

#### 1.4. CANCERUL COLORECTAL NONPOLIPOZIC EREDITAR (HNPCC)

HNPCC (OMIM 114500), cunoscut și sub denumirea de **sindromul Lynch**, este cea mai frecventă formă de predispoziție genetică cunoscută pentru cancerul de colon. Incidența în populația generală este de 1 la 1000 și de circa 3-6% dintre pacienții diagnosticați cu neoplasm de colon. HNPCC este caracterizat printr-un risc de 80% de dezvoltare a cancerului colorectal până la vârsta de 70 de ani și de 60% pentru cancerul endometrial la femei. Indivizii cu HNPCC au deasemeni un risc crescut pentru dezvoltarea altor cancere: gastric (13%), ovarian (12%), de intestin subțire, tract biliar, urinar, rinichi, SNC (4%). Cancerele de colon care se dezvoltă în cadrul HNPCC diferă de cele sporadice prin mai multe caracteristici: debutul mai precoce (vârsta medie fiind 44 ani), localizarea predominantă la nivelul hemicolonului drept (60-70% din cazuri), riscul crescut de dezvoltare a unor cancere de colon multiple sincrone sau metacrone, frecvența crescută a unor cancerelor coloide, cu infiltrat abundent limfocitar, prognosticul mai bun.

HNPCC este o afecțiune autosomal dominantă cauzată de mutații germinale ale genelor care intervin în repararea erorilor de împerechere – MMR.

Funcția esențială a acestui sistem este eliminarea erorilor de împerechere bază-bază și a buclor de inserție-deleție care apar ca urmare a fenomenului de "derapaj" a ADN-polimerazei în cursul replicării ADN. Alterarea funcției acestor gene are drept consecință esențială apariția unor substituții nucleotidice (de exemplu G - T) ori câștigul sau pierderea unor scurte unități repetitive (tip CA) din constituția microsateleților, fenomen denumit **instabilitatea microsateleților – MIN**. Există cel puțin șapte proteine MMR implicate în acest proces. Pentru recunoașterea erorilor proteina MSH2 formează un heterodimer cu MSH6 (în cazul împerecherilor greșite bază-bază) sau cu MSH3 (în situația apariției unor bucle de inserție-deleție). Un alt heterodimer alcătuit din proteinele MLH1 și PMS2 mediază interacțiunile dintre complexul de recunoaștere a erorii și alte componente ale sistemului MMR. Acestea din urmă includ: antigenul nuclear de proliferare celulară (PCNA), ADN polimerazele delta și epsilon, proteina de legare a ADN-ului monocatenar, unele helicaze. Pe lângă PMS2, MLH1 poate forma complexe și cu alte două proteine: MLH3 ori PMS1.

Majoritatea mutațiilor răspunzătoare de apariția familiilor cu HNPCC (peste 85%) interesează genele MLH1 și MSH2; mutațiile MSH6 reprezintă până la 9% din cazuri, în timp ce mutațiile altor gene reprezintă o minoritate a cazurilor.

Nu există corelații genotip-fenotip bine definite, deși mutațiile MSH2 par a fi asociate mai frecvent cu manifestările extracolice decât mutațiile MLH1. De asemenea, mutațiile MSH6 asociază mai frecvent un debut tardiv, o incidență crescută a cancerelor endometriale și un grad mai redus de instabilitate a microsateleților.

Instabilitatea microsateleților este întâlnită nu numai în HNPCC ci și în aproximativ 15% din cancerele de colon sporadice. La fel, o parte dintre cancerele de endometru ori stomac prezintă un grad accentuat de MIN. MIN este de fapt o marcă pentru instabilitatea la nivelul întregului genom și se asociază cu o creștere a ratei mutațiilor de 100-1000 ori. MIN se asociază în special cu mutații ale unor gene importante pentru dezvoltarea cancerelor colorectale precum: TGFBR2, IGFI2R, BAX sau TCF4.

Există câteva seturi de criterii pentru diagnosticul clinic al HNPCC, printre cele mai utilizate fiind criteriile Amsterdam II (1999): a) trei rude cu cancere asociate HNPCC (colorectale, endometriale, de intestin subțire,

ureter sau pelvis renal); b) una din persoane trebuie să fie ruda de gradul I cu celelalte două; c) afectarea trebuie să includă cel puțin două generații; d) cel puțin unul din pacienți trebuie să fie diagnosticat înainte de 50 de ani; e) polipoza adenomatoasă familială trebuie exclusă.

Deoarece 95% dintre cancerele de colon dezvoltate în cadrul HNPCC prezintă instabilitatea microsateleților, testarea acestui fenotip trebuie efectuată înaintea testelor genetice pentru identificarea unor mutații ale genelor MMR la toți pacienții care întrunesc criteriile clinice de diagnostic.

Testarea pentru MIN trebuie efectuată însă și la alte categorii de pacienți, cum sunt cei diagnosticați înainte de 50 de ani, cei cu o rudă de gradul I diagnosticată cu cancer de colon sau endometrial sau cei care au fost diagnosticați anterior cu una dintre aceste neoplazii. Conform criteriilor internaționale MIN este definită ca fiind instabilitatea a cel puțin 2 din 5 loci testați sau cel puțin 30-40% din totalul locilor studiați. Instabilitatea la nivelul unui număr mai mic de loci este definită ca MIN grad redus. Pacienții cu criterii clinice pentru HNPCC și MIN trebuie să beneficieze de analize pentru identificarea unor mutații MMR.

Se recomandă ca persoanele din aceste familii să beneficieze de screening pentru diverse variante de cancer. Astfel, colonoscopia trebuie începută la 20-25 de ani și efectuată la fiecare 1-3 ani. Screening-ul pentru cancerul endometrial constă în analiza citologică a aspiratelor endometriale sau ultrasonografia transvaginală și trebuie început la 25-35 de ani, cu repetare la fiecare 1-2 ani. Screening-ul pentru cancerele gastrice sau de tract urinar trebuie recomandat numai în familiile care au avut asemenea cazuri și constă în gastroscopie, ecografie și analize urinare efectuate la fiecare 1-2 ani începând cu vârsta de 30-35 de ani. Opțiunea colectomiei profilactice trebuie avută în vedere atunci când sunt identificate adenoame colonice sau la diagnosticul primului cancer de colon. De asemeni, histero-salpingo-ooforectomia bilaterală poate fi efectuată profilactic, mai ales că riscul de dezvoltare a cancerelor endometriale depășește la aceste femei chiar pe cel al dezvoltării cancerelor de colon.

### 1.5. POLIPOZA ADENOMATOASĂ FAMILIALĂ (FAP)

FAP (OMIM 175100) este o boală rară, răspunzătoare de mai puțin de 1% din cazurile de cancer de colon, caracterizată prin dezvoltarea a sute sau mii de polipi adenomatoși de-a lungul colonului și rectului. În absența colectomiei profilactice, aproape 100% din pacienții cu FAP dezvoltă cancer de colon, majoritatea până la vârsta de 40 de ani.

Polipii adenomatoși pot apare de asemenea la nivelul tractului gastro-intestinal superior, putând determina o creștere a riscului pentru cancerul duodenal, în special la nivelul ampulei lui Vater (5-8%). Indivizii cu FAP au de asemeni un risc crescut pentru dezvoltarea hepatoblastoamelor în copilărie, a meduloblastoamelor (în varianta Turcot) și a carcinoamelor papilare tiroidiene (în special la femei).

Alte manifestări fenotipice includ: dezvoltarea osteoamelor mandibulare (peste 90% din cazuri), a hipertrofiei congenitale a epiteliului pigmentar retinian – CHRPE – (58-88%), prezența dinților supranumerari sau neerupți (33%). Tumorile desmoide apar la 5-10% din pacienții cu FAP, sunt mai frecvente la femei și reprezintă o cauză majoră de morbiditate și mortalitate. Există un grad crescut de variabilitate în cadrul acestui sindrom, astfel că pacienții pot avea orice combinație a acestor trăsături clinice și cu diferite grade de severitate. Sindromul Gardner este o variantă a FAP caracterizată prin prezența osteoamelor și a chisturilor desmoide.

FAP este o boală transmisă autosomal dominant, determinată de mutațiile **genei APC** (cromosomul 5q21). Aproape o treime dintre pacienții cu FAP au mutații APC de novo. 95% dintre mutațiile germinale sunt de tip nonsens sau cu alterarea cadrului de lectură și conduc la sinteza unei proteine trunchiate și cu funcții anormale. Cele mai frecvente mutații germinale interesează codonii 1061 și 1309 (o treime din total). Manifestările FAP sunt corelate specific cu localizarea mutației la nivelul genei APC.

Astfel, polipoza severă (cu peste 5000 polipi colorectali) apare frecvent la pacienții cu mutații situate între codonii 1250 și 1464. În contrast, forma atenuată de polipoză este atribuită unor mutații situate la nivelul extremităților 5' sau 3' ale genei, ori în regiunea de matisare alternativă de la nivelul exonului 9. CHRPE este prezența numai la pacienții cu mutații între codonii 457 și 1444, iar tumorile desmoide în cazul mutațiilor

localizate între codonii 1403 și 1578.

Gena APC codifică o proteină cu numeroase domenii funcționale care îndeplinește roluri importante în semnalizarea pe calea WNT, în adeziunea intercelulară, în stabilitatea citoscheletului microtubular, în reglarea ciclului celular și, posibil, în apoptoza.

APC împreună cu axina realizează un complex care promovează fosforilarea  $\beta$ -cateninei de către glicogen sintetază-kinaza 3 $\beta$  (GSK3B). Rezultatul este inducerea degradării  $\beta$ -cateninei. Mutațiile APC au efect similar cu stimularea pe calea WNT și determină acumularea  $\beta$ -cateninei în citoplasmă și pătrunderea acesteia în nucleu unde se asociază cu factori de transcripție din familiile TCF și LEF, cărora le stimulează activitatea. Printre acești factori se numără TCF4, puternic exprimat în nucleii celulelor epiteliale intestinale. Complexul  $\beta$ -catenină-TCF4 activează transcripția mai multor gene printre care MYC și ciclina D1 care intervin în controlul ciclului celular, conexina 43 care participă la formarea joncțiunilor intercelulare tip gap și matrilizina – o metaloproteinază.

O dată ce este afirmat diagnosticul de FAP, rudele de gradul I ale persoanelor afectate au un risc de 50% de a fi moștenit mutația. Testarea genetică este considerată un standard pentru această boală. Este recomandat ca testarea genetică să se facă la descendenții persoanelor afectate la vârsta de 10-11 ani, aceasta fiind și vârsta când se recomandă începerea screening-ului clinic. Pentru familiile în care mutația nu este detectabilă, examenul endoscopic și/sau oftalmologic pentru identificarea CHRPE pot ajuta la diagnosticarea rudelor cu risc teoretic. Indivizii cu FAP beneficiază de sigmoidoscopie flexibilă începând cu vârsta de 10-11 ani. Colectomia profilactică poate fi efectuată în general între 17 și 20 de ani. În prezent sunt în curs de evaluare trialuri clinice de chemoprevenție cu antiinflamatorii nesteroidiene. În familiile fără mutații APC identificate, rudele cu risc teoretic ar trebui să efectueze sigmoidoscopie anual între 11-24 ani, la fiecare 2 ani între 24-35 ani, la fiecare 3 ani între 35-44 ani și la fiecare 3-5 ani după 45 de ani. Dacă între timp se dezvoltă polipi, screening-ul trebuie efectuat ulterior după regulile existente în cazul persoanelor afectate.

## 1.6. CANCERUL DE SÂN ȘI OVAR EREDITAR

Există două asemenea sindroame (OMIM 113705 și OMIM 600185) care sunt responsabile împreună de apariția a circa 2-3% din cancerele de sân și ovar și circa 40% din cazurile cu istoric familial pozitiv. Aceste sindroame au transmitere autosomal dominantă și sunt determinate de mutațiile germinale ale genelor BRCA1 (cromosomul 17q21) și BRCA2 (cromosomul 13q12.3). Mutațiile genei BRCA1 au o frecvență de circa 1/500 - 1/1000 în populația generală (una dintre cele mai frecvente boli genetice), în timp ce mutațiile genei BRCA2 au o frecvență încă imprecis apreciată. Riscul dezvoltării unui cancer de sân la femeile purtătoare ale unor asemenea mutații este de 85-90% pe parcursul întregii vieți și de 50% până la vârsta de 50 de ani. Riscul dezvoltării unui cancer ovarian este diferit pentru cele două gene: 60% pentru BRCA1 și 20% pentru gena BRCA2. La ambele sexe este crescut ușor riscul dezvoltării cancerelor colorectale. Bărbații purtători ai unei mutații BRCA1 sau BRCA2 au un risc de circa 8% de dezvoltare a unui cancer de prostată. În plus, mutațiile BRCA2 generează la bărbați un risc de 6% de dezvoltare a unui cancer mamar (ceea ce reprezintă o creștere de peste 100 ori a riscului față de populația generală). În sfârșit, mutațiile germinale ale genei BRCA2 cresc riscul dezvoltării cancerelor de pancreas, cap și gât, vezica urinară, tract biliar, stomac și a melanoamelor.

Genele BRCA1 și BRCA2 au funcții de gene supresoare de tumori. Proteinele codificate de aceste gene intervin în două procese majore: repararea rupturilor ADN bicatenare (interacționând cu alte proteine, cum sunt RAD51 și BARD1) și în reglarea transcripției (prin coordonarea activității unor componente ale aparatului transcripțional, de exemplu ARN helicaza A și CTIP).

Persoanele din familiile cu cazuri multiple de cancer de sân și/sau de ovar trebuie să

beneficieze de consult și teste genetice și, în cazul confirmării prezenței unor mutații germinale BRCA1 ori BRCA2, trebuie incluse în programe de supraveghere sau de utilizare a unor măsuri profilactice.

National Comprehensive Cancer Network (NCCN - 1999) recomandă ca femeile din aceste familii să înceapă autoexaminarea sânilor la vârsta de 25 de ani, ori cu cel puțin 5 ani mai devreme decât cel mai precoce cancer de sân diagnosticat în familie. Examinarea clinică a sânilor, anual ori semianual, trebuie începută la aceeași vârstă. Pentru screening-ul cancerului ovarian se recomandă ultrasonografia transvaginală semianuală ori anuală, împreună cu dozarea markerului CA-125, începând cu vârsta de 25-35 de ani. Sunt încă discutabile o serie de măsuri profilactice chirurgicale cum ar fi mastectomia sau histero-ooforectomia. Modelele teoretice și studiile epidemiologice sugerează că aceste metode de chirurgie profilactică descresc riscul dezvoltării celor două neoplazii, dar nu îl abolesc. Utilizarea chimioprofilaxiei cu Tamoxifen este încă în curs de evaluare. Pentru bărbații purtători ai unei mutații BRCA2 trebuie recomandate autoexaminarea sânilor, precum și examinarea clinică și mamografia efectuate anual. De asemenea, trebuie efectuat screening-ul pentru cancerul de prostată, deși nu este încă foarte clar dacă metodele de screening trebuie utilizate pentru aceste cazuri mai precoce sau nu decât pentru populația generală.

## 2. CANCERELE FAMILIALE

Această formă de predispoziție genetică este asociată cu un risc redus – moderat de dezvoltare a unor cancere și este întâlnită în special în formele comune de neoplazii precum cancerele ginecologice sau digestive. Spre deosebire de formele ereditare în care se asociază frecvent alte modificări fenotipice nonneoplazice, în cancerele familiale singura trăsătură care poate fi recunoscută este agregarea familială. Aceasta face și mai importantă o anamneză familială corectă. Cauzele cancerelor familiale pot fi variante alelice particulare ale aceluiași gene implicate și în producerea cancerelor ereditare, ori alte gene cu activitate de *caretakers*. Studiul acestei forme de predispoziție genetică este important atât pentru implicațiile privind sănătatea publică, cât și pentru posibilitatea identificării unor noi procese relevante pentru dezvoltarea cancerelor. Cercetarea acestor gene este încă într-un stadiu incipient, iar datele existente sunt încă relativ reduse. Câteva exemple identificate până în prezent sunt enumerate în **tabelul 17.5**. Identificarea acestor gene va fi mult accelerată de datele aduse de Proiectul Genom Uman. Principala modalitate constă în catalogarea diverselor variante ale genelor întâlnite în populație, asociată cu identificarea corelațiilor existente între asemenea variante specifice și riscul pentru anumite forme de cancer, răspunsul la tratament sau supraviețuirea. Variantele cel mai intens studiate în prezent sunt polimorfismele mononucleotidice - SNPs (single nucleotide polymorphisms), apreciate a fi de ordinul câtorva milioane în întregul genom uman.

**Tabelul 17.5. Gene raportate a acționa ca loci cu susceptibilitate redusă-moderată în diverse cancere familiale**

Gena	Localizarea cromosomica	Cancerurile asociate
Varianta I1307K a genei APC	5q21	cancere colorectale
Varianta E1317Q a genei APC	5q21	cancere colorectale
Varianta VNTR scurtă a genei H-RAS	11p15	cancere de sân, plămân, leucemii
Variante cu repetiții CAG anormale ale receptorului androgenic	Xq11-q12	cancere de sân, cancere de prostată
Mutația cu trunchierea proteinei 1100delC a genei CHEK2	22q12.1	cancere de sân

## 3. CANCERE CU PREDISPOZIȚIE GENETICĂ FĂRĂ ISTORIC FAMILIAL

Deși considerate în cea mai mare parte rezultatul intervenției factorilor de mediu, majoritatea cancerelor sunt incluse în prezent în categoria bolilor multifactoriale, componenta genetică și cea de mediu având ponderi variabile de la caz la caz.

S-a observat că riscul dezvoltării cancerelor "sporadice" variază semnificativ chiar în condițiile expunerii la aceiași factori de mediu. Aceasta se datorează în cea mai mare parte moștenirii unor variante ale unor gene implicate în *metabolismul substanțelor carcinogene* sau în *repararea leziunilor ADN*. Asemenea variante ale acestor gene pot intensifica sau, dimpotrivă, preveni efectele carcinogene ale diverșilor factori de mediu.

De exemplu, clasa genelor care codifică citocromii P450 (genele CYP) - de ordinul a câtorva sute în genomul uman - este răspunzătoare de detoxifierea substanțelor chimice străine. Unele dintre aceste gene CYP sunt polimorfice în populație și determină variații în metabolizarea unor substanțe chimice. Un asemenea polimorfism bine studiat este cel al genei *CYP1A1* care codifică enzima aril hidrocarbon hidroxilaza (AAH), asociat cu susceptibilitatea la cancerul pulmonar. AAH este răspunzătoare de metabolizarea hidrocarburilor policiclice, precum cele întâlnite în fumul de țigară, pe care le convertește într-o formă epoxid mai ușor excretabilă din organism dar, în același timp, cu activitate carcinogenică crescută. Indivizii care prezintă o mutație la nivelul exonului 7 ce convertește un reziduu izoleucinic în valina (aproximativ 10% în populația generală) au un risc de 8-10 ori mai mare de a dezvolta cancer pulmonar atunci când sunt expuși la fumul de țigară decât indivizii din populația generală.

Un alt polimorfism interesează un alt *citocrom P450 (CYP2D6)* răspunzător de metabolizarea debrisoquinei (agent  $\beta$ -adrenergic blocant). Unii indivizi din populație (1-30%, în funcție de originea etnică) au o capacitate accentuată de metabolizare a acestui drog adeseori datorită existenței unor duplicații ale genei. Asemenea persoane par a fi mai predispuse la efectele carcinogenice ale fumatului sau ale altor carcinogeni ocupaționali (azbestul, hidrocarburile policiclice aromatice). Riscul de dezvoltare a unui cancer pulmonar la fumatorii din acest subgrup este de 4 ori mai înalt decât în populația generală și de 18 ori mai mare dacă se asociază expunerea frecventă la alți carcinogeni. O asociere asemănătoare a fost evidențiată și pentru cancerul vezical.

Alte variante polimorfice asociate cu creșterea riscului de dezvoltare a unor cancere ca urmare a expunerii la agenți carcinogeni externi sunt enumerate în tabelul 17.6.

**Tabelul 17.6. Polimorfisme ale enzimelor implicate în metabolizarea carcinogenilor**

Genă	Localizarea cromosomică	Polimorfismul	Frecvența în populație	Cancerile implicate	Carcinogenii metabolizați
CYP1A1	15q22-q24	exon 7: Ile-Val	~10%	plămân, sân, colon, uter	hidrocarburi policiclice aromatice
CYP1A2	15q22-qter	expresie crescută în absența mutațiilor	30-40%	vezica, colon	nitrozamine, arilamine
CYP2D6	22q13.1	duplicații genice	1-30%	plămân, vezica, ficat	nitrozamine
GSTM1	1p13.3	alele nule	40-45%	colon, uter, ORL	compuși electrofilici
NAT2	8p23.1-p21.3	Arg197Glu, Ile114Thr, Lys268Arg	~72%	vezica, colon, ficat	amine aromatice, hidrazine

Factorii genetici modulează, de asemenea, răspunsul organismului la acțiunea radiațiilor ionizante și UV. Așa cum am prezentat deja în subcapitolul 17.A.2 mutațiile germinale ale genelor implicate în repararea leziunilor ADN determină producerea unor boli care se caracterizează printr-o creștere a riscului de dezvoltare a unor neoplazii induse de radiațiile din mediul înconjurător. Se consideră însă că o serie de polimorfisme ale aceluiași gene ar putea fi

răspunzătoare de o variabilitate mult mai largă a răspunsului la acțiunea acestor agenți din mediu. Astfel, circa 1% din indivizii populației generale sunt heterozigoți pentru mutații ale genei ATM. Unele dintre aceste mutații par a crește riscul dezvoltării unor cancere de către radiațiile ionizante.

În sfârșit, așa cum am arătat în cadrul capitolului 8 (ecogenetica), unii factori genetici pot influența susceptibilitatea organismului la dezvoltarea unor infecții. Asemenea factori de predispozanți operează și în cadrul infecțiilor cu virusuri oncogenice, precum și etapele ulterioare infecției, responsabile de declanșarea dezvoltării tumorale. Au fost identificați asemenea factori de predispozanți. De exemplu, un polimorfism la nivelul promotorului IL10 pare să modifice susceptibilitatea organismului uman la infecția cu virusul Epstein-Barr, în timp ce mutația homozigotă P72R la nivelul proteinei P53 pare a crește semnificativ (până la 7 ori) riscul dezvoltării cancerelor cervicale la femeile cu infecții HPV.

## E. NOI PERSPECTIVE ÎN DIAGNOSTICUL ȘI TRATAMENTUL CANCERELOR

Descifrarea substratului molecular al unor cancere a permis dezvoltarea unor metode noi de depistare a neoplaziilor maligne, de evaluare a prognosticului și răspunsului la tratament, precum și elaborarea primelor metode de terapie specifice, cu rezultate clinice îmbucurătoare.

Printre metodele de depistare precoce se numără dozarea unor *markeri moleculari* cu specificitate de organ. Așa sunt PSA (antigenul prostatic specific) în cancerul de prostată sau o serie de antigene carbohidrat (CA) precum: CA125 (cancerle ovariene, cervicale și endometriale), CA27.29 și CA15-3 (cancerul mamar), CA19-9 (cancerle de colon și ducte biliare), CA195 (cancerle pancreatice) etc. Identificarea *translocațiilor cromozomice* care sunt răspunzătoare de producerea hemopatiilor maligne a permis dezvoltarea unor metode de diagnostic și urmărire a răspunsului la tratament bazate pe dozarea specifică a ARNm himeric. În sfârșit, dozarea nivelului de exprimare a *receptorilor estrogenici și progesteronici* în cancerle mamare permite predicția răspunsului la tratamentul hormonal, în timp ce identificarea amplificării ERBB2 (în cancerle mamare) sau MYCN (în neuroblastoame) este asociată cu un prognostic rezervat.

Un exemplu de tratament specific este utilizarea **acidului retinoic** la pacienții cu leucemie acută promielocitară al cărei substrat molecular este apariția unei fuziuni între gena pentru receptorul alfa al acidului retinoic și oncogena PML.

Tratamentul cu **anticorpi monoclonali** a devenit o realitate în cazul bolilor limfoproliferative și a unui mic număr de alte neoplazii. De exemplu, utilizarea unor anticorpi monoclonali față de antigenul CD20 exprimat de limfoamele non-Hodgkin derivate din celulele B permite obținerea unui răspuns clinic lipsit de efecte toxice secundare. La fel, Imatinib mesylate-ul inhibă specific activitatea produsului de fuziune BCR-ABL din leucemia mieloidă cronică (vezi caseta 17.2). Un alt exemplu elocvent este cel al anticorpului monoclonal față de produsul oncogenei ERBB2 (HER2/neu) amplificată în numeroase cancere de sân. Utilizarea acestui anticorp monoclonal (Transtuzumab - Herceptin) permite obținerea unui răspuns clinic în forme avansate de cancer. De asemenea, au fost dezvoltate o serie de **inhibitori direcți ai angiogenezei**. Printre aceștia, cel mai cunoscut este anticorpul monoclonal împotriva factorului de creștere vasculară derivat din celulele endoteliale – VEGF (Bevacizumab – Avastin).

În sfârșit, o altă direcție majoră este **terapia genică** (vezi capitolul 19). Mijloacele utilizate sunt extrem de variate dar cercetările în acest domeniu sunt încă într-o etapă incipientă, iar rezultatele clinice inconsistente.

## INTERNET

1. American Association for Cancer Research - [www.aacr.org](http://www.aacr.org);
2. Atlas de genetica si citogenetica in oncologie si hematologie - [www.infobiogen.fr/services/chromcancer](http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer);
3. Cancer Genome Anatomy Project - [www.ncbi.nlm.nih.gov/ncicgap](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncicgap);
4. European Organisation for Research and Treatment of Cancer - [www.eortc.be](http://www.eortc.be);
5. Genecards – bază de date genele umane și bolile genetice : <http://www.bighost.area.ba.cnr.it/GeneCards>
6. Informatii despre genetica bolii canceroase - [www.cancer-genetics.org](http://www.cancer-genetics.org);
7. Institute of Cancer Research – [www.icr.ac.uk](http://www.icr.ac.uk);
8. International Union Against Cancer - [www.uicc.org](http://www.uicc.org);
9. National Cancer Institute - [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov).
10. OMIM – catalogul bolilor mendeliene la om: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

### Bibliografie specifică selectivă

1. Baylin S.B., Esteller M. et al.- *Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer* - Hum. Mol. Genet., 2001;10: 687-692;
2. Bianchi N.O., Bianchi M.S., Richard S.M. - *Mitochondrial genome instability in human cancers* - Mutation Research, 2001; 488: 9-23;
3. Carmeliet P., Jain R.K. - *Angiogenesis in cancer and other diseases* - Nature, 2000;407:249-257;
4. Cui H., Cruz-Correa M., Giardiello F.M., Hutcheon D.F., Kafonek D.R., Brandenburg S., Wu Y., He X., Powe N.R., Feinberg A.P. - *Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk* - Science, 2003;299: 1753-1755;
5. Duesberg P., Rasnick D.- *Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own* - Cell Motility and the Cytoskeleton, 2000; 47: 81-107;
6. Eng C., Hampel H., de la Chapelle A.- *Genetic testing for cancer predisposition* - Ann. Rev. Med., 2000; 52: 371-400;
7. Evan G.I., Vousden K.H.- *Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer* - Nature, 2001; 411: 342-348;
8. Fodde R., Kuipers J. et al.- *Mutations in the APC tumor suppressor gene cause chromosomal instability* - Nature Cell Biology, 2001; 3: 433-438;
9. Hanahan D., Winberg R.A.- *The hallmarks of cancer* - Cell, 2000; 100: 57-70;
10. Houlston R.S., Tomlinson I.P.M.- *Detecting low penetrance genes in cancer: the way ahead* - J. Med. Genet., 2000; 37: 161-167;
11. Joyce J.A., Schofield P.N.- *Genomic imprinting and cancer* - Molecular Pathology, 1998; 185-190;
12. Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B.- *Genetic instabilities in human cancers* - Nature, 1998; 396: 643-649;
13. Lynch H.T., de la Chapelle A.- *Hereditary colorectal cancer* - N. Engl. J. Med., 2003; 348: 919-932;
14. Marsh D.J., Zori R.T.- *Genetic insights into familial cancers – update and recent discoveries* - Cancer Lett., 2002; 181: 125-164;
15. Nevins J.R.- *The Rb/E2F pathway and cancer* - Hum. Mol. Genet., 2001;10: 699-703;
16. Patel A.S., Hawkins A.L., Griffin C.A.- *Cytogenetics and cancer* - Curr. Opin. Oncol., 2000; 12: 62-67;
17. Peltomaki P.- *Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer* -



- Hum. Mol. Genet., 2001;10: 735-740;
18. Ponder B.A.J.- *Cancer genetics* - Nature, 2001;411: 336-341;
  19. Wang J., Hannon G.J., Beach D.H.- *Cell biology: risky immortalization by telomerase* - Nature, 2000; 405: 755-756;
  20. Weber G.F., Ashkar S.- *Stress response genes: the genes that make cancer metastasize* - J. Mol. Med., 2000, 78: 663-672;
  21. Weinberg R.A.- *Telomeres: Bumps on the road to immortality* - Nature, 1998;396: 23-24;
  22. Welsh P-L, King M.C.- *BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer* - Hum. Mol. Genet., 2001;10: 705-713;
  23. Werck-Reichhart D., Feyereisen R.- *Cytochromes P450: a success story* - Genome Biology, 2000, 1: 3003.1-3003.9;
  24. Wooster R., Weber B.L. - *Breast and ovarian cancer* - N. Engl.J.Med.,2003;348:2339-2343;

## CAPITOLUL 18

# PROFILAXIA BOLILOR GENETICE

Profilaxia bolilor genetice include un ansamblu de măsuri ce urmăresc cunoașterea și evitarea cauzelor bolilor genetice, depistarea persoanelor și familiilor cu risc genetic crescut și diagnosticul precoce al persoanelor afectate.

## A. PRINCIPALELE DIRECȚII DE PROFILAXIE A BOLILOR GENETICE

**Profilaxia primară** a bolilor genetice urmărește evitarea apariției acestor afecțiuni și se realizează prin două mari direcții de acțiune:

(1) *Prevenirea apariției (producerii) și/sau transmiterii (propagării) mutațiilor.*

- *Cunoașterea și evitarea agenților mutageni din mediu* (vezi capitolul 6.B.3) ar putea preveni producerea unor mutații. Identificarea agenților mutageni este posibilă prin intermediul unor teste de mutagenză și aceasta permite evitarea lor prin măsuri adecvate de securitate și educație; din păcate un procent important de mutații se produc spontan ca urmare a erori de replicare, a dezaminării și a agresiunilor endogene – ce nu pot fi evitate.
- *Reducerea vârstei reproductive* sub 35-38 de ani la femei și 45 de ani la bărbați ar putea scădea riscul producerii unor gameți cu anomalii cromosomice (la femei) sau al unor mutații genice (la bărbați).
- *Transmiterea mutațiilor* la descendenți ar putea fi influențată prin: diagnosticul presimptomatic al purtătorilor de mutații dominante (înaintea reproducerii lor), depistarea heterozigoților (purtători de mutații recesive), evitarea căsătoriilor consanguine (care cresc probabilitatea întâlnirii a doi heterozigoți) și acordarea sfatului genetic.

(2) *Prevenirea apariției bolii la persoanele cu predispoziție genetică* (vezi capitolul 13.A) poate fi realizată prin:

- cunoașterea factorilor care determină predispoziția genetică la boală,
- identificarea rudelor sănătoase ale bolnavilor care moștenesc genele de predispoziție,
- evitarea factorilor de mediu care determină transformarea predispoziției genetice în boală.

**Profilaxia secundară** presupune depistarea precoce a bolii și/sau evitarea complicațiilor sale. Acest lucru este posibil prin următoarele acțiuni:

(1) *Prevenirea nașterii unui copil cu genotip anormal* – în cuplurile cu risc genetic crescut

- *Contracepția și/sau fecundarea in vitro.* Atunci când unul din membrii cuplului este afectat se poate evita nașterea unui copil bolnav folosind contracepția voluntară, temporară (mecanică, hormonală) sau definitivă (ligatura de trompe/canale deferente); o soluție alternativă este fecundarea in vitro folosind în locul gameților persoanei afectate gameți de la un donator normal.
- *Screeningul și diagnosticul prenatal.* Screeningul prenatal se realizează de obicei la 16 săptămâni de gestație și mai rar în trimestrul I, la 11 săptămâni – dozând concentrația unor markeri biochimici în serul matern, care se modifică semnificativ în sarcinile cu feteți prezentând defecte de tub neural deschise, sindrom Down sau alte anomalii congenitale. Diagnosticul prenatal se efectuează prin ecografie fetală, analiza (cromosomică sau moleculară) a celulelor fetale (obținute de obicei printr-o manevră intervențională: biopsie de vilozități coriale, amniocenteză, cordocenteză) sau prin determinări biochimice

în lichidul amniotic; se pot obține astfel informații diagnostice importante, în funcție de care se va decide sau nu întreruperea sarcinii.

(2) *Prevenirea manifestărilor bolilor genetice sau ale complicațiilor lor la un copil născut cu o boală genetică.* Acest obiectiv se realizează prin screening populațional sau familial care permite depistarea precoce, la naștere sau ulterior în cursul vieții, a persoanelor cu genotip anormal fără semne clinice de boală sau cu manifestări incipiente.

- *Screeningul neonatal* se adresează unor boli monogenice relativ frecvente în anumite populații, care *nu pot fi diagnosticate clinic la naștere*, au consecințe severe și sunt costisitor de tratat, dacă se intervine tardiv, după apariția manifestărilor clinice; ele trebuie să beneficieze de un tratament care, aplicat presimptomatic ar putea să reducă severitatea bolii. În numeroase țări, screeningul nou-născuților vizează fenilcetonuria și hipotiroidia congenitală.
- *Screeningul heterozigoților pentru anumite boli* (de exemplu, talasemie, boala Tay Sachs, fibroza chistică) în anumite grupuri etnice, precum și screeningul familial al unor persoane cu genotip anormal, permite adoptarea de măsuri profilactice adecvate.

Aplicarea măsurilor de profilaxie, în cadrul unor **Programe naționale** sau regionale, poate contribui la reducerea poverii bolilor genetice. Ele s-au dovedit a fi eficiente și în relația cost-beneficiu, fiind promovate în toate țările (inclusiv cele în curs de dezvoltare) care au o politică sanitară coerentă și țin cont de recomandările OMS, pentru care bolile genetice sunt o problemă majoră de sănătate publică. Astfel, s-a conturat și dezvoltat rapid domeniul **geneticii comunitare** – o ramură a geneticii medicale care se ocupă de screeningul și prevenirea bolilor genetice în populație.

## B. SCREENINGUL POPULAȚIONAL AL BOLILOR GENETICE

Dezvoltarea cunoștințelor despre bolile genetice, testele de diagnostic și posibilitățile lor de tratament au dus la introducerea, în anii '70, a screeningului populațional pentru identificarea într-o populație definită a unor persoane cu o anumită boală genetică tratabilă, înaintea apariției manifestărilor clinice, în stadiul presimptomatic.

**Screeningul populațional** a fost definit ca „identificarea prezumtivă a unei boli sau defect nerecunoscut clinic, prin aplicarea unor proceduri ce pot fi realizate rapid, în scopul sortării persoanelor aparent sănătoase care *probabil au* boala de cele care *probabil nu au* boala” (Mausner și Bahn, 1974). Testele screening *nu sunt menite să asigure diagnosticul definitiv* ci mai curând să identifice un grup populațional la care vor trebui făcute alte teste diagnostice. **Screeningul genetic** a fost definit (Academia Națională de Științe a SUA, 1975) ca fiind „căutarea într-o populație a unor persoane cu anumite genotipuri care:

- (1) sunt deja asociate cu o anumită boală (de exemplu, screeningul neonatal pentru fenilcetonurie),
- (2) pot produce boală la descendenții lor (de exemplu, detectarea purtătorilor sănătoși – a heterozigoților pentru gena de talasemie sau a fibrozei chistice)”.

În afara celor două categorii, screeningul genetic poate fi aplicat la membrii unei familii în care există o boală genetică sau cu predispoziție genetică (tabelul 18.1).

*Scopul screeningului* este recunoașterea precoce a unei boli sau a unui genotip anormal astfel ca, printr-o intervenție precoce adecvată, procesele patogenice să poată fi prevenite sau persoanele implicate pot lua o decizie reproductivă informată.

**Tabelul 18.1** Tipuri de screening genetic

I. Screening	a) Screening prenatal	- Vârsta maternă >35 de ani - Alfa fetoproteină anormală în serul matern - Triplu test anormal - Ecografia fetală
--------------	-----------------------	--

populațional	b) Screening neonatal - sânge  - urină	- Fenilcetonurie - Hipotiroidie congenitală; ș.a - Aminoacidopatii
	c) Screeningul heterozigoților în anumite grupuri etnice	- Talasemie, sicklemie - Fibroză chistică - Boala Tay-Sachs
II. Screening familial*	- presimptomatic  - purtătorii sănătoși de anomalii cromosomice echilibrate - heterozigoții în boli recesive: autosomale legate de X - premutații	- Boala Huntington, cancer sân, cancer colon, ș.a - Translocatii  - Fibroză chistică - Distrofie musculară Duchenne - Sindromul X fragil, ș.a.

\* Pe bază de Registre genetice

Inițial screeningul genetic era numai *neonatal* și viza fenilcetonuria – o afecțiune în care, după depistarea sa la noi născuți, o dietă cu conținut redus de fenilalanină putea preveni retardul mental produs de boală; ulterior, screeningul neonatal s-a extins la hipotiroidia congenitală și apoi la alte erori înnăscute de metabolism.

Aproape concomitent s-a introdus *screeningul prenatal* pentru defectele de tub neural (DTN) deschise – prin dozarea alfa fetoproteinei (AFP) în lichidul amniotic și apoi în serul matern; acțiunea a fost foarte eficientă deoarece, în trei decenii, prevalența DTN a scăzut semnificativ (de circa 30 de ori în Marea Britanie). Determinarea AFP și a altor markeri serici materni a permis de asemenea identificarea sarcinilor cu sindrom Down sau cu alte aneuploidii autosomale. Screeningul seric matern și ecografia fetală permit depistarea a circa ¾ din feteșii cu sindrom Down și peste 80% din sarcinile cu DTN. În multe țări, screeningul prenatal a devenit o parte importantă a îngrijirii prenatale de rutină,

Screeningul populațional s-a dezvoltat ulterior prin introducerea depistării, în populația adultă, a *purtătorilor sănătoși* ai unei mutații pentru una dintre bolile genetice frecvente în populația respectivă (talasemie, sicklemie, fibroză chistică, cancer ereditare etc); acest lucru este util pentru sfatul genetic acordat cuplurilor de heterozigoți, al căror risc de a avea un descendent afectat este de 25%. În acest context, o altă acțiune profilactică eficientă o reprezintă **registrele genetice**, realizate în Centrele de Genetică Medicală, ce conțin informații despre bolnavii cu anumite afecțiuni precum și despre rudele lor sănătoase, cu risc genetic crescut; ele reprezintă o premiză valoroasă pentru inițierea unor acțiuni de diagnostic precoce, prenatal sau presimptomatic postnatal.

În era medicinei genomice se va dezvolta medicina predictivă pe baza screeningului populațional care va determina *susceptibilitatea individuală* la bolile comune ale adultului, cum ar fi boala coronariană, diabetul zaharat sau cancerul; va deveni, astfel, posibilă identificarea unor persoane sau grupe de risc la care se vor iniția acțiuni de prevenție primară (de exemplu, dieta, exercițiile ș.a) sau secundară (detectarea precoce sau intervențiile farmacologice) pentru a preveni boala sau îmbunătăți starea de sănătate.

În ultimii ani s-au înregistrat progrese însemnate în screeningul populațional prin folosirea unor noi tipuri de teste și de instrumente: spectrofotometrie, fluorometrie, determinările imunoreactive, spectrometria de masă, genetica moleculară.

## 1. PRINCIPII DE SCREENING POPULAȚIONAL

### 1.1 CRITERIILE DE SCREENING

Orice program de screening populațional trebuie să îndeplinească o serie de criterii care țin de boală, test și program.

- *Boala* trebuie să fie relativ frecventă în populația țintă și să aibă efecte potențiale severe asupra stării de sănătate, care să poată fi prevenite sau ameliorate, printr-o intervenție medicală precoce; acest lucru va asigura beneficiul necesar, în măsură să justifice costul programului de screening.

- *Testele* trebuie să fie non-invazive, ușor de realizat (eventual prin automatizare) și ieftine; ele trebuie să aibă o acuratețe ridicată. *Acuratețea* se referă la capacitatea testului de a separa indivizii care au boala de cei care nu o au; ea implică două componente: sensibilitatea și specificitatea (determinate prin compararea rezultatelor screeningului cu acelea ale testelor definitive de diagnostic; tabelul 18.2):
    - *sensibilitatea* este abilitatea testului de a identifica corect indivizii care *au boala*; ea se măsoară prin proporția indivizilor afectați la care testul este pozitiv („adevărați pozitivi”); se poate exprima și prin proporția rezultatelor *fals-negative*, adică a cazurilor neidentificate;
    - *specificitatea* este capacitatea testului de a identifica corect subiecții care nu sunt afectați; ea se măsoară prin proporția indivizilor neafectați la care testul este negativ („adevărați negativi”); se poate exprima și prin proporția rezultatelor *fals-pozitive*, (1-specificitatea) adică a cazurilor neafectate incorect depistate;
- Testele de screening sunt – într-un număr foarte redus – 100% sensibile și 100% specifice deoarece distribuția valorilor testului în populația bolnavilor se suprapune parțial pe cea observată în populația neafectată; astfel, un test screening – spre deosebire de un test diagnostic – va identifica incorect unii indivizi din populația testată; de aceea se stabilește o valoare prag care separă indivizii afectați din populație de cei neafectați. Acuratețea testelor pozitive – ori *valoarea predictivă pozitivă* sau proporția testelor pozitive care sunt cu adevărat pozitive – se măsoară prin proporția indivizilor cu test pozitiv care au într-adevăr boala [se calculează prin raportul  $a/(a+b)$  din tabelul 18.2]

**Tabelul 18.2 Calculul sensibilității și specificității**

Test Screening	Starea de boală	
	Bolnavi	Sănătoși
Rezultate pozitive (+)	<b>a</b> (adevărat pozitiv)	<b>b</b> (fals pozitiv)
Rezultate negative (-)	<b>c</b> (fals negativ)	<b>d</b> (adevărat negativ)
<b>Sensibilitate = <math>a/(a+c)</math></b>		
<b>Specificitate = <math>d/(b+d)</math></b>		
<b>Valoare predictivă pozitivă = <math>a/a+b</math></b>		

- *Programul* trebuie oferit în mod corect și *echitabil*, unui număr cât mai mare de persoane; participarea trebuie să fie *voluntară*, bazată pe o informare completă și ușor de înțeles, care să permită un *consimțământ informat*. Foarte important este ca programul să asigure resursele necesare pentru diagnosticul și tratamentul persoanelor depistate prin screening. Costul programului de screening trebuie să fie rezonabil și permisibil iar relația cost-beneficiu – corectă. Decizia introducerii unui program de screening se bazează pe factori etici, medicali, financiari și politici.  
Costurile „măsurabile” includ cheltuielile necesare desfășurării programului de screening și costurile îngrijirii/tratamentului pacienților identificați în stadiul presimptomatic<sup>1</sup>. Beneficiile, deseori dificil de evaluat, sunt reprezentate de îmbunătățirea calității vieții pentru pacient și familie plus reducerea costurilor îngrijirii pacienților depistați clinic tardiv.

## 1.2. TIPURI DE SCREENING POPULAȚIONAL.

În funcție de populația țintă și de obiective se pot deosebi mai multe categorii *operaționale* de screening populațional (tabelul 18.1).

- *Screeningul prenatal* – urmărește identificarea gravidelor cu risc suficient de mare pentru a justifica aplicarea unor proceduri de diagnostic invaziv care, datorită riscului medical și

<sup>1</sup> Dacă nu sunt disponibile fondurile necesare tratamentului presimptomatic al unei boli atunci nu are rost introducerea unui program de screening pentru acea boală.

costului ridicat, nu pot fi aplicate la toate gravidele. Se realizează prin dozarea unor markeri biochimici fetalii în serul matern și ecografie fetală pentru a depista feteșii cu defecte deschise de tub neural (și eventual alte malformații congenitale) precum și cei cu sindrom Down (și alte aneuploidii).

- *Screeningul neonatal* – se adresează unor boli monogenice relativ frecvente (fenilcetonuria, hipotiroidia congenitală ș.a) care nu pot fi diagnosticate *clinic* la naștere, au consecințe severe și sunt costisitor de tratat, dacă se intervine tardiv, după apariția manifestărilor clinice. Ele trebuie să beneficieze de un tratament care să reducă atât severitatea bolii (dacă este început presimptomatic) cât și costurile îngrijirii pacientului (comparativ cu tratamentul început postsimptomatic).
- *Screeningul purtătorilor sănătoși* ai unei mutații pentru o anumită boală monogenică frecventă într-o anumită populație (talasemie, sicklemie, fibroză chistică, etc)<sup>2</sup> identifică familiile cu risc genetic crescut.

### 1.3. SERVICIILE DE SCREENING.

Realizarea screeningului nu este o problemă tehnică ci mai ales una *profesională și managerială*. Într-adevăr, screeningul se impune a fi realizat de un serviciu integrat, de înaltă calitate (acreditat), care trebuie să asigure patru elemente: management, monitorizare, informare și decizie, pregătire profesională continuă.

- *Managementul serviciului* trebuie să fie asigurat de către un medic consultant, cu experiență în screening, care va avea toate responsabilitățile serviciului; el va fi ajutat de către un *coordonator de screening* – responsabil de activitatea zilnică. Cei doi coordonatori trebuie să lucreze într-o strânsă colaborare și să ajusteze programul de screening și metodele de furnizare a serviciilor în funcție de resurse și necesități. Pentru introducerea și desfășurarea testării sunt esențiale *colectarea probelor, infrastructura de laborator și profesionalismul echipei*.
- *Monitorizarea programului* include evaluarea periodică a performanțelor testelor, a metodelor de laborator și furnizarea serviciilor – prin acțiuni de control de calitate, intern și extern; în funcție de datele obținute se va realiza o ameliorare continuă a programului de screening.
- *Informare și decizie*. Persoanele ce ar putea beneficia de screening trebuie să fie informate adecvat (oral și în scris), înainte de efectuarea testului, despre metodele de screening, avantajele și limitele lor (posibilitatea unor rezultate fals negative sau fals pozitive), pentru a lua o *decizie personală informată privind participarea la test*. După efectuare, rezultatele pozitive trebuie transmise imediat, de către o persoană care să cunoască bine problemele legate de screening și să le explice într-o manieră tonică, relaxantă și plină de înțelegere. Rezultatele negative se pot comunica prin telefon cu mențiunea că nu exclud complet ca subiectul să fie afectat. Esențial este ca subiecții să înțeleagă faptul că metodele de screening *nu realizează un diagnostic cert* ci numai o apreciere a riscului.
- *Pregătirea continuă a staff-ului (training)* este importantă, pentru a asigura calitatea tuturor etapelor/ operațiunilor (începând de la completarea formelor de solicitare a testului – cu date clinice relevante pentru interpretare, metoda de lucru și terminând cu transmiterea rezultatelor). Periodic se vor face informări privind controlul de calitate și performanțele programului în care echipa tehnică este implicată.

### 1.4. PROBLEME ETICE ASOCIATE SCREENINGULUI POPULAȚIONAL

Toate tipurile de screening – prenatal, neonatal, al purtătorilor adulți – ridică multiple și delicate probleme etice; deși ele vor fi discutate în detalii în capitolul 20 vom preciza aici

---

<sup>2</sup> La această categorie se poate atașa *diagnosticul presimptomatic* al purtătorilor sănătoși de mutații patogene prezenți în familia unui bolnav, pe baza unor *registre genetice*.

câteva aspecte. Problema esențială este posibilitatea compromiterii *autonomiei de decizie* a cuplului (în cazul screeningului prenatal) sau a părinților (în cazul screeningului neonatal), determinată de o *informare inadecvată* premedietoare testării. La aceasta se poate adăuga o *inechitate în accesul la programele de screening* (în special prenatal) datorită fie limitării resurselor sau distribuției lor inegale (fapt ce împiedică efectuarea screeningului întregii populații țintă), fie unei adresabilități inegale, determinată de o informare și educație sanitară deficitară (a populației dar și a medicilor de familie) sau de dificultățile financiare ale familiei.

- În *screeningul seric matern prenatal* cuplurile pot să nu înțeleagă semnificația proporțiilor de rezultate fals pozitive (5%) sau fals negative (10-20%) și astfel pot fi confruntate cu opțiunile diagnosticului prenatal pe care ele nu le-au luat în considerare; la aceasta se pot adăuga complexitatea interpretării testelor și dificultățile în înțelegerea informațiilor post-testare. Mai există și o problemă de *costuri* care cresc (cu circa 25%) o dată cu numărul mai mare de amniocenteze necesare pentru validarea testelor serice materne.
- În *screeningul neonatal*, pentru a reduce rata nedepistării unor cazuri de boală, este necesar un nivel înalt de participare la screening; în unele țări/regiuni participarea la screening este obligatorie, dar cele mai multe programe se bazează pe *inclusiunea voluntară* a mamelor în testare. Deseori se alege varianta „*opt-out*”: gravidele sunt informate prenatal despre test și dacă nu-și exprimă dezacordul sunt incluse automat în testare, fără a li se mai cere alt consimțământ. Desigur, din punct de vedere etic, varianta „*opt-in*” este cea mai corectă deoarece se solicită un consimțământ informat, activ, înainte de efectuarea testului.
- *Screeningul purtătorilor sănătoși* se confruntă cu problema *confidențialității* datelor, mai ales față de angajatori sau companiile de asigurări

Vom sublinia, din nou, că programele de screening ar trebui să fie oferite în mod echitabil întregii populații, participarea ar trebui să fie *voluntară*, bazată pe o informare completă și ușor de înțeles, care să permită un *consimțământ informat*; persoanele vizate *au dreptul de a alege să nu fie testate*.

## 2. SCREENINGUL PRENATAL

Screeningul prenatal se efectuează prin determinarea concentrației unor markeri biochimici fetal<sup>3</sup> în serul matern, care se modifică semnificativ în sarcinile în care fetusul are defecte de tub neural (DTN) deschise, sindrom Down sau alte anomalii congenitale.

### 2.1 SCREENINGUL PRENATAL AL DTN DESCHISE

Inițial screeningul serului matern a vizat DTN<sup>4</sup> prin determinarea **alfa fetoproteinei** (AFP), la 16 săptămâni de vârstă gestațională (VG)<sup>5</sup>, care are valori semnificativ mai mari la gravidele cu fetuși ce au DTN deschise.

- AFP este echivalentul fetal al albuminei și principala proteină din sânge în primele stadii ale dezvoltării fetale; treptat, spre sfârșitul perioadei fetale și neonatal, AFP este înlocuită cu albumina. AFP difuzează prin membranele fetale în sângele matern; în mod normal, concentrația AFP în serul matern (AFM-SM) crește treptat, din săptămâna a 10-a până în săptămâna a 32-a de gestație.
- Valorile AFP pentru o anumită gravidă sunt exprimate ca *multiplu al medianei* („*multiple of median – MoM*”) pentru sarcinile normale de aceeași vârstă gestațională; *mediana* – este valoarea mijlocie a rezultatelor determinărilor AFP efectuate într-o anumită săptămână de vârstă gestațională (într-o populație

---

<sup>3</sup> Este vorba de proteine produse de făt în cursul perioadei gestaționale sau hormoni produși de unitatea fetoplacentară.

<sup>4</sup> DTN îndeplinesc condițiile unei boli supuse screeningului deoarece sunt anomalii congenitale relativ frecvente, au consecințe grave pentru făt și 95% dintre copiii cu DTN se nasc din gravide fără istoric familial pozitiv.

<sup>5</sup> VG se determină în raport cu data primei zile a ultimei menstruații sau, mai bine, prin estimarea diametrului biparietal (DBP) prin ecografie (dacă ritmul creșterii fetale este normal).

definită de gravide), aranjate în ordine crescătoare<sup>6</sup>; un *multiplu al medianei* se obține prin divizarea valorii observate la o gravidă cu o anumită vârstă gestațională la valoarea mediană stabilită pentru VG respectivă. De obicei se face o *corecție* a nivelului AFP în raport cu greutatea gravidei (nivelul AFP-SM scade o dată cu creșterea greutății materne, datorită diluției AFP în circulația maternă)<sup>7</sup>, etnia, prezența diabetului, fumatul și alți factori.

- Orice defect fetal, care permite *scurgerea* serului fetal în lichidul amniotic (LA), va produce creșterea semnificativă a AFP în LA și apoi în serul matern<sup>8</sup>. Principala cauză a acestui fenomen este reprezentată de către defectele deschise ale tubului neural<sup>9</sup> (țesutul neural este expus direct la exterior sau acoperit de o membrană subțire și transparentă).
- Curbele nivelului AFP-SM în sarcinile normale și anormale se suprapun parțial (figura 18.1), de aceea în practică a fost introdus un *nivel prag arbitrar* – corespunzător percentilului 95 sau multiplului 2,5 al medianei – peste care se poate afirma existența unui DTN.

Screeningul AFP-SM se practică de obicei la 16 săptămâni de vârstă gestațională (determinată ecografic prin DBP), deși performanțele sunt mai mici decât la 17 săptămâni, pentru a permite eventuala întrerupere a sarcinii până la 20 săptămâni. Circa 1-2% din femeile gravide vor prezenta valori crescute ale AFP-SM peste pragul  $AFP \geq 2,5 \text{ MoM}$  și vor fi supuse *testelor diagnostice*: ecografie și amniocenteză, pentru a se determina nivelul AFP și acetilcolinesterazei în LA.

- **Ecografia fetală** dă rezultate foarte bune dacă este practică de specialiști cu experiență; anencefalia este practic totdeauna observată; spina bifida se poate identifica combinând examinarea coloanei vertebrale cu semnele craniene: reducerea DBP, semnul „lămâiei” (regiunea frontală a craniului fetal este mai „ascuțită” luând formă de lămâie în locul forme normale de ou”) și semnul „bananei” (diametrul transvers al cerebelului este redus). În centrele unde ecografia se efectuează de rutină examenul ultrasonografic ar putea înlocui dozarea AFP-SM pentru screeningul DTN dar screeningul AFP-SM este mai ușor de aplicat la un număr mare de gravide, nu necesită operatori antrenați în ecografie și, în plus, dă informații și pentru screeningul sindromului Down (vezi mai jos).
- Amniocenteza și dozarea AFP în LA contribuie la confirmarea diagnosticului la valori de 3,5 MoM, la 16 săptămâni VG; dacă se găsesc valori  $\geq 2 \text{ MoM}$  (5% dintre gravide) atunci se practică și dozarea **acetilcolinesterazei** în LA, detectându-se astfel 99% din toate DTN deschise cu o rată de 0,3% rezultate fals-pozitive (determinate în special de contaminarea cu sânge a LA)

Numai 1 din 15 femei cu AFM-SM crescută va avea AFM crescută și în LA. Deci *valoarea predictivă a AFM-SM* este scăzută – de circa 6% . Totuși *sensibilitatea* AFM-SM<sup>10</sup> este înaltă, permițând identificarea a peste 90% din feteșii cu anencefalie și a peste 80% din cazurile de spina bifida deschisă. Dozarea AFM-SM combinată cu ecografia identifică peste 95% din DTN. Screeningul DTN prin determinarea AFP-SM nu are nici o *specificitate* de 100% deoarece există și alte cauze ce produc creșterea AFP-SM: supraestimarea vârstei gestaționale (!), sarcini multiple, făt mort, iminențe de avort tratate, alte anomalii fetale: defecte ale peretelui abdominal (omfalocel, gastroschizis), atrezii esofagiene și intestinale, teratoame sacro-coccigiene, extrofie vezicală, sindrom nefrotic congenital, leziuni cutanate și sângerări fetale intrauterine. Cea mai mare parte dintre aceste situații pot fi însă diferențiate de DTN prin ecografie. În ciuda acestor limite determinarea AFM-SM este larg utilizată și, împreună cu suplimentarea periconcepțională cu acid folic (vezi capitolul 13.B.1) a dus la scăderea semnificativă a incidenței DTN în multe țări.

## 2.2 SCREENINGUL PRENATAL AL SINDROMULUI DOWN

Inițial, screeningul prenatal al sindromului Down (SD) s-a bazat pe asocierea recunoscută dintre vârsta maternă avansată și boală (Penrose, 1933) și consta din analiza cromosomilor în celulele fetale (Valenti et al, 1968) la gravidele de peste 35 de ani. Dar

<sup>6</sup> *Mediana* este o valoare mai bună decât *media* – deoarece nu este influențată de valori ocazionale.

<sup>7</sup> Corecția se face prin divizarea valorilor MoM observate prin valorile MoM așteptate la o anumită greutate maternă.

<sup>8</sup> Inițial screeningul DTN deschise s-a făcut prin determinarea radioimunologică a AFP în LA; deoarece nivelul AFM-LA se corelează cu nivelul AFP-SM s-a introdus screeningul serului matern și măsurarea AFP printr-o manevră neinvazivă.

<sup>9</sup> DTN închise, acoperite de piele sau o membrană groasă și opacă, nu pot fi detectate prin dozarea AFP.

<sup>10</sup> Deși sensibilitatea AFM-SM este mai mică decât a AFM-LA riscurile determinărilor AFM-SM sunt nule.



numai circa 5-7% dintre femeile gravide se încadrează în această categorie și numai 25-30% dintre toate cazurile de SD se nasc din mame de peste 35 de ani. Ulterior s-a descoperit că sarcinile cu fetoși care au SD se asociază cu *reducerea AFM-SM* (Mercatz et al., 1984), *creșterea concentrației serice a gonadotropinei corionice umane (HCG)* (Bogart et al, 1987) și *scăderea estriolului neconjugat (uE3)* în serul matern (Wald et al, 1988)<sup>11</sup>; acești trei markeri serici au fost asociați în **triplul test** care, depistând circa 60-70% dintre sarcinile afectate, a fost introdus după 1990 în practica de rutină a îngrijirii prenatale în multe țări ale lumii.

#### a) Screeningul seric la 16 săptămâni de sarcină.

În mod normal, în trimestrul II de sarcină nivelul seric matern al AFP și uE3 crește o dată cu vârsta gestațională iar cel al HCG total scade; în SD acești markeri, exprimați ca multiplu al medianei (MoM) – vezi mai sus – se modifică semnificativ: AFM și uE3 scad cu aproximativ 25% iar valoarea HCG se dublează<sup>12</sup> (figura 18.2). Nici unul dintre cei trei markeri serici nu dă, evident, o discriminare absolută dar luați împreună, în triplul test, ei pot modifica riscul inițial al unei sarcini cu SD dat de vârsta maternă; când pragul de risc este  $\geq 1:270$  testul screening este pozitiv (la circa 5% din toate gravidele) și se propune efectuarea amniocentezei de diagnostic: se identifică astfel circa 67% din cazurile de sindrom Down dar testul este fals pozitiv la 5% din gravide care vor avea un făt normal (figura 18.3). Valorile situate în limitele normale reduc probabilitatea ca fetusul să fie trisomic, fără însă a o exclude.

Performanțele triplului test în SD pot fi sporite până la 70%-80% dacă se măsoară și fosfataza alcalină rezistentă la uree a neutrofilelor (triplul test plus) sau subunitățile libere  $\alpha$  și  $\beta$  ale HCG. Recent a fost identificat un al patrulea marker seric – *inhibina A* – care la 16 săptămâni de sarcină are un nivel de 1,8 MoM în sarcinile cu SD; astfel **quadruplul test** (AFP, uE3, HCG și inhibina A sau  $\beta$ HCG) identifică la această vârstă gestațională circa 79% din fetoșii cu SD cu o rată de 5% rezultate fals-pozitive.

Triplul test – efectuat la 16 săptămâni de sarcină – furnizează informații utile nu numai pentru evaluarea riscului nașterii unui copil trisomic, ci și pentru depistarea altor anomalii fetale (vezi tabelul 18.3).

**Tabelul 18.3. Variațiile markerilor serici materni în diferite afecțiuni fetale.**

Afecțiunea fetală	Nivelul markerilor serici materni		
	AFP	estriol neconjugat	HCG
moartea fetusului, spina bifida deschisă, defecte ale peretelui abdominal	crescut	normal	normal
anencefalie	crescut	reduc	normal
hiperplazie corticosuprarenaliană congenitală	normal	foarte reduc	normal
sindromul Down, sindromul Turner cu higroma chistică	reduc	reduc	crescut
trisomia 18	reduc	reduc	reduc
monosomia X fără higroma	normal	reduc	reduc

Intervalul optim pentru efectuarea triplului test este cuprins între săptămânile 15 și 18 de sarcină, cel mai bine la 16 săptămâni. Nivelurile serice ale markerilor utilizați în evaluarea riscului nașterii unui copil afectat sunt influențate de mai mulți factori:

- vârsta gestațională (care trebuie stabilită cu exactitate prin examen ecografic);
- greutatea gravidei;
- diabetul insulino-dependent matern;
- sarcina multifetală;

<sup>11</sup> HGC este un hormon glicoproteic alcătuit din două subunități neidentice – alfa și beta – aflate fie libere, fie cuplate între ele; HGC este produsă de sincițiotrofoblastul placentar și excretată direct în sângele matern. Estriolul neconjugat este un hormon steroid secretat de unitatea fetoplacentară.

<sup>12</sup> Valorile medii ale celor trei markeri în sarcinile cu SD, exprimate ca multiplu ai MoM din sarcinile normale (la care prin definiție MoM este 1,0) sunt: AFP – 0,75; uE3 – 0,73; HCG – 2,05 (după Muller și Young, 1999); ca și în cazul DTN se vor face o serie de corecții ale valorilor observate funcție de VG, greutate maternă, imaturitate fetală, fumat etc.

- istoricul familial de trisomii sau defecte de tub neural;
- numărul de țigări fumate zilnic;
- grupul etnic căruia îi aparține gravida.

Prelucrarea computerizată a valorilor biochimice raportate la factorii menționați stabilește magnitudinea riscului. În sindromul Down, de pildă, limita acceptată (*cut off*) este de 1/270 (corespunzătoare riscului de trisomie 21 al gravidelor de 35 de ani, dar inferioară riscului de avort consecutiv amniocentezei).

Tinând cont de performanțele și mai ales de limitele screeningului serului matern, părinților trebuie să li se explice foarte clar că *triplul test este numai un test de screening* și nu unul de diagnostic. Gravidele la care rezultatele triplului test sunt pozitive trebuie supuse unui examen ecografic efectuat cu aparatură de înaltă rezoluție, de către experți în medicina fetală. Se impune a fi subliniat faptul că rezultatele celor două tipuri de investigații – biochimice și ecografice – au doar o valoare orientativă. Diagnosticul prenatal de certitudine se stabilește exclusiv prin examinarea citogenetică a celulelor fetale obținute prin metode invazive

#### **b) Screeningul sindromului Down la 10 săptămâni de sarcină.**

Testele de screening și diagnostic prenatal a SD efectuate în trimestrul al doilea de sarcină au dezavantajele traumei psihologice și ale dificultăților obstetricale de întrerupere a cursului sarcinii. Ambele inconveniente pot fi depășite prin introducerea unor teste de screening al SD în trimestrul I.

Rezultatele unor cercetări recente atestă că examenele biochimice, în special cele care evidențiază scăderea concentrației *proteinei plasmatice A asociată cu sarcina (PAPP-A)* și creșterea nivelului seric al subunității beta libere a HGC<sup>13</sup>, sunt capabile să detecteze, încă din săptămânile 8-9 de sarcină, circa 60% din sarcinile cu fetuși având trisomie 21 (la un nivel de risc de 1:300). Performanțele screeningului la 10 săptămâni de sarcină sunt aproape similare cu cele obținute cu triplul test la 16 săptămâni dar inferioare quadruplului test. Rezultatele pot fi însă substanțial ameliorate prin cercetarea unui marker ecografic: translucența nucală  $\geq 3$  mm.

Detecția precoce are însă și dezavantaje. Acestea includ:

- obligativitatea stabilirii ecografice a vârstei gestaționale;
- riscurile crescute ale biopsiei de vilozități coriale efectuată în primul trimestru pentru confirmarea citogenetică a diagnosticului;
- sensibilitatea mai redusă a testelor;
- imposibilitatea obținerii unor date suplimentare (de exemplu detectarea DTN) prin dozarea AFP, care nu are valori semnificativ modificate în trimestrul I de sarcină;
- costurile mai ridicate în cazul în care rezultatele sunt incerte și investigațiile urmează a fi repetate în al doilea trimestru;
- screeningul precoce se dovedește a fi inutil în cel puțin 20% din cazuri, această cifră reprezentând proporția fetușilor afectați care sunt avortați spontan între săptămânile 10 și 16 de sarcină.

Cu toate acestea screeningul biochimic și ecografic al SD în primul trimestru de sarcină cunoaște o permanentă dezvoltare.

### **3. SCREENINGUL NEONATAL**

Programele de screening ale nou-născuților reprezintă o oportunitate ideală pentru depistarea presimptomatică și prevenirea unor boli genetice. Prima afecțiune supusă screeningului neonatal a fost fenilcetonuria, o boală relativ frecventă care evoluează natural spre un retard mental profund; această evoluție poate fi evitată dacă boala este depistată – prin evaluarea fenilalaninei în sânge (mai exact, o picătură de sânge colectată de la sugar pe o hârtie de filtru și apoi uscată) cu ajutorul testului de inhibiție bacteriană descris de Guthrie – și

<sup>13</sup> Valoarea mediană a PAPP-A în sarcinile cu SD este în jur de 0,43 MoM iar a  $\beta$ -HCG de 1,79 MoM (Wald et al 1997).

tratată imediat după naștere, când sugarul este încă asimptomatic, printr-o dietă săracă în fenilalanină. Demonstrarea succesului testului și a eficienței tratamentului au dus la introducerea, în multe țări ale lumii, a screeningului neonatal pentru unele boli genetice ca o modalitate utilă de optimizare a sănătății publice.

Așa cum am precizat, screeningul neonatal se adresează unor boli monogenice relativ frecvente în anumite populații sau grupuri etnice, care *nu pot fi diagnosticate clinic la naștere*, au consecințe severe și sunt costisitor de tratat, dacă se intervine tardiv, după apariția manifestărilor clinice. Ele trebuie să beneficieze de un tratament care să reducă atât severitatea bolii (dacă este început într-un stadiu presimptomatic) cât și costurile îngrijirii pacientului (comparativ cu tratamentul început postsimptomatic). Aceste condiții sunt îndeplinite integral de *fenilcetonurie și de hipotiroidia congenitală* și parțial de *galactozemie și hiperplazia suprarenaliană congenitală* sau de unele aminoacidemii. În prezent, în unele regiuni (centre) sau țări s-a introdus în programele de screening neonatal și depistarea unor afecțiuni genetice frecvente – cum ar fi fibroza chistică, hemoglobinopatiile, distrofia musculară Duchenne (la băieți), deficiența în  $\alpha$ -1-antitripsină – pentru care nu există încă un tratament eficient dar care diagnosticate precoce pot fi ameliorate prin tratamente paliative sau permit un sfat genetic corect, un planing familial și un diagnostic prenatal la sarcinile următoare<sup>14</sup>.

În ultimii ani s-au înregistrat progrese importante în screeningul neonatal prin standardizarea procedurilor de colectare și procesare a picăturilor de sânge, introducerea unor noi tipuri de teste și aparate, de obicei automatizate, ce îmbunătățesc sensibilitatea și specificitatea. Pentru a reduce numărul rezultatelor fals pozitive se folosește deja testarea în două etape: în prima etapă se utilizează teste cu sensibilitate și precizie mai mică iar în a doua etapă, folosind proba inițială, teste de mare precizie; de exemplu în screeningul fenilcetonuriei testul Guthrie urmat de determinarea tirozinemiei.

### 3.1. SCREENINGUL NEONATAL PENTRU FENILCETONURIE

Screeningul nou-născuților pentru fenilcetonurie (PKU) reprezintă primul și cel mai bun exemplu pentru a demonstra eficiența screeningului neonatal în bolile genetice. PKU este o boală autosomal recesivă, relativ frecventă (1:13.000 nașteri), produsă de o deficiență a fenilalanin hidroxilazei, prima enzimă ce intervine în calea metabolică principală a fenilalaninei; aceasta duce la creșterea concentrației plasmatice a fenilalaninei și metaboliților săi, cum ar fi fenilpiruvatul („fenilcetona”) și la scăderea tirozinei. Boala nu poate fi identificată clinic în primul an de viață și netratată evoluează în peste 95% din cazuri spre un retard mental profund care poate fi prevenit prin menținerea fenilalaninei plasmatice la un nivel aproape normal cu o dietă săracă în fenilalanină, începută în primele săptămâni de viață<sup>15</sup>. Există controverse asupra duratei de menținere a dietei dar este cert faptul că gravidele cu PKU trebuie să fie supuse unui control strict pentru a fi evitate efectele negative ale hiperfenilalaninemiei asupra fătului.

PKU este detectată la nou-născuți prin măsurarea fenilalaninei în sânge folosind testul Guthrie de inhibiție bacteriană. Câteva picături de sânge, recoltate de regulă din călcâi la 2-3 zile după naștere, sunt plasate pe o hârtie de filtru specială; un eșantion din picătura de sânge uscat este plasat pe o placă cu agar și incubat cu o linie de *Bacillus subtilis* care necesită fenilalanină pentru creștere. Măsurarea creșterii bacteriene permite determinarea cantității de fenilalanină în proba de sânge; testele pozitive sunt de obicei repetate și urmate de dozarea

---

<sup>14</sup> S-a demonstrat că în DM Duchenne (circa 1:4500 nou-născuți de sex masculin) prin screening pot fi prevenite prin screening peste 15% din sarcinile cu fetești afectați, fapt ce conferă programului un raport cost-beneficiu favorabil.

<sup>15</sup> O excepție importantă este reprezentată de pacienții care au un defect în metabolismul *biopterinei*, care vor urma un tratament diferit.

cantitativă a fenilalaninei (>20 mg/dl în PKU clasică) și tirozinei în plasmă. Sensibilitatea testului<sup>16</sup> este de circa 95% și specificitatea aproape de 100%.

Analizele cost-beneficiu în screeningul PKU sunt foarte favorabile justificând (singur) cheltuielile pentru infrastructura necesară colectării și testării neonatale (în Marea Britanie beneficiul net pentru fiecare pacient identificat și tratat a fost de 143.000 £).

### 3.2. SCREENINGUL NEONATAL PENTRU HIPOTIROIDISMUL CONGENITAL

Hipotiroidismul congenital (CH) este o boală frecventă (circa 1:4000 de nașteri) – produsă de obicei de *agenzia tiroidiană* non-genetică (aport insuficient de iod) și, mai rar, de hipopituitarism sau de defecte genetice în sinteza tiroxinei, și care, netratată la timp, evoluează spre retard mental, hipostatură și facies grosier.

Screeningul neonatal al CH se realizează, în prezent, prin măsurarea TSH în probe de sânge recoltate a treia zi de viață. Tratamentul cu tiroxină (în doză suficientă pentru a menține TSH plasmatic la valori normale) previne dezvoltarea simptomelor severe dar nu exclude total unele deficite neurologice ce pot apărea mai târziu în viață.

Eficiența screeningului neonatal este influențată de CH tranzitoriu la un sugar ce va deveni eutiroidian în câteva luni și mai ales de cazurile în care boala se dezvoltă mai târziu la nou-născuți cu rezultate normale la screening. Totuși, analizele cost-beneficiu ale screeningului neonatal al CH sunt foarte favorabile determinând introducerea sa în toate programele de screening neonatal.

## 4. SCREENINGUL POPULAȚIONAL AL HETEROZIGOȚILOR

Screeningul heterozigoților (Na) constă în testarea unei populații țintă pentru identificarea purtătorilor sănătoși a unei gene-boală, cu risc crescut de a avea copii afectați de o boală recesivă gravă; purtătorii depistați vor primi apoi informații adecvate și complete despre riscurile și opțiunile reproductive posibile (inclusiv diagnosticul prenatal).

Criteriile tehnice și etice pe care trebuie să le îndeplinească programele de screening a purtătorilor sunt următoarele:

- frecvența mare a heterozigoților în populația-țintă – de obicei grupuri etnice specifice – (tabelul 18.4) pentru a justifica screeningul;
- existența unui test ieftin și precis, cu foarte puține rezultate fals-negative și fals-pozitive;
- cuplurile de heterozigoți identificate trebuie să aibe acces la sfat genetic și diagnostic prenatal;
- participarea la screening trebuie să fie voluntară, bazată pe un consimțământ informat și accesibilă tuturor membrilor comunității, iar rezultatele strict confidentiale.

**Tabelul 18.4. Exemple de programe de screening ale heterozigoților**  
(modificat după Jorde et al, 1999)

Boală	Grup etnic	Frecvența heterozigoților	Frecvența cuplurilor cu risc
Boala Tay-Sachs	Evrei Ashkenazi	1/30	1/900
β-Talasemia	Ciprioți, greci, italieni	1/30	1/900
α-Talasemia	Asiatici (sud-est), chinezi	1/25	1/625
Sicklemlia	Afro-americieni	1/12	1/150
Fibroza chistică	Europeni (nord-vest)	1/25	1/625

Screeningul purtătorilor a fost aplicat cu succes pentru *boala Tay-Sachs* (boală lizozomală letală) la populațiile de evrei Ashkenazi din America de Nord și pentru β-

<sup>16</sup> Proporția de 5% rezultate fals pozitive este determinată mai ales de tirozinemii tranzitorii reversibile sau, mai rar, de alte cauze de hiperfenilalaninemie; această proporție poate fi redusă prin retestare la 2-4 săptămâni sau folosind metodele fluorometrice ori, mai recent, spectrometria de masă (care măsoară concomitent și tirozina).

*talasemie* în Cipru ducând, în două decenii, la o reducere de peste 90% a numărului de nou-născuți cu aceste boli. În contrast, tentativele de screening a *sicklemeiei* în comunitățile de afro-americani din SUA au fost mai puțin eficiente subliniind importanța consultării, cooperării și educării populației țintă. *Fibroza chistică* este o altă afecțiune autosomal recesivă pentru care screeningul purtătorilor este posibil (cu ajutorul PCR se pot identifica 12 dintre cele mai frecvente mutații, prezente la circa 90% dintre heterozigoți) dar relația cost-beneficiu nu este, pentru moment, favorabilă. În aceste condiții screeningul este limitat numai la indivizii cu istoric familial pozitiv și se practică mai ales la femeile gravide sau la cele ce își planifică o sarcină (în cazul unui test pozitiv se evaluează și partenerul de viață iar dacă ambii sunt heterozigoți se recurge la diagnosticul prenatal al fătului).

Screeningul purtătorilor are mai puține beneficii pentru indivizii cu teste pozitive, iar dacă acțiunile educaționale nu sunt suficient de ample și eficiente, poate duce la stigmatizarea lor printr-o imagine negativă despre ei înșiși și familia lor sau grupul etnic specific căruia îi aparțin. În plus, nerespectarea confidențialității poate duce la probleme de integrare socio-profesională sau de asigurare medicală.

## 5. SCREENINGUL FAMILIAL

Screeningul genetic poate fi aplicat la membrii unei familii în care există o boală genetică sau o predispoziție genetică (tabelul 18.1) datorită căreia unii indivizi sănătoși, în special rudele de gradul I, au un risc crescut de a moșteni și transmite anomalia genetică. Depistarea precoce a acestei anomalii la persoanele cu risc crescut poate contribui la prevenirea bolii sau a complicațiilor ei, precum și la luarea unei decizii reproductive informate. Practic, screeningul familial se aplică în următoarele situații:

- unele boli autosomal dominante pleiotrope, cu expresivitate variabilă sau penetranță redusă, care se manifestă clinic în a treia sau a patra decadă de viață (boala polichistică renală AD, hipercolesterolemia familială, polipoza adenomatoasă familială, boala Huntington ș.a) sau mai precoce dar oligosimptomatic (neurofibromatoza, scleroza tuberoasă, sindromul Marfan ș.a); în multe din aceste cazuri este posibil un *diagnostic presimptomatic*;
- rudele sănătoase ale bolnavilor cu unele afecțiuni recesive autosomale (de exemplu, fibroza chistică) sau legate de X (de exemplu, distrofia musculară Duchenne) care au un risc crescut de a fi purtătoare ale genei mutante și de a avea un descendent afectat dacă și partenerul de cuplu se dovedește a fi heterozigot (situație frecventă în anumite populații și pentru anumite boli); în aceste cazuri testarea genetică a partenerului de cuplu și/sau a produsului de concepție (diagnostic prenatal) permite alegerea celor mai bune opțiuni pentru familie;
- în unele boli provocate de expansiunea repetițiilor trinucleotidice (vezi capitolele 6.B.1.4 și 11.D), în special sindromul X fragil, se pot identifica printre rudele sănătoase ale bolnavilor persoanele cu *premutație*, cărora li se poate acorda un sfat genetic corect;
- în multe dintre bolile comune ale adultului, inclusiv diferite forme de cancer, se pot determina persoanele sănătoase cu *predispoziție genetică* la boală; în epoca medicinei genomice, se prefigurează dezvoltarea screeningului populațional pe direcția *medicinii predictive* și *identificării indivizilor susceptibili*, vulnerabili, la anumite boli comune;
- rudele apropiate ale purtătorilor sănătoși de anomalii cromosomice echilibrate pot moșteni anomalia și pot avea descendenți anormali, cu monosomii sau trisomii parțiale (vezi capitolul 10).

Aceste situații variate pot fi abordate în Centrele de Genetică Medicală pe baza unui **registru genetic** al indivizilor și familiilor afectate.

### 5.1. DIAGNOSTICUL PRESIMPTOMATIC.

În unele boli monogenice cu debut clinic tardiv sau cu penetranță redusă se poate stabili dacă o persoană sănătoasă dar cu risc (de exemplu, o rudă de gradul I a unui bolnav cu o afecțiune autosomal dominantă) a moștenit sau nu gena mutantă, înainte ca semnele sau simptomele bolii să devine manifeste.

Diagnosticul presimptomatic se poate face în unele boli prin evaluare imagistică – RMN, CT, ecografie – (de exemplu, ADPKD, scleroza tuberoasă ș.a) sau prin alte investigații speciale (EMG, examene oftalmologice, ș.a), altele prin studii biochimice (de exemplu, hipercolesterolemia familială, hemocromatoza) și, cel mai frecvent și mai sigur, prin analiza ADN (de exemplu, boala Huntington, distrofia miotonică, neurofibromatoza etc). De subliniat că rezultatele normale la explorările paraclinice și biochimice *nu exclud diagnosticul bolii* dar reduc considerabil probabilitatea ca persoanele respective să fi moștenit gena mutantă. Numai analiza ADN permite de cele mai multe ori un diagnostic de certitudine.

Decizia testării genetice a persoanelor cu risc crescut va aparține *numai* celor direct implicați; în cazul copiilor este preferabilă amânarea investigațiilor până după 18 ani dacă stabilirea unui diagnostic precoce nu oferă beneficii medicale. Oricum, decizia nu este simplă deoarece un diagnostic pozitiv schimbă radical viața pacientului. Din păcate, în unele afecțiuni nu există un tratament eficace și acest lucru influențează decisiv luarea deciziei. Astfel, în boala Huntington – după ce testarea genetică a devenit disponibilă – numai 20-25% din persoanele cu risc au optat pentru testare. O situație asemănătoare se întâlnește în cancerul de sân sau de colon ereditare în care, la persoanele cu teste pozitive, evaluările periodice (mamografie sau colonoscopie) pot detecta precoce o tumoră, cu șanse mari de a beneficia de o terapie adecvată, dar nu o pot preveni; nici eventuala îndepărtare chirurgicală a organului (de exemplu, mastectomie) nu elimină complet riscul de cancer. În alte afecțiuni (de exemplu, ADPKD sau hemocromatoză) diagnosticul precoce poate îmbunătăți managementul pacientului, starea lui de sănătate și poate, de asemenea, preveni eventualele complicații.

Există însă două beneficii indiscutabile:

- o persoană cu risc la care testele genetice se dovedesc negative are șansa evitării traumelor psihice determinate de incertitudinea privind apariția bolii, precum și a altor proceduri de diagnostic, de cele mai multe ori dificile și/sau scumpe;
- o persoană la care diagnosticul genetic confirmă prezența mutației poate lua o decizie reproductivă informată, evitând transmiterea mutației la copiii săi.

Cert este că oricărei persoane cu risc crescut căreia i se oferă alternativa diagnosticului presimptomatic trebuie să i se asigure atât informații detaliate și clare, cât și o susținere psihologică importantă. La acestea se adaugă confidențialitatea deciziei și rezultatelor.

## 5.2. REGISTRELE GENETICE

Cele mai multe servicii de genetică medicală înregistrează persoanele cu anumite afecțiuni și datele lor familiale, deci și rudele sănătoase cu risc genetic, într-o bază de date denumită *registru genetic*. Bolile ce vor fi incluse în registrele genetice trebuie să fie frecvente, cu consecințe potențiale severe, dar care să poată fi prevenite sau tratate, și care să genereze riscuri de recurență importante la alți membri ai familiei (**tabelul 18.5**). Includerea unor persoane și familii în registre trebuie să fie voluntară și să asigure confidențialitatea datelor, care nu pot fi folosite fără consimțământul participanților.

### **Tabelul 18.5 Boli ce pot fi incluse în registrele genetice**

<b>Boala genetică</b>	<b>Localizarea cromozomică</b>
<b>Boli autosomal dominate</b>	
Boala polichistică renală AD	16,4
Boala Huntington	4
Cancerul colorectal nonpolipozic ereditar	2,3
Cancerul de sân ereditar	13,17
Distrofia miotonică	19
Hipercolesterolemia familială	19
Neoplazia endocrină multiplă	10,11
Neuropatia senzorială și motorie ereditară de tip I	1,5,8
Neurofibromatoza I și II	
Polipoza de colon	17,22
Retinoblastomul	5
Sindromul Marfan	13
Scleroza tuberoasă	15
Sindromul Von Hippel-Lindau	9,16
<b>Boli autosomal recesive</b>	
Hemocromatoza ereditară	6
Fibroza chistică	7
Talassemia	11,16
Sicklemlia	11
<b>Boli legate de X</b>	
Distrofia musculară Duchenne/Becker	
Sindromul X fragil	
Hemofilia	
Retinita pigmentară	
<b>Anomalii cromosomice echilibrate</b>	
Translocații și inversii	

Funcțiile profilactice ale unui registru genetic sunt:

- asigurarea unei legături permanente, bilaterale și de durată între unitatea de genetică medicală și familie, pentru a permite nu numai coordonarea unui management corect și performant al bolnavilor și rudelor cu risc, ci și asigurarea unui suport psihologic adecvat;
- determinarea stării de purtător (în bolile recesive) sau realizarea unui diagnostic presimptomatic (în bolile dominante cu debut tardiv) și prenatal atunci când acestea sunt solicitate;
- asigurarea implementării unor noi tehnologii și tratamente odată ce acestea devin disponibile.

Practic, un registru genetic funcțional poate contribui decisiv la ameliorarea calității vieții indivizilor și familiilor cu risc de boli genetice severe precum și la prevenirea lor.

## **C. DIAGNOSTICUL PRENATAL**

În anul 1966, Steele și Berg au arătat că se poate determina constituția cromosomică a fătului prin cultura și analiza celulelor obținute din lichidul amniotic. Această metodă a deschis calea diagnosticului prenatal (DPN) la gravidele care, datorită vârstei reproductive avansate, aveau un risc crescut de a naște un copil cu sindrom Down. Ulterior, o dată cu perfecționarea ecografiei și a testelor genetice, indicațiile DPN s-au diversificat iar *cuplurile cu risc genetic sau malformativ crescut* au dobândit o valoroasă opțiune reproductivă<sup>17</sup>.

<sup>17</sup> Până la introducerea DPN cuplurile cu risc genetic crescut aveau doar posibilitatea asumării riscului sau evitării oricărei sarcini (prin contracepție sau sterilizare voluntară).



Ele vor putea concepe o sarcină știind că prezența sau absența bolii la fetus poate fi confirmată prin testare. În peste 95% din cazuri DPN este normal și, ca urmare, marea majoritate a cuplurilor /gravidelor cu risc vor primi un sprijin psihologic decisiv. În prezența unei anomalii fetale cuplul parental va decide evoluția ulterioară a sarcinii, în funcție de tipul și gravitatea defectului, precum și a posibilităților reale de corecție prenatală sau neonatală.

Diagnosticul prenatal este un act medical complex, înalt informativ, care permite depistarea a numeroase anomalii congenitale și boli genetice în cursul vieții fetale. Acest serviciu este realizat corect numai printr-o strânsă colaborare multidisciplinară, în care medicul genetician are un rol esențial în evaluare, diagnostic și sfat genetic.

Pentru a evidenția poziția „cheie” a medicului genetician în cadrul echipei de DPN (alcătuită din obstetricieni, ultrasonografiști, biochimici, citogeneticieni ș.a) vom remarca faptul că DPN începe și, în cazul unui făt anormal, se sfârșește cu *sfatul genetic*.

- Problema esențială este *identificarea precoce a cuplurilor cu risc genetic* sau malformativ. Această acțiune ar trebui realizată *preconcepțional* deoarece ar permite un sfat genetic corect și ar crește opțiunile cuplului; în plus ar permite aplicarea biopsiei de vilozități coriale și rezolvarea dilemei unui fetus normal sau anormal în primul trimestru de sarcină. Dacă soluția optimă a unui sfat genetic preconcepțional nu se poate realiza, atunci ar fi bine ca identificarea sarcinilor cu risc să se facă *precoce în cursul gravidității*, prin screening ultrasonografic („semne de alarmă”) sau seric matern (triplu test pozitiv). Din păcate multe gravide cu risc nu sunt identificate sau nu sunt trimise pentru DPN până la mijlocul trimestrului II, când această acțiune poate fi prea tardivă sau imposibilă.
- Cuplurile/gravidele propuse pentru DPN au nevoie de *informații* care să le permită să înțeleagă corect riscul lor genetic și să accepte sau nu procedura. *Sfatul genetic* al candidatelor pentru DPN trebuie să precizeze:
  - riscul ca fătul să fie afectat;
  - natura și consecințele probabile ale afecțiunii;
  - procedurile posibile pentru DPN, cu riscurile și limitele lor;
  - intervalul de timp necesar pentru a obține un rezultat;
  - posibilitatea unui rezultat dificil de interpretat;
  - necesitatea repetării procedurii în cazul unui eșec și/sau efectuării de noi teste.
- Medicul genetician este cel mai abilitat să interpreteze rezultatele testelor citogenetice și moleculare efectuate pe celulele fetale sau testele biochimice realizate în lichidul amniotic
- Identificarea unui făt anormal implică „continuarea” acțiunii de sfat genetic pentru a defini mai precis natura bolii, riscul de recurență și opțiunile viitoare posibile.

Vom mai preciza că numeroase boli genetice nu pot fi încă diagnosticate prenatal (dar în fiecare an noi afecțiuni se adaugă pe lista celor la care DPN este posibil) precum și faptul că DPN ridică probleme etice, uneori complexe și emoționale<sup>18</sup> (vezi capitolul 20)

## 1. INDICAȚIILE DIAGNOSTICULUI PRENATAL

Selecția femeilor gravide pentru efectuarea DPN se bazează pe principiul că riscul unei anomalii fetale trebuie să fie cel puțin egal cu riscul de inducere a avortului prin utilizarea procedurii de DPN. În prezent, peste 200 de afecțiuni genetice pot fi diagnosticate prin DPN (vezi web site-ul *Genetest*) dar indicațiile majore sunt următoarele:

### (1) *Vârsta reproductivă avansată a părinților*

- *Femeile de peste 35 de ani* reprezintă indicația majoră de DPN deoarece acestea au riscul nașterii unor copii cu aneuploidii (în special trisomie 21; vezi **tabelul 18.1**) egal sau mai mare decât riscul de avort după amniocenteză.
- *Bărbații de peste 55 de ani* (după 50 de ani în celulele stem seminale se acumulează un număr mare de mutații dominante).

**Tabelul 18.1. Incidența sindromului Down la nou-născuți vii și fetuși în funcție de vârsta maternă**

Vârsta maternă	Incidență		
	La naștere	La amnio-	La BVC

<sup>18</sup> Întreruperea cursului sarcinii, mai ales pentru un defect mediu sau „tratabil” postnatal, este o dureroasă dilemă personală, care se poate rezuma prin: „to kill or not to kill !”



(ani)		centeză	
15-19	1/1250	—	—
20-24	1/1400	—	—
25-29	1/1100	—	—
30-34	1/900-1/500	—	—
35	1/385	1/250	1/250
36	1/300	1/200	1/175
37	1/225	1/150	1/175
38	1/175	1/115	1/115
39	1/140	1/90	1/90
40	1/100	1/70	1/70
41	1/80	1/50	1/50
42	1/65	1/40	1/30
43	1/50	1/30	1/25
44	1/40	1/25	1/25
≥45	1/25	1/20	1/15

Surse: Gardner și Southerland (1996); Hsu (1998); Nussbaum et al (2001)

(2) *Screeningul serului matern pozitiv și/sau semne ecografice „de alarmă”.*

(3) *Prezența unei anomalii cromosomice structurale la unul dintre părinți.*

Riscul unei anomalii cromosomice la copil depinde de tipul anomaliei parentale și sexul părintelui purtător (vezi capitolul 9.C.3.2).

(4) *Existența unui copil cu o anomalie cromosomică de novo.*

Studii recente au semnalat faptul că după nașterea unui copil cu sindrom Down, printr-un mecanism necunoscut (posibil un mozaicism parental), riscul nașterii unui alt copil cu o anomalie cromosomică este mai mare decât cel corespunzător vârstei materne (de exemplu, pentru o femeie de 30 de ani riscul unei anomalii cromosomice la făt este de 1/100, în comparație cu 1/390 riscul corespunzător vârstei).

(5) *Istoric familial de boală monogenică (AR, AD sau LX) care poate fi diagnosticată la fetus prin analize biochimice sau ADN (tabelul 18.2.).*

În această categorie sunt incluși și părinții depistați ca fiind purtători sănătoși prin programe speciale de screening efectuate în anumite grupuri de populație în care există o frecvență înaltă a unor mutații recesive. Pentru bolile recesive legate de X se va stabili mai întâi dacă fetusul este de sex masculin și apoi se va recurge la DPN sau la diagnostic preimplantatoriu.

**Tabelul 18.2. Boli monogenice mai frecvente la care este posibil un DPN prin analiza ADN**

Boli monogenice	Nr. OMIM
<b>Autozomal dominante</b>	
Acondroplazia	100800
ADPKD	173900
Sindromul Marfan	154700
Neurofibromatoza tip 1	162200
Distrofie miotonică	160900
Boala Huntington	143100
<b>Autozomal recesive</b>	
Anemia falciformă	141900
Fenilcetonuria	261600
Boala Gaucher (I, II, III)	230800
Fibroza chistică	219700
Hiperplazia congenitală de suprarenală	201910
Ataxia Friedreich	229300
Atrofia musculară spinală	253300
Talasemiile $\alpha$ și $\beta$	141800, 141900
Boala Tay-Sachs	272800
<b>Legate de cromozomul X</b>	
Hemofilia A	306700
Sindrom X fragil	309550

Distrofia musculară Duchenne	310200
Deficiența de ornitin transcarbamilază	311250
Adrenoleucodistrofia	300100

(6) *Istoric familial sugestiv pentru o boală legată de X pentru care nu există un test specific de DPN.*

În acest caz determinarea sexului fetal poate fi utilă pentru a ajuta părinții cu risc să decidă continuarea sau terminarea sarcinii.

(7) *Riscul unui defect de tub neural.*

Rudele de gradul I ale pacienților cu DTN vor fi supuse DPN deoarece au un risc crescut de a avea un copil cu DTN.

(8) *Rude de gradul I cu o malformație unică (în special malformație de cord) sau un sindrom plurimalformativ (posibil mendelian)*

(9) *Agresiuni teratogene în cursul sarcinii.*

Expunerea gravidelor la teratogeni cunoscuți (vezi capitolul 14.B.2.1); afecțiuni materne (diabet zaharat, epilepsie tratată cu anticonvulsivante, fenilcetonurie).

(10) *Istoricul obstetrical pozitiv*

În cazul unor avorturi spontane recurente și/sau nou-născuți morți, deși există deseori un risc mic de recurență, se poate recurge la DPN pentru a evita o nouă sarcină anormală.

## 2. TEHNICILE DE DIAGNOSTIC PRENATAL

Spre deosebire de metode de screening prenatal, neinvazive și fără risc fetal, aplicate la un număr mare de gravide, pentru a identifica sarcinile cu risc crescut de a fi anormale, tehnicile de diagnostic prenatal sunt de regulă invazive (biopsia vilozităților coriale – BVC – , amniocenteza, cordocenteza); ele presupun prelevarea și analiza celulelor fetale pentru a stabili – la gravidele selecționate pe baza riscului genetic și/sau malformativ crescut – dacă fătul este sau nu normal. La aceste metode, folosite curent în Centrele de DPN, se adaugă o serie de *tehnici speciale* (de exemplu, diagnosticul preimplantatoriu) sau, încă, experimentale (de exemplu, selecția și analiza celulelor fetale din circulația maternă) – folosite în puține Centre profilate.

Indiferent de procedură, tehnicile de DPN trebuie să îndeplinească următoarele condiții de aplicabilitate:

- *securitatea*, care depinde de experiența celui ce aplică procedura; securitatea este exprimată prin rata avorturilor imediate sau tardive, consecutive aplicării procedurii;
- *acuratețea*, exprimată prin calitatea rezultatelor
- *controlul de calitate* ce se realizează prin utilizarea de proceduri standardizate, care vizează calificarea personalului, funcționarea echipamentelor și mai ales respectarea tehnologiilor și acuratețea rezultatelor.

Testele trebuie efectuate cât mai *precoce*, iar rezultatele se impun a fi obținute *rapid* pentru ca, în cazul în care gravida este purtătoarea unui fetus anormal, aceasta să poată beneficia de avortul selectiv, pe cât posibil *în termenul stabilit prin lege*. Desigur, tehnicile de DPN sunt relativ scumpe dar beneficiile pentru reproducerea și sănătatea familiilor sunt mari.

Tabelul 18.3. Tehnici de diagnostic prenatal

Tehnici de DPN	Timpul optim (în săptămâni)	Afecțiuni diagnosticate
----------------	--------------------------------	-------------------------

<b>Tehnici standard</b>		
a) Ecografia fetală	10-18	- Anomalii congenitale. Displazii scheletice.
b) Tehnici de diagnostic (invazive)		
▪ BVC	10-12	- Anomalii cromosomice
▪ Amniocenteza	15-18	- DTN (determinarea AFP)
- lichid		- Anomalii cromosomice; unele boli metabolice (prin analize enzimatic); unele boli moleculare (prin analiza ADN).
- celule		
▪ Cordocenteza	20-40	- Anomalii cromosomice, boli hematologice sau imunologice, boli moleculare
<b>Tehnici speciale:</b>		
▪ Amniocenteza precoce	12-14	- Defecte de tub neural. Anomalii cromosomice
▪ Analiza celulelor fetale din sângele matern	>20	- Anomalii cromosomice; unele boli moleculare (prin analiza ADN).
▪ Diagnosticul genetic preimplantatoriu	2	- Trisomiile frecvente; unele boli moleculare diagnosticate prin analiza ADN (PCR).
▪ Fetosopia	17-20	- Genodermatoze

## 2.1. ECOGRAFIA FETALĂ

Ecografia este cea mai folosită metodă de vizualizare a fătului (depășind net radiografia sau RMN) deoarece este fără riscuri pentru mamă și făt. A fost utilizată ca metodă de diagnostic prenatal încă din 1972, scopul inițial fiind cel al detectării anencefaliei. Capacitatea informativă a investigațiilor ecografice a crescut spectaculos în ultimii ani, o dată cu sporirea performanțelor aparaturii și cu formarea experților în medicina fetală.

Informațiile obstetricale oferite de ecografie depind de trimestrul în care este efectuată examinarea.

- În trimestrul I (de obicei la 10±2 săptămâni de amenoree), examenul ecografic stabilește: vârsta sarcinii și determină viabilitatea.
- În trimestrul II (de obicei la 18±2 săptămâni), ecografia permite diagnosticul gemelării, determinarea poziției placentei, vârsta gestațională – prin măsurarea diametrului biparietal și lungimea femurului, screeningul anomaliilor structurale fetale.
- În trimestrul III (de obicei la 32-34 săptămâni), investigațiile ecografice permit, determinarea dimensiunilor și poziționării fătului, aprecierea ratei creșterii, intensitatea mișcărilor fetale, sexul, anomaliile lichidului amniotic, screeningul anomaliilor.

În prezent, în numeroase țări, ecografia se efectuează de rutină la toate femeile gravide pentru evaluarea morfologiei și creșterii fătului. Metodei ecografice i se descriu două niveluri.

*Primul nivel* servește ca procedură de rutină pentru stabilirea viabilității și creșterii fetale, precum și pentru screeningul anomaliilor fetale (sunt vizualizate doar anomaliile grosiere și se pot evidenția doar anumite „semne ecografice de alarmă”); cuplurile (și unii medici) trebuie să înțeleagă *limitele acestui nivel de evaluare*, determinate de rezoluția și focusarea limitată a aparaturii, la care se adaugă timpul redus de investigație (și uneori lipsa de experiență a examinatorului în medicină fetală !); sunt posibile rezultate fals pozitive (de exemplu, chiștii intracranieni) sau fals negative (nevizualizarea multor anomalii congenitale). În scopul evitării erorilor de interpretare, suspiciunea existenței unei anomalii fetale trebuie confirmată de un ecografist expert.

*Ecografia fetală detaliată (nivelul II)* este o expertiză de finețe efectuată de specialiști în medicina fetală și practică cu aparatură performantă (cu focusare pe un anumit organ<sup>19</sup>, ecocardiografie cu Doppler<sup>20</sup>, imagini tridimensionale) atunci când există riscul apariției unor anomalii specifice. Perioada optimă pentru efectuarea examenului ecografic este situată între 16-18 săptămâni de sarcină. Sensibilitatea metodei pentru determinarea malformațiilor

<sup>19</sup> De exemplu, măsurarea dimensiunilor ventriculilor cerebrali fetali.

<sup>20</sup> Analiza Doppler apreciază amploarea fluxului sanguin în vasele ombilicale și poate defini patologia cardiacă fetală; fluxul redus cu rezistență crescută este frecvent notat în întârzierile creșterii fetale.

congenitale majore este de 40-60% dar pentru anumite tipuri de anomalii este mult mai mare (aproape 100% pentru anencefalie; 85-90% pentru spina bifida); specificitatea metodei este de aproape 99%.

Defectele fetale ce pot fi detectate în al doilea trimestru al sarcinii sunt:

- *anomalii ale sistemului nervos*: anencefalie, chist al fosei posterioare, encefalocel, displazia facială, holoprocencefalia (anomalii ale ventriculilor cerebrali și ale feții), hidrocefalia, microcefalia, mielomeningocel, poncefalia (leziuni chistice ale creierului), rachischisis, spina bifida;
- *defecte cardiovasculare*: aritmii, colecții lichidiene pericardice, defecte septale, situs inversus, defecte valvulare, anomalii vasculare, hiperplazie sau hipoplazie ventriculară;
- *anomalii toracice*: atrezia esofagiană, hernia diafragmatică, efuziuni pleurale, chisturi intratoracice;
- *malformații gastrointestinale*: absența mușchilor abdominali, ascita, limfangiom chistic, atrezie intestinală, laparochisis (extruzia para-ombilicală a viscerelor abdominale), chisturi mezenterice, omfalocel (herniere ombilicală a viscerelor abdominale);
- *malformații urogenitale*: hidronefroză, hidroureter, rinichi polichistici, atrezie renală, teratoame, valvă uretrală;
- *malformații musculo-scheletale*: artrogripoză, displazie osoasă, picior strâmb, fracturi, paralizia membrelor, reducția membrelor, defecte ale mineralizării;
- *alte anomalii*: bride amniotice, gemeni siamezi, teratoame, tumori.

Vizualizarea unor anomalii fetale multiple se impune a fi urmată de amniocenteză și de analiza citogenetică. Între 15% și 30% dintre feteșii la care se decelează ecografic anomalii morfologice prezintă aberații cromozomice. O serie de *semne ecografice de alarmă* se asociază cu un risc crescut de anomalii cromosomice. Astfel:

- îngroșarea pliului nucal identificată în trimestrul I de sarcină este sugestivă pentru sindromul Down;
- excesul de piele pe ceafă este sugestiv pentru sindromul Turner sau pentru sindromul Down;
- placenta mare sugerează prezența triploidiei, a hidropsului fetal sau a talasemiei;
- întârzierea precoce a creșterii se produce în cazul trisomiilor și a triploidiei;
- despicăturile labio-palatine sunt observate frecvent la feteșii cu trisomia sau triploidie;

*Markeri ecografici sugestivi pentru prezența unei anomalii fetale:*

- Calcificări abdominale (peritonită meconială);
- Degete permanente flexate (trisomia 18, artrogripoză);
- Defect conotruncal sau defect al trunchiului comun, manifestat ca tetralogie Fallot sau ca defect vascular (sindroamele DiGeorge și velo-cardio-facial secundare unei deleții – del22q11);
- Defecte ale osificării boltei craniene (anencefalie);
- Deformări toracice (displazie scheletică)
- Hipertrofia vezicii urinare (valvă uretrală);
- Hipodensitate osoasă (hipofosfatazie);
- Higroma chistică (sindrom Turner);
- Hipoplazia facială și despicătură palatină (trisomia 13 - holoprocencefalie);
- Fracturi (osteogenesis imperfecta);
- Număr crescut de chisturi coroidale (trisomie);
- Polidactilie (trisomie 13, sindrom Ellis Van-Creveld);
- Pterygium colli (sindrom Turner);
- Semnul lămâii – craniu în formă de lămâie (spina bifida);
- Scurtarea oaselor lungi (displazie osoasă);
- Translucența nucală (trisomia 21);
- Volum crescut al ventriculilor cerebrali (hidrocefalie);

Vom încheia prezentarea ecografiei subliniind din nou necesitatea diferențierii obiectivelor celor două niveluri de analiză, între care există o mare diferență, necesitatea utilizării unor *protocoale standardizate*, precum și faptul că ecografia se constituie într-un auxiliar *necesar* al procedurilor invazive de recoltare a celulelor fetale (spre exemplu, în amniocenteză – poziția fătului și placentei va determina poziția optimă de inserție a acului seringii de prelevare a lichidului amniotic).

## 2.2. AMNIOCENTEZA.

Amniocenteza este procedura de a obține o probă de lichid amniotic (LA) prin puncție transdominală, ghidată ecografic (figura 18.4). LA conține celule de origine fetală<sup>21</sup> care pot fi supuse testelor ADN pentru detectarea mutațiilor sau cultivate<sup>22</sup> pentru a efectua analiza cromosomilor (rezultatele se obțin, însă, după 2-4 săptămâni, ceea ce constituie un dezavantaj semnificativ); în LA pot fi realizate dozări biochimice, în special AFP și acetilcolinesteraza care (împreună cu ecografia fetală) pot diagnostica 99% din cazurile de DTN deschise.

Amniocenteza „clasică” se practică (de bicei în ambulatoriu) la 15-17 săptămâni de gestație (după prima zi a UM); în unele centre se folosește și amniocenteza „precoce”, la 12-14 săptămâni de sarcină.

În ambele cazuri, amniocenteza este precedată de o examinare ecografică atentă pentru a stabili: numărul de fetuși, conformația și viabilitatea fetală, vârsta gestațională, poziția placentei, volumul aproximativ al LA și locul puncției (în funcție de placentă și făt). Apoi sub ghidaj ecografic se introduce transabdominal (cu o mișcare lentă dar continuă) un ac de puncție rahidiană până în cavitatea amniotică. Primii ml de LA (contaminați cu celule materne) se lasă să se scurgă și apoi cu o altă seringă se aspiră circa 20 ml LA (câțiva ml în cazul amniocentezei precoce<sup>23</sup>). Proporția reușitelor este de peste 99%. În 1-2% de cazuri se poate produce o ușoară contaminare cu sânge matern. După amniocenteză se observă ecografic bătăile cordului fetal și se urmărește starea gravidei (scurgeri vaginale de LA sau sânge, contracții, febră).

Complicația majoră a amniocentezei este riscul de 0,5-1% de inducere a avortului, peste riscul bazal de 2-3% pentru *orice* sarcină în trimestrul II. Alte complicații rare sunt: scurgerile mici de LA, infecțiile și lezarea fătului. Amniocenteza precoce are o rată de avort semnificativ mai mare decât cea clasică, comparabilă cu BVC (~2,5%); la aceasta se adaugă și riscul de detresă respiratorie a noului-născut sau deformări ortopedice benigne.

### 2.3 BIOPSIA VILOZITĂȚILOR CORIALE.

Biopsia vilozităților coriale (BVC)<sup>24</sup> este metoda de obținere a unor fragmente de vilozități coriale (figura 18.5), structuri de origine embrionară ce derivă din trofoblast, partea externă a blastocistului (vezi figura 14.1). Probele obținute conțin atât celule fetale cât și celule din decidua maternă, care trebuie îndepărtate cu grijă înainte de analiză. Celulele trofoblastice pot fi utilizate pentru efectuarea unor teste ADN pentru detectarea mutațiilor și analizei cromosomice directe (datorită activității mitotice înalte a acestor celule) sau după cultivare.

BVC se efectuează la 10-12 săptămâni de gestație<sup>25</sup>, pe cale transcervicală (cu ajutorul unui cateter flexibil) sau transabdominal (cu un ac subțire de puncție rahidiană), sub ghidaj ecografic, în funcție de localizarea placentei. Efectuarea BVC în această perioadă precoce de sarcină permite obținerea mai rapidă a unor rezultate, reducând perioada de incertitudine și stresul psihologic al așteptării lor până la mijlocul trimestrului II, precum în cazul amniocentezei; în plus, dacă se optează pentru întreruperea sarcinii, aceasta se poate face la sfârșitul trimestrului I, prin metode mai facile. Dezavantajul diagnostic al metodei este că nu permite evaluarea AFP

Complicațiile BVC sunt reprezentate de sângerări (40%), avort (1-2% în plus față de nivelul bazal de 2-5% pentru perioada gestațională de 7-12 săptămâni), producerea unor malformații ale membrilor (anomaliile transverse) și feței când este practică înaintea săptămânii a 10-a de sarcină<sup>26</sup>.

### 2.4. CORDOCENTEZA

<sup>21</sup> Celulele fetale provin din descuamațiile pielii sau mucoaselor tractului urinar sau digestiv.

<sup>22</sup> Eșecurile culturii de celule amniotice sunt de circa 0,8-1%, în condițiile unei tehnici perfecte.

<sup>23</sup> În acest caz procesarea LA presupune o tehnicitate remarcabilă.

<sup>24</sup> În limba engleză CVS – de la *chorionic villus sampling*.

<sup>25</sup> Poate fi efectuată și într-un stadiu mai tardiv de sarcină dar în acest caz se numește biopsie placentară

<sup>26</sup> Mecanismele teratogenice posibile ar fi producerea unor embolii în circulația fetală sau hipoperfuzia (determinată de hemoragie feto-maternă sau spasme vasculare consecutive eliberării unor substanțe presoare)

Cordocenteza<sup>27</sup> este procedura prin care se obține o probă de 2-3 ml sânge fetal punșionând, sub ghidaj ecografic, rădăcina cordonului ombilical (proporția reușitelor sub 95%) (figura 18.6). Se practică de obicei la 18-21 săptămâni de sarcină la paciente care se prezintă târziu pentru DPN, atunci când culturile de celule amniotice nu reușesc sau dau rezultate ambigue (mozaicism) sau atunci când diagnosticul ADN nu este posibil pentru o boală ce poate fi identificată prin teste biochimice ale plasmei ori ale celulelor sanguine (unele afecțiuni hematologice sau imunologice ereditare, infecții bacteriene, virale sau parazitare). Sângele fetal necesită numai câteva zile de cultură pentru obținerea unor preparate cromosomice de foarte bună calitate. Riscul de avort datorită procedurii este 2-3%.

## 2.5. FETOSCOPIA

Fetoscopia comportă introducerea în uter pe cale transabdominală a unui instrument subțire, flexibil, denumit fetoscop, care permite vizualizarea embrionului sau a fătului și colectarea de țesuturi ale produsului de concepție (piele, mușchi, țesut hepatic). Fetoscopia detectează defecte și boli fetale ce nu pot fi sesizate prin celelalte tehnici invazive (genodermatoze, distrofii musculare, boli hepatice). Fetoscopia se practică după 20 săptămâni de sarcină și numai în scop experimental, în câteva centre specializate.

## 2.6. DIAGNOSTICUL GENETIC PREIMPLANTATORIU

Diagnosticul genetic preimplantatoriu (DGP) a fost introdus în 1990 (Handyside et al) ca o alternativă la diagnosticul prenatal, pentru cuplurile cu risc crescut de a transmite o boală ereditară la descendenții lor. În principiu, embrionii sunt produși prin tehnici de fertilizare *in vitro* (IVF) și în stadiul de clivare pot fi obținute, prin biopsie embrionară, 1-2 blastomere, care sunt analizate genetic; apoi embrionii neafecțați sunt transferați în uterul femeii, pregătită pentru sarcină.

Procedurile de diagnostic trebuie să fie precise și rapide pentru a permite transferul embrionului în aceeași zi cu efectuarea biopsiei<sup>28</sup>; în funcție de indicația diagnostică se folosesc curent două metode: amplificarea genică prin PCR - pentru diagnosticul mutațiilor genice - și analiza cromosomică prin FISH interfazic - pentru stabilirea sexului genetic al embrionului, screeningul aneuploidiilor pentru cromosomii 13,18,21, X și Y sau caracterizarea cromosomică a embrionului cuplurilor care au o anomalie cromosomică echilibrată. În consecință numărul de boli diagnosticate este mic și, uneori, se produc erori de diagnostic.

Indicațiile actuale ale diagnosticului genetic preimplantatoriu sunt următoarele:

- (1) *Selecția sexului*<sup>29</sup> la embrionii cu mutații ale cromosomului X. (Determinarea sexului genetic prin FISH, folosind sonde pentru cromosomii sexuali).
- (2) *Diagnosticul unor boli monogenice* (identificarea mutațiilor prin PCR).
- (3) *Purtătorii de anomalii cromosomice echilibrate*<sup>30</sup> - au un risc crescut de a avea descendenți cu monosomii sau trisomii parțiale (vezi capitolul 9.C.3.2).

În aceste cazuri se folosesc: a) FISH - dar numai atunci când sunt disponibile sonde pentru analiza segregării meiotice a unei translocării echilibrate; b) studiul cromosomilor după conversie interfazică (nucleul interfazic al blastomerului este convertit în nucleu metafazic după fuziunea sa cu un ovocit enucleat)<sup>31</sup>; c) hibridizare genomică comparativă, ce implică co-hibridizarea ADN extras din blastomer și a unei probe ADN control cu cromosomii unei metafaze normale. Toate aceste tehnici sunt scumpe și laborioase.

- (4) *Alte indicații*: femei cu vârsta de peste 35 de ani, cupluri cu avorturi repetate, suspiciunea unui mozaicism gonadal.

<sup>27</sup> În limba engleză PUBS- de la *percutaneous umbilical blood sampling*

<sup>28</sup> Pentru proceduri mai laborioase, embrionul se cultivă până la stadiul de blastocist.

<sup>29</sup> Tehnicile actuale pentru caracterizarea mutațiilor de pe cromosomul X sunt prea lungi pentru a fi aplicate la DGP.

<sup>30</sup> Dacă femeia este purtătoare a anomaliei este posibil un diagnostic indirect (PCGD - preconception genetic diagnosis) prin analiza cromosomilor primului globul polar, înainte de fertilizarea ovocitului.

<sup>31</sup> În acest caz se folosesc: SKY (*spectral karyotyping*) sau FISH multicolor - prin care fiecare cromosom este colorat diferit.

Cu toate progresele tehnice realizate în ultimii ani, DGP are numeroase limite tehnice și ridică unele probleme etice. Trecând peste dificultățile de a obține embrioni prin IVF, problema cea mai mare cu care se confruntă DGP este faptul că numai *una sau două celule sunt disponibile* pentru analiză; în aceste condiții și *în timpul scurt* de care se dispune pentru studiu se pot produce erori de diagnostic. Una dintre sursele acestor erori este *mozaicismul cromosomic*, frecvent la embrionii în stadiul preimplantatoriu; în aceste condiții nucleul unui blastomer nu poate fi reprezentativ pentru restul embrionului. Deși aceste erori sunt rare, diagnosticul prenatal este recomandat ulterior în toate cazurile; de aceea, în prezent, se consideră că DGP nu este încă o alternativă fericită la diagnosticul prenatal, ci mai curând o cale mai bună de a asigura cuplurile cu risc crescut că vor avea un copil normal și sănătos și/sau de a evita un avort recurent sau o întrerupere a cursului sarcinii (pentru un fetus anormal).

## 2.7. ANALIZA CELULELOR FETALE DIN SÂNGELE MATERN.

Este cunoscut faptul că la femeile gravide, una din  $10^8 - 10^9$  celule nucleate circulante își are originea în organismul fătului. Celulele fetale care circulă în sângele matern sunt de trei tipuri: limfocite, eritroblaști și celule ale sincițiotrofoblasului. Acestea pot fi identificate și izolate din sângele matern datorită diferențelor antigenice dintre mamă și fetus. Din cele trei tipuri celulare prezente în sângele gravidei, eritroblaștii par a fi cei mai adecvați pentru depistarea prenatală. Potrivit unor date recente, numărul celulelor fetale din sângele matern este mai mare în cazul sarcinilor cu fetuși prezentând aneuploidii și, în special, al celor cu trisomie 21, ceea ce ar facilita detecția unor astfel de anomalii.

Reușita izolării și asigurarea acurateții rezultatelor comportă parcurgerea a trei etape:

- identificarea celulelor fetale cu ajutorul anticorpilor monoclonali sensibili și înalt specifici,
- utilizarea unei tehnici de îmbogățire (triajul prin citometrie în flux a celulelor marcate fluorescent),
- analiza genetică a celulelor astfel obținute, utilizându-se tehnici de înaltă sensibilitate (PCR, FISH). FISH cu sonde specifice anumitor cromozomi, face posibilă stabilirea sexului fătului (coeficientul de exactitate este cuprins – la primigeste - între 94% și 100% în cazul sarcinilor care au depășit 8 săptămâni, precum și detectarea diferitelor anomalii numerice.

Înainte de aplicarea pe scară largă a metodei se impun a fi rezolvate o serie de probleme care ar putea altera rezultatele determinărilor. Dintre acestea pot fi menționate contaminarea, dificil de evitat, cu celule materne și artefactele cauzate de posibilele efecte ale incompatibilității ABO și Rh asupra supraviețuirii în circulația maternă a globulelor roșii ale fătului. Acestor inconveniente li se adaugă și faptul că limfocitele feților anteriori pot persista în circulația maternă timp de câțiva ani, genomul lor putând fi confundat cu cel al celulelor actualului produs de concepție.

Pentru moment, analiza celulelor fetale din sângele periferic matern este o metodă care operează la interfața dintre activitatea de cercetare și cea a prestării de servicii medicale. Este, totuși, de așteptat ca, într-un viitor nu prea îndepărtat, această tehnologie să-și dobândească statutul de cea mai fiabilă metodă de evaluare noninvazivă a calității produsului de concepție.

## 3. ANALIZE DE LABORATOR EFECTUATE PE CELULE FETALE

### 3.1. ANALIZA CROMOSOMILOR

Diagnosticul anomaliilor cromosomice la făt reprezintă cea mai frecventă componentă a DPN fiind indicat în prezența unei anomalii cromosomice structurale la unul dintre părinți sau dacă în familie există un copil cu o anomalie cromosomică de novo precum și la gravidele peste 35 de ani, cu triplu test pozitiv sau semne ecografice de alarmă. Testarea citogenetică prenatală nu este recomandată în următoarele situații: boli monogenice, istoric familial de defecte de tub neural, iradiieri terapeutice materno sau paterno anterioare concepției, anxietate

parentală, informarea cu privire la sexul fătului (dacă nu există istoric de boli recesive legate de cromozomul X).

Se realizează de obicei prin analiza celulelor fetale (obținute prin BVC sau amniocenteză), cultivate timp de 1-2 săptămâni. Mult mai rar, cromosomii se pot cerceta pe preparate obținute prin culturi (3 zile) de sânge fetal obținut prin cordocenteză. Strategia analizei prenatale a cromosomilor ar fi următoarea :

- în cazul unei indicații stabilite preconcepțional se va recurge la BVC (analiză directă sau prin cultură), pentru a rezolva rapid problema ;  
Celulele vilozităților coriale au index mitotic înalt și este posibilă obținerea rapidă, fără cultură, a unor preparate; calitatea cromosomilor obținuți prin metode directe este însă nesatisfăcătoare (cromosomi contractați) și permite numai detectarea anomaliilor numerice și a celor structurale mari (rezoluția marcatului cromosomic este inadecvată pentru analize detaliate). În plus circa 2% din probe pot da rezultate ambigue datorită mozaicismului cromozomic și în aceste cazuri este recomandată amniocenteza pentru a stabili dacă fătul are anomalii cromozomice. Recent s-au dezvoltat tehnicile de FISH pe nucleii interfazici pentru identificarea aneuploidiilor frecvente, ale cromosomilor 13,18,21, X și Y.
- dacă cultura de vilozități coriale nu crește sau rezultatul este incert, datorită mozaicismului cromosomic (vom reveni), sau indicația analizei este pusă mai tardiv - există încă timp pentru a analiza cromosomii prin amniocenteză;
- în cazurile rare în care cultura de amniocoite nu crește sau rezultaul este incert se va recurge la cordocenteză.

Analiza cromosomică prenatală se mai poate confrunta cu două situații dificile: mozaicurile cromosomice și cromosomii markeri sau derivativi

**Mozaicismul cromozomial.** Această condiție este rar întâlnită în citogenetica prenatală, fiind observată, în medie, la 5% dintre fături analizați în al doilea trimestru de sarcină, și numai la 1 din 3500 născuți vii.

Termenul de mozaic definește prezența într-un organism sau țesut a două sau mai multe linii celulare genetic distincte, derivate dintr-un singur zigot. Se descriu patru tipuri de mozaicuri:

- *mozaicismul adevărat* – detectat în colonii multiple din mai multe culturi primare diferite; studiile postnatale confirmă prezența sa la nou-născut; majoritatea mozaicurilor adevărate implică gonozomii, cromozomii mici: 18, 20, 21, 22 sau un cromozom marker;
- *mozaicismul monocelular* – sau mozaic de nivelul I (o celulă cu un extracromozom sau o anomalie structurală prezentă într-o singură colonie sau într-un singur flacon de cultură) ; are o incidență de circa 3% și poate fi considerat un artefact ;
- *pseudomozaicismul* - sau mozaic de nivelul II (două sau mai multe celule cu aceeași anomalie prezente într-o singură colonie sau flacon de cultură); reprezintă 0,5% din toate mozaicurile ; pseudomozaicismele cele mai frecvente interesează cromozomii 2, 3, 7, 18.
- *mozaicism limitat la placentă* (« *confined placental mosaicism* »); incidență: 1-2% din sarcinile viabile. O placentă cu cariotip anormal poate determina moartea fătului, deși cariotipul fetal este normal; invers, o placentă cu cariotip normal poate permite supraviețuirea mai îndelungată a unui făt cu anomalii cromozomiale<sup>32</sup>.

Cele mai multe mozaicuri detectate în celulele trofoblastului sunt cauzate de generarea unui extracromozom în cursul cultivării *in vitro* (pseudomozaicism) sau de contaminarea cu celule materne (mozaicism cu linii XX și XY) datorită asocierii intime între celulele materne și celulele vilozităților coriale. Diferențierea de mozaicismul adevărat este posibilă prin recursul la tehnici capabile să stabilească dacă toate celulele dintr-o colonie sunt descendente ale unei singure celule fetale.

Confirmarea și interpretarea mozaicismului reprezintă una dintre cele mai dificile probleme legate de DPN. *Confirmarea* mozaicismului se poate face numai prin analiza celulelor sângelui fetal obținut prin cordocenteză, deși o ecografie normală (fără tulburări de creștere și anomalii congenitale) este de bun augur.

---

<sup>32</sup> Cariotipul normal în placentă se poate produce prin pierderea cromosomului suplimentar prezent la făt



*Semnificația clinică a mozaicismului.* În mod obișnuit, mozaicismul diagnosticat prenatal nu se asociază cu anomalii fetale. 60% din mozaicurile ce interesează gonozomii au fenotip normal. Este totuși recunoscută relația mozaicismului placentar atât cu retardul creșterii intrauterine, cât și cu rata crescută a avorturilor. Pseudomozaicismele pot fi considerate artefacte ale culturilor pe termen lung. În schimb prezența unei linii cu trisomie autozomală în care sunt implicați cromozomii 8, 9, 13, 18, 21 sau, foarte rar, iso(12p)(sindromul Pallister-Killian) reclamă efectuarea unor investigații extensive deoarece în fenotipurile nou-născuților vii figurează, de regulă, anomalii morfologice și clinice.

**Cromosomi markeri sau derivativi.** Ocazional, într-un cariotip normal ca număr se pot observa cromosomi markeri sau o rearanjare cromozomică rară. Semnificația acestor date la fetus nu poate fi determinată fără analiza cromosomilor la ambii părinți. Dacă aceleași modificări sunt găsite la un părinte normal atunci ele pot fi considerate variante normale; rearanjările de novo neechilibrate pot cauza anomalii fetale.

### 3.2 DETERMINĂRI BIOCHIMICE PENTRU BOLI METABOLICE

Peste 100 de boli metabolice pot fi diagnosticate prenatal prin studii biochimice efectuate pe celule fetale sau lichid amniotic. Cele mai multe (fiind autosomal recesive) au un risc mare de recurență și aceasta justifică DPN. Raritatea lor este însă un impediment tehnic pentru centrele obișnuite și de aceea este bine ca gravidele cu risc să fie trimise în centre specializate.

### 3.3. ANALIZA ADN

Numeroase afecțiuni monogenice (vezi tabelul 18.2) pot fi diagnosticate prin analiza ADN, folosind metode de detectare directă a mutațiilor sau diagnosticul indirect, prin studiul unor markeri strâns înlănțuiți cu gena mutantă. Exceptând bolile comune – fibroza chistică, sindromul X fragil – analiza prenatală a ADN se face de obicei în laboratoare specializate și, cel mai bine, cunoscând mutația patogenică caracteristică unei familii.

### 4. AVANTAJELE DPN

În majoritatea țărilor din Europa, o dată cu dezvoltarea planificării familiale a crescut interesul pentru calitatea produsului de concepție și asistența prenatală și perinatală s-au ameliorat considerabil; în acest context screeningul și DPN au devenit unele dintre cele mai solicitate servicii medicale. Astfel, cuplurile cu risc genetic sau malformativ crescut au dobândit o valoroasă opțiune reproductivă: ele vor putea concepe o sarcină știind că prezența sau absența bolii la fetus poate fi confirmată prin testare. În peste 95% din cazuri rezultatele DPN sunt normale și, ca urmare, marea majoritate a cuplurilor /gravidelor cu risc vor fi asigurate că viitorul lor copil va fi sănătos, fapt care constituie principalul avantaj al DPN. Într-o mică proporție de cazuri, fetusul va fi serios afectat și, în absența unei terapii prenatale efective, cuplurile vor alege soluția întreruperii sarcinii. Acest lucru va produce, la nivelul populației, un declin al incidenței bolilor genetice severe. DPN este încă o metodă scumpă de diagnostic dar beneficiile sale pentru familie și populație, ambele interesate în nașterea de copii sănătoși, realizează o relație cost-beneficiu pozitivă. Cu certitudine screeningul și DPN se vor dezvolta în viitor și vor deveni una dintre cele mai eficiente metode de profilaxie ale bolilor genetice.

### 5. PROBLEME ETICE

scurtă prezentare cu trimiter la caoitoul 20

## INTERNET

1. Academiei Americane de Pediatrie - pagina de web cu informații legate de metodele de screening <http://www.medicalhomeinfo.org/resources/screening.html> -
2. Comitetul consultativ pentru testare genetică (SUA) <http://www4.od.nih.gov/oba/sacgt.htm>
3. GeneTests/Geneclinics home page - Seattle: University of Washington : <http://www.geneclinics.org/>
4. Informații despre tehnicile de diagnostic prenatal și indicațiile lor <http://omni.ac.uk/browse/mesh/detail/C0033053L0033053.html#1>
5. Metode de diagnostic prenatal <http://medlib.med.utah.edu/WebPath/TUTORIAL/PRENATAL/PRENATAL.html>
6. Metode de screening prenatal [http://www.geneticstesting.com/prenatal\\_genetic\\_screening/](http://www.geneticstesting.com/prenatal_genetic_screening/)
7. Site-ul oficial al GeneTest dedicat testării genetice <http://www.genetests.org>

## Bibliografie specifică selectivă

1. Aitken DA, Crossley JA, Spencer K. Prenatal screening for neural tube defects and aneuploidy. Principles and Practice of Medical Genetics. Ed. DL Remoin, JM Connor, RE Pyritz, BR Korf, Fourth Edition, Churchill Livingstone, London, Edinburgh, 2002, pp 763-401
2. Burke W, Coughlin SS et al – *Application of population screening principles to genetic screening for adult-onset conditions* – Genet Test 2001;5:201-211
3. Burke W - *Genetic testing* – N Engl J Med 2002;347:1867-1875
4. Chodirker BN, Cadrin G, Davies GA et al. Canadian Guidelines for Prenatal Diagnosis. J Obstet Gynaecol Can, 23:616-624, 2001
5. Clague A, Thomas A. – *Neonatal biochemical screening for disease* – Clin. Chim. Acta 2002;315:99-110
6. Egozcue J, Santalo J, Gimenez C, Perez N, Vidal F – *Preimplantation genetic diagnosis* – Molec. Cell Endocrinology 2000;77:21-25
7. Elias S, Simpson JL, Shulman LP. Techniques for prenatal diagnosis 805-825
8. Elias S – *Preimplantation genetic diagnosis by comparative genomic hybridization* – N Engl J Med 2001;345:1569-1571
9. Goel V - *Appraising organized screening programmes for testing for genetic susceptibility to cancer* – BMJ 2001;322:1174-1178
10. Guttmacher AE, Collins FS – *Population screening in the age of genomic medicine* – Engl J Med 2003;348:50-58
11. Harper JC, Delhanty DA. – *Preimplantation genetic diagnosis* – Current Opin Obst Gynec. 2000;12:67-72.
12. Kanavakis E, Traeger-Synodinos J. - *Preimplantation genetic diagnosis in clinical practice* / J Med Genet 2002;39:6-11
13. Wald NJ – *The definition of screening* – J Med Screen 2001;8:1-2
14. \* \* \* - *Newborn screening task Force. Serving the family from birth to the medical home: newborn screening / blueprint for the future* – Pediatrics 2000;106:389-442

# PRINCIPII DE GENETICA MEDICALA

## Cuprins

### CAPITOLUL 1 - GENETICA UMANĂ ȘI IMPORTANȚA EI ÎN MEDICINA MODERNĂ

Mircea Covic

- A. Conținutul geneticii umane.
  - 1. Genetica – știința eredității și variabilității
  - 2. Genetica umană - disciplină fundamentală, clinică și medico-socială.
- B. Omul, ereditatea și mediul.
  - 1. Individualitatea genetică și biologică.
  - 2. Determinismul caracterelor fenotipice.
  - 3. Relația Genotip → Fenotip ← Mediu.
  - 4. Omul - subiect de studiu al geneticii umane
- C. Istoria geneticii umane
  - 1. Etapa preștiințifică (→ 1865).
  - 2. Etapa fundamentării geneticii ca știință și introducerii sale în medicină (1865→ 1960) .
  - 3. Dezvoltarea geneticii medicale (1960→ 1970).
  - 4. Noua genetică umană și medicină moleculară (1980 → )
- D. Importanța geneticii în medicina modernă
  - 1. Bolile genetice
  - 2. Genetica medicală
  - 3. Medicina în era post-genomică
  - 4. Abordarea genetică în relația medic – pacient

### CAPITOLUL 2 - STRUCTURA ȘI ORGANIZAREA CELULARĂ A ADN

Mircea Covic, Ionel Sandovici, Trandafir Angheloni

- A. ADN - substratul molecular al eredității **MC**
  - 1. Evoluția concepțiilor despre natura genei.
  - 2. Demonstrarea rolului genetic al ADN.
- B. Structura ADN **MC**
  - 1. Structura primară și secundară a ADN.
  - 2. Polimorfismul structural și flexibilitatea moleculei de ADN
- C. Structura genomului uman **MC+IS**
  - 1. Date generale.
  - 2. Genomul nuclear
  - 3. Genomul mitocondrial.
  - 4. Schița secvenței genomului uman
- D. Organizarea ADN în celulă **MC+AT**
  - 1. Aparatul genetic
  - 2. Cromatina
  - 3. Cromosomii umani

### CAPITOLUL 3 - STRUCTURA, ANALIZA ȘI LOCALIZAREA GENELOR

Mircea Covic, Dragoș Ștefănescu

- A. Concepția clasică despre structura genei **MC**
  - 1. Gena - unitate de structură a materialului genetic
  - 2. Fenomenele de înlănțuire genică (linkage) și încrucișare cromosomică (crossing-over)
- B. Concepția actuală despre structura genei **MC**
  - 1. Anatomia unei gene care codifică o proteină
  - 2. Gene comune și gene specifice.
  - 3. Gene unice și familii de gene.
  - 4. Elementele genetice mobile
- C. Metode de clonare și analiză a genelor (tehnologia ADN recombinant) **MC+DS**
  - 1. Clonarea ADN în celule.
  - 2. Clonarea acelulară a ADN (metoda PCR)
  - 3. Metode de analiză a acizilor nucleici.
  - 4. Metode de analiză a proteinelor
  - 5. Tehnicile de modificare a materialului genetic.
- D. Localizarea genelor pe cromosomi (harta genică la om) **MC**
  - 1. Cartografierea genetică
  - 2. Cartografierea fizică
  - 3. Aplicațiile cartografierii genomului uman
  - 4. Proiectul genom uman

**CAPITOLUL 4 - EXPRESIA INFORMAȚIEI EREDITARE (FUNCȚIA GENEI)**

Mircea Covic, Ionel Sandovici

- A. Concepția clasică despre funcția genei **MC**
1. Gena unitate de funcție și mutație.
  2. Poligenia
  3. Pleiotropia
  4. Interacțiunile GENEI
  5. Heterogenitatea genetică
- B. Concepția actuală despre funcția genei **MC**
1. Genele controlează sinteza proteinelor
  2. Structura proteinelor
  3. Genele structurale determină secvența aminoacizilor în proteină
  4. Relația "o genă → un polipeptid" este mult mai complexă
  5. Interacțiunile genice în concepția actuală
- C. Mecanismele moleculare ale expresiei genice **MC**
1. Transcripția
  2. Translația
  3. Localizarea proteinelor
  4. Modificările post-tranlaționale ale proteinelor.
  5. Sinteza proteinelor, originea și evoluția vieții.
- D. Reglarea expresiei genelor. **IS+MC**
1. Reglarea pretranscripțională (epigenetică) a expresiei genice
  2. Reglarea transcripțională.
  3. Reglarea posttranscripțională.
  4. Reglarea translațională.

**CAPITOLUL 5 - TRANSMITEREA INFORMAȚIEI EREDITARE**

Mircea Covic, Marius Bembea, Victor Pop, Mihai Voloșciuc

- A. Replicarea ADN. **MC**
1. Proteinele implicate în replicarea ADN
  2. Mecanismul molecular al replicării ADN.
  3. Particularitățile replicării ADN la eucariote.
- B. Transmiterea informației genetice de la o celulă la celulele „fiice” **VP+MC**
1. Ciclul celular.
  2. Mitoza
- C. Transmiterea informației genetice de la părinți la descendenți **MC**
1. Gametogeneza
  2. Fecundarea
- D. Ereditatea monogenică **MC+MV**
1. Legile lui Mendel.
  2. Transmiterea caracterelor monogenice
  3. Ereditatea monogenică non - mendeliană
- E. Ereditatea poligenică și multifactorială **MB+MC**
1. Stabilirea naturii genetice a unui caracter familial non-mendelian
  2. Teoriile care explică determinismul genetic al caracterelor multifactoriale
  3. Identificarea genelor implicate în bolile multifactoriale.

**CAPITOLUL 6 - VARIABILITATEA GENETICĂ**

Mircea Covic, Iuliana Dimofte, Julieta Puiu, Ionel Sandovici

- A. Sursele de variabilitate **MC**
1. Mutațiile
  2. Recombinările genetice
  3. Migrațiile
- B. Mutațiile genice **MC+IS**
1. Tipuri și mecanisme de producere ale mutațiilor genice
  2. Consecințele genotipice și fenotipice ale mutațiilor genice
  3. Cauzele și frecvența mutațiilor genice
  4. Mecanismele reparării leziunilor ADN.
- C. Anomaliile cromosomice **MC+ID**
1. Tipurile și mecanismele de producere ale anomaliilor cromosomice.
  2. Consecințele fenotipice ale anomaliilor cromosomice
  3. Consecințele anomaliilor cromosomice neechilibrate
  4. Frecvența și cauzele anomaliilor cromosomice
- D. Polimorfismele genetice **JP+MC**
1. Polimorfisme proteice
  2. Polimorfisme ADN

**CAPITOLUL 7 - GENETICA POPULAȚIILOR**

Julietta Puiu, Emilia Severin, Mircea Covic

- |   |              |
|---|--------------|
| A. Frecvența genelor și genotipurilor într-o populație                  | <b>JP+MC</b> |
| 1. Definiția și obiectivele geneticii populațiilor                      |              |
| 2. Legea Hardy-Weinberg   |              |
| 3. Aplicațiile medicale ale legii Hardy-Weinberg                        |              |
| B. Factori care influențează frecvența genică și genotipică             | <b>MC+JP</b> |
| 1. Uniunile (încrucișările) neîntâmplătoare                             |              |
| 2. Mutațiile  |              |
| 3. Selecția   |              |
| 4. Populațiile reduse   |              |
| 5. Migrațiile și fluxul genic   |              |
| 6. Efectele acțiunilor disgenice și eugenice asupra frecvențelor genice |              |
| C. Originea și evoluția populațiilor umane                              | <b>ES+MC</b> |
| 1. Dovezile paleoantropologiei.   |              |
| 2. Dovezile genetice ale evoluției                                      |              |
| 3. "Rasele" umane   |              |

**CAPITOLUL 8 - ROLUL FACTORILOR GENETICI ÎN PRODUCEREA BOLILOR**

Mircea Covic, Ortansa Stoica, Ionel Sandovici, Vlad Gorduza

- |  |                 |
|--|-----------------|
| A. Interacțiunea dintre ereditate și mediu în producerea bolilor       | <b>MC</b>       |
| 1. Starea de sănătate și boală   |                 |
| 2. Concepții despre boală  |                 |
| B. Ecogenetica și farmacogenetica                                      | <b>OS+IS+VG</b> |
| 1. Ecogenetica   |                 |
| 2. Farmacogenetica   |                 |
| C. Bolile genetice   | <b>MC</b>       |
| 1. Clasificarea bolilor genetice                                       |                 |
| 2. Caracterele generale ale bolilor genetice.                          |                 |
| 3. Impactul și consecințele bolilor genetice asupra stării de sănătate |                 |
| D. Abordarea genetică în medicină                                      | <b>MC</b>       |

**CAPITOLUL 9 - CONSULTUL ȘI SFATUL GENETIC**

Mircea Covic, Marius Bembea, Ionel Sandovici, Dragoș Ștefănescu,

- |  |                 |
|--|-----------------|
| A. Consultul genetic                           | <b>MC</b>       |
| 1. Definiție. Obiective.                       |                 |
| 2. Cadrul organizatoric                        |                 |
| 3. Indicațiile consultului genetic             |                 |
| 4. Principiile de bază ale consultului genetic |                 |
| 5. Etapele consultului genetic                 |                 |
| B. Explorările genetice                        | <b>MC+DS+IS</b> |
| 1. Diagnosticul cromosomic                     |                 |
| 2. Diagnosticul molecular                      |                 |
| C. Sfatul genetic                              | <b>MB+MC</b>    |
| D. Serviciile de genetică clinică              | <b>MC</b>       |

**CAPITOLUL 10 - BOLILE CROMOSOMICE**

Mircea Covic, Iuliana Dimofte, Vlad Gorduza

- |   |              |
|---|--------------|
| A. Boli cromosomice autosomale.                               | <b>MC+ID</b> |
| 1. Trisomiile autosomale                                      |              |
| 2. Sindroamele cu deleții autosomale                          |              |
| 3. Sindroamele cu microdeleții și microduplicații cromosomice |              |
| B. Sindroamele cu anomalii ale cromosomilor sexuali           | <b>ID+MC</b> |
| 1. Sindromul Turner   |              |
| 2. Sindromul Klinefelter                                      |              |
| 3. Trisomia X și alte polisomii X                             |              |
| 4. Sindromul 47,XYY   |              |
| C. Tulburările de reproducere de cauză cromosomică            | <b>MC+VG</b> |
| 1. Sterilitatea feminină                                      |              |
| 2. Sterilitatea masculină                                     |              |
| 3. Avorturi spontane și nou-născuții morți.                   |              |

**CAPITOLUL 11 - BOLILE MONOGENICE**

Ionel Sandovici, Paula Grigorescu-Sido, Victor Pop, Dragoș Ștefănescu

- A. Bazele moleculare și biochimice ale bolilor monogenice. **MC+VP**
1. Mutații cu pierderea funcției.
  2. Mutații cu câștig de funcție
  3. Mutații cu dobândirea unei funcții noi
  4. Mutații asociate cu expresia heterocronică sau ectopică
- B. Boli moleculare **PGS+IS+MC**
1. Boli enzimatice (erori inascute de metabolism)
  2. Boli produse prin anomalii ale proteinelor de transport.
  3. Boli prin anomalii ale proteinelor structurale
  4. Boli prin anomalii ale proteinelor implicate în comunicarea intercelulară și controlul dezvoltării.
  5. Boli ale proteinelor implicate în controlul homeostaziei extracelulare.
- D. Boli genetice produse prin mutații dinamice **MC+DS**
1. Caractere generale
  2. Boală Huntington
  3. Distrofia miotonică

**CAPITOLUL 12 - BOLILE MITOCONDRIALE**

Dragoș Ștefănescu

- A. Structura moleculară, biogeneza și funcțiile mitocondriilor
1. Genomul mitocondrial
  2. Biogeneza și funcțiile mitocondriilor
  3. Mutațiile ADNmt
  4. Transmiterea la descendenți a mutațiilor ADNmt.
- B. Principalele tipuri de boli mitocondriale
1. Manifestările clinice ale afecțiunilor mitocondriale
  2. Tratamentul bolilor mitocondriale
- C. Mutațiile ADNmt și senescența
- D. Mutațiile ADNmt în bolile degenerative
- E. Mutațiile mitocondriale și tumorigeneza

**CAPITOLUL 13 - BOLILE MULTIFACTORIALE**

Marius Bembea, Adrian Covic, Mircea Covic

- A. Bolile comune ale adultului **AC+MB+MC**
1. Boala coronariană.
  2. Hipertensiunea arterială
  3. Diabetul zaharat
  4. Astmul bronșic
  5. Bolile neurodegenerative: boala Alzheimer și boala Parkinson
  5. Psihozele
  6. Cancerul
  7. Obezitatea
  8. Alcoolismul
- B. Malformațiile Congenitale Multifactoriale **MB+MC**
1. Defectele de tub neural
  2. Hidrocefalia
  3. Malformațiile congenitale de cord
  4. Despicăturile labiale și despicăturile palatine
  5. Alte anomalii congenitale izolate
- C. Retardul mental **MC**

**CAPITOLUL 14 - GENETICA DEZVOLTĂRII ȘI ANOMALIILE CONGENITALE**

Ionel Sandovici, Mircea Covic, Dragoș Ștefănescu, Andra Hurjui

- A. Genetica dezvoltării **IS+DS+AH**
1. Categoriile de gene implicate în controlul dezvoltării
  2. Procese majore în cadrul dezvoltării embrionare
  3. Rolul apoptozei în dezvoltare
  4. Senescența
- B. Anomaliile Congenitale **MC**
1. Clasificarea anomaliilor congenitale.
  2. Cauzele anomaliilor congenitale.
  3. Conduita practică în diagnosticul anomaliilor congenitale

- 4. Profilaxia anomaliilor congenitale
- C. Sexualizarea normală și patologică IS+MC
  - 1. Embriologia aparatului genital
  - 2. Controlul genetic și hormonal al sexualizării
  - 3. Tulburări ale dezvoltării sexuale
  - 4. Conduita practică în tulburările de sexualizare

## CAPITOLUL 15 - RETARDUL MENTAL

**Mircea Covic, Cristina Rusu**

- A. Date generale: definiție, clasificare, prevalență
- B. Etiologia retardului mental
  - 1. Cauzele genetice și negenetice ale retardului mental
  - 2. Retardul mental legat de X (RMLX)
- C. Evaluarea diagnostică a retardului mental
  - 1. Anamneza și evaluarea clinică
  - 2. Teste de diagnostic
- D. Sfatul genetic în retardul mental.

## CAPITOLUL 16 - GENETICA SISTEMULUI IMUN

**Petre Cianga, Mircea Covic**

- A. Generalități despre sistemul imun
- B. Mecanismele genetice care stau la baza generării diversității imunoglobulinelor
  - 1. Formarea lanțurilor ușoare
  - 2. Formarea lanțurilor grele
  - 3. Mecanismul rearanjării genelor care codifică regiunea variabilă
  - 4. Factori care contribuie la generarea diversității imunoglobulinelor
  - 5. Asocierea genei constante și comutarea de clasă
- C. Mecanismele genetice care stau la baza generării diversității TCR
- D. Complexul major de histocompatibilitate
  - 1. Genele MHC
  - 2. Proprietățile și funcțiile sistemului HLA
  - 3. Sistemul HLA și asocierea cu diverse afecțiuni
- E. Imunodeficiențele.

## CAPITOLUL 17 - GENETICA BOLII CANCEROASE

**Ionel Sandovici, Dragoș Ștefănescu, Mircea Covic**

- A. Clase de gene implicate în dezvoltarea cancerului
  - 1. Oncogenele
  - 2. Genele supresoare de tumori
- B. Anomalii citogenetice în cancer
  - 1. Anomalii cromozomice numerice
  - 2. Anomalii cromozomice structurale
  - 3. Amplificările genice
- C. Evoluția multistadială a cancerelor
  - 1. Imortalizarea celulelor tumorale
  - 2. Modificări epigenetice în cancer
  - 3. Mutații ale ADN mitocondrial
  - 4. Angiogeneza tumorală
  - 5. Invazia și metastazarea
  - 6. Modele de evoluție multistadială a cancerelor
- D. Predispoziția genetică în cancer
  - 1. Cancerele ereditare
  - 2. Cancerele familiale
  - 3. Cancere cu predispoziție genetică fără istoric familial
- E. Noi perspective în diagnosticul și tratamentul cancerelor

## CAPITOLUL 18 - PROFILAXIA BOLILOR GENETICE

**Dragoș Ștefănescu, Mircea Covic**

- A. Principalele direcții de profilaxie a bolilor genetice
- B. Screeningul populațional al bolilor genetice
  - 1. Principii de screening populațional
  - 2. Screeningul prenatal
  - 3. Screeningul neonatal

4. Screeningul populațional al heterozigoților
5. Screeningul familial. Diagnosticul presimptomatic. Registrele genetice

- C. Diagnosticul prenatal
1. Indicațiile diagnosticului prenatal
  2. Tehnicile de diagnostic prenatal
  3. Analize de laborator efectuate pe celule fetale
  4. Avantajele DPN
  5. Probleme etice

## **CAPITOLUL 19 - TRATAMENTUL BOLILOR GENETICE**

**Ortansa Stoica, Ionel Sandovici, Mircea Covic, Georgiana Taușer**

- A. Strategii de terapie ale bolilor genetice
1. Metode de tratament care acționează la nivelul fenotipului
  2. Tratamentul tulburărilor metabolice sau biochimice asociate bolilor genetice
  3. Metode de tratament care acționează la nivelul proteinei deficitare
  4. Metode de tratament bazate pe modularea farmacologică a expresiei genice
  5. Terapia celulară
- B. Terapia genică
1. Terapia genică somatică
  2. Terapia genică germinala
  3. Boli ereditare candidate pentru terapia genică
  4. Terapia genică pentru bolile neereditare
  5. Considerații etice privind terapia genică

## **CAPITOLUL 20 - PROBLEME ȘI DILEME ETICE ÎN GENETICA MEDICALĂ**

**Vasile Astărăstoae, Cristina Gavrilovici, Ortansa Stoica, Mircea Covic**

- A. Principiile generale ale bioeticii
1. Respectarea autonomiei
  2. Nonvătămarea și beneficiul persoanei
  3. Respectarea confidențialității și protejarea intimității
  4. Dreptate și echitate
  5. Dileme și conflicte etice.
  6. Datoriile medicilor confrunțați cu boli genetice
- B. Probleme etice specifice unor activități de genetică medicală
1. Sfatul genetic
  2. Testarea genetică
  3. Screeningul populațional și familial
  4. Terapia genică
- C. Reflexii bioetice asupra omului și umanității

**Glosar**

**Index**