

6

LA BIOPSIA DELL'EMBRIONE E LA DIAGNOSI PREIMPIANTO



INDICE

- Introduzione	Pag. 3
- Indicazioni alla tecnica	Pag. 4
- Cenni di storia delle tecniche	Pag. 4
- Come si eseguono le tecniche di biopsia	Pag. 6
- Come si eseguono le tecniche di lettura e diagnosi	Pag. 8
- Efficacia ed efficienza delle tecniche	Pag. 14
- I risultati delle metodiche eseguite da SISMER	Pag. 15
- Come accedere al programma	Pag. 15
- Consenso informato Diagnosi preimpianto su Globuli polari, blastomeri e cellule del trofocodermia per la ricerca di aneuploidie	Pag. 23
- Consenso informato diagnosi reimpianto per la ricerca di anomalie strutturali cromosomiche o malattie genetiche	Pag. 27



BIOPSIA DELL' OVOCITA E DELL' EMBRIONE

Introduzione

La biopsia dell'ovocita consente di estrarre i globuli polari che vengono estrusi dall'ovocita stesso nel corso della propria maturazione, mentre la biopsia dell'embrione prevede la rimozione di una o più delle cellule che lo costituiscono. Il materiale prelevato è utilizzato per eseguire la diagnosi genetica preimpianto (conosciuta con la sigla PGD) di malattie genetiche quali la fibrosi cistica e la talassemia, o di anomalie cromosomiche, sia relative alla struttura dei cromosomi che al numero degli stessi (in questo caso la sigla identificativa è PGS). È inoltre possibile, sia per PGD che per PGS, eseguire la biopsia delle blastocisti.

Indicazioni alla tecnica

Queste metodiche sono applicate in diversi gruppi di pazienti:

- 1) Coppie portatrici di patologie genetiche che possono essere trasmesse alla prole e il cui elenco (incompleto poiché viene costantemente aggiornato) è riportato nella Tabella I.
- 2) Pazienti infertili o subfertili che si sottopongono a programmi di concepimento assistito (FIVET o ICSI) con scarse possibilità di successo perché la loro storia riproduttiva ha già dimostrato una difficoltà al concepimento sia naturale che assistito. In particolare, coppie le cui partner femminili hanno compiuto 38 anni oppure hanno fallito tre cicli di trattamento FIVET o ICSI pur avendo eseguito un trasferimento di embrioni considerati potenzialmente in grado di dare origine ad una gravidanza; pazienti con un cariotipo alterato a causa della presenza di linee cellulari a mosaico a carico dei cromosomi sessuali, o gonosomi. Più recentemente, le indicazioni sono state estese a pazienti azoospermici che devono ricorrere al prelievo di spermatozoi dalle vie seminali mediante le tecniche microchirurgiche di MESA e TESE e che hanno fallito almeno un ciclo ICSI in precedenza.
- 3) Pazienti portatori di traslocazioni nel loro patrimonio cromosomico. Le traslocazioni possono essere considerate come delle anomalie di posizione di “pezzi” più o meno lunghi di cromosomi che possono portare alla nascita di bambini con alterazioni cromosomiche più gravi di quelle di cui sono portatori i genitori. Molto spesso inoltre, queste alterazioni inducono il verificarsi di aborti ricorrenti o impediscono il concepimento sia naturale che assistito. Dal punto di vista medico si suddividono in traslocazioni robertsoniane e reciproche (Tabella II).
- 4) Pazienti nella cui storia riproduttiva sono presenti due o più aborti non dovuti a cause “meccaniche” quali patologie dell’ utero (sinechie, fibromi, malformazioni congenite etc.).

Vi sono inoltre altre patologie che potrebbero beneficiare delle tecniche in questione, ma in mancanza di dati scientifici comprovati, queste non verranno descritte in quanto ancora oggetto di studio.

Cenni di storia delle tecniche

Alla metà degli anni 80 il ricercatore australiano Alan Trounson ipotizzò la possibilità di rimuovere, senza danneggiarla, una cellula da un embrione allo stadio di 8 cellule. A quel tempo una delle ricercatrici del nostro gruppo era in Australia presso il dipartimento diretto da Trounson e partecipò ai primi studi utilizzando come modello sperimentale il topo.



Agli inizi degli anni 90 Alan Handyside, ricercatore a Londra, pubblicò la prima gravidanza ottenuta dopo biopsia degli embrioni eseguita allo scopo di evitare il trasferimento di embrioni affetti da una patologia genetica.

Nel 1993 l'incontro, in occasione di un congresso internazionale, tra Santiago Munné e Luca Gianaroli creò una opportunità di collaborazione che si rivelò negli anni unica per capacità di produrre informazioni scientifiche in grado di aiutare alcune categorie di coppie infertili.

A quei tempi Munné stava mettendo a punto una tecnica in grado di “contare” i cromosomi presenti in una unica cellula. Da questi studi nacque l'idea che potevano esistere categorie di pazienti che producevano una percentuale elevata di embrioni cromosomicamente alterati e, di conseguenza, non in grado di impiantarsi qualora trasferiti nell' utero della paziente.

Contemporaneamente, con un approccio diverso, Yury Verlinsky a Chicago cominciò a produrre dati analoghi rimuovendo i globuli polari che rappresentano il prodotto di scarto della cellula uovo prima e dopo l'avvenuta fecondazione. La tecnica, molto promettente e meno invasiva per l'embrione, soffre del fatto che, ovviamente, non è in grado di studiare la componente maschile dell'eventuale problema genetico o cromosomico.

Nel 1997 escono le prime pubblicazioni condivise ed accettate dalla comunità scientifica internazionale e da allora le riviste scientifiche internazionali di settore più prestigiose pubblicano su base regolare gli studi del nostro gruppo e degli altri gruppi che nel contempo si sono cimentati nell'impiego di questa tecnologia.

Ad oggi sono state formate due organizzazioni scientifiche che si interessano specificatamente di questo argomento: la Preimplantation Genetic Diagnosis International Society (PGDIS) e il Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium della Società Europea di Riproduzione Umana ed Embriologia (ESHRE PGD Consortium). Entrambi i gruppi si incontrano regolarmente almeno una volta all'anno per scambiarsi idee, progetti ed opinioni nel tentativo di far progredire il più rapidamente possibile queste tecniche.

Come si eseguono le tecniche di biopsia

La biopsia dell'ovocita fecondato avviene attraverso la rimozione di entrambi i globuli polari (**Figura 1**).

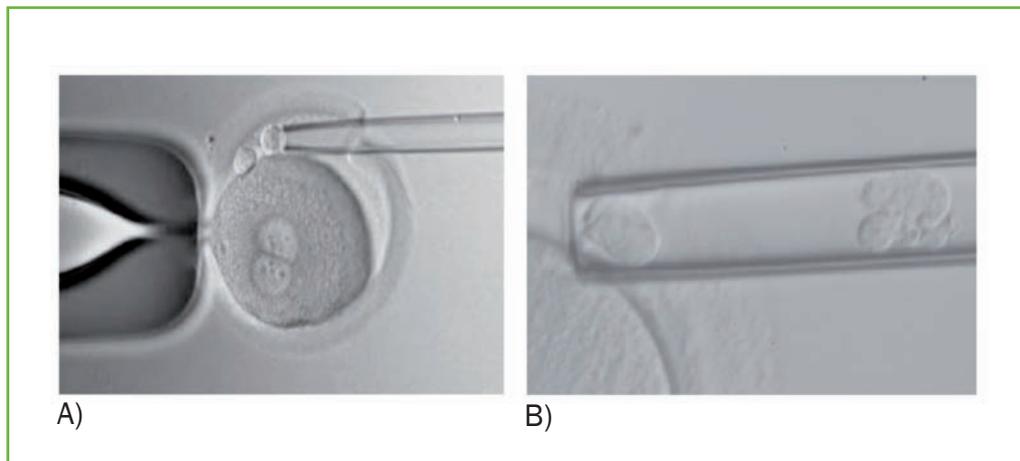


Figura 1. Biopsia dei globuli polari dall'ovocita fecondato. (A) Un sottile microago di vetro è introdotto nella zona pellucida che circonda l'ovocita ed entrambi i globuli polari sono rimossi (B) per l'analisi genetica o cromosomica.

Il primo e il secondo globulo polare vengono estrusi per dimezzare il corredo cromosomico dell'ovocita e fare così “posto” ai 23 cromosomi dello spermatozoo. Il secondo globulo polare viene espulso dall'ovocita quando questo è già fecondato. È in questo lasso di tempo che con una tecnica chimica o meccanica o attraverso una fonte di luce coerente (laser) si procede alla apertura della zona pellucida ed alla introduzione di un microago in grado di aspirare i globuli polari che successivamente verranno preparati per la lettura e per la diagnosi.

Ulteriori informazioni sull'analisi cromosomica della cellula uovo e in particolare sulla rimozione e diagnosi del primo globulo polare si trovano nel fascicolo informativo n° 10.

La biopsia dell'embrione si effettua invece due giorni dopo l'avvenuta fecondazione nell'ovocita. La metodica è molto simile a quella di prelievo dei globuli polari con la differenza che la rimozione di una cellula è una manovra più delicata per il rischio di danneggiare le cellule vicine a quella che si vuole rimuovere (**Figura 2**). Se la tecnica è eseguita correttamente non vi sono rischi per l'embrione, come comprovato da diversi studi già pubblicati sugli animali e sull'uomo. Come nel caso della biopsia del globulo polare, la cellula rimossa viene poi preparata per il fissaggio su vetrino o per la lettura attraverso sofisticate tecniche di biologia molecolare (ad esempio la PCR).

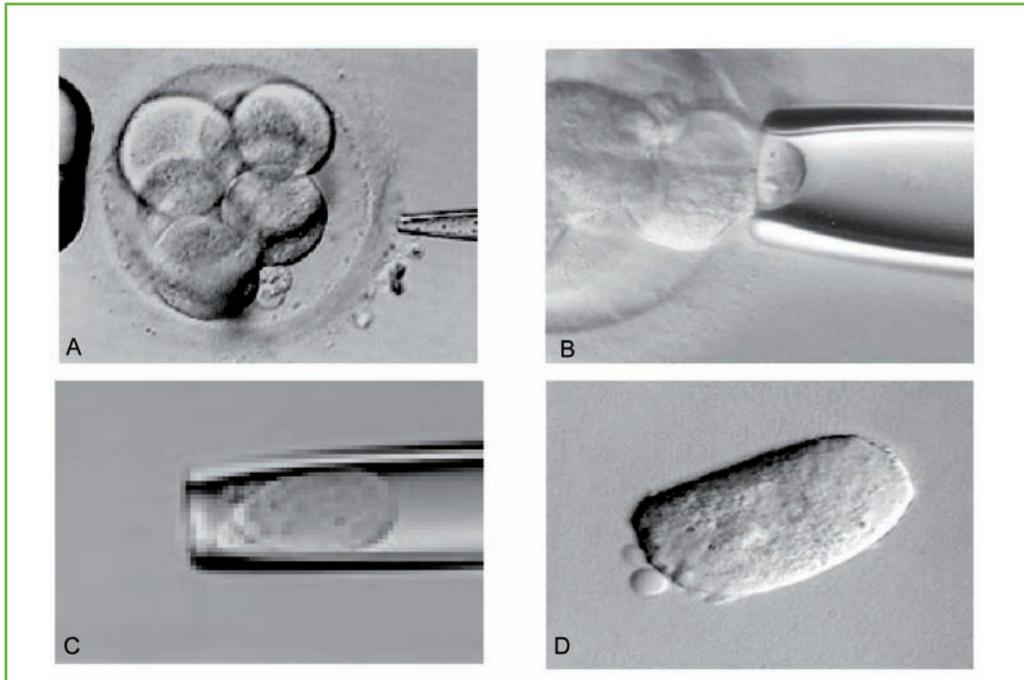


Figura 2. Biopsia dell'embrione. Si crea un'apertura nella zona pellucida, l'involucro che racchiude l'embrione (A), attraverso la quale si procede all'aspirazione di una cellula (B). Una volta completata la rimozione della cellula (C), questa viene rilasciata (D) e predisposta per l'analisi genetica.

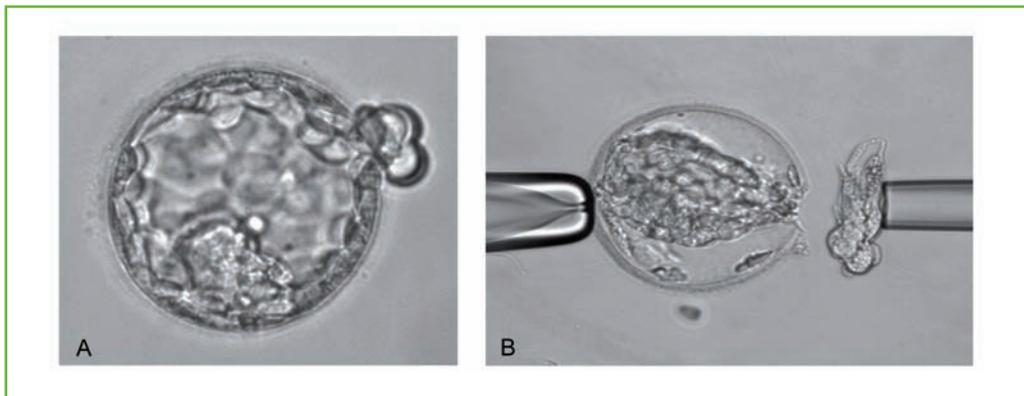


Figura 3. Biopsia della blastocisti. Un gruppo di cellule esce spontaneamente attraverso l'apertura indotta nella zona pellucida (A); queste cellule sono prelevate (B) e preparate per l'analisi genetica.

In tempi più recenti, si è messa in atto una nuova strategia che consiste nella biopsia della blastocisti, lo stadio embrionale che l'ovocita fecondato raggiunge 5 giorni dopo l'inseminazione e che è costituito da oltre 60 cellule (**Figura 3**). In questo caso è possibile rimuovere varie cellule, di solito 5 o 6, rendendo così più agevole l'analisi genetica successiva.

Come si eseguono le tecniche di lettura e diagnosi

Le tecniche principali di lettura della cellula (e di conseguente diagnosi) sono due: la **FISH** (dall'inglese Fluorescence In Situ Hybridization) e la **PCR** (dall'inglese Polymerase Chain Reaction).

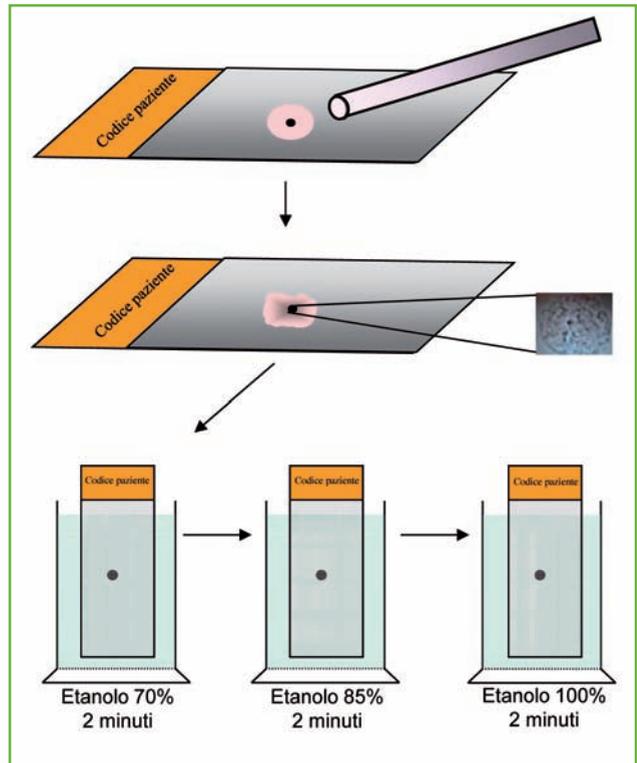
La prima serve per mettere in evidenza i cromosomi e consiste in vari passaggi in grado di esporre la piccola quantità di **DNA** contenuto nel nucleo della cellula prelevata, di aprirne la doppia elica e di metterla a contatto, per competizione, con una grande quantità di DNA esterno opportunamente "colorato" con fluorocromi di colore diverso a seconda del cromosoma che si vuole studiare. Il nucleo della cellula, fissato sul vetrino e così preparato, viene poi letto attraverso uno speciale microscopio a fluorescenza in grado di rilevare le differenze tra i singoli cromosomi (**Figura 4**).

FISSAZIONE DELLA CELLULA BIOPSIZZATA

1. La cellula prelevata e' trasferita su di un vetrino portaoggetti.

2. Utilizzando un'apposita soluzione che promuove la rottura della membrana cellulare (1% sodio citrato), si rimuove tutto il citoplasma lasciando esposto il nucleo che viene trattato con il fissativo (metanolo : acido acetico in proporzione 3 a 1).

3. Segue la disidratazione in alcool etilico, o etanolo, del nucleo fissato. Al termine dell'ultimo passaggio, il vetrino si lascia asciugare.

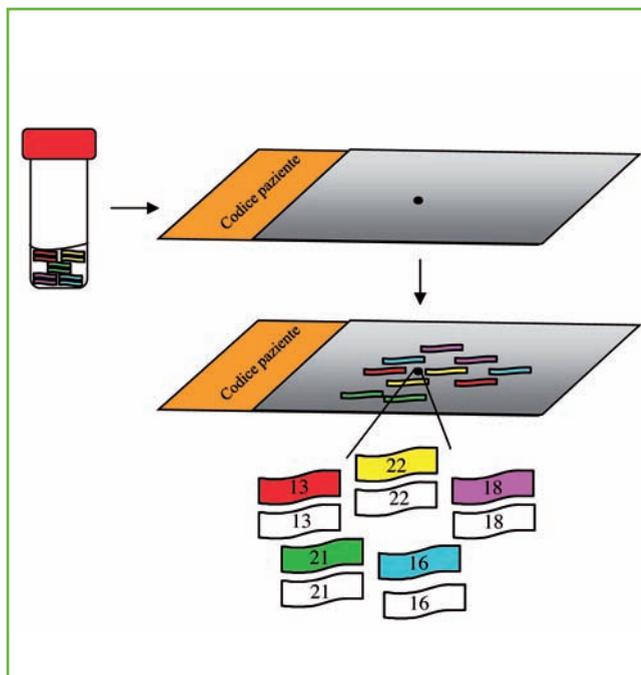


DENATURAZIONE E IBRIDIZZAZIONE

4. Un'aliquota della preparazione contenente le sonde fluorescenti, ognuna specifica per un determinato cromosoma, è aggiunta al nucleo fissato sul vetrino.

5. Denaturazione a 73° C per 5 minuti: si aprono le due eliche del DNA, sia quello della cellula biopsizzata che quello delle sonde specifiche per i vari cromosomi.

6. Ibridizzazione a 37° C per 3 ore: le sonde fluorescenti si uniscono ai cromosomi della cellula fissata rendendoli così visibili.

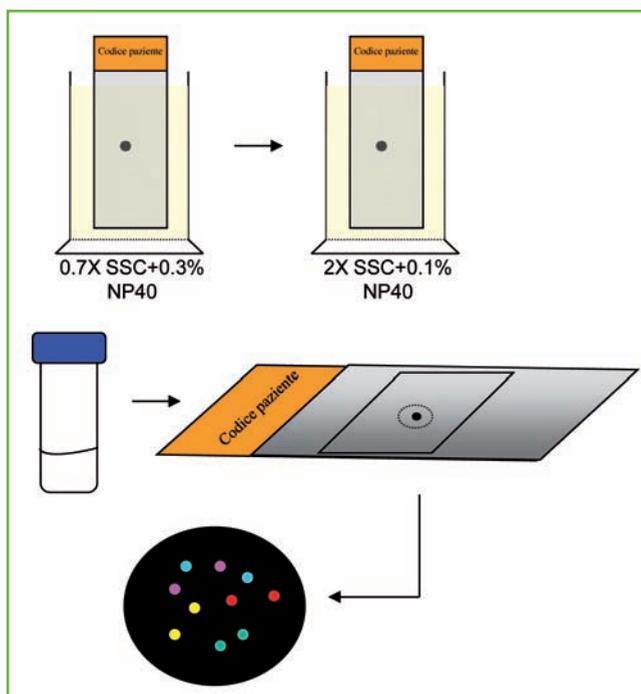


COLORAZIONE – ANALISI DELLA FLUORESCENZA

7. Lavaggio: il vetrino viene immerso in una prima soluzione (0.7X SSC + 0.3% NP40) per 4 minuti a 71° C. Segue l'immersione nella seconda soluzione (2X SSC + 0.1% NP40) per 1 minuto a temperatura ambiente.

8. Si applica un colorante di contrasto (Antifade o DAPI) che consente di localizzare la cromatina e si appone un coprioggetto sul quale si deposita una goccia di olio da immersione.

9. Si procede alla lettura dei segnali al microscopio a fluorescenza.



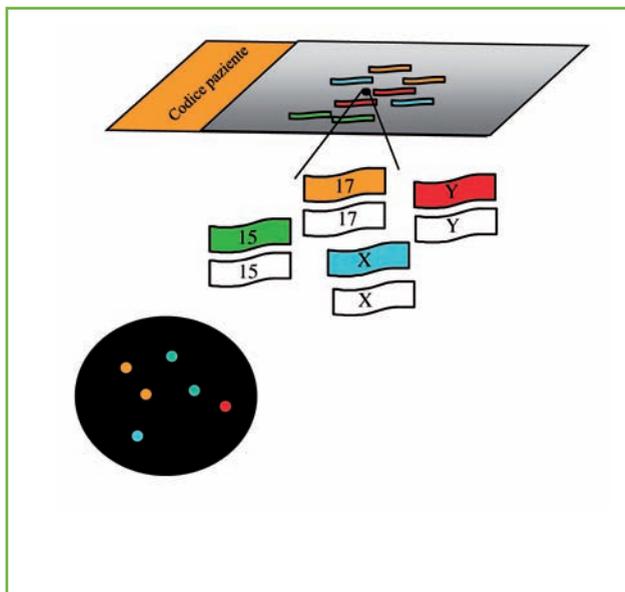
RE - IBRIDIZZAZIONE

10. Dopo rimozione del vetrino coprioggetto, si procede alla disidratazione.

11. Seguono denaturazione e ibridizzazione con sonde specifiche per altri cromosomi.

12. Si effettua un lavaggio a 71 °C per 30-60 secondi in 0.7X SSC + 0.3 % NP40 seguito da 1 minuto in 2X SSC

13. Si applicano: colorante di contrasto, vetrino coprioggetto e l'olio da immersione; si procede alla lettura al microscopio a fluorescenza.



Il procedimento può essere ripetuto in forma analoga ai fini di ampliare il numero dei cromosomi analizzati (**Figura 4B**).

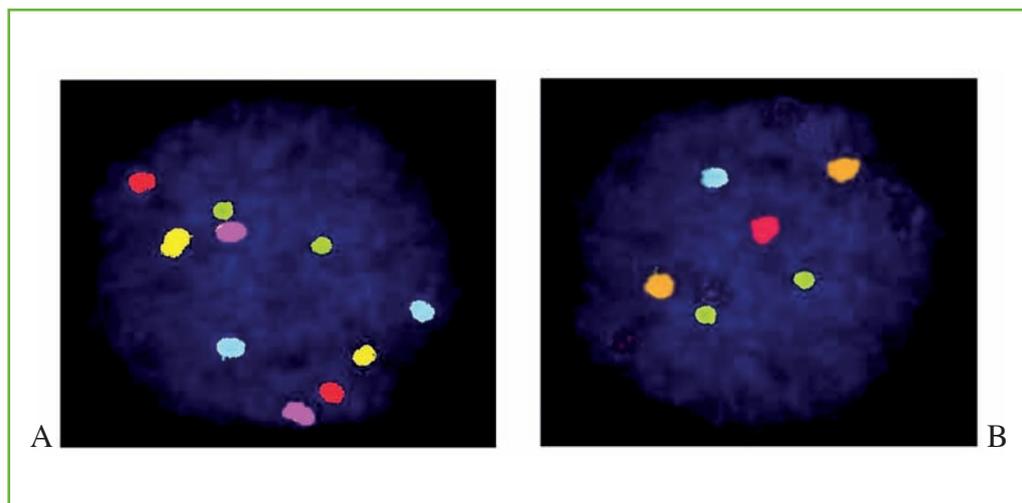


Figura 4. Lettura al microscopio a fluorescenza di una cellula biopsizzata da un embrione o da una blastocisti. (A) Dopo il primo ciclo di ibridizzazione, i segnali fluorescenti rilevati al microscopio indicano la presenza di due copie ognuno per i cromosomi 13 (rosso), 16 (azzurro), 18 (rosa intenso), 21 (verde) e 22 (giallo). (B) Una copia del cromosoma X (azzurro), una del cromosoma Y (rosso), due copie ciascuna dei cromosomi 15 (arancione) e 17 (verde) risultano dal secondo ciclo di ibridizzazione effettuato sulla stessa cellula. Questa cellula è quindi classificata normale per i nove cromosomi analizzati.

La PCR (che, per inciso, ha fruttato il premio Nobel al suo inventore) serve a mettere in evidenza pezzi molto piccoli dei cromosomi (sequenze di geni, singoli geni o, addirittura, pezzi di un singolo gene) attraverso un sofisticato sistema di amplificazione della minima quantità di DNA prelevato dal nucleo della singola cellula (**Figura 5**).

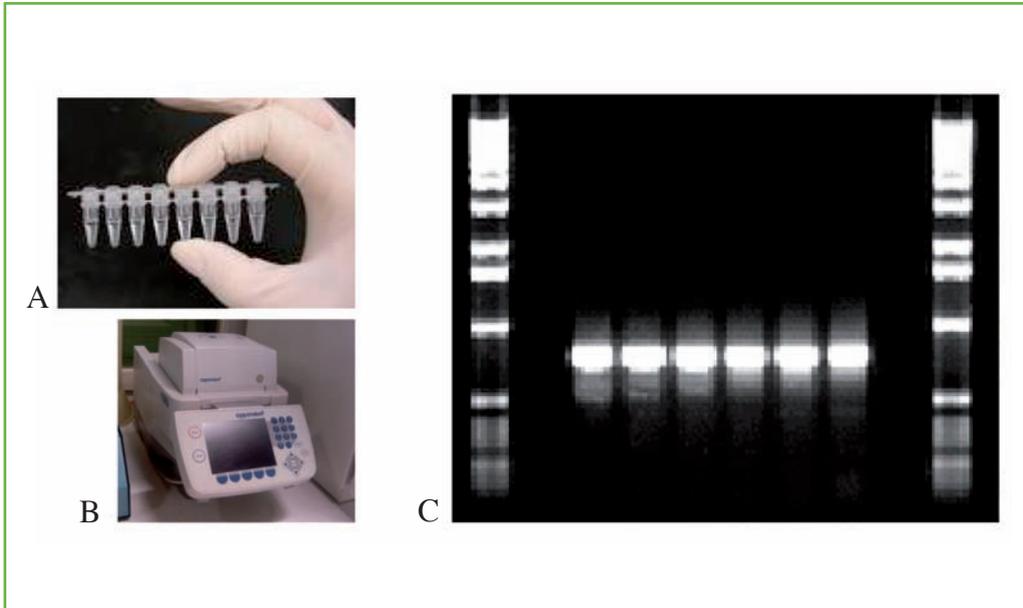


Figura 5. Ognuna delle cellule biopsizzate è trasferita a una piccola provetta sterile (A). Mediante la tecnica di PCR, che utilizza un'apposita macchina (B), è amplificata la regione corrispondente al gene responsabile, qualora vi sia una mutazione di una malattia genetica come, ad esempio la fibrosi cistica. I prodotti dell'amplificazione sono evidenziati in un gel di agarosio cui si applica corrente a basso voltaggio. In questo modo, avviene la separazione delle varie bande sulla base della loro carica elettrica (C). La prima e ultima colonna, contenenti una serie di bande, rappresentano i marcatori di peso molecolare, utili per l'identificazione del prodotto di amplificazione. Le bande luminose singole che si osservano nelle prime 5 colonne indicano l'avvenuta amplificazione. Nello stesso esperimento sono inclusi sistemi di controllo: la sesta banda rappresenta il controllo positivo in cui, se il sistema è efficiente, deve apparire la banda di amplificazione che deve invece essere assente nella settima banda, il controllo negativo.

Una volta ottenuto il prodotto amplificato è possibile arrivare a identificare la presenza di mutazioni, anche puntiformi, responsabili della patologia in oggetto (**Figura 6**).

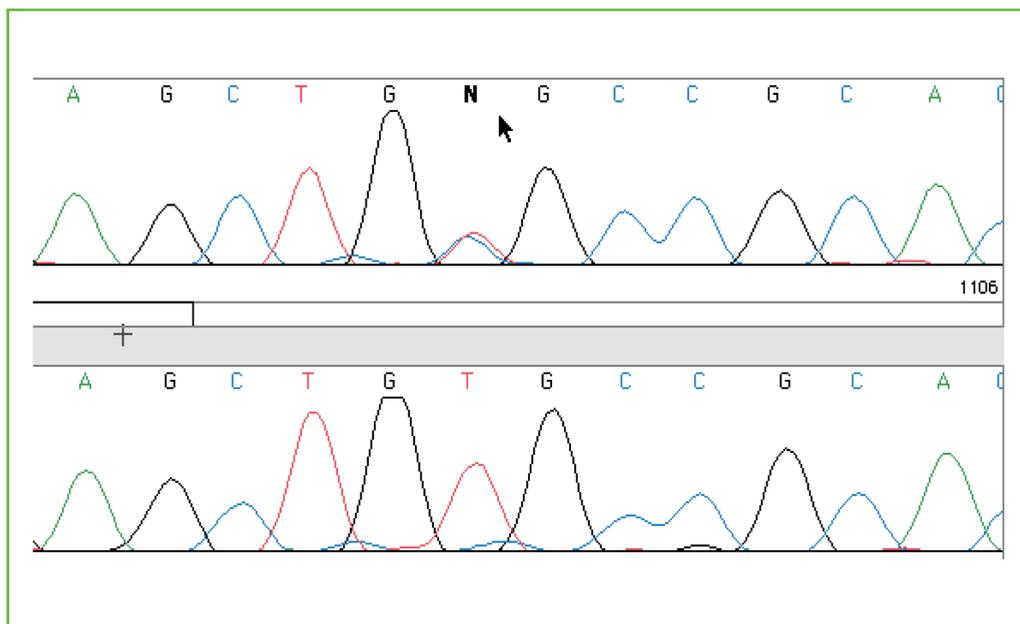


Figura 6. Una volta ottenuto dopo PCR, il prodotto di amplificazione viene analizzato. Tra le tecniche maggiormente all'avanguardia c'è quella del sequenziamento automatico che consente di individuare mutazioni tanto piccole come quelle puntiformi. La figura è relativa al sequenziamento della regione in cui mappa il gene responsabile della beta-talassemia. La mutazione rilevata, denominata 110 T→C, è indicata dalla freccia. Il DNA analizzato nel grafico inferiore è invece normale.

Nel corso degli ultimi anni, sono state sviluppate metodiche che consentono l'analisi di tutti i cromosomi dei globuli polari, degli embrioni e delle blastocisti. Per procedere in tal senso, è necessaria una quantità notevole di DNA che si ottiene eseguendo l'amplificazione dell'intero genoma mediante la variante della PCR conosciuta come WGA (dall'inglese Whole Genomic Amplification). Il prodotto così ottenuto è poi analizzato per tutti i cromosomi con la metodica di CGH (dall'inglese Comparative Genomic Hybridization; **Figura 7**), che è pertanto in grado di fornire un'informazione sull'assetto cromosomico completo (**Figura 8**). L'impiego dei microarrays, noti anche con il termine di microchip, è una delle possibili varianti di questa tecnica che consente di effettuare, assieme all'analisi cromosomica, anche la ricerca di una serie di geni implicati in alcune patologie genetiche.

L'affinamento della CGH ha richiesto molti anni e questa tecnica estremamente avanzata è già applicata presso i centri S.I.S.Me.R. da diverso tempo.

TECNICA DI CGH CON MICROARRAYS

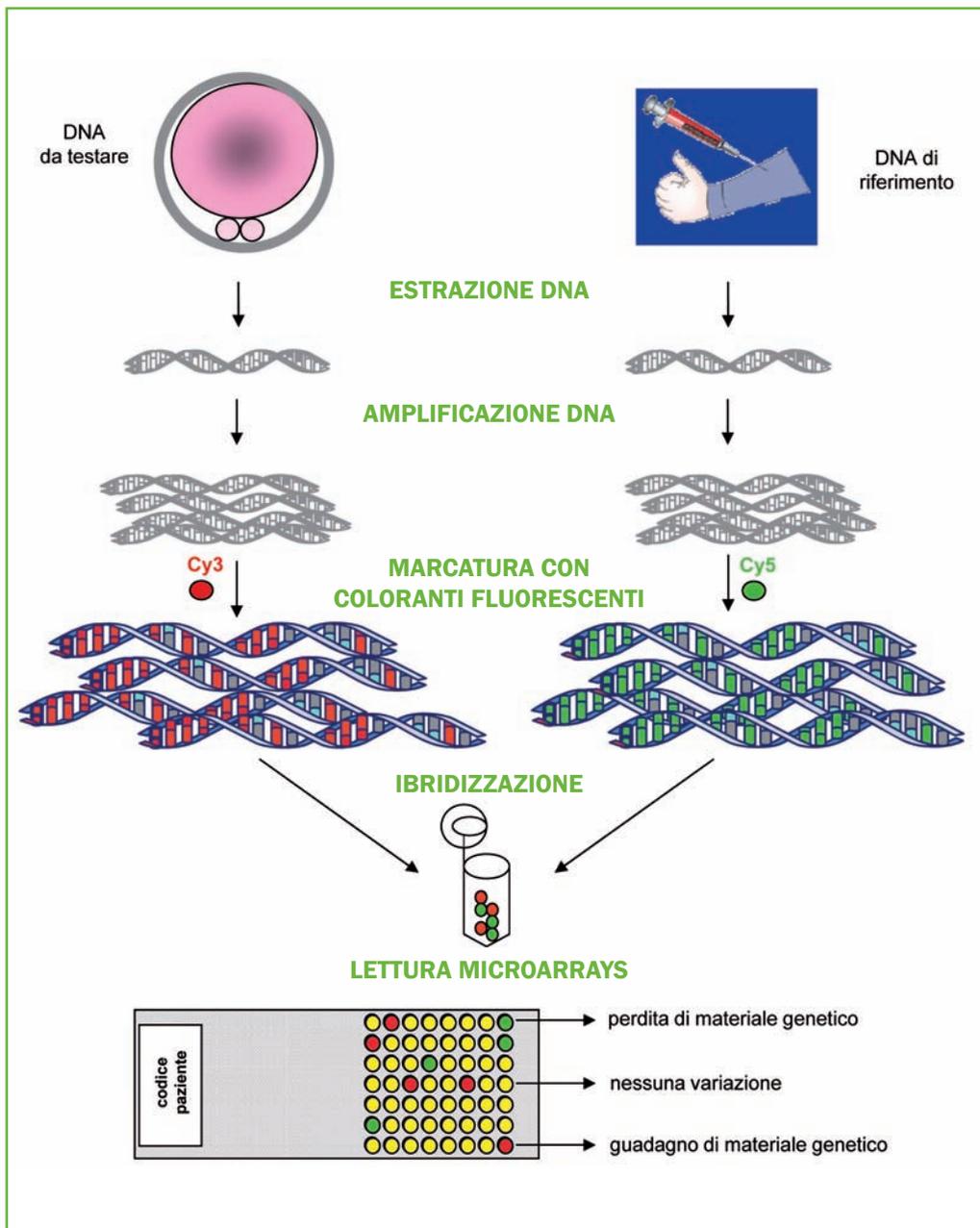


Figura 7. La tecnica di CGH microarrays consente di visualizzare tutti i cromosomi presenti all'interno di una singola cellula. La tecnica utilizza sonde fluorescenti di diverso colore, rosso per il DNA da analizzare e verde per il DNA di controllo, la cui intensità, una volta trasferiti i prodotti ottenuti a microarrays specifici, è letta da un apposito scanner. La colorazione gialla indica una condizione di normalità rispetto al numero di cromosomi, il colore verde denota perdita di materiale genetico (monosomia), mentre il colore rosso denota guadagno di materiale genetico (trisomia).

TECNICA DI CGH CON MICROARRAYS

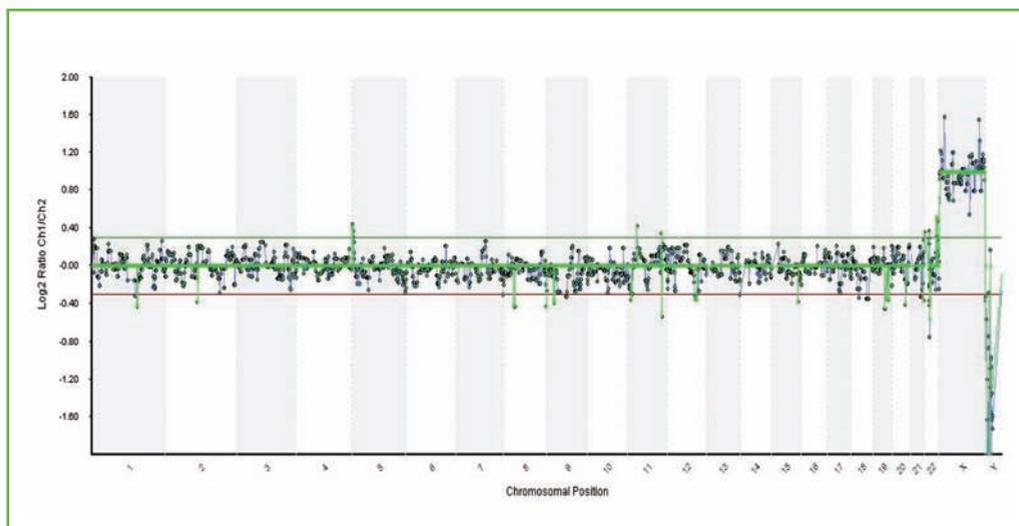


Figura 8. L'immagine prodotta dallo scanner in seguito alla lettura dei microarrays, è valutata mediante un software specifico. In questo modo si ottiene un grafico su cui si distribuiscono i segnali relativi ai vari cromosomi (in ascissa). Ogni cromosoma è identificato da una serie di cloni specifici il cui posizionamento, nella condizione di normalità cromosomica, è per lo più all'interno delle due linee nere orizzontali disegnate al di sopra e al di sotto della linea verde che rappresenta il valore medio. Lo scostamento rispetto ai valori normali indicano perdita o guadagno di materiale genetico. Nel caso rappresentato in figura, la cellula analizzata è il globulo polare di un ovocita ed è normale per tutti i cromosomi. Lo scostamento dei cromosomi X e Y è dovuto al fatto che il DNA di controllo utilizzato è maschile: ne risulta un eccesso di cromosoma X, presente anche nell'ovocita, e una carenza di Y che è invece assente nella cellula uovo.

Efficacia ed efficienza delle tecniche

Allo stato attuale delle nostre conoscenze è possibile dire che queste tecniche sono in grado di essere efficaci nel 90-93% dei casi nei quali sono applicate e che il raggiungimento del 100% di efficacia dipende dalla capacità di sviluppare nuove tecnologie. **Per questo motivo, a oggi, queste tecniche non possono essere considerate una alternativa alla diagnostica prenatale classica (prelievo dei villi coriali o amniocentesi)**, bensì complementari ad essa. Infatti, la loro applicazione riduce di almeno il 95% il trasferimento e l'eventuale impianto in utero di embrioni affetti da patologie trasmissibili o, nel caso delle coppie infertili, che vengano trasferiti nell'utero embrioni non in grado di impiantarsi.

E' comunque importante tener presente che sono stati riportati nella letteratura mondiale alcuni casi, se pur pochi, di discordanza tra i risultati ottenuti dopo biopsia dell'embrione e quelli registratisi alla diagnosi prenatale o alla nascita. Ciò ribadisce



da un lato la validità di queste tecniche e dall'altro l'importanza di sottoporsi, in caso di gravidanza, a diagnosi prenatale al fine di validare e completare i risultati ottenuti in laboratorio.

I RISULTATI DELLE METODICHE ESEGUITE DA SISMER

I risultati delle metodiche eseguite presso il centro SISMER di Bologna sono riportati nelle tavole 3-9 suddivise in base alle indicazioni. E' utile tener presente che per:

- **aneuploidie** si intende un numero di cromosomi diverso (in più o in meno) dai 46 normalmente presenti;
- **gravidezze cliniche** si intende gravidanze a termine o in corso oltre il III mese, con evidenza all'ecografia di battito cardiaco fetale (BCF);
- **indice d'impianto** si intende il rapporto tra i feti che all'ecografia in gravidanza mettono in evidenza il BCF e il numero di embrioni trasferiti.

Nella tavola 10 sono riportati i dati relativi all'esito delle gravidanze.

E' importante ricordare che tra marzo 2004 e aprile 2009, viste le disposizioni legislative allora vigenti, la metodica é stata eseguita con tecnologia SISMER in Paesi che consentivano la Diagnosi Preimpianto.

COME ACCEDERE AL PROGRAMMA

Le modalità per accedere al programma di biopsia dell'ovocita e dell'embrione variano a seconda delle indicazioni, e sono illustrate alla coppia durante il colloquio con i medici responsabili del centro.

Mentre per coppie infertili o per pazienti portatori di traslocazioni robertsoniane o di mosaicismo dei gonosomi, l'inserimento nel programma non prevede modalità differenti da quelle seguite per un normale ciclo di concepimento assistito, una fase di preparazione particolare è indicata per gli altri casi. Tale fase prevede, nella maggior parte delle traslocazioni reciproche, un prelievo di sangue che consente la messa a punto delle sonde molecolari specifiche utilizzate per la loro analisi. Per la diagnosi della malattia genetica in oggetto di studio, si richiede di norma alla coppia di effettuare un prelievo di sangue, e al partner maschile di produrre un campione di liquido seminale. Qualora la coppia abbia un parente affetto, è di grande utilità avere anche il suo DNA (tamponi buccali o sangue); allo stesso modo, e dipendendo dai casi, può essere richiesto il DNA di uno o più familiari (tamponi buccali).

Sono necessari mediamente due mesi per completare questi studi di preparazione, allo scadere dei quali i pazienti, come loro spiegato all'effettuazione del prelievo, dovranno contattare telefonicamente, previo appuntamento, il servizio di diagnosi preimpianto presso il centro SISMER di Bologna, che li informerà sull'esito della fase



di preparazione. Una volta terminata questa fase preliminare, i pazienti saranno ammessi al ciclo di trattamento. Data la complessità di questa organizzazione, che peraltro prevede la collaborazione di un laboratorio specializzato in genetica molecolare nel caso di biopsia per malattie genetiche, i cicli di trattamento corrispondenti sono eseguiti esclusivamente in date prefissate.

I pazienti inseriti nel programma di biopsia dell'ovocita e dell'embrione dovranno sottoscrivere, oltre ai consensi normalmente previsti per il ciclo di trattamento e riportati nel fascicolo informativo n° 7 di questa collana, un consenso informato specifico mediante il quale autorizzano l'esecuzione della biopsia degli ovociti, degli embrioni o delle blastocisti generate durante il ciclo di trattamento. A tal proposito, sono stati formulati consensi informati specifici in base alle indicazioni alla biopsia, riportati negli allegati a seguire.

La complessità delle metodiche utilizzate nell'analisi genetica della cellula prelevata dall'ovocita o dall'embrione fa sì che non sia possibile, di norma, ottenere i risultati con anticipo rispetto all'ora programmata per il trasferimento degli embrioni nell'utero della paziente. Per questa ragione, nel caso in cui nessun embrione risulti idoneo al trasferimento a causa dell'esito della biopsia, la comunicazione potrà essere data alla coppia solo al momento programmato per il trasferimento. Esiste poi la possibilità, soprattutto quando si eseguono diagnosi particolarmente complesse, che si proceda alla crioconservazione degli embrioni che si sviluppano regolarmente in attesa del completamento dell'indagine genetica. In questo modo, il trasferimento degli embrioni sarà programmato in seguito, sulla base dei risultati ottenuti dal laboratorio di genetica.

Tavola 1. Malattie genetiche trasmissibili alla prole in coppie che hanno consultato il centro allo scopo di sottoporsi a diagnosi genetica dopo biopsia di ovociti o embrioni.

- Aciduria Metilmalonica
- Acondroplasia
- Anemia falciforme
- Anemia di Fanconi
- Atrofia spinale muscolare I - Werdnig Hoffman
- ATRX
- Charcot-Marie-Tooth 1 e 2
- Citrullinemia classica
- Corea di Huntington
- Deficit Carbamilfosfato sintetasi
- Deficienza dell'enzima 21 idrossilasi (Sindrome adreno genitale)
- Distrofia fascioscapulomerale
- Distrofia miotonica di tipo I (Steinert)
- Distrofia miotonica proteine kinasi (DMPK)
- Distrofia muscolare di Becker
- Distrofia muscolare di Duchenne (DMD)
- Distrofia muscolare spinale
- EEC ectrodattilia-displasia ectodermica-labiopalatoschisi
- Emofilia A e B
- Emocromatosi
- Eterotopia ventricolare e displasia frontonasale
- Favismo
- Fibrosi cistica
- Idrocefalo legato al cromosoma X
- Glaucoma congenito
- Glicogenosi tipo II (malattia di Pompe)
- Glomerulonefrite proliferativa mesangiale
- HLA
- Incontinentia pigmenti
- Istiocitosi
- Ittiosi X-linked (IPEX)
- Ittiosi volgare
- Malattia esostosante
- Malattia di Fabry (gene α -galattosidasi)
- Malattia di Gaucher
- Malattia di Salla
- MELAS
- Menkes
- Miopatia congenita centronucleare
- Miopatia miotubolare legata al cromosoma X
- Mucopolisaccaridosi
- Neurofibromatosi I e II
- Neoplasia endocrina multipla tipo II
- Osteogenesi imperfetta I e IV
- Osteopetrosi
- Paraparesi spastica (Strumpell disease)
- Poliposi adenomatosa familiare (FAP)
- Polisindattilia
- Predisposizione cancro ovarico e mammella (BRCA1)
- Rene policistico (forma dominante e recessiva)
- Retinite pigmentosa
- Retinoblastoma
- Sclerosi tuberosa
- Sindrome di ADULT
- Sindrome di Alport
- Sindrome di Angelman
- Sindrome di Brugada-QT Lungo
- Sindrome di Gorlin-Goltz
- Sindrome di insensibilità agli androgeni
- Sindrome di Kallman
- Sindrome di Kartagener
- Sindrome di Lesch-Nyhan
- Sindrome di Leigh (SURF1)
- Sindrome di Marfan
- Sindrome di Meckel-Gruber
- Sindrome di Potter I
- Sindrome di Prader-Willi
- Sindrome di Sotos
- Sindrome di Von Hippel Lindau
- Sindrome di Wiskott-Aldrich
- Sindrome di Wolf-Hirschhorn
- Sindrome dell' X fragile
- Sindrome di SOTOS
- Sordità congenita (connessine)
- Talassemia

Tavola 2. Traslocazioni: riarrangiamenti strutturali tra 2 o più cromosomi non omologhi. Tipi di traslocazioni trattate o in corso di verifica per la preparazione delle sonde.

Robertsoniane: avvengono tra i cromosomi 13, 14, 15, 21, 22	Reciproche: avvengono tra tutti gli altri cromosomi
13;14 13;15 13;21	1;3 1;4 1;5 1;9 1;11 1;13 1;15
14;15 14;21 14;22	1;16 1;17 1;21 1;22
15;22	2;3 2;8 2;13
21;22	3;5 3;6;13 3;12 3;14
	4;14 4;14;6;7 4;15 4;17 4;18 4;20
	4;22
	5;10 5;12 5;15 5;17 5;20
	6;8 6;11 6;16
	7;9 7;14 7;18
	8;11
	9;12 9;13 9;14
	10;12 10;13
	11;18 11;22
	12;13 12;16 12;18
	13;17
	14;17 14;18 14;20
	15;18
	16;17 16;19 16;22
	18;20
	20;21

Tavola 3. Risultati in portatori di malattie monogeniche (al dicembre 2012).

N. cicli	85
N. pazienti	62
N. ovociti - embrioni analizzati	427
N. ovociti - embrioni trasferibili (%)	235 (55)
N. ovociti - embrioni non trasferibili (%)	141 (33)
N. embrioni senza risultato (%)	51 (12)
N. trasferimenti (%)	71 (83)*
N. gravidanze cliniche (%)	27 (38)**
N. aborti (%)	5 (18.5)
Indice d'impianto (%)	(27.4)
Percentuale di gravidanze evolutive per paziente (%)	(35.5)

* Comprendono i trasferimenti eseguiti sia nel ciclo fresco che in quelli da embrioni scongelati.

** Tutte le diagnosi effettuate dopo biopsia dell'embrione sono state confermate mediante successiva diagnosi prenatale.

Tavola 4. Risultati relativi allo screening delle aneuploidie in pazienti con età materna ≥ 38 anni mediante analisi dei globuli polari prelevati dall'ovocita o di una o più cellule prelevate dall'embrione (al dicembre 2012).

	Ovociti	Embrioni
N. cicli	126*	454
N. pazienti	116	310
N. ovociti / embrioni totali	744	2676
N. ovociti / embrioni analizzati	659	2196
N. ovociti / embrioni normali (%)	192 (29)	636 (29)
N. ovociti / embrioni aneuploidi (%)	405 (62)	1549 (70.5)
N. ovociti / embrioni senza risultato (%)	62 (9)	11 (0.5)
N. trasferimenti (%)	92 (73)	293 (64)
N. gravidanze cliniche (%)	10 (11)	70 (24)
N. aborti (%)	1 (10)	14 (20)
Indice d'impianto (%)	(7.6)	(16.9)
Percentuale di gravidanze evolutive per paziente (%)	(8)	(18.1)

* In 30 cicli l'analisi cromosomica è stata eseguita mediante tecnica di microarrays.

Tavola 5. Risultati relativi allo screening delle aneuploidie in pazienti con ≥ 3 fallimenti di cicli di riproduzione assistita in pazienti con cariotipo normale ed età inferiore ai 38 anni mediante analisi dei globuli polari prelevati dall'ovocita o di una o più cellule prelevate dall'embrione (al dicembre 2012).

	Ovociti	Embrioni
N. cicli	22*	205
N. pazienti	20	145
N. ovociti / embrioni totali	136	1384
N. ovociti / embrioni analizzati	120	1139
N. ovociti / embrioni normali (%)	40 (33)	415 (37)
N. ovociti / embrioni aneuploidi (%)	75 (63)	707 (62)
N. ovociti / embrioni senza risultato (%)	5 (4)	17 (1)
N. trasferimenti (%)	20 (91)	161 (78)
N. gravidanze cliniche (%)	4 (20)	56 (35)
N. aborti (%)	1 (25)	4 (7)**
Indice d'impianto (%)	(18.5)	(25.1)
Percentuale gravidanze evolutive per paziente (%)	(16)	(35.9)

* In 5 cicli l'analisi cromosomica è stata eseguita mediante tecnica di microarrays.

** 1 gravidanza extra uterina.

Tavola 6. Risultati relativi allo screening delle aneuploidie su embrioni generati da pazienti azoospermici con spermatozoi recuperati mediante MESA o TESE che abbiano fallito almeno un ciclo ICSI precedente (al dicembre 2012).

	MESA	TESE
N. cicli	25	63
N. pazienti	19	48
N. embrioni totali	148	340
N. embrioni analizzati	120	269
N. embrioni normali (%)	39 (32.5)	91 (33.8)
N. embrioni aneuploidi (%)	80 (67)	177 (65.8)
N. embrioni senza risultato (%)	1 (0.5)	1 (0.4)
N. trasferimenti (%)	16 (64)	43 (68)
N. gravidanze cliniche (%)	8 (50)	7 (16)
N. aborti (%)	2 (25)	2 (29)
Indice d'impianto (%)	(40)	(12.7)
Percentuale di gravidanze evolutive per paziente (%)	(31.6)	(10.4)

Tavola 7. Risultati relativi allo screening delle aneuploidie su ovociti o embrioni generati da pazienti con cariotipo alterato per la presenza di mosaici o di aneuploidie a carico dei cromosomi sessuali (al dicembre 2012). L'analisi cromosomica è stata eseguita sui globuli polari prelevati dall'ovocita o su una o più cellule prelevate dall'embrione.

	Ovociti	Embrioni
N. cicli	4	70
N. pazienti	4	49
N. ovociti / embrioni totali	32	457
N. ovociti / embrioni analizzati	14	376
N. ovociti / embrioni normali (%)	4 (29)	143 (38)
N. ovociti / embrioni aneuploidi (%)	9 (64)	230 (61)
N. ovociti / embrioni senza risultato (%)	1 (7)	3 (1)
N. trasferimenti (%)	2 (50)	53 (76)
N. gravidanze cliniche (%)	0	27 (51)
N. aborti (%)	0	2 (7)
Indice d'impianto (%)	0	(35.6)
Percentuale di gravidanze evolutive per paziente (%)	0	(51)

Tavola 8. Risultati relativi allo screening delle aneuploidie su ovociti o embrioni generati da pazienti con aborti ricorrenti e mappa cromosomica normale (al dicembre 2012). L'analisi cromosomica è stata eseguita sui globuli polari prelevati dall'ovocita o su una o più cellule prelevate dall'embrione.

	Ovociti	Embrioni
N. cicli	28*	115
N. pazienti	28	90
N. ovociti / embrioni totali	190	734
N. ovociti / embrioni analizzati	145	608
N. ovociti / embrioni normali (%)	39 (27)	193 (31.7)
N. ovociti / embrioni aneuploidi (%)	84 (58)	413 (68)
N. ovociti / embrioni senza risultato (%)	22 (15)	2 (0.3)
N. trasferimenti (%)	19 (68)	81 (70)
N. gravidanze cliniche (%)	4 (21)	25 (31)
N. aborti (%)	2 (50)	3 (12)**
Indice d'impianto (%)	(12.5)	(22.9)
Percentuale di gravidanze evolutive per paziente (%)	(7)	(24.4)

* In 12 cicli l'analisi cromosomica è stata eseguita mediante tecnica di microarrays.

** 1 gravidanza extra uterina

Tavola 9. Risultati in pazienti portatori di traslocazioni robertsoniane e reciproche (al dicembre 2012).

	Robertsoniane	Reciproche
N. cicli	74*	84*
N. pazienti	53	55
N. ovociti - embrioni analizzati	343**	455***
N. embrioni normali (%)	91 (26)	71 (15.6)
N. embrioni aneuploidi (%)	252 (74)	383 (84.2)
N. embrioni senza risultato (%)	0	1 (0.2)
N. trasferimenti (%)	50 (68)	39 (46)
N. gravidanze cliniche (%)	21 (42)	9 (23)
N. aborti (%)	5 (24)****	2 (22)
Indice d'impianto (%)	(34.7)	(20.0)
Percentuale di gravidanze evolutive per paziente (%)	(30.2)	(12.7)

* In 1 ciclo l'analisi cromosomica è stata eseguita mediante tecnica di microarrays

** In 6 cicli sono stati analizzati anche i globuli polari degli ovociti fertilizzati

*** In 10 cicli sono stati analizzati anche i globuli polari degli ovociti fertilizzati

**** 1 aborto dopo amniocentesi (cariotipo fetale normale); due feti trisomici, trisomia 21 e 22 rispettivamente, in due pazienti con una traslocazione 13;14

Tavola 10. Esito delle gravidanze ottenute nei cicli con biopsia degli ovociti fertilizzati e/o degli embrioni.

N. gravidanze cliniche	295
N. aborti	47
N. gravidanze tubariche	6
N. gravidanze in corso	12
N. parti	230
• singoli	178
• gemellari	49
• tripli	3
N. totale nati	285
N. nati con malformazioni maggiori	5*

* un polimalformato (patologia di origine non cromosomica), un portatore di sindrome di Down, un'agenesia del corpo calloso, una tetralogia di Fallot, una focomelia.

INFORMATIVA E DICHIARAZIONE DI CONSENSO INFORMATO PER EFFETTUAZIONE DI DIAGNOSI PREIMPIANTO SU GLOBULI POLARI, BLASTOMERI E CELLULE DEL TROFECTODERMA PER LA RICERCA DI ANEUPLOIDIE

Ai sensi di:

“legge 40/2004: norme in materia di procreazione medicalmente assistita” pubblicata su G.U.R.I. n. 45 del 24 febbraio 2004, “decreto 11 aprile 2008 n. 336: Regolamento recante norme in materia di procreazione medicalmente assistita” pubblicato su G.U.R.I. n. 101 del 30 aprile 2008, “Sentenza della Corte Costituzionale n. 151 1 aprile - 8 maggio 2009” pubblicata su G.U.R.I. Prima Serie Speciale n. 19 del 13 maggio 2009, e Sentenza TAR Lazio 398/2008.

Noi sottoscritti **(partner femminile)**
nata a **il**
e **(partner maschile)**
nato a **il**

Premesso che abbiamo già accettato di essere sottoposti ad un ciclo di concepimento assistito denominato: “FECONDAZIONE IN VITRO E TRASFERIMENTO IN UTERO DEGLI EMBRIONI” come da consenso pure sottoscritto (MD PS PMA 1-30 Dichiarazione di consenso informato per: fecondazione in vitro e trasferimento in utero degli embrioni).

Premesso che il ricorso alla diagnosi preimpianto delle aneuploidie (da ora in poi PGS) legittima il medico ad inseminare tutti gli ovociti ottenuti (purché risultati idonei ad essere inseminati) come da piano terapeutico con Voi concordato.

Premesso che ai sensi dell’art 14 comma 5 della Legge 40/04 abbiamo richiesto di avere notizia dello stato di salute degli zigoti e degli embrioni formati nel trattamento di PMA.

CHIEDIAMO di essere sottoposti ad un ciclo di concepimento assistito denominato: Fecondazione In Vitro E Trasferimento In Utero Degli Embrioni Con Tecnica Di Diagnosi Preimpianto su (**cancellare l’ipotesi scartata**):

GLOBULI POLARI (Come specificato nel Glossario)
BLASTOMERI (Come specificato nel Glossario)
CELLULE DEL TROFECTODERMA (Come specificato nel Glossario)

e dichiariamo di avere preliminarmente effettuato un colloquio con il dott..... della Struttura sopra indicata, nel corso del quale siamo stati informati, in modo chiaro ed esaustivo che nel Nostro caso, l’effettuazione della diagnosi preimpianto per la ricerca di alterazioni cromosomiche numeriche, è suggerita per motivi di salute della paziente legati all’elevata incidenza di mancato impianto o di aborto ripetuto.

In tale occasione, ci è stato inoltre consegnato un fascicolo informativo (MD PS PMA 1-3, fascicolo n. 6) dove sono chiaramente illustrate le varie procedure, le problematiche ed i risultati del centro.

Qualora sia necessario completare i risultati dell'analisi accettiamo che la stessa sia effettuata anche su (**cancellare l'ipotesi scartata**):

GLOBALI POLARI

BLASTOMERI

CELLULE DEL TROFECTODERMA

Siamo stati altresì informati sui seguenti punti:

1. Tempistica

La biopsia delle cellule su cui si esegue la PGS può essere effettuata prima o dopo l'inseminazione degli ovociti. Più precisamente:

- la biopsia del primo globulo polare viene effettuata subito dopo il prelievo chirurgico dell'ovocita;
- la biopsia del secondo globulo polare viene effettuata poche ore dopo l'inseminazione. In alcuni casi, i globuli polari possono essere asportati insieme, quindi dagli ovociti fecondati circa 16-18 ore dopo la inseminazione.
- la biopsia dell'embrione viene effettuata quando l'embrione risulta formato da 6-8 cellule (3^a giornata dall'inseminazione) dando così la possibilità di ottenere nelle successive 24-72 ore una risposta e al contempo trasferire gli eventuali embrioni risultati idonei.
- la biopsia delle cellule del trofetto derma viene effettuata allo stadio di blastocisti (5^a-6^a giornata dall'inseminazione).

Nel caso si utilizzi la tecnica di array-CGH, l'inseminazione degli ovociti viene sempre eseguita con tecnica ICSI, sia per potere valutare la maturità degli ovociti al momento del prelievo sia per ridurre il rischio di contaminazione da DNA esterno (cellule del cumulo e spermatozoi).

Qualora non si riuscisse ad ottenere la risposta entro i tempi utili per il trasferimento, gli embrioni sono temporaneamente crioconservati in attesa dell'esito.

Per motivi tecnici legati alla diagnosi specifica e/o per ottimizzare la procedura, la crioconservazione temporanea di tutti gli ovociti (prima o dopo l'asportazione dei globuli polari) o di tutti gli embrioni o blastocisti può essere programmata fin dall'inizio del trattamento. In tal caso, l'eventuale trasferimento di embrioni risultati idonei alla PGS, verrà effettuato in un ciclo supportato con la convenzionale terapia di preparazione dell'endometrio che non richiede alcun monitoraggio.

2. Finalità

La PGS sui globuli polari, sui blastomeri e sulle cellule del trofetto derma ha lo scopo di valutare e informare, come da Noi richiesto ai sensi dell'art 14 comma 5 della Legge 40/04, dello stato di salute degli ovociti e degli embrioni generati in vitro.

Siamo a conoscenza del fatto che la maggior parte delle anomalie cromosomiche numeriche comportano il mancato impianto ovvero il mancato sviluppo fetale ovvero aumentati rischi di aborto spontaneo in gravidanza già instaurata.

E' possibile che parte del materiale residuo in seguito all'applicazione delle tecniche di diagnosi sia utilizzato per eventuali studi di verifica dei risultati e per analisi supplementari di DNA mitocondriale o genomico.

A questo proposito, la nostra libera scelta è (**cancellare l'ipotesi scartata**) di **acconsentire // non acconsentire**

3. Risultati

In particolare ai sensi dell'art. 6 della Legge 40/04 siamo informati che presso la presente struttura, su un numero di oltre 1000 cicli di PMA con PGS, la percentuale di gravidanze cliniche sui trasferimenti eseguiti è stata del 30%. I dati completi sono riportati nel fascicolo informativo (MD PS PMA 1-3, fascicolo n. 6).

Sin dalla fondazione del consorzio europeo della diagnosi preimpianto (ESHRE PGD Consortium), i dati del centro S.I.S.Me.R afferiscono alla casistica europea. Questa casistica al dicembre 2008, riporta oltre 19.000 cicli PGS con una percentuale di gravidanze cliniche del 27% sui trasferimenti eseguiti.

4. Rischi e problematiche connesse alla tecnica

L'effettuazione di screening cromosomici non comporta ulteriori rischi alla salute fisica della paziente rispetto a quelli evidenziati nel consenso al trattamento di PMA. Recenti studi condotti hanno accertato che il prelievo di cellule dall'embrione non condiziona lo sviluppo dell'embrione stesso.

E' possibile che si verifichino falsi negativi con conseguente trasferimento di embrioni patologici ovvero falsi positivi con la conseguenza che non venga trasferito un embrione sano essendo stato valutato come patologico. Presso S.I.S.Me.R., su 238 gravidanze cliniche, 1 è risultata patologica (0.4%).

Visto quanto sopra riportato in merito alla non assoluta efficacia della tecnica, in caso di trasferimento di embrioni che esiti in gravidanza, si raccomanda l'effettuazione di diagnosi prenatale (villocentesi o amniocentesi) da eseguirsi alle scadenze indicate dai protocolli specifici.

In caso di mancata effettuazione della diagnosi prenatale ovvero di scelta da parte della coppia di non effettuare comunque la diagnosi prenatale, nessun addebito potrà essere mosso al presente centro per l'inefficacia della tecnica applicata.

5. Rischi specifici per il nascituro

Oltre ai rischi indicati nell'atto di consenso al trattamento di PMA, qualora si verifichi un caso di falso negativo il concepito, se affetto da patologia cromosomica compatibile con la vita, nasce con tale patologia, mentre se affetto da patologia non compatibile con la vita è destinato ad essere abortito naturalmente.

6. Questioni bioetiche connesse alla PGS.

Oltre alle questioni di natura bioetica di un trattamento di PMA, il ricorso alla PGS comporta un'ulteriore serie di questioni bioetiche connesse sia al potenziale rischio di danneggiare lo zigote, l'embrione o la blastocisti, sia al rischio di falsi positivi con conseguente mancato trasferimento di embrioni sani.

Per l'approfondimento di tali questioni bioetiche il centro di PMA, conformemente a quanto prevede la Legge 40/04 mette a disposizione della coppia consulenze psicologiche e bioetiche.

A questo proposito, nonostante un'eventuale nostra richiesta, il medico, ai sensi dell'art. 6 ultimo comma della Legge 40/04, può rifiutare il trasferimento di embrioni patologici, quando sussistano motivi di tutela di salute.

Nell'ipotesi in cui la PGS metta in evidenza la presenza di zigoti, embrioni o blastocisti cromosomicamente anormali, ma vitali secondo i parametri convenzionali della PMA, siamo a conoscenza del fatto che essi non saranno distrutti in quanto la distruzione è espressamente vietata dall'art. 14, comma 1, Legge 40/04, e che saranno oggetto di crioconservazione.

7. Costi economici dell'intera procedura.

Dichiariamo di essere stati chiaramente informati sui costi del trattamento diagnostico di PGS sugli zigoti, embrioni e blastocisti.

Pertanto,

premesso che ai sensi dell'art 14, comma 5, Legge 40/04, vogliamo avvalerci del diritto di conoscere lo stato di salute di (cancellare l'ipotesi scartata)

ZIGOTI

EMBRIONI

BLASTOCISTI

fermo quanto prospettato in atto di consenso al trattamento di PMA, nel rispetto **del comma 1 dell'articolo 6 (consenso informato) della Legge 40/2004, siamo stati informati in maniera dettagliata dal dott. , davanti a cui firmiamo il presente consenso, sui metodi, sui problemi bioetici e sui possibili effetti collaterali sanitari e psicologici conseguenti all'applicazione della tecnica di PMA con PGS, sulle probabilità di successo e sui rischi dalla stessa derivanti, nonché sulle relative conseguenze giuridiche per la donna, per l'uomo e per il nascituro.**

DICHIARIAMO di essere stati chiaramente informati di non avere rapporti sessuali durante il trattamento PMA/PGS.

La sottoscritta

COGNOME _____ NOME _____

Documento No. _____ Rilasciato da _____ il _____

Data _____ **Firma** _____

Il sottoscritto

COGNOME _____ NOME _____

Documento No. _____ Rilasciato da _____ il _____

Data _____ **Firma** _____

Il medico

COGNOME _____ NOME _____

Data _____ **Firma** _____

INFORMATIVA E DICHIARAZIONE DI CONSENSO INFORMATO PER EFFETTUAZIONE DI DIAGNOSI PREIMPIANTO PER LA RICERCA DI ANOMALIE STRUTTURALI CROMOSOMICHE O MALATTIE GENETICHE

Ai sensi di:

“legge 40/2004: norme in materia di procreazione medicalmente assistita” pubblicata su G.U.R.I. n. 45 del 24 febbraio 2004, “decreto 11 aprile 2008 n. 336: Regolamento recante norme in materia di procreazione medicalmente assistita” pubblicato su G.U.R.I. n. 101 del 30 aprile 2008, “Sentenza della Corte Costituzionale n. 151 1 aprile - 8 maggio 2009” pubblicata su G.U.R.I. Prima Serie Speciale n. 19 del 13 maggio 2009 e Sentenza TAR Lazio 398/2008.

Noi sottoscritti **(partner femminile)**
nata a **il**
e **(partner maschile)**
nato a **il**

Premesso che abbiamo già accettato di essere sottoposti ad un ciclo di concepimento assistito denominato: “FECONDAZIONE IN VITRO E TRASFERIMENTO IN UTERO DEGLI EMBRIONI” come da consenso pure sottoscritto (MD PS PMA 1-30 Dichiarazione di consenso informato per: fecondazione in vitro e trasferimento in utero degli embrioni).

Premesso che abbiamo eseguito una consulenza con un medico genetista, durante il quale ci è stato chiaramente spiegato quali sono le ripercussioni sulla salute della prole connesse alla malattia genetica e le possibilità diagnostiche connesse alla patologia.

Premesso che il ricorso alla diagnosi preimpianto (da ora in poi PGD) legittima il medico ad inseminare tutti gli ovociti ottenuti (purché risultati idonei ad essere inseminati) come da piano terapeutico con Voi concordato.

Premesso che ai sensi dell’art 14 comma 5 della Legge 40/04 abbiamo richiesto di avere informazioni sullo stato di salute degli zigoti e degli embrioni formati nel trattamento di PMA.

CHIEDIAMO di essere sottoposti ad un ciclo di concepimento assistito denominato: Fecondazione In Vitro E Trasferimento In Utero Degli Embrioni Con Tecnica Di Diagnosi Preimpianto su (**cancellare l’ipotesi scartata**):

GLOBULI POLARI (Come specificato nel Glossario)

BLASTOMERI (Come specificato nel Glossario)

CELLULE DEL TROFECTODERMA (Come specificato nel Glossario)

e dichiariamo di avere preliminarmente effettuato un colloquio con il dott..... della Struttura sopra indicata, nel corso del quale siamo stati informati, in modo chiaro ed esaustivo che nel Nostro caso, l'effettuazione della diagnosi preimpianto per la ricerca di anomalie strutturali cromosomiche o di malattie genetiche è indicata in quanto atti medici allegati alla cartella clinica hanno accertato che l'utilizzo del nostro materiale genetico comporta il rischio di formazione di embrioni cromosomicamente o geneticamente patologici con conseguente elevato grado di rischio, non solo per la salute psicofisica della paziente, ma anche per i concepiti. In tale occasione, ci è stato inoltre consegnato un fascicolo informativo (MD PS PMA 1-3, fascicolo n. 6) dove sono chiaramente illustrate le varie procedure, le problematiche ed i risultati del centro. Qualora sia necessario completare i risultati dell'analisi accettiamo che la stessa sia effettuata anche su (**cancellare l'ipotesi scartata**):

GLOBULI POLARI

BLASTOMERI

CELLULE DEL TROFECTODERMA

Siamo stati altresì informati sui seguenti punti:

1. Tempistica

La biopsia delle cellule su cui si esegue la PGD può essere effettuata prima o dopo l'inseminazione degli ovociti. Più precisamente:

- la biopsia del primo globulo polare viene effettuata subito dopo il prelievo chirurgico dell'ovocita;
- la biopsia del secondo globulo polare viene effettuata poche ore dopo l'inseminazione. In alcuni casi, i globuli polari possono essere asportati insieme, quindi dagli ovociti fecondati circa 16-18 ore dopo la inseminazione.
- la biopsia dell'embrione viene effettuata quando l'embrione risulta formato da 6-8 cellule (3^a giornata dall'inseminazione) dando così la possibilità di ottenere nelle successive 24-72 ore una risposta e al contempo trasferire gli eventuali embrioni risultati idonei.
- la biopsia delle cellule del trofetto derma viene effettuata allo stadio di blastocisti (5^a-6^a giornata dall'inseminazione).

Nel caso di PGD per malattie genetiche o di utilizzo della tecnica di array-CGH, l'inseminazione degli ovociti viene sempre eseguita con tecnica ICSI, sia per potere valutare la maturità degli ovociti al momento del prelievo sia per ridurre il rischio di contaminazione da DNA esterno (cellule del cumulo e spermatozoi).

Qualora non si riuscisse ad ottenere la risposta entro i tempi utili per il trasferimento, gli embrioni sono temporaneamente crioconservati in attesa dell'esito.

Per motivi tecnici legati alla diagnosi specifica e/o per ottimizzare la procedura, la crioconservazione temporanea di tutti gli ovociti (prima o dopo l'asportazione dei globuli polari) o di tutti gli embrioni o blastocisti può essere programmata fin dall'inizio del trattamento. In tal caso, l'eventuale trasferimento di embrioni risultati idonei alla PGD, verrà effettuato in un ciclo supportato con la convenzionale terapia di preparazione dell'endometrio che non richiede alcun monitoraggio.

2. Finalità

La PGD sui globuli polari, sui blastomeri e sulle cellule del trofetto derma ha lo scopo di valutare e informare, come da Noi richiesto ai sensi dell'art. 14 comma 5 della Legge 40/04, dello stato di salute degli ovociti e degli embrioni generati in vitro.

Siamo a conoscenza del fatto che, allo stato attuale, in caso di malattie genetiche, la

tecnica è mirata all'analisi della patologia di cui la coppia è portatrice e pertanto ciò non esclude che l'embrione possa essere portatore di altre anomalie (numeriche, strutturali o genetiche) diverse da quelle ricercate.

In caso di traslocazioni, la tecnica è mirata all'analisi della presenza di traslocazioni sbilanciate. Non consente di distinguere tra embrioni portatori e non portatori della stessa traslocazione bilanciata presente nel genitore. Tali embrioni vengono quindi definiti "normali/portatori"

La diagnosi preimpianto da noi richiesta potrà essere associata, se necessario, allo studio dei cromosomi con l'utilizzo della tecnica di array-CGH o FISH, come risulta dallo specifico consenso informato da noi firmato (MD IO PS PMA 1-73, fascicolo 6). E' possibile che parte del materiale residuo in seguito all'applicazione delle tecniche di diagnosi sia utilizzato per eventuali studi di verifica dei risultati e per analisi supplementari di DNA mitocondriale o genomico.

A questo proposito, la nostra libera scelta è **(cancellare l'ipotesi scartata) di acconsentire // non acconsentire**

firma ♀ firma ♂

3. Risultati

In particolare, ai sensi dell'art. 6 della Legge 40/04, siamo informati che presso la presente struttura, su un numero di oltre 200 cicli di PMA con PGD, la percentuale di gravidanze cliniche sui trasferimenti eseguiti è stata del 36%. I dati completi sono riportati nel fascicolo informativo (MD PS PMA 1-3, fascicolo n. 6).

Sin dalla fondazione del consorzio europeo della diagnosi preimpianto (ESHRE PGD Consortium), i dati del centro S.I.S.Me.R afferiscono alla casistica europea. Questa casistica, al dicembre 2008, riporta oltre 12.000 cicli PGD ed una percentuale di gravidanze cliniche del 28% sui trasferimenti eseguiti.

4. Rischi e problematiche connesse alla tecnica

L'effettuazione di diagnosi preimpianto non comporta ulteriori rischi alla salute fisica della paziente rispetto a quelli evidenziati nel consenso al trattamento di PMA. Recenti studi condotti hanno accertato che il prelievo di cellule dall'embrione non condiziona lo sviluppo dell'embrione stesso.

E' possibile che si verifichino falsi negativi con conseguente trasferimento di embrioni patologici ovvero falsi positivi con la conseguenza che non venga trasferito un embrione sano essendo stato valutato come patologico. A questo proposito, i dati pubblicati dal PGD Consortium riportano che nello 0.7% delle gravidanze insorte, la diagnosi prenatale o postnatale ha messo in evidenza la presenza di malattia (falsi negativi). Presso S.I.S.Me.R., su 57 gravidanze cliniche, 1 è risultata patologica (1.7%). Questo margine di inefficacia diagnostica, pur fonte di grave stress per la coppia, è comunque nettamente inferiore al rischio di trasmissione della patologia al concepito in caso di concepimento naturale, rischio che per le malattie genetiche varia, a seconda dei casi, dal 25% al 50%. Nelle traslocazioni, il limite superiore può andare ben oltre il 50%.

In riferimento ai falsi negativi, è possibile che durante l'analisi per malattie genetiche si verifichi il fenomeno di ADO (Allele Drop Out), cioè la mancata amplificazione

di un allele che può fare diagnosticare un embrione malato come portatore sano e quindi trasferibile. La incidenza del fenomeno ADO è stimata intorno al 10%; tuttavia esistono strategie specifiche, applicate anche presso il nostro centro, che consentono di ridurre il rischio di diagnosi di falsi negativi.

Per motivi legati alla tecnica stessa ed al materiale genetico analizzato, il test può non dare esito o non essere sufficientemente informativo sulla presenza o meno della malattia ricercata. Tale evenienza, calcolata per singola cellula, è più frequente sui globuli polari e più rara sui blastomeri o sulle cellule del trofotoderma. Per questa ragione, allo scopo di massimizzare l'affidabilità della diagnosi, può essere necessario ricorrere all'analisi combinata su cellule dello zigote e dell'embrione o della blastocisti.

Siamo stati altresì informati che, in caso di scarsa risposta alla stimolazione e/o di prelievo di un basso numero di ovociti, esiste la c.d. possibilità di "accumulo", cioè di crioconservare gli ovociti / zigoti / embrioni / blastocisti e di eseguire un successivo ciclo di stimolazione per effettuare la PGD su un maggiore numero di zigoti / embrioni / blastocisti, aumentando quindi le possibilità di trasferire embrioni idonei.

Visto quanto sopra riportato in merito alla non assoluta efficacia della tecnica, in caso di trasferimento di embrioni che esiti in gravidanza, si raccomanda l'effettuazione di diagnosi prenatale (villocentesi o amniocentesi) da eseguirsi alle scadenze indicate dai protocolli specifici.

In caso di mancata effettuazione della diagnosi prenatale ovvero di scelta di non effettuare comunque la diagnosi prenatale, nessun addebito potrà essere mosso al presente centro per l'inefficacia della tecnica applicata.

5. Rischi specifici per il nascituro

Oltre ai rischi indicati nell'atto di consenso al trattamento di PMA, qualora si verifichi un caso di falso negativo il concepito, se affetto da patologia genetica compatibile con la vita, nasce con tale patologia, mentre se affetto da patologia non compatibile con la vita è destinato ad essere abortito naturalmente.

6. Questioni bioetiche connesse alla PGD.

Oltre alle questioni di natura bioetica di un trattamento di PMA, il ricorso alla PGD comporta un'ulteriore serie di questioni bioetiche connesse sia al potenziale rischio di danneggiare lo zigote, l'embrione o la blastocisti, sia al rischio di falsi positivi con conseguente mancato trasferimento di embrioni sani.

Per l'approfondimento di tali questioni bioetiche il centro di PMA, conformemente a quanto prevede la Legge 40/04 mette a disposizione della coppia consulenze psicologiche e bioetiche.

A questo proposito, nonostante un'eventuale nostra richiesta, il medico, ai sensi dell'art. 6 ultimo comma della Legge 40/04, può rifiutare il trasferimento di embrioni patologici, quando sussistano motivi di tutela di salute.

Nell'ipotesi in cui la PGD metta in evidenza la presenza di zigoti, embrioni o blastocisti patologici, ma vitali secondo i parametri convenzionali della PMA, siamo a conoscenza del fatto che essi non saranno distrutti in quanto la distruzione è espressamente vietata dall'art. 14, comma 1, Legge 40/04, e che saranno oggetto di crioconservazione.

7. Costi economici dell'intera procedura.

Dichiariamo di essere stati chiaramente informati sui costi del trattamento diagnostico di PGD sugli zigoti, embrioni e blastocisti.

Pertanto,

premesso che ai sensi dell'art 14, comma 5, Legge 40/04, vogliamo avvalerci del diritto di conoscere lo stato di salute di (cancellare l'ipotesi scartata)

ZIGOTI

EMBRIONI

BLASTOCISTI

fermo quanto prospettato in atto di consenso al trattamento di PMA, nel rispetto del comma 1 dell'articolo 6 (consenso informato) della Legge 40/2004, siamo stati informati in maniera dettagliata dal dott., davanti a cui firmiamo il presente consenso, sui metodi, sui problemi bioetici e sui possibili effetti collaterali sanitari e psicologici conseguenti all'applicazione della tecnica di PMA con PGD, sulle probabilità di successo e sui rischi dalla stessa derivanti, nonché sulle relative conseguenze giuridiche per la donna, per l'uomo e per il nascituro.

DICHIARIAMO di essere stati chiaramente informati di non avere rapporti sessuali durante il trattamento PMA/PGD.

La sottoscritta

COGNOME _____ NOME _____

Documento No. _____ Rilasciato da _____ il _____

Data _____ **Firma** _____

Il sottoscritto

COGNOME _____ NOME _____

Documento No. _____ Rilasciato da _____ il _____

Data _____ **Firma** _____

Il medico

COGNOME _____ NOME _____

Data _____ **Firma** _____

Bibliografia scientifica apparsa su riviste specifiche del settore soggette a sistema di refertaggio anonimo.

- Diblík J., Macek M., Magli M.C., Krejci R., Gianaroli L. (2005) Topology of chromosome 18 and X in human blastomeres from 3- to 4-day old embryos. *J. Histochem. Cytochem.* 53, 273-276.
- Diblík J., Macek M. Sr., Magli M.C., Krejci R., Gianaroli L. (2007) Chromosome topology in normal and aneuploid blastomeres from human embryos. *Prenat. Diagn.* 27, 1091-1099.
- Farfalli V.I., Magli M.C., Ferraretti A.P., Gianaroli L. (2007) Role of aneuploidy on embryo implantation. *Gynecol. Obstet. Invest.* 64, 161-165.
- Ferraretti A.P., Magli M.C., Kocpow L., Gianaroli L. (2004) Prognostic role of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy in assisted reproductive technology outcome. *Hum. Reprod.* 19, 694-699.
- Fiorentino F., Biricik A., Karadayi H., Berkil H., Karlikaya G., Sertyel S., Podini D., Baldi M., Magli M.C., Gianaroli L., Kahraman S. (2004) Development and clinical application of a strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders combined with HLA matching. *Mol. Hum. Reprod.* 10, 445-460.
- Fiorentino F., Magli M.C., Podini D., Ferraretti A.P., Nuccitelli A., Vitale N., Baldi M., Gianaroli L. (2003) The minisequencing method: an alternative strategy for preimplantation genetic diagnosis (PGD) of single gene disorders. *Mol. Hum. Reprod.* 9, 399-410.
- Geraedts J., Collins J., Gianaroli L., Goossens V., Handyside A., Harper J., Montag M., Repping S., Schmutzler A. (2010) What next for preimplantation genetic screening? A polar body approach! *Hum. Reprod.* 25, 575 - 577.
- Geraedts J.P., Harper J., Braude P., Sermon K., Veiga A., Gianaroli L., Agan N., Munné S., Gitlin S., Blenow E., De Boer K., Hussey N., Kanavakis E., Lee S.H., Viville S., Krey L., Ray P., Emiliani S., Liu Y.H., Vermeulen S. (2001) Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD): a collaborative activity of clinical genetic departments and IVF centres. *Prenat. Diagn.* 21, 1086-1092.
- Geraedts J., Montag M., Magli M.C., Repping S., Handyside A., Staessen C., Harper J., Schmutzler A., Collins J., Goossens V., van der Ven H., Vesela K., Gianaroli L. (2011) Polar body array-CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part I: clinical results. *Hum. Rep.* 26, 3173-3180.
- Gianaroli L., Magli M.C., Ferraretti A.P. (2001) The in vivo and in vitro efficiency and efficacy of PGD for aneuploidy. *Mol. Cell. Endocrinol.* 183, 13-18.
- Gianaroli L., Magli M.C., Ferraretti A.P. (2005) Sperm and blastomere aneuploidy detection in reproductive genetics and medicine. *J. Histochem. Cytochem.* 53, 261-268.
- Gianaroli L., Magli M.C., Ferraretti A.P. (2002) Preimplantation genetic diagnosis. In: *Current practices and controversies in assisted reproduction*. Ed. E. Vayena, P. Rowe, Griffin D. World Health Organization, Geneva, pp.210-219.
- Gianaroli L., Magli M.C., Ferraretti A.P., Fiorentino A., Garrisi J., Munné S. (1997) Preimplantation genetic diagnosis increases the implantation rate in human in vitro fertilization by avoiding the transfer of chromosomally abnormal embryos. *Fertil. Steril.* 68, 1128-1131.
- Gianaroli L., Magli M.C., Ferraretti A.P., Fortini D., Grieco N. (2003) Pronuclear morphology and chromosomal condition as scoring criteria for embryo selection. *Fertil. Steril.* 80, 341-349.
- Gianaroli L., Magli M.C., Ferraretti A.P., Fortini D., Tabanelli C., Gergolet M. (2000) Gonadal activity and chromosomal constitution of in vitro generated embryos. *Mol. Cell. Endocrinol.* 161, 111-116.
- Gianaroli L., Magli M.C., Ferraretti A.P., Iammarrone E. (2000) Preimplantation diagnosis after assisted reproduction techniques for genetically-determined male infertility. *J. Endocrinol. Invest.* 23, 711-716.
- Gianaroli L., Magli M.C., Ferraretti A.P., Lappi M., Borghi E., Ermini B. (2007) Oocyte euploidy,



pronuclear zygote morphology and embryo chromosomal complement. *Hum. Reprod.* 22, 241-249.

- Gianaroli L., Magli M.C., Ferraretti A.P., Munné S. (1999) Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. *Fertil. Steril.* 72, 837-844.
- Gianaroli L., Magli M.C., Ferraretti A.P., Munné S., Balicchia B., Escudero T., Crippa A. (2002) Possible interchromosomal effect in embryos generated by gametes from translocation carriers. *Hum. Reprod.*, 17, 3201-3207.
- Gianaroli L., Magli M.C., Ferraretti A.P., Tabanelli C., Trengia V., Farfalli V., Cavallini G. (2005) The beneficial effects of PGD for aneuploidy supports extensive clinical application. *Reprod. Biomed. Online* 10, 633-640.
- Gianaroli L., Magli M.C., Ferraretti A.P., Tabanelli C., Trombetta C., Boudjema E. (2002) The role of Preimplantation Diagnosis for Aneuploidies. *Reprod. BioMed. Online* 4, 31-36.
- Gianaroli L., Magli M.C., Fiorentino F., Baldi M., Ferraretti A.P. (2003) Clinical Value of Preimplantation Genetic Diagnosis. *Placenta* 24, suppl. 2, 77-83.
- Gianaroli L., Magli M.C., Munné S., Fiorentino A., Montanaro N., Ferraretti A.P. (1997) Will preimplantation genetic diagnosis assist patients with a poor prognosis to achieve pregnancy? *Hum. Reprod.* 8, 1762-1767.
- Gianaroli L., Magli M.C., Munné S., Fortini D., Ferraretti A.P. (1999) Advantages of day 4 embryo transfer in patients undergoing preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *J. Assist. Reprod. Genet.* 16, 170-175.
- Gianaroli L., Munné S., Magli M.C., Ferraretti A.P. (1997) Preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy and male infertility. *Int. J. Androl.* 20, suppl. 3, 31-34.
- Goossens V., Traeger-Synodinos J., Coonen E., De Rycke M., Moutou C., Pehlivan T., Derks-Smeets I.A., Harton G. (2012) ESHRE PGD Consortium data collection XI: cycles from January to December 2008 with pregnancy follow-up to October 2009. *Hum. Reprod.* 27, 1887-1911.
- Handyside A.H., Kontogianni E.H., Hardy K., Winston R.M.L. (1990) Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 344, 768-770.
- Handyside A.H., Montag M., Magli M.C., Repping S., Harper J., Schmutzler A., Vesela K., Gianaroli L., Geraedts J. (2012) Multiple meiotic errors caused by predivision of chromatids in women of advanced maternal age undergoing in vitro fertilization. *Eur. J. Hum. Genet.* 20, 742-747.
- Harper J., Sermon K., Geraedts J., Vesela K., Harton G., Thornhill A., Pehlivan T., Fiorentino F., Sengupta S., De Die-Smulders C., Magli C., Moutou C., Wilton L. (2008) What next for preimplantation genetic screening? *Hum. Reprod.* 23, 478-480.
- Harper J.C., Wilton L., Traeger-Synodinos J., Goossens V., Moutou C., SenGupta S.B., Pehlivan Budak T., Renwick P., De Rycke M., Geraedts J.P., Harton G. (2012) The ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection. *Hum. Reprod. Update* 18, 234-247.
- Harton G.L., Magli M.C., Lundin K., Montag M., Lemmen J., Harper J.C. (2011) ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group-best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS). *Hum. Reprod.* 26, 41-46.
- Magli M.C., Gianaroli L., Ferraretti A.P. (2001) Chromosomal abnormalities in embryos. *Mol. Cell. Endocrinol.* 183, 29-34.
- Magli M.C., Gianaroli L., Ferraretti A.P., Gordts S., Feliciani E. (2002) Impact of parental gonosomal mosaicism detected in peripheral blood on preimplantation embryos. *Reprod. BioMed. Online* 5, 306-312.
- Magli M.C., Gianaroli L., Ferraretti A.P., Gordts S., Fredericks V., Crippa A. (2009) Paternal contribution to aneuploidy in preimplantation embryos. *Reprod. Biomed. Online* 18, 536-542.
- Magli M.C., Gianaroli L., Ferraretti A.P., Lappi M., Ruberti A., Farfalli V. (2007) Embryo

morphology and development is dependent on the chromosomal complement. *Fertil. Steril.* 87, 534-541.

- Magli M.C., Gianaroli L., Ferraretti A.P., Toschi M., Esposito F., Fasolino M.C. (2004) The combination of polar body and embryo biopsy does not affect embryo viability. *Hum. Reprod.* 19, 1163-1169.
- Magli M.C., Gianaroli L., Fortini D., Ferraretti A.P., Munné S. (1999) Impact of blastomere biopsy and cryopreservation techniques on human embryo viability. *Hum. Reprod.* 14, 770-773.
- Magli M.C., Gianaroli L., Grieco N., Cefalu' E., Ruvolo G., Ferraretti A.P. (2006) Cryopreservation of biopsied embryos at the blastocyst stage. *Hum. Reprod.* 21, 2656-2660.
- Magli M.C., Gianaroli L., Munné S., Ferraretti A.P. (1998) Incidence of chromosomal abnormalities from a morphologically normal cohort of embryos in poor prognosis patients. *J. Assist. Reprod. Genet.* 15, 297-301.
- Magli M.C., Grugnetti C., Castelletti E., Paviglianiti B., Ferraretti A.P., Geraedts J., Gianaroli L. (2012) Five chromosome segregation in polar bodies and the corresponding oocyte. *Reprod. Biomed. Online* 24, 331-338.
- Magli M.C., Jones G., Gras L., Gianaroli L., Korman I., Trounson A.O. (2000) Chromosome mosaicism in day 3 aneuploid embryos that develop to morphologically normal blastocysts in vitro. *Hum. Reprod.* 15, 1781-1786.
- Magli M.C., Montag M., Koester M., Muzii L., Geraedts J., Collins J., Goossens V., Handyside A.H., Harper J., Repping S., Schmutzler A., Vesela K., Gianaroli L. (2011) Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part II: technical aspects. *Hum. Reprod.* 26, 3181-3185.
- Magli M.C., Sandalinas M., Escudero T., Morrison L., Ferraretti A.P., Gianaroli L., Munné S. (2001) Double locus analysis of chromosome 21 for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Prenat. Diagn.* 21, 1080-1085.
- Mastenbroek S., Twisk M., van Echten-Arends J., Sikkema-Raddatz B., Korevaar J.C., Verhoeve H.R., Vogel N.E., Arts E.G., de Vries J.W., Bossuyt P.M. et al. (2007) In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N. Engl. J. Med.* 357, 9-17.
- Munné S., Escudero T., Pere C., Xuezhong Z., Oter M., Garrisi M., Barnes F., Zouvers C., Werlin L., Magli M.C., Cohen J. (2004) Predictability of preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy and translocations on prospective attempts. *Reprod. Biomed. Online* 9, 645-651.
- Munné S., Fragouli E., Colls P., Katz-Jaffe M., Schoolcraft W., Wells D. (2010) Improved detection of aneuploid blastocysts using a new 12-chromosome FISH test. *Reprod. Biomed. Online.* 20, 92-97.
- Munné S., Gianaroli L., Tur-Kaspa I., Magli M.C., Sandalinas M., Grifo J., Cram D., Kahraman S., Verlinsky Y., Simpson J.L. (2007) Substandard application of preimplantation genetic screening may interfere with its clinical success. *Fertil. Steril.* 88, 781-784.
- Munné S., Lee A., Rosenwaks Z., Grifo J., Cohen J. (1993) Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum. Reprod.* 8, 2185-2191.
- Munné S., Magli M.C., Bahçe M., Fung J., Legator M., Morrison L., Cohert J., Gianaroli L. (1998) Preimplantation diagnosis of the aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births: XY, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22. *Prenat. Diagn.* 18, 1459-1466.
- Munné S., Magli M.C., Cohen J., Morton P., Sadowy S., Gianaroli L., Tucker M., Márquez C., Sable D., Ferraretti A.P., Massey J., Scott R. (1999) Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. *Hum. Reprod.* 14, 2191-2199.
- Munné S., Márquez C., Magli M.C., Morton P., Morrison L. (1998) Scoring criteria for preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for chromosomes X, Y, 13, 16, 18 and 21. *Mol. Hum. Reprod.* 4, 863-870.
- Munné S., Sandalinas M., Escudero T., Fung J., Gianaroli L., Cohen J. (2000) Outcome of



preimplantation genetic diagnosis of translocations. 73, 1209-1218.

- Munné S., Sandalinas M., Magli M.C., Gianaroli L., Cohen J., Warburton D. (2004) Increased rate of aneuploid embryos in young women with previous aneuploid conceptions. *Prenat. Diagn.* 24, 638-643.
- Munné S., Wells D., Cohen J. (2010) Technology requirements for preimplantation genetic diagnosis to improve assisted reproduction outcomes. *Fertil Steril.* 94, 408-430.
- Schoolcraft W.B., Katz-Jaffe M.G., Stevens J., Rawlins M., Munne S. (2009) Preimplantation aneuploidy testing for infertile patients of advanced maternal age: a randomized prospective trial. *Fertil. Steril.* 92, 157-162.
- Sermon K., Goossens V., Seneca S., Lissens W., De Vos A., Vandervorst M., Van Steirteghem A., Liebaers I (1998) Preimplantation diagnosis of Huntington's disease (HD): clinical application and analysis of the HD expansions in affected embryos. *Prenat. Diagn.* 18, 1427-1436.
- Staessen C., Platteau P., Van Assche E., Michiels A., Tournaye H., Camus M., Devroey P., Liebaers I., Van Steirteghem A. (2004) Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum. Reprod.* 19, 2849-2858.
- Verlinsky Y., Cohen J., Munné S., Gianaroli L., Simpson J.L., Ferraretti A.P., Kuliev A. (2004) Over a decade of experience with preimplantation genetic diagnosis: A multicenter report. *Fertil. Steril.* 82, 292-294.
- Verlinsky Y., Kuliev A. (1996) Preimplantation diagnosis of common aneuploidies in infertile couples of advanced maternal age. *Hum. Reprod.* 11, 2076-2077.
- Wilton L. and Diotallevi L. (1988) Ultra-rapid cryopreservation of 8 cell mouse embryos with a punctured zona pellucida. *Proceedings of the Twentieth Annual Conference of the Australian Society for Reproductive Biology, Newcastle, Australia.* 2077.

In questa collana

- 1 Infertilità di coppia
- 2 Le metodiche di procreazione medicalmente assistita
- 3 Tappe di un ciclo di concepimento assistito
- 4 Risultati dei trattamenti PMA dei Centri SISMeR
- 5 Informazioni e preparazione al ciclo di trattamento PMA
- 6 La biopsia dell'embrione e la diagnosi pre-impianto
- 7 Consensi informati
- 8 Per saperne di più
- 9 Glossario
- 10 Studio dei cromosomi in spermatozoi e cellule uovo
- 11 Laboratorio di andrologia
- 12 Documentazione sugli aspetti legislativi in Italia
- 13 Progetti di ricerca SISMeR



Società Italiana di Studi di Medicina della Riproduzione

Via Mazzini, 12 - 40138 Bologna

T. +39 051 307307

F. +39 051 302933

pazienti@sismer.it

www.sismer.it

UNI EN ISO 9001:2008



SISTEMA DI GESTIONE
QUALITÀ CERTIFICATO
CERTIFICATO N. 1298

CERTIQUALITY
È MEMBRO DELLA
FEDERAZIONE CISQ



AZIENDA CON SISTEMA DI GESTIONE
PER LA QUALITÀ CERTIFICATO DAL 1998