

MARIO PLEBANI

## MEDICINA MOLECOLARE NELLA DIAGNOSTICA\*

Esistono numerose definizioni della «medicina molecolare», ma tutte fanno riferimento ad un nuovo modo di intendere la pratica della medicina con un' enfasi per la personalizzazione dell' approccio alla diagnostica e cura delle patologie. Anzi, per definizione, la medicina molecolare e personalizzata si focalizzano sulla prevenzione, identificazione dei fattori di rischio, diagnosi precoce e terapie mirate.

Di certo, è sconvolgente pensare che la scoperta delle basi biochimiche degli acidi nucleici ad opera di Crick e Watson risalga al 1953 e che, a soli cinquanta anni di distanza, sia stato portato a termine il progetto di sequenziamento del genoma umano.

L'evoluzione delle conoscenze e delle tecnologie è talmente rapida, e si è detto che segue una crescita logaritmica, da consentire già oggi il sequenziamento del genoma di un soggetto in pochi giorni ed a costi che stanno progressivamente diminuendo fino a valori di circa 1000 dollari. In meno di dieci anni si è passati da tecniche di sequenziamento del genoma umano che richiedevano settimane di lavoro e costi superiori a circa 100 milioni di dollari ai tempi e costi attuali: il genoma «low cost» è una realtà.

La medicina molecolare, pertanto, gioca un ruolo centrale nell'evoluzione della moderna medicina, come illustrato nella figura 1.

Le conoscenze a livello molecolare sono indispensabili per sostenere l'evoluzione verso la personalizzazione del processo diagnostico e terapeutico e, pertanto, sono utilizzate sia nello studio del genoma del singolo individuo, sia nello sviluppo di farmaci che individuano precisi bersagli molecolari.

I principali obiettivi della medicina molecolare sono:

1. lo studio e la comprensione delle alterazioni molecolari che stanno alla base del fenotipo patologico e l'uso delle metodiche che contribuiscono alla loro identificazione (diagnostica molecolare);
2. lo sviluppo di farmaci molecolari che colpiscono selettivamen-

\* Comunicazione letta l'11 febbraio 2011 nell'Odeo Olimpico.

te i bersagli a livello molecolare che sono tipicamente coinvolti nelle specifiche malattie;

3. una nuova filosofia nell'approccio al singolo paziente (personalizzazione);

4. una nuova relazione fra medicina e società, vista la crescente focalizzazione sulla prevenzione e sul mantenimento della qualità di vita.

### *Complessità biologica e malattie monogeniche*

Il completamento della mappatura del genoma umano, tuttavia, ha dimostrato quanto sia ancora lunga la via verso la conoscenza dei meccanismi molecolari che sono alla base delle patologie più frequenti nella società moderna. Infatti il rapporto fra il numero di geni e la funzione degli stessi, le modifiche che influenzano il fenotipo senza alterare il genotipo (epigenetica) e le interazioni fra geni ed ambiente rendono conto della complessità biologica. Questa complessità biologica, a sua volta, rende necessario incentivare l'attività di ricerca che deve ulteriormente chiarire importanti elementi che stanno alla base delle malattie e del rischio di malattia. Come si può osservare nella figura 2, l'interazione fra geni, la loro trascrizione, la codifica per il proteoma sono alla base della complessità biologica che, a sua volta, determina la genesi delle patologie che colpiscono l'uomo.

La complessità biologica spiega perché non sia immediato risalire dal fenotipo e dalla «faccia visibile» delle patologie alla loro natura molecolare, ed ancor più come sia difficile la terapia delle stesse patologie.

Già ora, peraltro, la medicina molecolare svolge un ruolo determinante nell'assistenza, specialmente per quanto riguarda la diagnosi delle **malattie monogeniche**. Per queste malattie, che hanno una modesta prevalenza (circa 1 caso su 2000 soggetti), il rapporto genotipo-fenotipo è diretto e la diagnosi molecolare è indispensabile anche per valutare il rischio di trasmissione. Oggi si conoscono circa 7000 entità, delle quali 2000 con difetto biochimico conosciuto: per una percentuale compresa fra 30 e 40% di queste malattie, è disponibile la diagnosi molecolare. Le più note di queste patologie sono: Talassemia, emofilia A, fibrosi cistica, distrofia muscolare di Duchenne.

### **Malattie poligeniche**

Molto più complessa è la situazione, sia a livello causale che diagnostico, delle malattie poligeniche, ossia causate da due o più geni

e, soprattutto, dall'interazione fra questi e l'ambiente. La frequenza di queste malattie è più elevata di quelle monogeniche e soprattutto rappresenta le cause di morbilità e mortalità prevalenti nella popolazione dei Paesi sviluppati. Fra queste, il diabete mellito, l'ipertensione arteriosa, la malattia coronarica ed il cancro.

Benché siano sempre più numerose le ricerche sulla genetica, e sui geni coinvolti in queste malattie, ad esempio gli studi che dimostrano un'associazione fra polimorfismi genetici e le malattie stesse, esistono varie problematiche nell'utilizzo clinico di queste acquisizioni. Ad esempio, è stata dimostrata la presenza di numerosi polimorfismi correlati all'elevata prevalenza del diabete mellito nella popolazione degli Indiani Pima. Tuttavia, ricerche effettuate sugli antenati di questi soggetti hanno dimostrato l'assenza di una patologia conclamata quando gli stessi vivevano allo stato selvaggio, all'aperto, cibandosi delle vittime della loro caccia che li costringeva a una vita molto attiva. Trasferiti nella civiltà del McDonalds e della sedentarietà, le variazioni genetiche presenti hanno potuto estrinsecarsi e manifestarsi fenotipicamente.

Per tutte queste malattie poligeniche, quindi, il rischio genetico rappresenta un'informazione che va attentamente valutata nel contesto della storia del soggetto, delle sue abitudini alimentari e stili di vita e dell'interazione con l'ambiente. Fuori da questo contesto clinico, l'informazione genetica, di per sé, può comportare solo danni psicologici ed economici.

### **Farmacogenetica e farmacogenomica**

È provato e ben noto da tempo che le differenze nella metabolizzazione e risposta ai farmaci hanno una base genetica. La farmacogenetica, quindi, si propone di personalizzare la somministrazione delle terapie, evitando eventi avversi, identificando i soggetti che non rispondono (non responders) o che rispondono in modo limitato (poor responders) ai farmaci. Le basi genetiche della risposta ai farmaci vanno sempre integrate con altre variabili sia intrinseche (età, razza, sesso ed eventuali patologie d'organo) che estrinseche (fumo, dieta, consumo di alcolici etc.) per realizzare il detto «il farmaco giusto, nella dose giusta, al paziente giusto e al tempo giusto».

Esiste una lista di farmaci per i quali, già al momento dell'approvazione del loro utilizzo clinico, sono stati identificati validi biomarcatori genetici. Fra questi, il TPMT (tiopurina S-metiltransferasi) per l'azatioprina, il promotore del gene UGT1A1 (glucuronil transferasi) per l'IRINOTECAN ed alcuni enzimi del Citocromo P450 per molte

categorie di farmaci che spaziano dagli antidepressivi, a cardioattivi, a chemioterapici e anticoagulanti.

Benché vi siano solide evidenze scientifiche e tecnologie mature per l'analisi dei polimorfismi genetici di molti farmaci, tuttavia queste analisi sono ancora scarsamente richieste ed utilizzate nella pratica clinica. I motivi sono vari e sono stati analizzati in alcune pubblicazioni che sottolineano l'impreparazione della classe medica a modificare abitudini e protocolli sulla base dei dati farmacogenetici anche per il costo delle analisi stesse. Tuttavia è da ricordare che gli studi farmacogenetici rappresentano una tipologia di analisi «once in life», ossia che non vanno ripetute nel tempo, dato che il patrimonio genetico non si modifica (se non in rarissimi casi). La nostra esperienza nello studio dei geni che presiedono alla metabolizzazione del warfarin, il più utilizzato farmaco anticoagulante orale, dimostra non solo l'accuratezza diagnostica dei metodi sviluppati ma soprattutto l'efficacia clinica nell'evitare episodi emorragici e/o trombotici dovuti al tempo necessario per somministrare la dose appropriata del farmaco nei soggetti con metabolismo lento o ultrarapido.

In generale, oggi si ritiene che i principi della farmacogenetica, e quindi i test corrispondenti, vadano utilizzati nella pratica clinica quando sono realizzate almeno due condizioni: a) validità dei metodi di analisi; b) consenso nella comunità scientifica sull'importanza del/i biomarcatore/i genetici per la personalizzazione dei dosaggi terapeutici.

Altro aspetto strettamente legato al precedente è la farmacogenomica, ossia lo sviluppo di farmaci «molecolari» che vengono indirizzati contro i bersagli specifici che stanno alla base delle malattie. Esempi già noti di questa nuova tipologia di farmaci capaci di aggredire selettivamente i bersagli molecolari, riducendo gli effetti avversi, sono il glivec nelle leucemie mieloidi croniche, l'Herceptin (trastuzumab) nel carcinoma mammario che esprime il recettore specifico del fattore di crescita epidermico umano (HER 2/neu) e l'Iressa (gefitinib) nei tumori non a piccole cellule del polmone. Questa nuova generazione di farmaci, molto specifici, selettivi ed efficaci ma anche molto costosi, necessita di biomarcatori che permettano di somministrare il farmaco solamente nei pazienti «recettivi», ossia in presenza dei bersagli molecolari specifici. È per questo che negli ultimi anni, vi è stato un support da parte dell'Industria farmaceutica dell'attività di ricerca e sviluppo dei cosiddetti «companion diagnostics», ossia di marcatori capaci di guidare la somministrazione appropriata dei farmaci molecolari. Anche in Italia, l'AIFA (agenzia del farmaco) ha legato la somministrazione di alcuni di questi nuovi farmaci alla positività di biomarcatori specifici (ad esempio l'Herceptin – transtu-

zumab può essere somministrato solamente in tumori che esprimono una positività per HER-2/neu).

In questo caso, quindi la medicina molecolare si estrinseca nell'identificazione di bersagli selettivi, sviluppo di farmaci specificamente diretti verso di essi e somministrazione del farmaco guidata dalla positività per i bersagli selettivi identificati.

### **Terapia genica**

Le conoscenze delle basi molecolari di gravi malattie, incurabili con le terapie farmacologiche, hanno portato a sviluppare nuove prospettive terapeutiche che trovano nella «gene therapy» la massima espressione.

Per terapia genica si intende il trasferimento di materiale genetico allo scopo di prevenire o curare una malattia. Nel caso di malattie genetiche consiste essenzialmente nel trasferire la versione «funzionante» del gene in modo da rimediare al difetto. Può essere applicata a cellule somatiche, nel qual caso il difetto viene curato esclusivamente nel paziente soggetto alla terapia, e a cellule germinali, rendendo possibile la trasmissione alle generazioni successive. La conoscenza del difetto genetico o dell'alterazione genetica è alla base dell'introduzione, attraverso vettori virali (ad es.: adenovirus, retrovirus) o di altra natura (ad es.: liposomi, gene gun), di cellule prive del difetto o, nel caso di gene mancante, arricchite dello stesso. Le terapie geniche hanno ormai superato la fase di sperimentazione, specie nel caso di alcune malattie oncoematologiche e della coagulazione, come nel caso dell'emofilia.

### **Medicina molecolare e traslazionale**

È evidente che il bagaglio di conoscenza teorica sulla natura genetica delle malattie e lo sviluppo delle tecniche di biologia molecolare hanno creato le basi della medicina molecolare e personalizzata. Tuttavia, se si osserva ancor oggi cosa avviene nella pratica clinica, non può che sorgere spontanea la domanda del perché gli enormi sviluppi scientifici degli ultimi decenni non siano stati tradotti in altrettanto sconvolgenti sviluppi clinici.

La storia di quella che oggi viene chiamata «medicina traslazionale», ossia della traduzione dell'innovazione scientifica in pratica assistenziale, dimostra che vi sono numerosi problemi nel trasferimento della conoscenza.

Il primo è proprio di natura culturale ed è legato alla difficoltà, specie per i medici che nel percorso «scolastico» non avevano ricevuto un insegnamento sulla genetica, intesa in senso lato, di capire pienamente ed utilizzare queste nuove armi diagnostiche e terapeutiche.

Il secondo motivo è la preoccupazione per una possibile esplosione dei costi per il sistema sanitario. In effetti, il consumismo applicato agli studi sugli acidi nucleici può determinare effetti drammatici non tanto per la spesa legata alle indagini, ma per i costi legati alle successive tappe ed alle ricadute di un'informazione scollegata da una corretta interpretazione. Va pertanto sottolineato, ancora una volta, come il counselling sia un momento fondamentale in ogni indagine molecolare. La richiesta di esami e la successiva interpretazione trovano un razionale solo se rientrano nel contesto clinico, della visita del paziente ed all'interno di tutte le altre necessarie informazioni, sia di tipo anamnestico che di storia familiare, che sono necessarie per le successive decisioni diagnostiche e/o terapeutiche.

Terzo, la medicina molecolare ha ancora necessità di avanzare nella conoscenza di meccanismi e interazioni che possono meglio spiegare la comparsa delle malattie e fornire migliori indicazioni per diagnosi precoci e trattamenti più mirati. Insomma, la strada della ricerca non vede mai il cartello «fine».

### **Alcune voci bibliografiche**

- 1) Kumar D. *The personalised medicine. A paradigm of evidence-based medicine*. Ann Ist Super Sanita 2011;47(1):31-40.
- 2) Jain KK. *Personalised medicine for cancer: from drug development into clinical practice*. Expert Opin Pharmacother 2005 Aug;6(9):1463-76.
- 3) Ong FS, Das K, Wang J, Vakil H, Kuo JZ, Blackwell WL, Lim SW, Goodarzi MO, Bernstein KE, Rotter JI, Grody WW. *Personalized medicine and pharmacogenetic biomarkers: progress in molecular oncology testing*. Expert Rev Mol Diagn 2012 Jul;12(6):593-602.
- 4) Love D, Stratton E, Stocum M. *Best practices for companion diagnostic and therapeutic development: translating between the stakeholders*. N Biotechnol 2012 Sep 15;29(6):689-94.
- 5) Gökmen-Polar Y, Badve S. *Molecular profiling assays in breast cancer: are we ready for prime time?* Oncology 2012;26(4):350-6.
- 6) Plebani M. *Evaluating laboratory diagnostic tests and translational research*. Clin Chem Lab Med 2010;48(7):983-8.

- 7) Littman BH, Di Mario L, Plebani M, Marincola FM. *What's next in translational medicine?* Clin Sci 2007 Feb;112(4):217-27.
- 8) Plebani M, Marincola FM. *Research translation: a new frontier for clinical laboratories.* Clin Chem Lab Med 2006;44(11):1303-12.

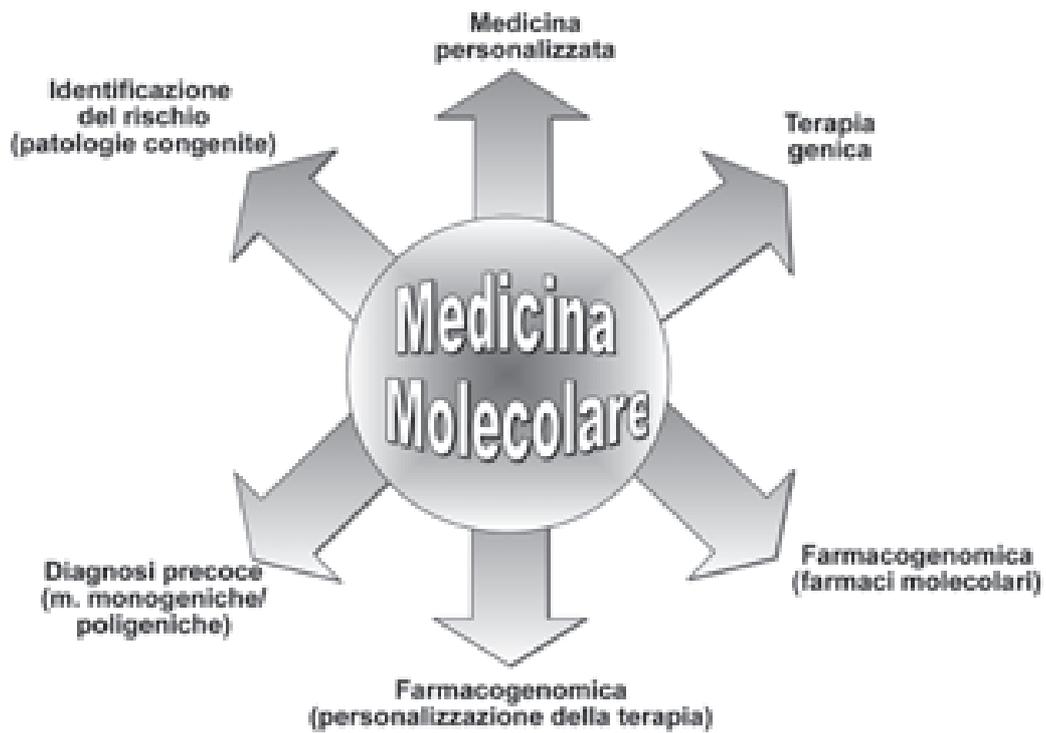


Figura 1. Medicina molecolare, medicina personalizzata e diagnostica.

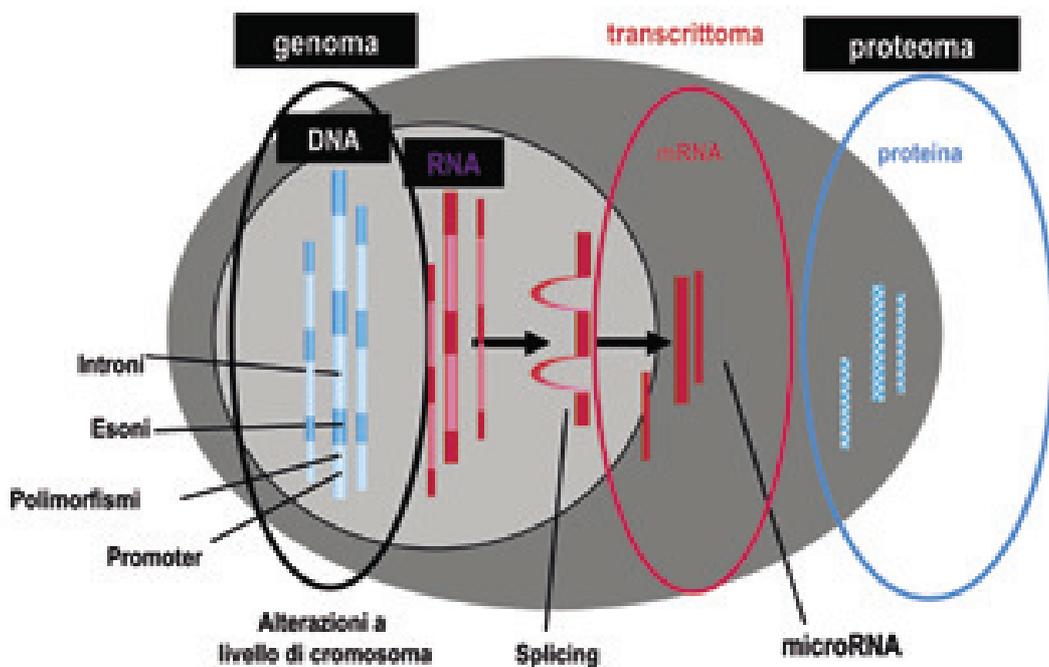


Figura 2. Complessità biologica.