

La Diagnosi Preimpianto

GUIDA AL TRATTAMENTO





GENOMA

si occupa di diagnosi preimpianto da **oltre 12 anni**,
nel corso dei quali **più di 1.000 coppie**
hanno potuto realizzare
il desiderio di avere un figlio,
la più concreta testimonianza del nostro impegno
e della qualità del nostro lavoro.



INDICE

7 Premessa

8 La diagnosi preimpianto e le sue applicazioni

- 10 La Diagnosi Genetica Preimpianto (PGD)
 - 11 Indicazioni alla diagnosi genetica preimpianto
-

14 Le tappe della diagnosi preimpianto

- 16 Come si esegue la PGD
 - 16 Le fasi della PGD
 - 24 La crioconservazione
-

26 Diagnosi preimpianto e rischio genetico

- 28 Diagnosi genetica preimpianto di malattie monogeniche
 - 29 PGD di malattie genetiche + tipizzazione HLA
 - 30 PGD di predisposizione ereditaria ai tumori
-

32 Diagnosi preimpianto e infertilità

- 35 PGD mediante screening delle aneuploidie cromosomiche (PGS)
 - 39 PGD in pazienti portatori di traslocazioni bilanciate
-

40 Diagnosi preimpianto per pazienti con problemi etici

- 42 Diagnosi Genetica Pre-concepimento
-

44 Il percorso del paziente per il trattamento di PGD

52 Diagnosi preimpianto: i rischi della procedura

58 Diagnosi preimpianto: le percentuali di successo

62 GENOMA: l'organizzazione

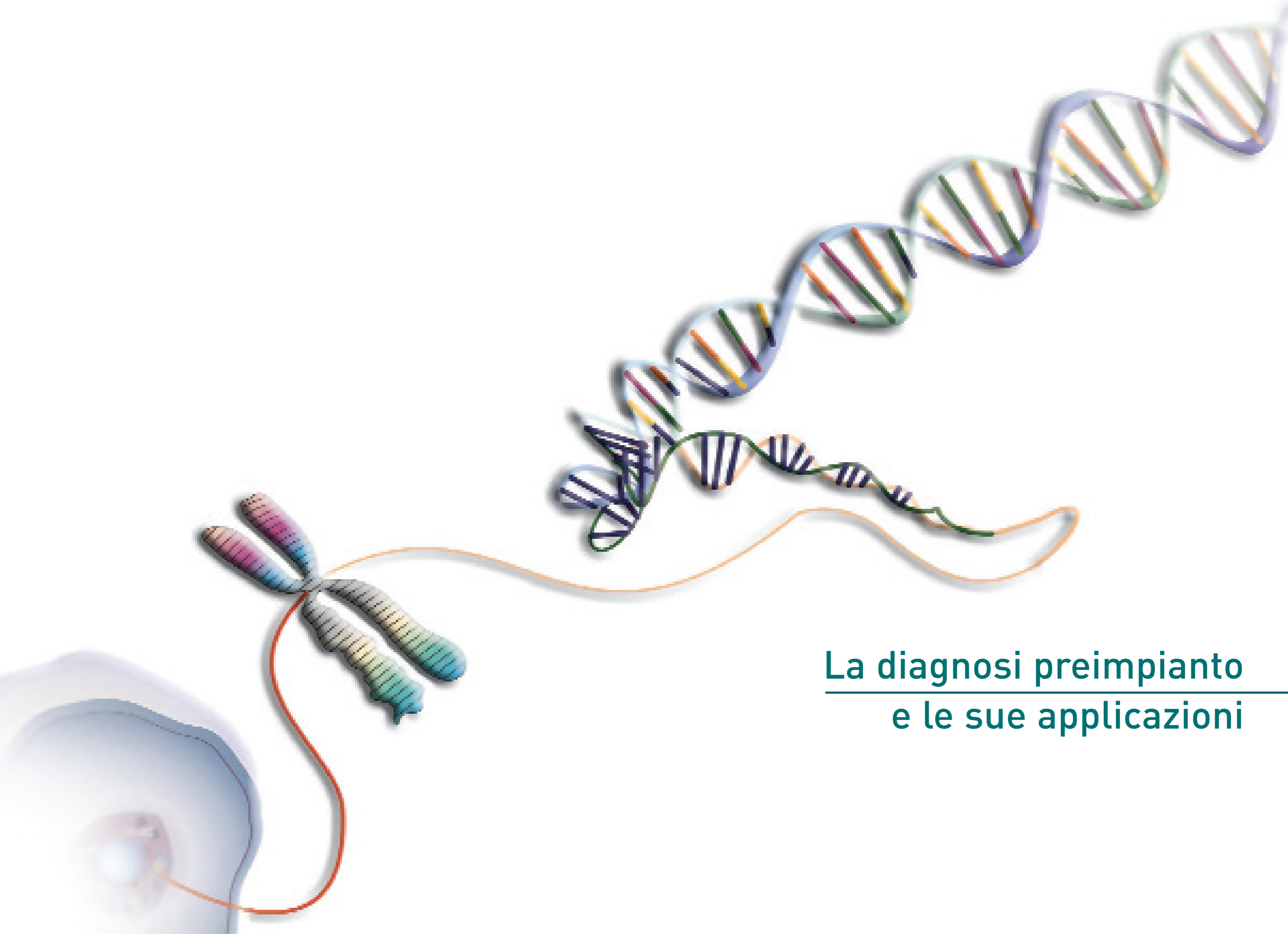
- 65 La sezione di diagnosi preimpianto
- 66 I primati di GENOMA
- 68 Come opera GENOMA
- 70 La tecnologia strumentale di GENOMA
- 71 Il Sistema di Qualità
- 72 La nostra équipe
- 73 L'attività scientifica
- 74 Le nostre pubblicazioni

Scopo di questa brochure è accompagnare la coppia nel percorso della diagnosi preimpianto, passo dopo passo. Conoscere la strada può aiutare a affrontare le difficoltà e a predisporre all'impegno necessario con più serenità ed equilibrio.

Inoltre, conoscere le procedure utilizzate con i relativi rischi e possibilità di successo, fa parte del processo di sviluppo dell'autonomia e della partecipazione consapevole della coppia su cui si fonda un rapporto medico-paziente trasparente ed etico.

Nel caso della diagnosi preimpianto, che coinvolge la sfera più intima della persona, la fiducia umanamente e scientificamente fondata nel medico e nella struttura compensa il disagio che il rischio genetico e/o l'infertilità spesso induce ed è di per sé un elemento di potenziamento delle possibilità di successo. Proprio per questo, pur offrendo delle informazioni di base, non intendiamo in alcun modo sostituirci ad un sereno e proficuo colloquio con il medico.





La diagnosi preimpianto
e le sue applicazioni

PGD

La Diagnosi Genetica Preimpianto

Le coppie che sono portatrici di una malattia genetica ereditaria, o di un'alterazione cromosomica, quindi, a rischio di trasmettere tale anomalia genetica ai figli, hanno la possibilità di ricorrere alle tecniche di diagnosi prenatale (villocentesi o amniocentesi) per la diagnosi della patologia genetica a livello fetale. Sebbene le tecniche di diagnosi prenatale siano al giorno d'oggi delle procedure d'uso comune, nel caso in cui si giunga alla diagnosi di un feto affetto, le coppie che vi fanno ricorso avranno come alternativa la scelta di proseguire la gravidanza o l'interruzione terapeutica della stessa.

L'evoluzione delle tecniche di fecondazione *in vitro* (IVF), e la possibilità di ottenere cellule gametiche ed embrionali utilizzabili per la diagnosi di patologie genetiche, ha determinato un ampliamento delle prospettive applicative della diagnosi prenatale, consentendo di trasferire l'epoca della diagnosi dalla fase "post-impianto" a quella "pre-impianto".

La **Diagnosi Genetica Preimpianto (PGD)** è una procedura, complementare alle tecniche di diagnosi prenatale, che permette di identificare la presenza di malattie genetiche o di alterazioni cromosomiche in embrioni in fasi molto precoci di sviluppo, generati *in vitro* da coppie a elevato rischio riproduttivo, prima del loro impianto in utero. La PGD, quindi, permette di evitare il ricorso all'aborto terapeutico, spesso devastante dal punto di vista psicologico e non sempre accettato dal punto di vista etico/morale.



INDICAZIONI ALLA DIAGNOSI GENETICA PREIMPIANTO

PGD DI MALATTIE MONOGENICHE

Permette di verificare che gli embrioni prodotti da coppie portatrici di malattie genetiche ereditarie (es. Fibrosi Cistica, Beta Talassemia, etc.), non siano affetti dalla specifica patologia. Questa tecnica ha consentito a migliaia di coppie a rischio genetico, di avere figli sani senza dover rinunciare a priori alla gravidanza o essere costretti successivamente all'aborto terapeutico.

PGD DI MALATTIE GENETICHE + TIPIZZAZIONE HLA

In coppie con un figlio affetto da una malattia genetica (es. **Beta Talassemia, Anemia falciforme, Anemia Fanconi**, etc.) la cui cura necessita di trapianto di cellule staminali provenienti da un soggetto HLA compatibile, la tipizzazione HLA associata alla PGD consente di individuare e trasferire gli embrioni che risulteranno, contemporaneamente, sani e HLA compatibili con il figlio malato. Alla nascita del bambino, le cellule staminali presenti nel sangue del cordone ombelicale del nascituro potranno essere isolate e trapiantate nel figlio malato della coppia, per consentirne la guarigione.

PGD DI PREDISPOSIZIONE EREDITARIA AI TUMORI

In coppie portatrici di una mutazione in geni predisponenti allo sviluppo di un tumore specifico (es. **tumore al seno, melanoma, tumore al colon, retinoblastoma**, etc), che può essere trasmessa alla prole, la PGD consente di identificare negli embrioni, prima dell'impianto in utero, la presenza di tali mutazioni predisponenti, evitando così il ricorso all'interruzione di gravidanza a seguito di diagnosi prenatale, la cui accettabilità dal punto di vista etico per tale genere di rischio genetico è controversa.

PGD DI MALATTIE GENETICHE AD ESORDIO TARDIVO

Coppie portatrici di malattie genetiche ad insorgenza tardiva (es. **Corea di Huntington, Alzheimer**), possono utilizzare la PGD al fine di escludere il rischio di trasmissione della malattia ai figli, evitando il ricorso diagnosi prenatale, la cui accettabilità dal punto di vista etico per tale genere di rischio genetico è controversa.

PGD PER TRASLOCAZIONI CROMOSOMICHE

In pazienti portatori di una traslocazione bilanciata (anomalia di struttura dei cromosomi, che non comporta né perdita e né guadagno di materiale genetico, in cui un segmento cromosomico cambia posizione), un'alta percentuale dei gameti può presentare gravi anomalie cromosomiche, che il più delle volte impediscono il concepimento sia naturale che assistito. Queste persone presentano sia una ridotta fertilità che il rischio di generare dei figli affetti da alterazioni cromosomiche.

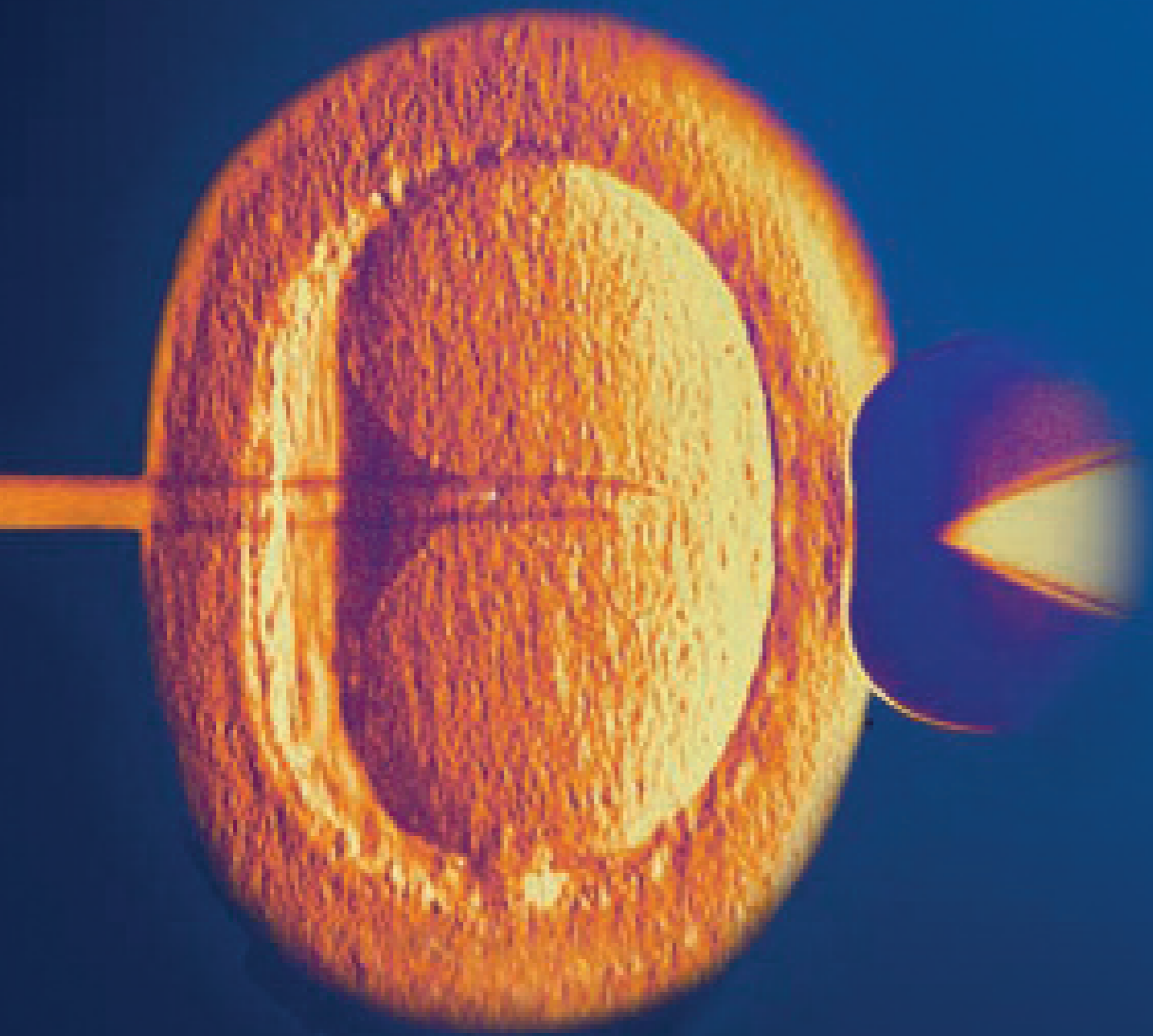
La PGD consente loro di selezionare gli embrioni senza sbilanciamenti cromosomici, migliorando di conseguenza l'*outcome* riproduttivo di queste coppie ed evitando la nascita di bambini con alterazioni cromosomiche gravi.

PGD DI ANEUPLOIDIE CROMOSOMICHE (PGS)

Lo studio dell'assetto cromosomico degli embrioni per il trattamento delle coppie infertili o subfertili che si sottopongono a programmi di concepimento assistito (FIVET o ICSI), viene effettuato nel tentativo di migliorare le percentuali di successo delle tecniche di IVF in gruppi di pazienti caratterizzati da una performance riproduttiva ridotta e/o per ridurre l'incidenza di aborti, ed anche ridurre il rischio di trasferire embrioni con alterazioni cromosomiche. In questi casi, la PGS permette di selezionare e trasferire in utero gli embrioni che all'analisi genetica risulteranno essere privi di anomalie cromosomiche, responsabili delle basse percentuali di successo delle tecniche di PMA. La PGS è indicata per le seguenti categorie di pazienti:

- **“Età materna avanzata” (Advanced Maternal Age - AMA)**, cioè pazienti con età superiore o uguale a 38 anni, in cui la riduzione della potenzialità riproduttiva con il progredire dell'età potrebbe essere attribuita all'elevata percentuale di embrioni con alterazioni cromosomiche.
- **“Ripetuti fallimenti d'impianto” (Repeated Implantation Failure - RIF)**, cioè pazienti che hanno avuto il fallimento in tre o più cicli di trattamento FIVET o ICSI, pur avendo eseguito un trasferimento di embrioni di buona qualità morfologica.
- **“Abortività ricorrente” (Recurrent Miscarriages - RM)**, cioè pazienti nella cui storia riproduttiva si annoverano tre o più aborti spontanei, non dovuti a cause “meccaniche” quali patologie dell'utero (fibromi, malformazioni congenite, etc.), o altri fattori (es. difetti della coagulazione, autoimmunità, traslocazioni cromosomiche, etc.).
- **“Mosaicismo cromosomico”**, cioè pazienti con un cariotipo alterato a causa della presenza di linee cellulari a mosaico
- **“Infertilità maschile grave” (Severe male infertility)**, cioè 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.





Le tappe della diagnosi preimpianto

Come si esegue la PGD?

La PGD combina l'utilizzo delle tecniche di IVF con le più innovative ricerche in campo genetico. I pazienti che richiedono l'accesso alle tecniche di diagnosi preimpianto inizieranno un trattamento di procreazione medicalmente assistita (PMA) che permetterà il recupero degli ovociti da fertilizzare con gli spermatozoi paterni. Una volta ottenuta la fertilizzazione, dagli embrioni ai primi stadi di sviluppo (*day 3*), si preleverà una cellula (blastomero) il cui DNA sarà analizzato in maniera specifica, in relazione al tipo di malattia genetica o patologia cromosomica da diagnosticare. Gli embrioni che risulteranno non affetti verranno trasferiti in utero al fine di generare una gravidanza senza la specifica malattia.

LE FASI DELLA PGD

La diagnosi genetica preimpianto segue uno schema articolato che richiede una stretta coordinazione tra due diverse *equipe*: i *team* del centro di procreazione assistita e quello del laboratorio di genetica molecolare. Per l'esecuzione della PGD sono previste le seguenti fasi:

	TEAM DI PMA	TEAM DI GENETICA
FASE 1	Stimolazione della funzione ovarica	
FASE 2	Prelievo dei gameti e fecondazione	
FASE 3	Coltura <i>in vitro</i> degli embrioni	
FASE 4	Biopsia dell'embrione	
FASE 5		Analisi genetica dei blastomeri
FASE 6	Trasferimento degli embrioni in utero (embryo transfer)	
FASE 7	Accertamento della gravidanza	

FASE 1: LA STIMOLAZIONE DELLA FUNZIONE OVARICA

La prima fase contempla la stimolazione della funzione ovarica. Lo scopo della stimolazione è quello di determinare la crescita contemporanea multipla di follicoli e quindi recuperare il maggior numero di ovociti destinati alla fecondazione, al fine di generare il maggior numero di embrioni su cui effettuare l'analisi genetica.

Praticamente, la stimolazione consiste nella somministrazione di farmaci che stimolano la crescita dei follicoli e la maturazione degli ovociti. I farmaci più comunemente usati si chiamano **Gonadotropine (FSH, LH)**. Questi farmaci si presentano sotto forma di iniezioni intramuscolari o sottocutanee da effettuarsi giornalmente, e sono generalmente associati ad altre sostanze ormonali (denominate Analoghi o Antagonisti del GnRH) che servono sia per



migliorare ulteriormente la risposta alla stimolazione, sia ad evitare un'ovulazione spontanea che renderebbe vana la terapia effettuata.

Lo schema di terapia (**protocollo di stimolazione**) prevede un dosaggio estremamente personalizzato, modificabile durante il corso del trattamento in base alla risposta della paziente. Infatti, la risposta alla terapia è strettamente soggettiva, quindi, deve essere verificata mediante controlli ecografici (**monitoraggio**) a scadenza

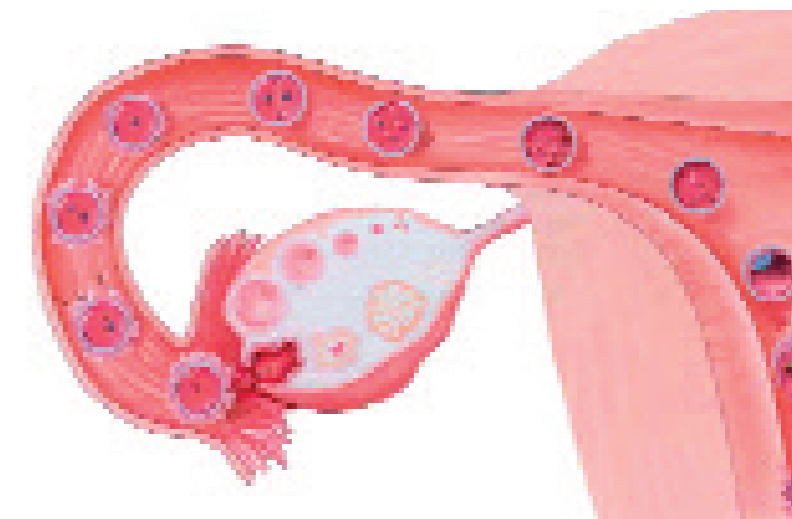
prestabilita e a volte integrata da prelievi di sangue per la misurazione dei livelli ormonali (dosaggi dell'estradiolo, l'ormone prodotto dai follicoli in fase di crescita) al duplice scopo di determinare il momento più appropriato per il recupero degli ovociti ed evitare una eccessiva stimolazione.

Il monitoraggio viene eseguito mediante 3-5 ecografie pelviche transvaginali in cui si valutano il numero, le dimensioni in millimetri dei follicoli ovarici e lo spessore della mucosa dell'utero (endometrio). Quando i follicoli raggiungono il diametro ottimale, alla paziente viene somministrato un farmaco (hCG) che induce la fase finale di maturazione follicolare. Nel caso in cui la coppia non risiedesse a Roma, una parte o l'intero processo di monitoraggio della stimolazione ovarica può essere svolto presso la città di residenza della coppia stessa, mediante la collaborazione con un medico di riferimento. Le coppie si limiteranno a recarsi a Roma per il prelievo degli ovociti ed il trasferimento degli embrioni.

FASE 2: PRELIEVO DEI GAMETI E FECONDAZIONE

• Prelievo degli ovociti (pick-up)

Il prelievo degli ovociti viene effettuato dopo circa 36-37 ore dalla somministrazione di HCG, per aspirazione transvaginale, sotto controllo ecografico. È preceduto da una profilassi antibiotica per prevenire il rischio di infezioni. Per eliminare il disagio della paziente si può effettuare una anestesia locale, togliendo la sensibilità alla parte della vagina in cui passerà l'ago, oppure, più frequentemente, una sedazione profonda somministrando un farmaco endo-



vena che realizza uno stato di incoscienza nei minuti in cui si effettua il prelievo. La tecnica consiste nella introduzione in vagina della sonda ecografica a cui è collegato un supporto che consente il passaggio dell'ago. L'ago penetra il fondo della vagina e raggiunge i follicoli ovarici che vengono aspirati singolarmente. Il liquido follicolare, contenente l'ovocita, viene prelevato grazie ad un sistema di aspirazione e raccolto mediante un tubicino all'interno di una provetta sterile. A questo punto gli ovociti potranno essere identificati dal biologo e posti in speciali terreni di coltura. Dopo il prelievo, che dura dai 10 ai 20 minuti, la paziente rimane in osservazione un paio d'ore: il tempo di smaltire l'effetto della terapia antidolorifica.

• **Prelievo e preparazione del liquido seminale**

Poco dopo il prelievo degli ovociti, al partner maschile viene chiesto di produrre tramite masturbazione un campione di liquido seminale che, dopo adeguata preparazione, viene utilizzato per inseminare gli ovociti. Il seme può essere raccolto precedentemente al giorno del pick up, per poi essere congelato ed utilizzato nel momento in cui è necessario.

• **Fecondazione in vitro mediante iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI - *intracytoplasmic sperm injection*)**

Una volta recuperati, gli ovociti vengono esaminati e valutati nella loro maturità. Questo consente di decidere il momento migliore per la fecondazione. La fecondazione in vitro viene effettuata median-

te procedura di microiniezione conosciuta come **ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*)**. L'ICSI è una tecnica messa a punto per scopi clinici, per fornire una soluzione a problemi di infertilità maschile. Viene solitamente applicata nei casi in cui le caratteristiche del seme non sono compatibili con la normale tecnica di inseminazione.

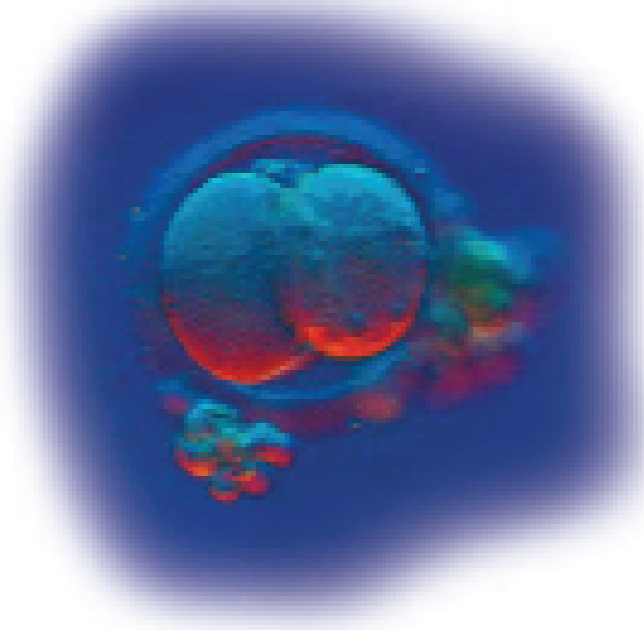
Essa comporta l'iniezione di un singolo spermatozoo all'interno dell'ovocita, e viene effettuata mediante l'ausilio di un particolare microscopio equipaggiato di un micromanipolatore. Questa strumentazione è molto delicata e precisa, consente di bloccare l'ovocita in una posizione corretta per l'inserimento dello spermatozoo, di recuperare il singolo spermatozoo in una micropipetta di vetro e di inserirlo all'interno della cellula uovo.

Per la PGD non è possibile utilizzare la tecnica **FIVET (*Fertilizzazione In Vitro ed Embryo Transfer*)**, in cui l'inseminazione viene effettuata ponendo a contatto ovociti e spermatozoi per un periodo di circa 16-18 ore, in quando ciò determinerebbe un rischio di contaminazione da parte del DNA degli spermatozoi in eccesso e potrebbe falsare i risultati della successiva analisi genetica effettuata sulle cellule embrionali.

FASE 3: COLTURA *IN VITRO* DEGLI EMBRIONI

Negli ovociti che mostrano segni di normale fecondazione si evidenzia la presenza dei **due pronuclei**. Il pronucleo femminile proviene dal nucleo dell'ovocita, il pronucleo maschile corrisponde alla testa dello spermatozoo dove è situato il DNA, e la sua presenza conferma la penetrazione dello spermatozoo, quindi la fecondazione ben avviata.

Questi ovociti vengono mantenuti in coltura, ossia in un ambiente di crescita adeguato, per ulteriori 24-48 ore. Durante questo periodo i due pronuclei scompaiono formando lo **zigote**. Successivamente si assiste alla prima divisione cellulare, momento nel quale si è in presenza dell'embrione vero e proprio.



FASE 4: BIOPSIA DELL'EMBRIONE

• **Tecniche di prelievo per praticare la diagnosi preimpianto**

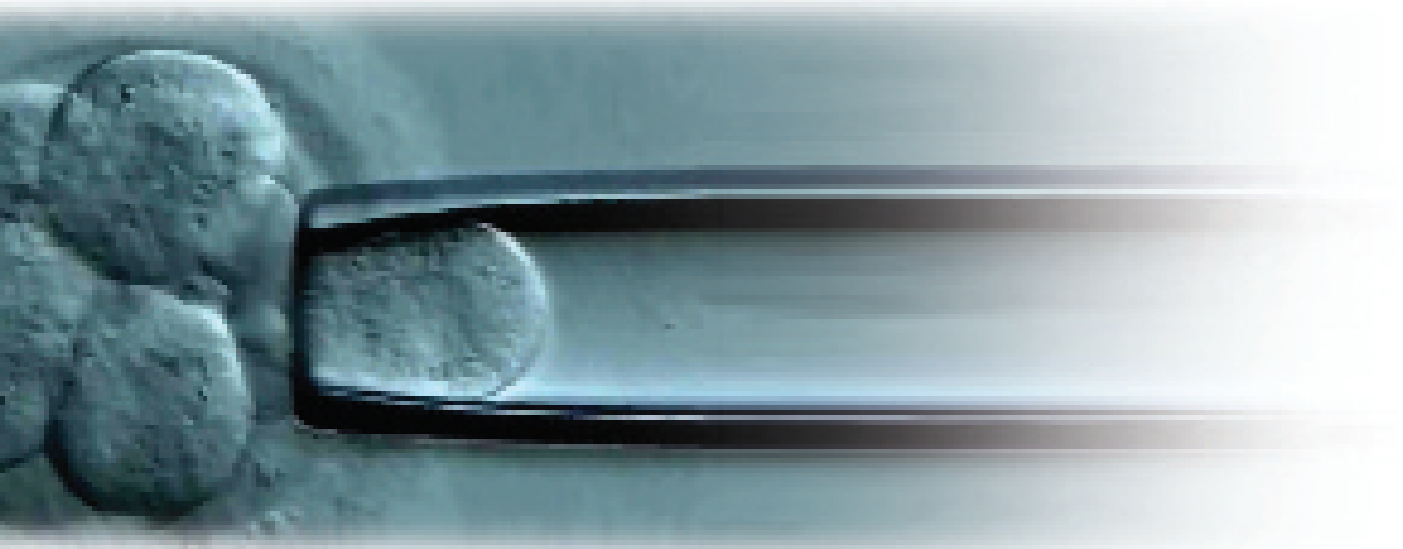
Le cellule da sottoporre ad analisi genetica possono essere ottenute sia dall'ovocita, attraverso il prelievo dei **globuli polari (PB)**, che dall'**embrione**, mediante l'analisi dei blastomeri allo stadio di segmentazione (day-3) o di blastocisti (day-5).

La tecnica di prelievo consiste nel praticare un foro nella zona pellucida, parete che avvolge l'ovocita e l'embrione fino allo stadio di blastocisti. Oggi, nei centri più all'avanguardia, la perforazione della zona pellucida viene effettuata mediante l'azione di un raggio laser. Le cellule vengono, quindi, poste all'interno di una provetta per eseguire l'analisi genetica.

• **Biopsia dei globuli polari (PB)**

Gli ovociti, recuperati per via trans-vaginale dai follicoli ovarici, vengono esaminati al microscopio e liberati dal cumulo ooforo. Gli ovociti maturi, ottimali per lo studio genetico, sono in metafase II, hanno già espulso il primo globulo polare (1PB), e sono idonei per la fecondazione in vitro. Dopo la fecondazione, poco dopo la penetrazione dello spermatozoo, l'ovocita espelle il secondo globulo polare (2PB), completando così la sua maturazione con la seconda divisione meiotica.

I PB vengono prelevati con il micromanipolatore, aspirandoli delicatamente mediante una micropipetta di vetro. Terminata la biopsia, l'ovocita viene rimesso in coltura, mentre ciascun globulo polare viene introdotto all'interno di una provetta per la successiva analisi genetica. La diagnosi preimpianto può essere effettuata sul primo globulo polare (1PB) o mediante analisi sequenziale del primo e del secondo globulo polare (2PB).



• Biopsia dell'embrione nella fase di segmentazione

È la tecnica maggiormente usata dai centri che effettuano PGD. Il terzo giorno (*day 3*) dopo la fecondazione, l'embrione è solitamente allo stadio di 6 - 8 cellule (stadio di clivaggio). In questa fase le cellule sono totipotenti, non compattate e facilmente prelevabili.

Attraverso l'apertura creata nella zona pellucida si introduce una micropipetta di vetro da biopsia, e si aspirano delicatamente uno o due cellule (blastomeri) che vengono poi rilasciati nel terreno di coltura. I blastomeri così ottenuti sono, quindi, sottoposti ad analisi genetica. Se la tecnica è eseguita correttamente non vi sono rischi per l'embrione, come dimostrato da diversi studi scientifici.

• Biopsia dell'embrione allo stadio di blastocisti

La blastocisti, che si forma a partire dal sesto giorno (*day 6*) dopo la fecondazione, contiene da 100 a oltre 300 cellule. Il prelievo di cellule in questa fase è conservativo per l'embrione, in quanto è possibile prelevare un discreto numero di cellule senza creare problemi allo sviluppo successivo dell'embrione. Inoltre dato che con la biopsia si prelevano cellule del trofoectoderma, la massa cellulare interna, che darà origine al feto nelle fasi successive, non è danneggiata, con indiscussi vantaggi biologici ed etici. La biopsia viene effettuata praticando un foro, con la tecnica precedentemente descritta, ed aspirando le cellule (circa 5-10) con una pipetta da biopsia o provocando una erniazione delle cellule del trofoectoderma all'esterno.

FASE 5: ANALISI GENETICA DEI BLASTOMERI

L'analisi genetica da singola cellula è una tecnica molto complessa, che richiede una notevole esperienza professionale e l'impiego di tecnologie strumentale avanzate. Dal punto di vista procedurale, la PGD è totalmente differente dalla diagnosi genetica prenatale. Infatti, dai prelievi dei tessuti fetali si estrae una notevole quantità di DNA, derivante da centinaia di migliaia di cellule. Inoltre, in caso vi sia un dubbio interpretativo e' possibile di ripetere il test, poiché non vi sono restrizioni temporali ed e' disponibile una cospicua quantità di cellule fetali. Nella diagnosi preimpianto, invece, il materiale su cui viene eseguito l'esame genetico è rappresentato da una singola cellula (e quindi un'unica copia di DNA); inoltre i tempi sono molto ristretti, in quanto l'esame deve essere completato in tempo utile per il transfer, entro il *day 5* o *day 6*.

Una volta introdotti i singoli blastomeri o i PB all'interno di differenti provette, si aggiunge una soluzione che consente la lisi delle cellule, e quindi la liberazione del DNA dal nucleo cellulare. Successivamente, mediante una reazione di amplificazione enzimatica in vitro, conosciuta come **Polymerase Chain reaction (PCR)**, si amplifica milioni di volte la regione genica d'interesse (dove, cioè, sono localizzate le mutazioni che causano la specifica malattia). In pratica, considerando la molecola del DNA come un "grosso libro" e la regione genica d'interesse come una "pagina" di questo libro, con la metodica PCR si "fotocopia" milioni di volte questa "pagina", fino ad ottenerne una quantità sufficiente per essere rilevata dalla strumentazione. Il prodotto di amplificazione viene quindi sottoposto ad analisi genetica e/o cromosomica. L'intera procedura viene solitamente completata entro 24 ore dalla biopsia, in tempo per effettuare il transfer degli embrioni in *day 4* o *day 5*.

L'analisi genetica rappresenta la fase più importante e delicata della PGD. Per garantire la massima affidabilità interpretativa è indispensabile che sia effettuata da personale qualificato, con notevole esperienza nel settore, e con l'impiego di metodiche e strumentazioni che permettono di ottenere una diagnosi univoca, che non lasci dubbi interpretativi.

L'analisi di sequenza automatizzata, attualmente, rappresenta il miglior metodo di analisi genetica, in quanto consente l'esatta determinazione e visualizzazione diretta di una specifica mutazione (Fiorentino et al., 2003). L'applicazione di tale tecnica alla PGD, viene eseguita impiegando sofisticate strumentazioni di ultima generazione, completamente automatizzate.



FASE 6: TRASFERIMENTO DEGLI EMBRIONI IN UTERO (EMBRYO TRANSFER)

Dopo l'analisi genetica, gli embrioni risultati sani (cioè privi delle mutazioni o delle anomalie cromosomiche ricercate) vengono trasferiti nella cavità uterina della paziente.

Il trasferimento embrionario è una semplice procedura ambulatoriale, veloce e indolore, che non richiede alcun tipo di analgesia. Uno o più embrioni vengono immersi in una goccia di terreno di coltura ed inseriti sotto osservazione microscopica all'interno di un catetere molto sottile e soffice. La punta di questo catetere oltrepassa il collo dell'utero e raggiunge il fondo uterino dove uno o più embrioni vengono rilasciati delicatamente.

Si noti che ciascun embrione può impiantarsi indipendentemente dagli altri. Così, trasferendo più di un embrione è possibile aumentare le probabilità complessive di ottenere una gravidanza in un determinato ciclo di trattamento, benché aumenti parallelamente anche il rischio di una gravidanza gemellare. Il procedimento richiede in tutto 10-15 minuti, dopodiché la paziente rimane sdraiata circa un'ora e può quindi riprendere le sue normali attività. Nei giorni successivi si raccomanda comunque uno stile di vita tranquillo, evitando impegni fisici importanti. Viene normalmente prescritta una terapia domiciliare a base di somministrazioni quotidiane di Progesterone: l'ormone che aiuta l'endometrio ad essere meglio preparato ad accogliere l'impianto dell'embrione.

• Trasferimento degli embrioni allo stadio di blastocisti

La procedura di trasferimento dell'embrione allo stadio di blastocisti è simile a quella effettuata in 4^a o 5^a giornata. In natura, l'ovocita fecondato raggiunge l'utero attraverso le tube di Fallopio in 5^a-6^a giornata come blastocisti, poi esce dalla zona pellucida circostante (*hatching*) e si impianta in utero (endometrio). Trasferendo l'embrione in utero nella fase di sviluppo di blastocisti, si riproduce ciò che semplicemente avviene durante il concepimento per via naturale. Con i nuovi terreni di coltura e il *know-how* necessario, si riesce a mantenere in coltura efficacemente gli embrioni per 6 giorni dal prelievo degli ovociti ed effettuare il transfer degli stessi in tale fase.

Il trasferimento degli embrioni allo stadio di blastocisti viene solitamente proposto per quelle coppie che hanno effettuato diversi tentativi di ICSI o FIVET, con transfer in 2^a o 3^a giornata, senza ottenere alcuna gravidanza. Tale strategia consente di adattare la procedura di fecondazione in vitro al concepimento per via naturale, al fine di aumentare le percentuali di successo. Il solo svantaggio di questa procedura è che non tutti gli embrioni si sviluppano fino alla sesta giornata, ma statisticamente ne sopravvivono solo la metà.

FASE 7: ACCERTAMENTO DELLA GRAVIDANZA

Trascorsi circa **12 giorni** dal trasferimento dell'embrione in utero, l'esito del trattamento viene in un primo momento verificato tramite il dosaggio del **β -HCG**, un ormone prodotto dall'embrione che si è impiantato, per stabilire se una gravidanza è iniziata. Se il test è **positivo** viene ripetuto per controllare l'evoluzione della gravidanza.

La prima ecografia è prevista alla 6-7 settimana post-transfer. Sarà visibile all'ecografia un'immagine liquida nella cavità uterina (il **sacco gestazionale**), nel quale comparirà un'eco embrionale che diventa pulsatile (**attività cardiaca**). La **gravidanza biochimica** è una gravidanza che viene rilevata solo dalla positività transitoria del β -HCG. La **gravidanza clinica** è definita dalla visualizzazione del sacco gestazionale all'ecografia.

All'esito positivo della visita ginecologica di controllo, la paziente ha concluso il suo percorso e potrà farsi seguire dal ginecologo di fiducia.

È importante, però, che il centro GENOMA conosca gli esiti della gravidanza e del parto: questi dati permettono una valutazione oggettiva dell'efficacia e della sicurezza delle tecniche.

Il fine è quello di tutelare la salute di tutti, in primo luogo delle donne e dei bambini che senza la PGD non sarebbero mai nati.



La Crioconservazione

Si intendono con questo termine tutte le tecniche che consentono di mantenere in vita per un lungo periodo di tempo cellule mediante temperature molto basse (in appositi contenitori contenenti azoto liquido a -196°C). La crioconservazione viene utilizzata per gli spermatozoi, per gli ovociti e per gli embrioni, nei casi consentiti dalla legge.

Congelamento degli ovociti

Conseguentemente all'entrata in vigore della legge 40/2004, la crioconservazione degli ovociti è stata una procedura molto utile per poter utilizzare al massimo una stimolazione ovarica. Gli ovociti in eccesso, e qualitativamente idonei, possono essere congelati e utilizzati successivamente senza necessità di ripetere la stimolazione della crescita follicolare ed il prelievo di ovociti.

Inoltre gli ovociti possono essere crioconservati anche per impreviste cause mediche impedenti il proseguimento del trattamento (vedi es. sindrome da iperstimolazione ovarica).

Il congelamento degli ovociti è una tecnica ancora sperimentale, che, incontra molte difficoltà a causa delle problemi che si incontrano a congelare tali cellule che essendo molto grandi e piene d'acqua, tendono a rovinarsi facilmente durante la procedura di congelamento/scongelo.

In alternativa al tradizionale procedimento di congelamento lento (*slow-freezing*), in cui il campione viene gradualmente portato a -150 gradi e successivamente immerso in azoto liquido (-196°C), attual-

mente si preferisce l'impiego di una nuova tecnica di crioconservazione di avanguardia, la **vitrificazione** che permette di congelare ovociti in modo molto rapido, passando direttamente allo stato "vitreo", impedendo così la formazione di cristalli di ghiaccio, che possono danneggiare le delicate strutture dell'ovocita. Tale processo di vitrificazione si attua mediante apposite procedure, terreni di coltura supplementati con crioprotettori, appositi supporti sui quali è posizionato il materiale biologico e appositi contenitori di azoto liquido (-196°C) per il mantenimento a breve e lungo termine del materiale biologico vitrificato.

Il congelamento degli ovociti mediante vitrificazione è ritenuta oggi essere la tecnica più efficace, con ottimi risultati in termini di sopravvivenza (96.5%) e sviluppo embrionale (risultato essere simile a quello ottenuto con gli ovociti freschi). I tassi di gravidanza sono anch'essi molto incoraggianti.

Congelamento degli embrioni

La Legge 40/2004 sulla fecondazione assistita non consente il congelamento degli embrioni tranne nei casi in cui non risulti possibile trasferire gli embrioni per grave e documentato stato di salute della donna non prevedibile al momento della fecondazione. Inoltre, in deroga al principio generale di divieto di crioconservazione, potranno essere crioconservati gli eventuali embrioni soprannumerari ove il loro trasferimento risulti contrario o alle esigenze di procreazione o all'interesse alla salute del paziente (**Sentenza Corte Costituzionale n.151/2009**).

Dopo lo scongelamento gli embrioni possono essere trasferiti in utero nel corso di un ciclo spontaneo, 2-3 giorni dopo l'ovulazione oppure, come solitamente avviene, nel corso di un ciclo artificiale "pilotato" tramite farmaci. Come gli spermatozoi e gli ovociti, anche gli embrioni possono essere danneggiati dalla crioconservazione: si calcola che sopravviva allo scongelamento il 90% degli embrioni.





**Diagnosi preimpianto
e rischio genetico**

Diagnosi genetica preimpianto di malattie monogeniche

Permette di verificare che gli embrioni prodotti da coppie portatrici di malattie genetiche ereditarie (es. Fibrosi Cistica, Beta Talassemia, etc.), non siano affetti dalla specifica patologia. Questa tecnica ha consentito a migliaia di coppie a rischio genetico, di avere figli sani senza dover rinunciare a priori alla gravidanza o essere costretti successivamente all'aborto terapeutico.

Lo sviluppo delle conoscenze sul genoma umano, con l'identificazione di nuovi geni coinvolti nell'insorgenza di malattie ereditarie, unitamente all'avanzamento della tecnologia strumentale, ha notevolmente esteso il campo di applicazione della PGD. Dal primo caso di PGD per fibrosi cistica eseguito nel 1992, le strategie diagnostiche si sono notevolmente evolute e di conseguenza si è avuta una sensibile crescita del numero di malattie genetiche per le quali è stata applicata la PGD. Oggi esistono protocolli diagnostici per **oltre 200 malattie monogeniche**, 150 dei quali sono stati ottimizzati dal Ns. Centro (Fiorentino et al., 2006).

Patologie genetiche molto comuni nella popolazione italiana, in cui la PGD trova una valida applicazione, comprendono: **Beta-Talassemia, Anemia Falciforme, Emofilia A e B, Distrofia Muscolare di Duchenne-Becker, Distrofia Miotonica, Fibrosi Cistica, Atrofia Muscolare Spinale e X-Fragile**. In linea generale, la PGD può essere applicata per tutte quelle patologie genetiche, autosomiche dominanti, recessive o legate al cromosoma X (X-linked), per le quali è stato identificato il gene responsabile. Il Ns. Centro dispone di un **gruppo di ricerca** che è in grado di sviluppare protocolli diagnostici per qualsiasi malattia genetica. I Ns. ricercatori possono studiare, e ottimizzare per la successiva PGD, anche casi di malattie genetiche rare, di cui non è disponibile la relativa diagnosi genetica. In quest'ultimo caso, il gruppo di ricerca di GENOMA provvederà a studiare il gene responsabile della malattia, determinando la sua sequenza ed effettuando l'analisi di mutazione al fine di identificare la/le alterazione/i causa dell'anomalia genetica.

Successivamente, quindi, verrà studiata una procedura personalizzata di diagnosi preimpianto, adattata alle specifiche mutazioni di cui la coppia è portatrice. Il protocollo diagnostico verrà preliminarmente ottimizzato su un cospicuo numero di singole cellule (linfociti o cellule della mucosa buccale) isolate dai partners della coppia, al fine di verificarne l'efficienza e l'attendibilità diagnostica. Quando i risultati prodotti sono in linea con i parametri suggeriti delle linee guida internazionali, il protocollo potrà essere applicato a livello clinico. Questa fase preliminare è conosciuta come **fase di set-up** diagnostico pre-clinico.

PGD di malattie genetiche + tipizzazione HLA

La tipizzazione dell'HLA in fase preimpianto (*Preimplantation HLA matching*) è stata recentemente proposta quale opzione per coppie con un figlio affetto da una malattia genetica, la cui cura necessita di trapianto di cellule staminali da un soggetto HLA compatibile (Fiorentino et al., 2004, 2005). Per tali pazienti, la PGD viene utilizzata non solo per individuare gli embrioni non affetti dalla specifica malattia, ma anche per selezionare quelli che sono HLA compatibili con il figlio malato.

Alla nascita del bambino, le cellule staminali presenti nel cordone ombelicale del nascituro potranno essere isolate e trapiantate nel figlio malato della coppia, per consentirne la guarigione.

Questa specifica caratteristica della PGD si è rivelata di enorme utilità per questa categoria di pazienti: per la prima volta un metodo di diagnosi genetica diviene uno **"strumento di terapia"**.

Tale tecnica è particolarmente indicata per malattie genetiche quali, per esempio, **la beta talassemia, l'anemia falciforme, l'anemia Fanconi** ed altre emoglobinopatie, curabili mediante trapianto di cellule staminali HLA compatibili, in cui una perfetta



identità molecolare donatore/ricevente e la consanguineità del donatore, offrono un'alta probabilità di sopravvivenza e un ridotto rischio di rigetto o di complicanze post trapianto, a volte fatali.

La presenza di geni HLA identici tra donatore e ricevente è, infatti, un requisito indispensabile affinché il trapianto abbia un esito favorevole e non si inneschino fenomeni di rigetto.

In linea generale, La tecnica PGD + HLA è indicata in tutti i casi di patologie ematologiche in cui vi sia un'alterazione grave del compartimento staminale, sia essa intesa come riduzione quantitativa (**aplasia midollare severa**), qualitativa (**leucemie o linfomi**, in cui avviene una **mutazione neoplastica**) o per difetto congenito (es.

Talassemia). Tale procedura, quindi, può anche essere considerata un'opzione per coppie

non a rischio genetico (cioè non portatrici di malattie genetiche), che hanno un figlio affetto da una malattia non ereditaria, come la leucemia o l'anemia sporadica di Diamond-Blackfan, curabili mediante trapianto di cellule staminali. In quest'ultimo caso, non essendoci nella coppia un rischio genetico, la tipizzazione dell'HLA diviene l'indicazione primaria, e gli embrioni verranno selezionati solo in base al loro profilo HLA.



PGD di predisposizione ereditaria ai tumori

Il **tumore**, oggi, può essere considerato una patologia a componente genetica caratterizzata da una crescita cellulare incontrollata. Le cellule del nostro corpo ricevono dei segnali che indicano loro quando crescere e moltiplicarsi e quando tale crescita deve arrestarsi. Nel tumore tali cellule, a causa di alterazioni del proprio patrimonio genetico, non rispondono ai segnali di controllo e crescono e si moltiplicano irregolarmente diffondendosi in diverse parti del corpo. L'evento che determina l'alterazione della funzione dei geni viene definito mutazione. Quando un gene subisce una

mutazione per cause diverse (biologiche, chimiche, fisiche), le informazioni che arriveranno alla cellula saranno improprie per le funzioni a cui è deputata.

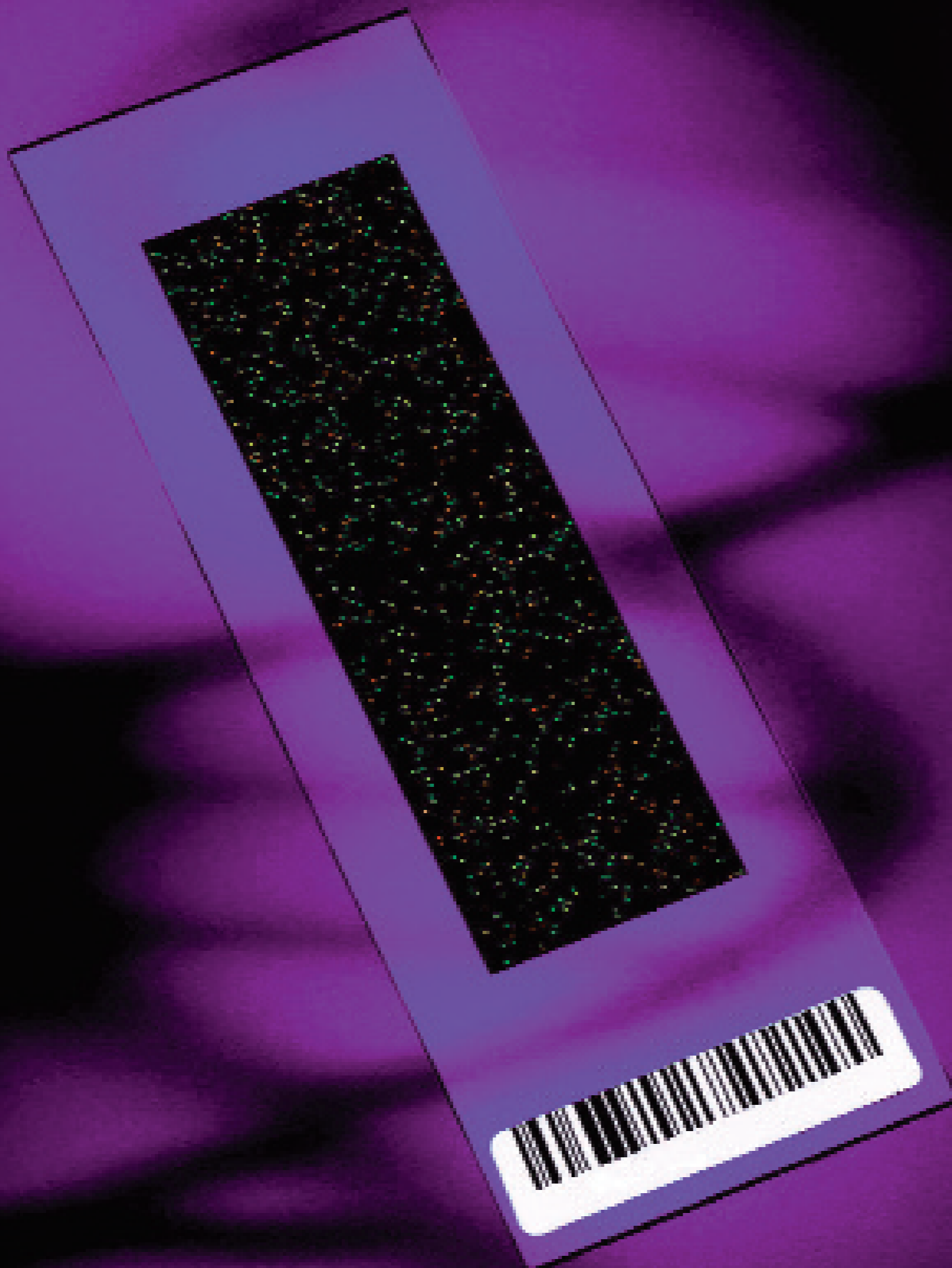
La maggior parte dei tumori sono **sporadici**, cioè le alterazioni del DNA (**mutazioni**) si sviluppano casualmente a livello delle cellule somatiche, cioè quelle cellule che costituiscono ogni organo ed apparato del nostro organismo. Queste mutazioni si originano nel DNA di un ristretto gruppo di cellule e determineranno l'errore genetico che si perpetuerà nelle discendenti di quelle cellule, le quali accumulandosi in un determinato organo si sostituiranno inizialmente al tessuto sano per poi diffondersi in altri organi vicini o a distanza (metastasi). Solo una piccola, anche se significativa, percentuale dei tumori sono **ereditari**.

Oggi si stima che circa il 7% dei tumori alla **mammella**, il 10% dei tumori **ovarici**, circa il 5-10 % dei tumori **colorettali**, e circa il 20% dei tumori midollari della **tiroide** abbiano una componente **eredo-familiare**. In questi tumori le mutazioni del DNA insorgono a livello delle cellule germinali o riproduttive e quindi potranno essere trasmesse alla progenie. L'individuo avrà alla nascita quel difetto genetico su uno o più geni in tutte le cellule dell'organismo, e sarà quindi predisposto a sviluppare una neoplasia quando, nel corso della vita, altre mutazioni si sommeranno a quella predisponente.

Con l'ausilio della **diagnosi preimpianto (PGD)** è possibile identificare negli embrioni, prima dell'impianto in utero, o negli ovociti, prima dello loro fecondazione, la presenza di mutazioni geniche predisponenti allo sviluppo di molteplici tumori ereditari.

La possibilità di diagnosticare questa predisposizione nell'embrione, prima dell'impianto, evita così il ricorso all'interruzione di gravidanza terapeutica, spesso devastante dal punto di vista psicologico e non sempre accettata dal punto di vista etico/morale.

Esempi di tumori ereditari diagnosticabili mediante PGD dal ns. Centro	
Tumore al Seno (BRCA1/BRCA2)	Poliposi Familiare(APC)
Tumore all'ovaio (BRCA1/BRCA2)	Neurofibromatosi (NF1/NF2)
Retinoblastoma (RB1)	Sindrome di Von Hippel Lindau (VHL)
Melanoma familiare(p16)	Neoplasia Endocrine Multipla (MEN1-MEN2-FMCT)
Sindrome di Li-Fraumeni (p53)	Tumore al colon ereditario di tipo non poliposico - HNPCC (MSH2/MLH1)



Diagnosi preimpianto e infertilità

Diagnosi genetica preimpianto ed infertilità

Lo studio dell'assetto cromosomico degli embrioni per il trattamento delle coppie infertili che si sottopongono a programmi di concepimento assistito (FIVET o ICSI), viene effettuato nel tentativo di migliorare le percentuali di successo delle tecniche di IVF (Fertilizzazione in vitro) in gruppi di pazienti caratterizzati da una performance riproduttiva ridotta, ritenuta dipendere dalla presenza, negli embrioni, di anomalie cromosomiche di tipo numerico.

LE ANEUPLOIDIE CROMOSOMICHE

Le alterazioni del numero dei cromosomi, conosciute anche come **aneuploidie**, sono caratterizzate da un numero maggiore o minore di cromosomi rispetto al numero standard.

Si parla, ad esempio, di **trisomia**, quando si riscontra la presenza di un cromosoma in più. A questo gruppo di anomalie cromosomiche appartengono patologie note come **Sindrome di Down** o

Trisomia 21, dove l'individuo presenta 47 cromosomi, ovvero possiede una copia in più del cromosoma 21. **La trisomia 13**, invece, prende il nome di **Sindrome di Patau**, mentre la **trisomia 18**, **Sindrome di Edwards**. Si parla, invece, di **monosomia**, quando si riscontra l'assenza di un cromosoma. A questo gruppo appartengono patologie cromosomiche come la **Sindrome di Turner** in cui è presente un solo cromosoma X.

Tra le aneuploidie, quelle a carico dei cromosomi 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22, X e Y, sono senz'altro quelle maggiormente responsabili di malformazioni fetali che portano a gran parte degli aborti precoci ossia durante il primo trimestre di gravidanza. In alcuni casi le gravidanze con feti affetti dalle suddette aneuploidie possono procedere nel corso dell'età gestazionale e portare alla nascita di neonati affetti dalla relativa patologia cromosomica (probabilità di sopravvivenza alla nascita rispettivamente del 22,1%, 5,4% e 2,8%).

Il meccanismo principale con cui si producono le aneuploidie è costituito dalla **non-disgiunzione**, ovvero dalla mancata separazione dei cromosomi omologhi o dei cromatidi durante la meiosi nel corso della gameto-

genes. Si possono formare quindi gameti rispettivamente con un cromosoma in più ed in meno che, unendosi ad un gamete normale, i primi daranno luogo ad una trisomia, gli altri ad una monosomia.

DIAGNOSI PREIMPIANTO DI ANEUPLOIDIE CROMOSOMICHE (PGS)

Con la diagnosi preimpianto, la selezione degli embrioni da trasferire nell'utero della paziente si basa non solo sull'aspetto morfologico degli stessi ma anche sul loro assetto cromosomico, che ne riflette la loro possibilità di dare origine ad una gravidanza evolutiva. In questi casi, la PGS permette di selezionare e trasferire in utero gli embrioni che all'analisi genetica risulteranno essere privi di anomalie cromosomiche, responsabili delle basse percentuali di successo delle tecniche di concepimento assistito.

La PGS è indicata per le seguenti categorie di pazienti:

“Età materna avanzata” pazienti con età uguale o superiore a 38 anni, in cui la riduzione della potenzialità riproduttiva con il progredire dell'età potrebbe essere attribuita ad elevate percentuali di embrioni con aneuploidie cromosomiche. Numerosi studi, infatti, hanno dimostrato che l'incidenza delle aneuploidie negli embrioni è direttamente proporzionale all'età della donna, con valori che vanno dal 63% (tra i 36 - 37 anni di età) ed arrivano all'81% in età più avanzata. Si è quindi formulata l'ipotesi che la tendenza a produrre embrioni con aneuploidie cromosomiche potesse rappresentare la causa del mancato impianto o di un aborto spontaneo, analogamente a quanto accade nelle donne in età riproduttiva avanzata.

“Ripetuti fallimenti d'impianto” pazienti che hanno avuto un fallimento in tre o più cicli di trattamento FIVET o ICSI, pur avendo eseguito un trasferimento di embrioni di buona qualità morfologica, considerati potenzialmente in grado di dare origine ad una gravidanza.

“Abortività ricorrente” pazienti nella cui storia riproduttiva si annoverano tre o più aborti spontanei, non dovuti a cause “meccaniche” quali patologie dell'utero (fibromi, malformazioni congenite, etc.), o altri fattori (es. difetti della coagulazione, autoimmunità, traslocazioni cromosomiche, etc.).

“Mosaicismo cromosomico” pazienti con un cariotipo alterato a causa della presenza di linee cellulari a mosaico.

“Rischio di ricorrenza” coppie che hanno avuto in precedenza una gravidanza o un figlio affetto da una patologia cromosomica.

“Infertilità maschile grave” 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.



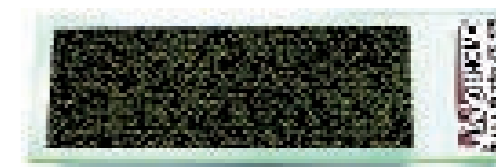
LA TECNICA: ANALISI DELL'INTERO ASSETTO CROMOSOMICO MEDIANTE ARRAY-CGH

L'analisi cromosomica dell'embrione viene effettuata mediante una tecnica innovativa che consente la valutazione dell'intero assetto cromosomico, conosciuta come ibridazione genomica comparativa su microarray (*Array - Comparative Genomic Hybridization* o *Array-CGH*). Tale procedura permette di identificare anomalie cromosomiche di tipo numerico (aneuploidie) a carico dei 22 autosomi (cromosomi dal nr. 1 al nr. 22) e dei cromosomi sessuali (X e Y), o anche variazioni del contenuto di piccole porzioni cromosomiche, come amplificazioni (duplicazioni), delezioni e traslocazioni sbilanciate.

Il principio su cui si basa la tecnica dell'Array CGH è la comparazione quantitativa del DNA in esame o **DNA test** (estratto dalle cellule embrionali) e del DNA genomico di riferimento proveniente da un soggetto sano (*reference DNA*). Durante il processo analitico questi DNA sono marcati in maniera differenziale con molecole fluorescenti e, successivamente, vengono mescolati in parti uguali e fatti incubare (ibridazione) su un **microarray**, costituito da un supporto di vetro la cui superficie è coperta di frammenti di DNA, noti come **sonde** o **cloni**. Ognuno di questi cloni rappresenta una specifica regione del genoma umano, fino a ricomprendere l'intero assetto cromosomico.

Al termine della suddetta incubazione, sia il DNA in esame che quello di controllo si legheranno ai cloni presenti sull'array. Il risultato sarà l'emissione di due distinti segnali fluore-

scenti le cui intensità saranno misurate a seguito di lettura degli arrays mediante un apposito strumento (scanner). Sull'immagine ottenuta verrà poi effettuata l'analisi comparativa tra le intensità di fluorescenza emesse dai due DNA e la relativa elaborazione dei dati mediante un apposito software, al fine evidenziare eventuali variazioni del numero di copie del DNA test. In caso di assetto cromosomico normale, il rapporto tra le due emissioni è bilanciato (1:1). Qualora vi siano nel DNA in esame (embrionale) delle **delezioni** (assenza di un cromosoma o parte di esso), il rapporto tra quest'ultimo ed il DNA di controllo sarà di 1:2 (**monosomia** completa o parziale). Nel caso di **duplicazioni** (presenza di un cromosoma soprannumerario o parte di esso) il rapporto tra il DNA embrionale e quello di controllo sarà di 2:1 (**trisomia** completa o parziale).



IL PERCORSO DEL PAZIENTE PER IL TRATTAMENTO DI PGS

Per l'esecuzione della PGS mediante la tecnica dell'array-CGH sono previste le seguenti fasi:

FASE 1:	Stimolazione della funzione ovarica
FASE 2:	Prelievo dei gameti e fecondazione
FASE 3:	Coltura in vitro degli embrioni
FASE 4:	Biopsia dell'embrione allo stadio di clivaggio o di blastocisti
FASE 5:	Analisi genetica dei blastomeri
FASE 6:	Trasferimento degli embrioni in utero

PERCENTUALI DI SUCCESSO DELLA PGS MEDIANTE ARRAY-CGH

La PGS mediante tecnica dell'array-CGH è una procedura di recente introduzione; i dati preliminari relativi alle percentuali di successo ottenute con questa tecnica si sono rivelati molto soddisfacenti. Schoolcraft e collaboratori hanno riportato l'**84.1%** di gravidanza clinica per *embryo transfer* e percentuali di impianto del **68,9%** (età materna media 37.7). Sher e collaboratori, invece, hanno riportato il **64%** di gravidanza clinica per *embryo transfer* (contro il 37% del campione di controllo) e percentuali di bambini nati per *embryo transfer* del **60%** (contro il 33% del campione di controllo), età materna media 37.6 ± 3.3 . In pratica, con la PGS array-CGH si sono raggiunte delle percentuali di successo di circa il doppio rispetto alla PGS effettuata con la precedente tecnica FISH con screening di 9 cromosomi. Le Ns. percentuali di successo, sono sovrapponibili alle sopracitate pubblicazioni, con il **69.2%** di gravidanza clinica per *embryo transfer* e percentuali di impianto del **62,5%** (età materna media 39.1 ± 3.9).



LE TRASLOCAZIONI CROMOSOMICHE

Ad ogni concepimento, una coppia su cento è a rischio di generare feti con anomalie cromosomiche, che possono giungere al termine della gravidanza oppure venire abortiti. La causa è nelle traslocazioni, alterazioni della struttura dei cromosomi derivanti da uno scambio di porzioni di cromosomi non omologhi. La loro frequenza nella popolazione è molto elevata: ne è portatore un individuo su duecento.

La traslocazione è detta bilanciata se lo scambio non comporta la perdita o il guadagno di materiale genetico. Un soggetto portatore di una traslocazione bilanciata risulta in genere fenotipicamente normale, ma la sua gametogenesi può risultare alterata (si possono formare dei gameti con sbilanciamenti cromosomici che potranno dare origine a zigoti non vitali o patologici). Le traslocazioni costituiscono uno dei più frequenti riscontri nei pazienti con difficoltà riproduttiva. I maschi portatori hanno un potenziale riproduttivo ridotto perché, oltre a produrre gameti con sbilanciamenti cromosomici, presentano alterazioni del numero e della morfologia degli spermatozoi.

Si distinguono due tipi principali di traslocazioni:

- **Traslocazioni reciproche**

Una traslocazione reciproca consiste nello scambio reciproco di segmenti cromosomici tra due cromosomi non omologhi. Questo tipo di traslocazioni avvengono con una frequenza di circa 1 su 600 nati.

- **Traslocazioni Robertsoniane**

Una traslocazione robertsoniana consiste nella fusione di due cromosomi acrocentrici (cromosomi in cui il centromero è situato molto vicino alla parte terminale del cromosoma), che si rompono ambedue in corrispondenza del centromero, ma su lati opposti. Per unione dei frammenti rotti si forma un nuovo cromosoma costituito dalla braccia lunghe dei due elementi originali, e un piccolo cromosoma costituito dalle due braccia corte, che di solito viene perduto. In seguito a questa anomalia, che non ha conseguenze fenotipiche, probabilmente perché il materiale perduto è geneticamente inerte, il corredo cromosomico dell'individuo viene ridotto di un'unità. Le traslocazioni robertsoniane possono coinvolgere tutte le combinazioni possibili di cromosomi acrocentrici (nell'uomo, sono i cromosomi 13, 14, 15, 21 e 22), ma il tipo più comune coinvolge i cromosomi 13 e 14, e viene rilevata con una frequenza di circa 1 su 1300 nati. Come per le altre traslocazioni, i portatori di una traslocazione robertsoniana possiedono un fenotipo normale, ma hanno una più alta probabilità di generare figli affetti da patologie cromosomiche. Ad esempio, i soggetti portatori di traslocazione robertsoniana 14;21 hanno un'alta probabilità di generare figli affetti dalla sindrome di Down, mentre quelli portatori di traslocazione 13;14 hanno un rischio elevato di generare figli affetti da Sindrome di Patau.

DIAGNOSI GENETICA PREIMPIANTO IN PAZIENTI PORTATORI DI TRASLOCAZIONI BILANCIATE

La diagnosi preimpianto è applicata anche per la prevenzione di aborti ricorrenti in pazienti portatori di traslocazioni bilanciate, rappresentati nella misura di circa il 9% nella popolazione fertile. Chi è portatore di traslocazioni bilanciate è perfettamente sano ma un'alta percentuale dei suoi gameti può presentare gravi anomalie cromosomiche. Queste persone hanno una probabilità inferiore alla media di mettere al mondo figli sani, ma la diagnosi preimpianto consente loro di selezionare gli embrioni privi di traslocazioni sbilanciate.

LA TECNICA

L'analisi di anomalie cromosomiche strutturali tipiche delle traslocazioni viene effettuata mediante una innovativa strategia molecolare (PCR fluorescente) ideata GENOMA, che prevede lo studio di marcatori polimorfici STR localizzati sui cromosomi oggetto di traslocazione (Fiorentino et al., 2010). Tale procedura ha prodotto dei risultati strabilianti in termini di percentuali di gravidanza clinica (**75% pregnancy rate per embryo transfer**) e percentuali di impianto (**59,6% implantation rate**), raggiungendo dei valori di oltre il doppio rispetto alla PGD effettuata con la tecnica FISH (Fiorentino et al., 2010).

La strategia molecolare per evidenziare gli sbilanciamenti cromosomici dovuti alla traslocazione viene utilizzata dal ns. Centro in sostituzione della FISH. Quest'ultima, infatti, presenta un margine d'errore, dovuto a falsi positivi o falsi negativi, che in taluni casi può raggiungere valori relativamente elevati (~7-10%). La PGD effettuata mediante PCR fluorescente, invece, ha un rischio di errore sensibilmente inferiore (< 0.5%); tale tecnica, inoltre, permette di evidenziare fenomeni di disomia uniparentale (UPD) e discernere l'origine delle aneuploidie cromosomiche, fornendo preziose informazioni supplementari alla coppia. Così come per l'analisi che impiega la tecnica FISH, le informazioni che si possono ottenere utilizzando la procedura molecolare di PCR fluorescente, riguardano esclusivamente la presenza o meno di uno sbilanciamento cromosomico, e non se l'embrione è portatore di una traslocazione bilanciata, come il genitore.

Per la ricerca di sbilanciamenti cromosomici dovuti a traslocazioni parentali si usano dei protocolli diagnostici opportunamente preparati per ciascuna specifica traslocazione delle riscontrate nelle coppie in studio, che quindi devono essere sottoposti a set up, come per le malattie monogeniche.



Diagnosi preimpianto
per pazienti con problemi etici

L'alternativa alla PGD per i pazienti con problemi etici: l'analisi genetica dell'ovocita (Diagnosi Genetica Pre-concepimento)

La **diagnosi genetica pre-concepimento**, studia i gameti femminili prima della loro fecondazione in vitro mediante la procedura ICSI. L'analisi viene, quindi, eseguita sull'ovocita e non sull'embrione. Ciò consente di superare i problemi etici che taluni pazienti hanno nel ricorrere alla diagnosi preimpianto. Quest'ultima, infatti, comporta la manipolazione dell'embrione mediante biopsia e la crioconservazione di quegli embrioni che all'analisi genetica risultano affetti dalla specifica patologia genetica di cui la coppia è portatrice. Con la diagnosi pre-concepimento, invece, si escludono dalla fecondazione quegli oociti il cui DNA risulta alterato alla diagnosi, e quindi si evita a priori la possibilità di produrre embrioni con anomalie genetiche.

L'analisi genetica dell'ovocita mediante diagnosi del primo globulo polare

L'ovocita maturo è caratterizzato dalla presenza di un primo **globulo polare (1PB)**, che contiene un complemento di 23 cromosomi materni.

Il 1PB, espulso dall'ovocita nella fase finale della sua maturazione, contiene un assetto genetico che è speculare a quello presente nell'ovocita stesso. L'analisi di questa piccola cellula, che non ha alcun ruolo biologico (si potrebbe definire come una cellula accessoria) e degenera dopo alcune ore, fornisce importanti informazioni sullo *status* genetico dell'ovocita e può essere considerata una valida alternativa alla diagnosi preimpianto effettuata sugli embrioni.

Il 1PB, infatti, può essere rimosso con una biopsia ed utilizzato per selezionare quegli oociti che, all'analisi genetica, non presentino una determinata mutazione genica materna. Poiché il 1PB possiede un assetto genetico speculare a quello dell'ovocita, se il 1PB presenta la mutazione ne consegue che l'ovocita risulterà privo della mutazione (e quindi normale). Viceversa, se il 1PB non presenta la mutazione materna, sarà l'ovocita a contenere quella mutazione.

Solo gli oociti normali (cioè senza la mutazione materna) saranno poi fecondati con gli spermatozoi del partner mediante ICSI. In tal caso, gli embrioni ottenuti potranno essere, al massimo, portatori della malattia (se lo spermatozoo conteneva la mutazione paterna), ma non saranno mai affetti dalla malattia.

L'analisi genetica del 1PB può essere complicata da fenomeni di **ricombinazione** (scambio di porzioni cromosomiche), che avvengono regolarmente tra cromosomi omologhi durante la prima divisione meiotica. Se la ricombinazione coinvolge la regione cromosomica contenente il gene causa della malattia genetica, l'ovocita tratterrà una copia normale del gene ed una contenente la mutazione materna. In tal caso la diagnosi genetica dell'ovocita risulterà non informativa e quest'ultimo non potrà essere considerato utile per la fecondazione.

Nel protocollo di diagnosi genetica dell'ovocita mediante analisi del 1PB, i tempi da osservare sono strettissimi (al massimo 4-6 ore). Per questo motivo, l'applicazione della tecnica segue

uno schema articolato che richiede una stretta coordinazione tra due diverse équipe, il team del laboratorio di PMA e quello del laboratorio di genetica molecolare. L'attività di questi due gruppi di professionisti consente di ottenere i risultati entro 6 ore dal prelievo degli oociti.

Una strategia di recente applicazione clinica prevede, in alternativa alla fecondazione degli oociti "a fresco", la crioconservazione degli oociti post biopsia mediante vitrificazione e transfer degli embrioni su ciclo non stimolato. Tale tecnica è stata proposta al fine di evitare il permanere degli oociti negli terreni di coltura per alcune ore prima della ICSI e facilitare anche l'esecuzione dell'analisi genetica, che potrà così essere completata, come per la PGD, entro le 24 ore.

Malattie genetiche diagnosticabili con l'analisi del 1PB

La diagnosi pre-concepimento può essere applicata a coppie portatrici di malattie monogeniche a trasmissione autosomica recessiva, o legata al cromosoma X (X-linked) o a trasmissione autosomica dominante di origine materna. Con questa procedura non possono essere individuati eventuali malattie genetiche a trasmissione autosomica dominante di origine paterna.

Vantaggi della procedura

- L'analisi è effettuata su materiale extra-embriionario, che non ha alcun ruolo biologico. La biopsia del 1PB non incide sullo sviluppo dell'embrione, mantenendo inalterate le relative percentuali di impianto.
- La diagnosi genetica viene quindi eseguita sull'ovocita, l'embrione non viene manipolato. Ciò previene la perdita di embrioni e consente di superare i problemi etici che talune coppie hanno circa l'uso della diagnosi preimpianto.

Limiti della procedura

- L'analisi consente di ottenere solo informazioni relative ad anomalie di origine materna, ed è quindi inapplicabile in caso di malattie genetiche autosomiche dominanti di origine paterna.
- L'elevata incidenza di ricombinazione comporta l'inefficienza della metodica in circa il 50% degli oociti, riducendo quindi il numero di oociti privi di mutazione genica disponibili per essere fecondati.
- Una bassa risposta alla stimolazione ovarica incide sul numero di oociti disponibili per l'analisi genetica. Una buona riserva ovarica, quindi, è un requisito indispensabile per il successo della procedura.
- L'analisi non consente di effettuare la tipizzazione dell'HLA in fase preimpianto, procedura recentemente impiegata da coppie con un figlio affetto da una malattia genetica, per la cui cura è necessario effettuare un trapianto di cellule staminali da un soggetto compatibile.





**Il percorso del paziente
per il trattamento
di diagnosi preimpianto**

Il percorso del paziente per il trattamento di PGD

L'iter del trattamento per la diagnosi genetica preimpianto prevede una serie di *steps* così articolati:

Step 1:	Colloquio preliminare con il Genetista
Step 2:	Esecuzione esami clinici
Step 3:	Ottimizzazione protocollo diagnostico per PGD (set-up pre-clinico)
Step 4:	Colloquio preliminare con il Ginecologo
Step 5:	Trattamento di PMA
Step 6:	Diagnosi genetica preimpianto

Step 1

Colloquio preliminare con il Genetista

Per le coppie che desiderano intraprendere un trattamento di PGD presso GENOMA, la prima tappa consiste nel colloquio preliminare con il genetista della nostra struttura. Per fissare un appuntamento, chiamare la segreteria del Centro al numero **06.8811270**, dalle 8:00 alle 20:00. Vi rammentiamo di portare con voi tutti gli esami già eventualmente eseguiti. Nel corso della consulenza sarà compilata una scheda clinica contenente i dati pertinenti alla coppia, verrà valutata la storia clinica della coppia, prospettata la strategia diagnostica più idonea, illustrate le procedure, le percentuali di successo, i rischi correlati al trattamento e i costi. Nella stessa seduta verrà inoltre consegnata la lista degli esami preliminari, che riguarderanno sia il partner femminile che maschile, e che saranno propedeutici per la scelta del programma successivo. I temi che sono stati oggetto di discussione nel colloquio vengono riassunti in un documento di consenso informato specifico per la parte di PGD, che viene firmato dai pazienti.

Step 2

Esecuzione esami clinici

La coppia esegue gli esami clinici preliminari previsti per l'accertamento di idoneità al trattamento anestesologico e gli esami preconcezionali necessari per evidenziare eventuali patologie in grado di rappresentare un rischio per il decorso della gravidanza e per il nascituro. Le indagini più comunemente richieste sono

PER LA DONNA:



- **ESAMI PRE-OPERATORI, COAGULAZIONE E TROMBOFILIA, SCREENING INFETTIVOLOGICO.**

- **ANALISI ORMONALI:**

Si effettuano nella donna per valutare i livelli ematici degli ormoni **FSH, LH, Estradiolo, Ormone Anti-Mulleriano (AMH) e Prolattina**. In particolare, tali dosaggi ormonali danno indicazioni sulla regolarità dell'ovulazione e quindi indirettamente sull'età biologica dell'ovaio, e servono per stabilire la riserva ovarica della paziente e a modulare una eventuale terapia. Il dosaggio di altri ormoni (**TSH, FT3, FT4**) fornisce indicazioni circa la funzionalità tiroidea.

- **ECOGRAFIA GINECOLOGICA TRANSVAGINALE:**

Questa metodica utilizza gli ultrasuoni emessi da una sonda inserita in vagina attraverso cui si visualizzano su un monitor gli organi genitali interni (utero, ovaie). L'ecografia transvaginale permette, inoltre, di effettuare il conteggio e la determinazione del diametro dei follicoli antrali, ed escludere la presenza di eventuali fibromi o altre patologie uterine, cisti ovariche o altre patologie annessiali.

- **VALUTAZIONE DELLA RISERVA OVARICA:**

La gonade femminile, diversamente da quella maschile, è costituita da un numero finito di unità follicolari, e quindi di cellule uovo, che rappresenta un patrimonio predeterminato suscettibile di un irreversibile depauperamento. Esiste una soglia critica di patrimonio follicolare, al di sotto di cui vi è una riduzione della potenzialità riproduttiva della donna, che può essere dovuta all'età riproduttiva avanzata ma anche ad un ridotto patrimonio follicolare congenito, o alla interferenza di fattori iatrogeni o patologici sulla consistenza e consumo del patrimonio follicolare (infezioni, esiti chirurgici, fattori ambientali, stili di vita, etc.). Un orientamento sulla riserva ovarica può essere ottenuto tramite la valutazione dei livelli di tre ormoni (**FSH, Inibina B, e ormone Anti-Mulleriano - AMH**) e un'ecografia pelvica transvaginale, volta a calcolare il volume delle ovaie e la stima dei follicoli antrali presenti in ciascun ovaio.

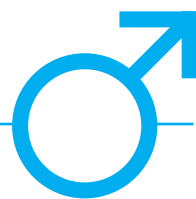
La valutazione della riserva ovarica deve essere fatta dal 2° al 7° giorno dall'inizio del ciclo mestruale. Il "test della riserva ovarica" misura il livello di tre ormoni presenti nel sangue: due di questi ormoni sono prodotti dalle ovaie e il terzo dall'ipofisi, una ghiandola situata nel sistema nervoso centrale. Gli ormoni prodotti dalle ovaie (Inibina B e AMH) all'avvicinarsi della menopausa si riducono mentre quello prodotto dall'ipofisi (FSH) aumenta. La misura del livello degli ormoni associata alla conta follicolare antrale e al calcolo del volume ova-

rico mediante ecografia in fase follicolare precoce del ciclo consentono di stimare la risposta ovarica alla stimolazione farmacologica con gonadotropine per trattamenti di procreazione assistita.

• ESAMI GINECOLOGICI:

- **Tampone cervico-vaginale:** Si effettua per la ricerca di infezioni a carico del basso tratto genitale (**Candida, Germi comuni, Mycoplasma, Ureaplasma, Chlamydia Tracomatis, HPV, Trichomonas, Gardnerella**).
- **Pap-test:** è un esame citologico che permette di verificare la presenza di un'eventuale displasia iniziale o la presenza di una lesione virale che può portare a lesioni neoplastiche del collo dell'utero (HPV- Human Papilloma Virus).
- **Isteroscopia:** è utilizzata per l'esame della cavità uterina e prevede il passaggio di un piccolo strumento a fibre ottiche (l'isteroscopio) attraverso il canale cervicale fino a visualizzare l'intera cavità. Questo esame risulta il più affidabile per la valutazione delle patologie endocavitarie quali miomi, polipi, setti completi e anche subsetti che a volte non vengono evidenziati dalle precedenti metodiche ma che risultano essere importanti nell'infertilità femminile.

PER L'UOMO



• SCREENING INFETTIVOLOGICO

• SPERMIOGRAMMA (ANALISI DEL LIQUIDO SEMINALE):

è uno strumento diagnostico attraverso cui è possibile valutare le principali caratteristiche dell'ejaculato. Oltre alle proprietà chimico-fisiche (volume, pH, fluidificazione e viscosità), vengono valutate concentrazione, motilità e morfologia degli spermatozoi presenti nel campione; tali parametri vengono poi confrontati con gli standard di normospermia proposti ed approvati dal WHO (*World Health Organization*).

• SPERMIOCOLTURA:

È un'analisi che si effettua su un campione di liquido seminale per indagare l'eventuale presenza di popolazioni di microorganismi (batteri e miceti) che possono determinare processi infiammatori a carico delle vie genitali e talora compromettere il processo di fecondazione.

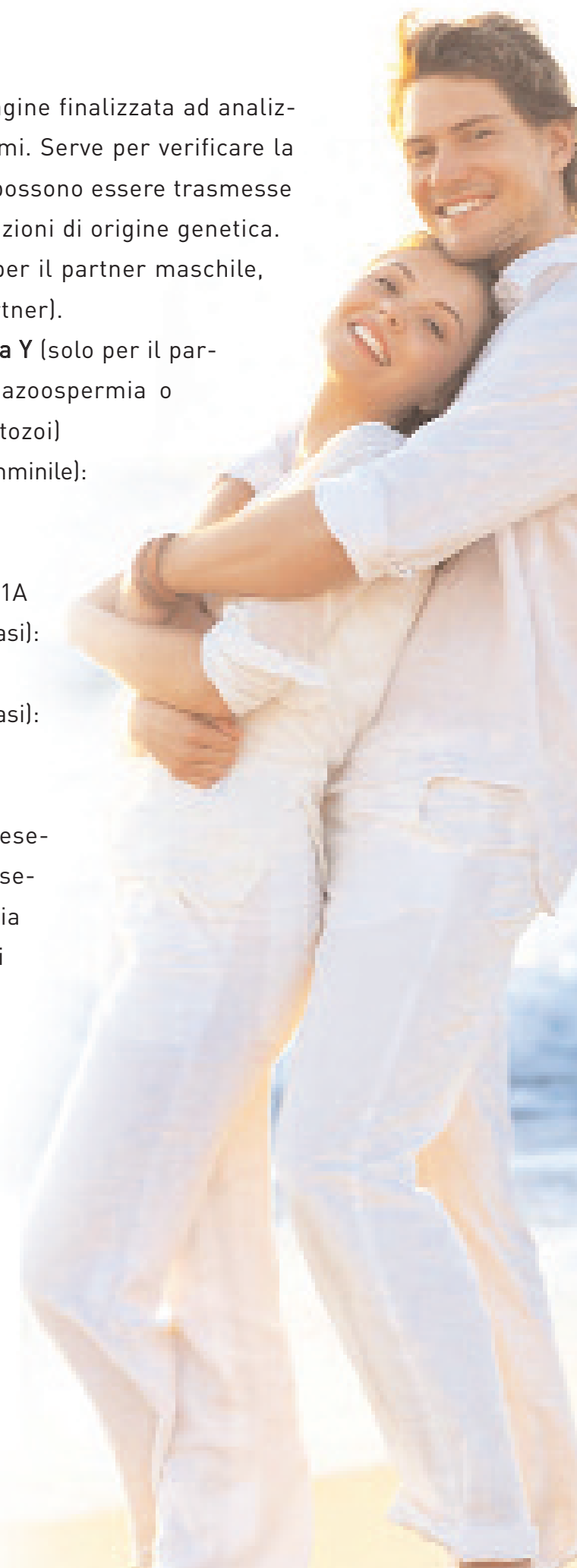
• ESAMI GENETICI:

- **Cariotipo (per entrambi i partners):** indagine finalizzata ad analizzare il numero e la struttura dei cromosomi. Serve per verificare la presenza di anomalie cromosomiche che possono essere trasmesse ai figli e dare luogo a malattie o malformazioni di origine genetica.
- **Ricerca mutazioni Fibrosi Cistica** (solo per il partner maschile, in caso di positività estendere all'altro partner).
- **Ricerca di microdelezioni del cromosoma Y** (solo per il partner maschile, da effettuarsi in caso di azoospermia o severa oligospermia < 5 milioni di spermatozoi)
- **Pannello Trombofilia** (solo per il partner femminile):
 - Fattore II (Protrombina) - mutazione 3'UTR G20210A
 - Fattore V di Leiden - mutazione G1691A
 - MTHFR (Metilentetraidrofolato-reduttasi): polimorfismo C677T
 - MTHFR (Metilentetraidrofolato-reduttasi): polimorfismo A1298C

Gli esami sopra elencati possono essere eseguiti nella città di residenza e dovranno essere controllati prima dell'inizio della terapia o dal proprio medico curante o dai medici del Centro secondo modalità concordate durante il colloquio preliminare. La coppia dovrà poi consegnare copia degli esami durante il colloquio con il ginecologo (vedi step 4).

Nota bene: Non è possibile iniziare la stimolazione senza avere completato le indagini richieste dal medico durante il colloquio preliminare.

Si invitano i signori pazienti a prestare la massima attenzione alla data di scadenza degli esami.



Step3

Ottimizzazione protocollo diagnostico per PGD (set-up pre-clinico)

Questa fase consiste nello studio personalizzato e nell'ottimizzazione di una strategia diagnostica idonea per effettuare la diagnosi genetica preimpianto della specifica malattia genetica o cromosomica di cui la coppia è portatrice. Il protocollo diagnostico verrà preliminarmente ottimizzato su un cospicuo numero di singole cellule (linfociti o cellule della mucosa buccale) isolate dai partners della coppia, al fine di verificarne l'efficienza e l'attendibilità diagnostica. Quando i risultati prodotti saranno in linea con i parametri suggeriti dalle linee guida internazionali, il protocollo potrà poi essere applicato a livello clinico. Questa fase preliminare è conosciuta come fase di **set-up diagnostico pre-clinico**.

Il Ns. Centro dispone di un gruppo di ricerca che è in grado di sviluppare protocolli diagnostici per qualsiasi malattia genetica o cromosomica. I Ns. ricercatori possono studiare, e ottimizzare per la successiva PGD, anche casi di malattie genetiche rare, di cui non è disponibile la relativa

diagnosi genetica. In quest'ultimo caso, il gruppo di ricerca del Laboratorio Genoma provvederà a studiare il gene responsabile della malattia, determinando la sua sequenza ed effettuando l'analisi di mutazione al fine di identificare la/le alterazione/i causa dell'anomalia genetica.

Step4

Colloquio preliminare con il Ginecologo

Nel corso della consulenza con il Ginecologo verrà valutata la storia clinica della coppia dal punto di vista dell'infertilità, presa visione dei risultati degli esami preliminari, illustrate le procedure relative al trattamento di PMA e verranno fornite tutte le altre informazioni che la legge 40/2004 contempla. I temi che sono stati oggetto di discussione nel colloquio vengono riassunti in un documento di consenso informato specifico per la parte di PMA, che viene firmato dai pazienti. Una psicologa è a disposizione della coppia per affrontare le problematiche psicologiche che possono scaturire dall'adesione del programma di procreazione medicalmente assistita. Se la coppia decide di sottoporsi a quanto prospettato dal medico in sede di consulto, si procede all'esecuzione del trattamento di PMA.

Step5

Trattamento di PMA

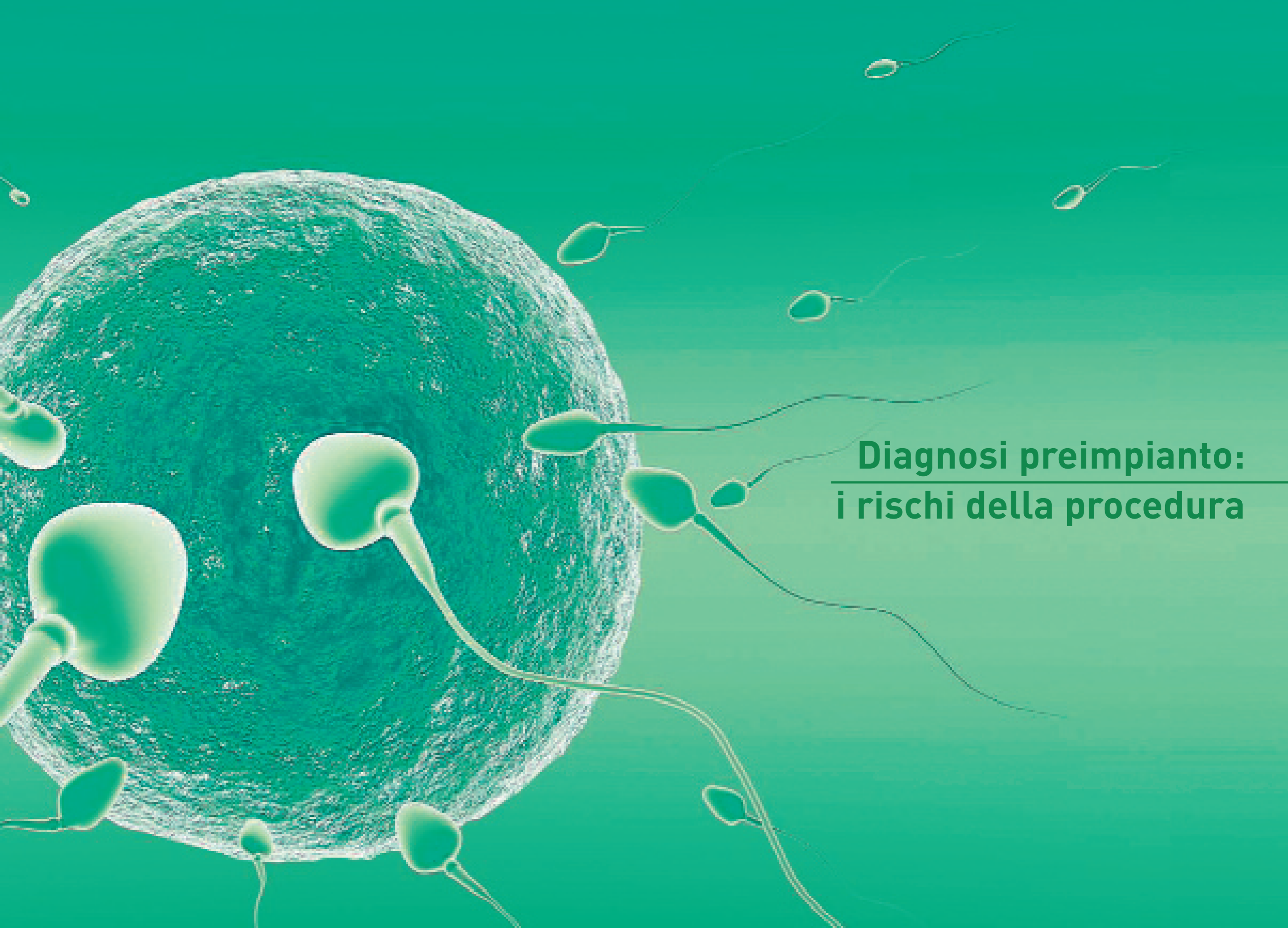
I pazienti che richiedono l'accesso alle tecniche di diagnosi preimpianto inizieranno quindi il trattamento di PMA, iniziando la fase di stimolazione della funzione ovarica, che permetterà il recupero di ovociti da fertilizzare con gli spermatozoi paterni. Una volta ottenuta la fertilizzazione, dagli embrioni ai primi stadi di sviluppo (day 3), si preleverà (biopsia) una cellula il cui DNA sarà analizzato in maniera specifica, in relazione al tipo di malattia genetica da diagnosticare. Gli embrioni che risulteranno non affetti dalla patologia genetica verranno, infine, trasferiti in utero.

Step6

Diagnosi genetica preimpianto

Le singole cellule embrionali (blastomeri) vengono introdotti all'interno di differenti provette e sottoposte ad analisi genetica e/o cromosomica, impiegando sofisticate strumentazioni di ultima generazione, completamente automatizzate.





Diagnosi preimpianto: i rischi della procedura

I rischi della procedura

RISCHI ASSOCIATI ALLE TECNICHE DI PMA

• I rischi per la paziente

La **sindrome da iperstimolazione ovarica (OHSS)** rappresenta la principale complicazione della fase di stimolazione ovarica. Può presentarsi in forme più o meno gravi. La forma lieve interessa una porzione significativa di pazienti (8-20%) e comporta distensione addominale, nausea e ingrossamento delle ovaie. In genere questa forma non richiede ospedalizzazione e si risolve spontaneamente. La forma più grave interessa un'esigua minoranza delle pazienti (circa 0,6%) e comporta alterazioni dell'equilibrio idroelettrolitico ed emocoagulativo (ipercoagulabilità) e si associa ad un abnorme aumento del volume delle ovaie, con dolori addominali, versamento ascitico, pleurico, possibile comparsa di fenomeni tromboembolici e varie altre complicazioni. Poiché le potenziali complicazioni di questa forma possono essere serie, è necessario il ricovero ospedaliero e un attento monitoraggio di vari parametri. Qualora il rischio di sviluppare tale condizione sia elevato, i medici potranno decidere di:

- sospendere il ciclo
- crioconservare gli ovociti
- o, nei casi di insorgenza post-fertilizzazione, di non effettuare il trasferimento degli embrioni e di procedere alla crioconservazione degli stessi ed al loro trasferimento differito non appena le condizioni di salute lo permettano, come previsto dalla legge (Art. 14 comma 3).

I rischi operatori legati al prelievo di ovociti per via transvaginale sono percentualmente molto bassi e comprendono infezioni pelviche (0,8%) e sanguinamento addominale (0,07%), perforazione dei vasi iliaci (0,04%), che possono richiedere un ricovero ospedaliero urgente con eventuale intervento chirurgico laparoscopico. Se il prelievo degli ovociti viene eseguito in anestesia esso implica i rischi generici della procedura anestesiológica adottata.

• I rischi per la madre ed il feto

Alcuni studi suggeriscono che l'incidenza di **aborto spontaneo** nel corso di gravidanze ottenute tramite trattamenti di PMA sia superiore rispetto a quella registrata nelle gravidanze spontanee. Ciò però, piuttosto che indicare un rischio specifico, più verosimilmente rispecchia il fatto che le pazienti che si sottopongono a queste procedure sono interessate da condizioni predisponenti, quale per esempio un'elevata età media.

Nei concepimenti naturali, ma anche in conseguenza di un trattamento di PMA, si possono verificare, con una frequenza di circa il 2-3%, delle **gravidanze ectopiche**, in cui uno o più embrioni si impiantano in una sede diversa dall'utero.

Benché molto meno frequenti, le **gravidanze eterotopiche**, ossia quelle in cui due o più embrioni si impiantano contemporaneamente nell'utero ed in un'altra sede, meritano particolare attenzione poiché possono risultare elusive ovvero non rilevabili da un punto di vista diagnostico. L'impianto in sede ectopica, oltre a non essere compatibile con un normale sviluppo del feto, costituisce un rischio anche per la madre, essendo all'origine di complicazioni emorragiche. Nelle pazienti sottoposte a trattamenti di PMA il rischio materno non costituisce una preoccupazione, perché le gravidanze ectopiche di regola sono individuate precocemente, prima dell'insorgenza delle eventuali complicazioni.

• Rischi per il feto

Uno dei dilemmi più assillanti della PMA riguarda la ricerca di un delicato equilibrio tra la tendenza a trasferire due o più embrioni allo scopo di garantire percentuali di gravidanze sufficientemente elevate e la opposta necessità di non trasferire un numero eccessivo di embrioni, allo scopo di minimizzare i rischi di **gravidanze multiple**.

Ogni sforzo va esercitato per evitare specialmente le gravidanze trigemellari, poiché queste con una frequenza significativa si risolvono in parti molto prematuri, i quali possono comportare una serie di gravi conseguenze per il neonato e di complicazioni ostetriche per la madre. Purtroppo, allo stato attuale non è possibile stabilire con assoluta certezza la capacità di sviluppo di ogni singolo embrione. Di conseguenza, in tutti quei casi in cui viene adottata la scelta di trasferire più di un embrione, il rischio di gravidanze multiple rimane inevitabile. Diversi studi indicano che complessivamente i bambini nati da trattamenti di PMA **hanno alla nascita un peso inferiore** alla norma e vengono partoriti dopo una **gravidanza pretermine**. Questo risultato è ovviamente fortemente influenzato dall'esito ostetrico delle gravidanze multiple. E' però da notare che, per cause da attribuirsi forse alla stessa condizione di infertilità, questo fenomeno si verifica anche nelle gravidanze singole, benché in misura sensibilmente inferiore rispetto a quelle multiple.

• Rischi per il nascituro

La valutazione del rischio di anomalie, malformazioni, patologie neonatali è molto difficile e presenta diversi problemi che sono: l'età materna superiore rispetto alla media della popolazione e la possibile presenza di fattori genetici collegati all'infertilità. Secondo i dati di letteratura più recenti e più ampi per quanto riguarda i casi analizzati, il rischio di malformazioni è lievemente aumentato nei bambini nati da fecondazione assistita rispetto ai nati della popolazione normale. Viene riportato un aumento dal 4,6% nei bambini concepiti spontaneamente ad un 5,6% in quelli concepiti a seguito di FIVET o ICSI (Hum Reprod 2001) o, in un più recente studio prospettico, 6,1% nei bambini concepiti spontaneamente e 8,7% in quelli concepiti a seguito di FIVET o ICSI (Fertil Steril 2004). I nati da ICSI per un fattore di infertilità maschile grave hanno un aumentato rischio di alterazioni cromosomiche (de-novo: 1.6% verso 0.5%; trasmesse: 1.4% verso 0.4% della popolazione normale).

L'aumento sembra essere più correlato alla alterata qualità dei parametri seminali che non alla tecnica ICSI di per sé (Hum Reprod 2002). Tutti i dati relativi invece allo sviluppo cognitivo e psicomotorio sono concordi nel non rilevare alcuna differenza fra i concepiti spontaneamente o a seguito di FIVET e ICSI (Hum Reprod 2003).

Non vi sono dati allo stato attuale che consentano di escludere completamente implicazioni a lungo termine sulla salute dei bambini nati con la fecondazione in vitro classica (e con la tecnica ICSI).

RISCHI ASSOCIATI ALLE TECNICHE DI PGD

Nonostante la sofisticata strumentazione analitica impiegata e gli accorgimenti tecnici utilizzati, le tecniche di diagnosi preimpianto sono efficaci in circa il **95%** delle cellule testate. Una piccola percentuale di embrioni potrebbero rimanere senza una diagnosi conclusiva, a causa di un fallimento nell'amplificazione genica o l'ottenimento di risultati dubbi. In questi casi, il raggiungimento del 100% di efficacia dipende dalla capacità di sviluppare nuove tecnologie più efficienti.

Un altro fattore che limita l'efficacia della procedura è costituito dalla **contaminazione** con materiale cellulare esterno, a causa della quale si potrebbe determinare, oltre che ad un fallimento nella diagnosi finale, anche un errore di diagnosi nel caso in cui tale contaminazione non fosse evidenziata.

Un'altra fonte d'errore è costituita dal cosiddetto fenomeno dell'**ADO (Allele Drop Out)**.

L'ADO consiste nella mancata amplificazione genica di uno dei due alleli, dovuta a motivi tecnici caratteristici della diagnosi genetica da singola cellula, la cui incidenza è stimata intorno al 5%. Se questo fenomeno si verifica, una delle mutazioni ricercate potrebbe non evidenziarsi. E' quindi possibile che un embrione sano sia erroneamente diagnosticato come affetto dalla specifica malattia genetica o alterazione cromosomica investigata, e quindi non essere considerato utile per il successivo **transfer**; oppure che un embrione sia erroneamente diagnosticato come normale, e quindi trasferito in utero materno.

Inoltre, bisogna tener conto del problema del **mosaicismo**, a causa del quale è possibile che cellule provenienti dallo stesso embrione presentino un differente cariotipo. In pratica può accadere che la cellula analizzata mediante PGD risulta normale all'analisi citogenetica, mentre altre cellule dello stesso embrione presentano invece alterazioni cromosomiche, o viceversa. Tale fenomeno, negli embrioni, è relativamente frequente e potrebbe limitare l'efficacia della tecnica o indurre ad errori di diagnosi.

Per l'identificazione di eventuali contaminazioni o del fenomeno dell'ADO, i laboratori qualificati che effettuano diagnosi preimpianto impiegano degli accorgimenti tecnici che riducono al minimo il rischio di ottenere una diagnosi errata, rischio che comunque è sempre esistente, anche se in percentuale molto bassa (< **0.5%**). In particolare, negli ultimi anni, i protocolli diagnostici su singola cellula sono stati integrati dall'introduzione di una strategia che prevede lo studio di marcatori polimorfici STR associati al gene investigato. Tale strategia permette di confermare, in maniera indiretta, la diagnosi ottenuta mediante analisi di mutazione diretta, permettendo quindi di ottenere un doppio controllo dei risultati (Fiorentino et al., 2006). Ciò permette di ottenere delle diagnosi estremamente precise. Per cui, sebbene in caso di gravidanza si consigli di confermare il risultato della diagnosi preimpianto mediante villocentesi o amniocentesi, il ricorso alla diagnosi prenatale per specifica malattia genetica potrebbe essere evitato, se si accetta la percentuale di rischio sopra menzionata. Ovviamente la diagnosi preimpianto non esclude la presenza di eventuali alterazioni cromosomiche specificatamente non ricercate, quindi la diagnosi prenatale per la ricerca di aneuploidie cromosomiche è raccomandata in particolar modo per le pazienti con età superiore ai 35 anni.

Per quanto riguarda il **rischio di errore diagnostico**, nonostante il laboratorio GENOMA, in oltre 4000 casi di diagnosi preimpianto non sia incorso in nessun errore di diagnosi (**Misdiagnosis rate: 0%**), l'errore diagnostico riportato dagli ultimi dati dell' ESHRE PGD Consortium è **inferiore all'1%** (ESHRE PGD Consortium data collection IX. Hum Reprod (2009) 24:1786-810; Wilton L et al., Hum Reprod 2009:24:1221-8.).



0%

**Diagnosi preimpianto:
le nostre percentuali di successo**

Percentuali di successo

Probabilmente il dato più significativo, dal punto di vista dei pazienti, sono le percentuali di successo della procedura. La tecnica, nonostante l'impegno e l'expertise dell'equipe specialistica, non garantisce la gravidanza. Per ogni ciclo di PGD è lecito attendersi, in media, una percentuale di successo intorno al 50%. Purtroppo ciò significa che circa il 50% dei tentativi ha esito negativo. Per via della bassa fertilità della specie umana, in condizioni ottimali una coppia ha una probabilità di concepire pari al 25%, ed in condizioni patologiche tale probabilità può scendere drasticamente, fino a diventare zero.

Il semplice valore numerico della percentuale di gravidanza non è però sufficiente ad interpretare i vari aspetti dell'argomento, poiché non esprime importanti elementi di giudizio. In primo luogo tale valore rappresenta una probabilità media, ossia la frequenza del verificarsi di un determinato evento (la gravidanza) nell'ambito di una popolazione di pazienti. Ma i pazienti, per loro natura, non costituiscono una classe omogenea. È facile così immaginare che le probabilità di successo che una coppia può attendersi possano, in specifici casi, discostarsi notevolmente in senso positivo o negativo dal valore medio, in dipendenza di una serie numerosa di fattori. L'**età della donna** è un fattore fondamentale nel determinare la qualità degli ovociti e in ultima analisi l'esito del trattamento. Il numero di embrioni trasferiti, ma anche alla loro qualità, a loro volta incidono sulle percentuali di successo.

L'espressione delle percentuali di gravidanza varia in funzione del tipo di gravidanza considerato. In genere non si usa presentare le gravidanze biochimiche, ma si preferisce divulgare solo le **percentuali di gravidanza clinica** (con rilevamento del battito cardiaco, che superano l'**11^a settimana**) o ancor meglio quelle che terminano con la nascita dei

bambini (**percentuali di bambini nati** o **take home baby rate**). Le percentuali di gravidanza possono essere espresse per ciclo di stimolazione iniziato, per prelievo ovocitario, per transfer. Di seguito sono riportate le percentuali di gravidanza del Ns. Centro, espresse per trasferimento di embrioni.

Risultati	CATEGORIE DI ETÀ				
	<35	35-37	38-39	40>	Tutte le età
% hCG+	73,5%	53,8%	42,9%	50,0%	59,4%
% Gravidanza Clinica	65,6%	53,8%	42,9%	37,5%	53,6%
% di impianto	37,8%	24,6%	20,8%	15,9%	27,7%
% di bambini nati	63,0%	50,0%	40,0%	37,5%	52,5%

Risultati	CATEGORIE DI PDG		
	SGD	Translocatione	PGS*
%hCG+	58,0%	75,0%	56,5%
% Gravidanza Clinica	50,0%	75,0%	47,8%
% di impianto	25,9%	59,6%	21,3%
% di bambini nati	47,7%	75,0%	38,7%

* Vecchia procedura di analisi 9 cromosomi



GENOMA: l'organizzazione



GENOMA: centro di diagnosi genetica preimpianto (PGD)

Il laboratorio **GENOMA** opera nel settore della procreazione medicalmente assistita (PMA) dal 1998, in qualità di centro specializzato in **diagnosi genetica preimpianto (PGD)**.

GENOMA è considerato uno dei centri più qualificati nel settore della **PGD**, con rilevanza nazionale ed internazionale. Il Centro detiene una tra le più ampie casistiche al mondo per quanto concerne la diagnosi preimpianto:

- **2000** CICLI DI PGD PER MALATTIE MONOGENICHE
- **500** CICLI DI PGD PER MALATTIE MONOGENICHE + TIPIZZAZIONE HLA
- **1000** CICLI DI PGD PER SCREENING ANEUPLOIDIE CROMOSOMICHE (PGS)
- **500** CICLI DI PGD PER TRASLOCAZIONI CROMOSOMICHE
- **PROTOCOLLI DI PGD PER OLTRE 150** DIFFERENTI MALATTIE GENETICHE

Il Centro si avvale di una *équipe* di professionisti altamente qualificati, con riconoscimenti internazionali, supportati da una dotazione strumentale che rappresenta quanto di più moderno e tecnologicamente avanzato sia oggi reperibile.

Il profondo interesse per questo settore e il desiderio di aiutare i numerosissimi pazienti anche al di fuori dei confini nazionali, ha indotto **GENOMA** a creare una rete internazionale di collaborazioni con Centri di IVF, coinvolgendo oltre **50 cliniche** in **Europa, USA** e nel **Medio Oriente**.

Oggi questo network ha accumulato una esperienza tale nella diagnosi preimpianto, da fornire un contributo fondamentale nella conoscenza e nella casistica globale del settore.

Il successo in campo clinico e gli ottimi risultati raggiunti dal suo team di collaboratori hanno consentito al Laboratorio **GENOMA** di divenire il punto di riferimento di numerosi Centri di procreazione assistita nazionali ed internazionali.

DIAGNOSI PREIMPIANTO: I PRIMATI DI GENOMA

1998

il laboratorio **GENOMA** è il primo Centro in Italia ad eseguire la diagnosi preimpianto per una coppia a rischio di Fibrosi Cistica.

2000

GENOMA sviluppa e applica a livello clinico una tecnica innovativa per la ricerca delle mutazioni sulle singole cellule embrionali, conosciuta come “**Minisequencing**” (Fiorentino *et al.*, 2003); la relativa pubblicazione scientifica ha meritato la copertina della rivista *Molecular Human Reproduction*. Questa procedura oggi viene impiegata dalla maggior parte dei Centri che effettuano la PGD.

2003

il laboratorio **GENOMA**, primo in Italia, e uno dei pochi centri al mondo, sviluppa e applica a livello clinico una procedura diagnostica che combina la Diagnosi Preimpianto con il test di tipizzazione dell'HLA. (*Preimplantation HLA matching*) (Fiorentino *et al.* 2004; Fiorentino *et al.*, 2005; Fiorentino *et al.*, 2006; Kahraman *et al.*, 2007; Van de Velde *et al.*, 2009). I numerosi e ben noti studi che ne sono derivati sono stati in seguito utilizzati per curare oltre 100 bambini affetti da malattie ematopoietiche, come la Beta Talassemia, l'Anemia Falciforme, l'Anemia Fanconi, etc.

2003

GENOMA, primo in Italia, sviluppa e applica a livello clinico una procedura di PGD per la predisposizione ai tumori ereditari, come la FAP (Poliposi Adenomatosa Familiare), la Sindrome di Von Hippel-Lindau (VHL), il Retinoblastoma, la Nerofibromatosi e la Sindrome di Li Fraumeni (Fiorentino *et al.*, 2003; 2006).

2003

GENOMA, primo in Italia, sviluppa e applica a livello clinico una procedura di PGD per patologie genetiche ad insorgenza tardiva, come la Corea di Huntington e l'Alzheimer (Fiorentino *et al.*, 2006).

2007

GENOMA, primo al mondo, introduce un nuovo concetto di diagnosi preimpianto, che si allinea alle direttive delle Legge 40/2004, che regola le tecniche di procreazione medicalmente assistita: la **diagnosi genetica pre-concepimento (PCGD)** (Fiorentino *et al.*, 2008).

2009

GENOMA, primo al mondo, introduce una tecnica molecolare innovativa per evidenziare gli sbilanciamenti cromosomici in gameti o embrioni prodotti da pazienti portatori di una traslocazione bilanciata, in sostituzione della tradizionale tecnica di Ibridazione Fluorescente *In-Situ* (FISH), determinando così una evoluzione della diagnosi preimpianto per le traslocazioni cromosomiche (Fiorentino *et al.*, 2010).

2009

il laboratorio **GENOMA**, primo in Italia e uno dei primi centri al mondo, applica a livello clinico una tecnica innovativa che consente la valutazione dell'intero assetto cromosomico dell'embrione: l'ibridazione genomica comparativa su microarray (**Array-CGH**).

COME OPERA GENOMA

GENOMA espleta attività di *service* di diagnosi genetica preimpianto per centri di PMA, sia italiani ed esteri, fornendo un supporto specialistico volto allo sviluppo, all'ottimizzazione ed alla relativa applicazione clinica di protocolli diagnostici impiegati per effettuare l'analisi genetica sulle singole cellule embrionali (blastomeri) o sui gameti (globuli polari).

La diagnosi genetica preimpianto segue uno schema articolato che richiede una stretta coordinazione tra due diverse *équipe*, i team del centro di procreazione assistita (PMA) e del laboratorio di genetica molecolare. Le cellule embrionali o i globuli polari vengono prelevati dall'equipe di embriologi del centro di PMA di riferimento, che collabora con **GENOMA**, e poste all'interno di provette analitiche.

Tali provette vengono quindi preparate per la spedizione, aggiungendo al loro interno una goccia di olio minerale, che mantiene la cellula in un ambiente circoscritto e sterile, evitando la possibilità di contaminazioni esterne e la perdita della cellula nelle pareti della provetta durante il trasporto.

Le provette vengono infine poste all'interno di speciali contenitori refrigerati per il trasporto e recapitate al nostro Centro.

Per la spedizione si fa ricorso ad un servizio speciale, che permette la consegna delle cellule da qualsiasi città europea **entro 3-6h** dalla loro spedizione (il tempo varia in base alla città di provenienza), entro **15-30 minuti** se la PGD si effettua in collaborazione con un centro di PMA di Roma.



LABORATORIO GENOMA

Direttore Tecnico e Scientifico:

Dr. Francesco Fiorentino Biologo Molecolare fiorentino@laboratoriogenoma.it

Genetista:

Dott.ssa Marina Baldi Specialista in Genetica Medica marinabaldi@laboratoriogenoma.it

Diagnosi genetica preimpianto: Unità operativa

Responsabile Unità Operativa:

Dott. Anil Biricik Biologo Molecolare biricik@laboratoriogenoma.it

Responsabile laboratorio di genetica molecolare:

Dr. Andrea Nuccitelli Biologo Molecolare nuccitelli@laboratoriogenoma.it

Responsabile laboratorio di citogenetica molecolare:

Dr.ssa Mariateresa Sessa Citogenetista sessa@laboratoriogenoma.it

Equipe operativa PGD:

Dr.ssa Silvia Michiorri Biologo Molecolare michiorri@laboratoriogenoma.it

Dr.ssa Letizia Spizzichino Biologo Molecolare spizzichino@laboratoriogenoma.it

Dr. Giuliano Cottone Biologo Molecolare cottone@laboratoriogenoma.it

Dr. Nello Vitale Biologo Molecolare vitale@laboratoriogenoma.it

Dr. Luca Brardinoni Biologo Molecolare brardinoni@laboratoriogenoma.it

Dr.ssa Sara Bono Biologo Molecolare bono@laboratoriogenoma.it

Equipe di ricerca PGD: (Genetica molecolare)

Dr.ssa Francesca Pizzuti Biologo Molecolare pizzuti@laboratoriogenoma.it

Dr.ssa Anna Iorillo Biotecnologa iorillo@laboratoriogenoma.it

Dr.ssa Elena D'Angelosante Tecnico di laboratorio biomedico dangelosante@laboratoriogenoma.it

Luana Barbetta Tecnico di laboratorio barbetta@laboratoriogenoma.it

Luca Filippo Caltagirone Tecnico di laboratorio caltagirone@laboratoriogenoma.it

Equipe di ricerca PGD: (Citogenetica molecolare)

Dott.ssa Alessandra Baldi Citogenetista alessandrabaldi@laboratoriogenoma.it

Dr.ssa Elisabetta Calio Citogenetista calio@laboratoriogenoma.it

Dr.ssa Stefania Napoletano Citogenetista napoletano@laboratoriogenoma.it

Dr.ssa Fiorina Caiazza Citogenetista caiazza@laboratoriogenoma.it

Carla Lori Tecnico di laboratorio lori@laboratoriogenoma.it

Sonia Sarullo Tecnico di laboratorio sarullo@laboratoriogenoma.it

Nadia Messina Tecnico di laboratorio messina@laboratoriogenoma.it

Maria Virginia Mattace Tecnico di laboratorio mattace@laboratoriogenoma.it

Ginecologi:

Dr.ssa Elisabetta Iammarrone Specialista in ginecologia e ostetricia; iammarrone@laboratoriogenoma.it

Fisiopatologia della riproduzione umana

Sara Pizziconi Tecnico di laboratorio pizziconi@laboratoriogenoma.it

Patient's Care:

Dott.ssa Maura Menaglia Biologo menaglia@laboratoriogenoma.it

Uffici amministrativi

Direttore Amministrativo:

Dr. Giovanni Spuria Dottore in Economia e Commercio spuria@laboratoriogenoma.it

Amministrazione e Contabilità:

Simona Righi Segretaria amministrativa righi@laboratoriogenoma.it

Patrizia Iovine Segretaria amministrativa iovine@laboratoriogenoma.it

Segreteria:

Tiziana Romanelli Segretaria amministrativa romanelli@laboratoriogenoma.it

Renata Colazzo Segretaria amministrativa colazzo@laboratoriogenoma.it

Nataschia Arghittu Segretaria amministrativa arghittu@laboratoriogenoma.it

Nicoletta Arghittu Segretaria amministrativa narghittu@laboratoriogenoma.it

Ivana Martino Segretaria amministrativa martino@laboratoriogenoma.it

Patrizia Cadderi Segretaria amministrativa cadderi@laboratoriogenoma.it

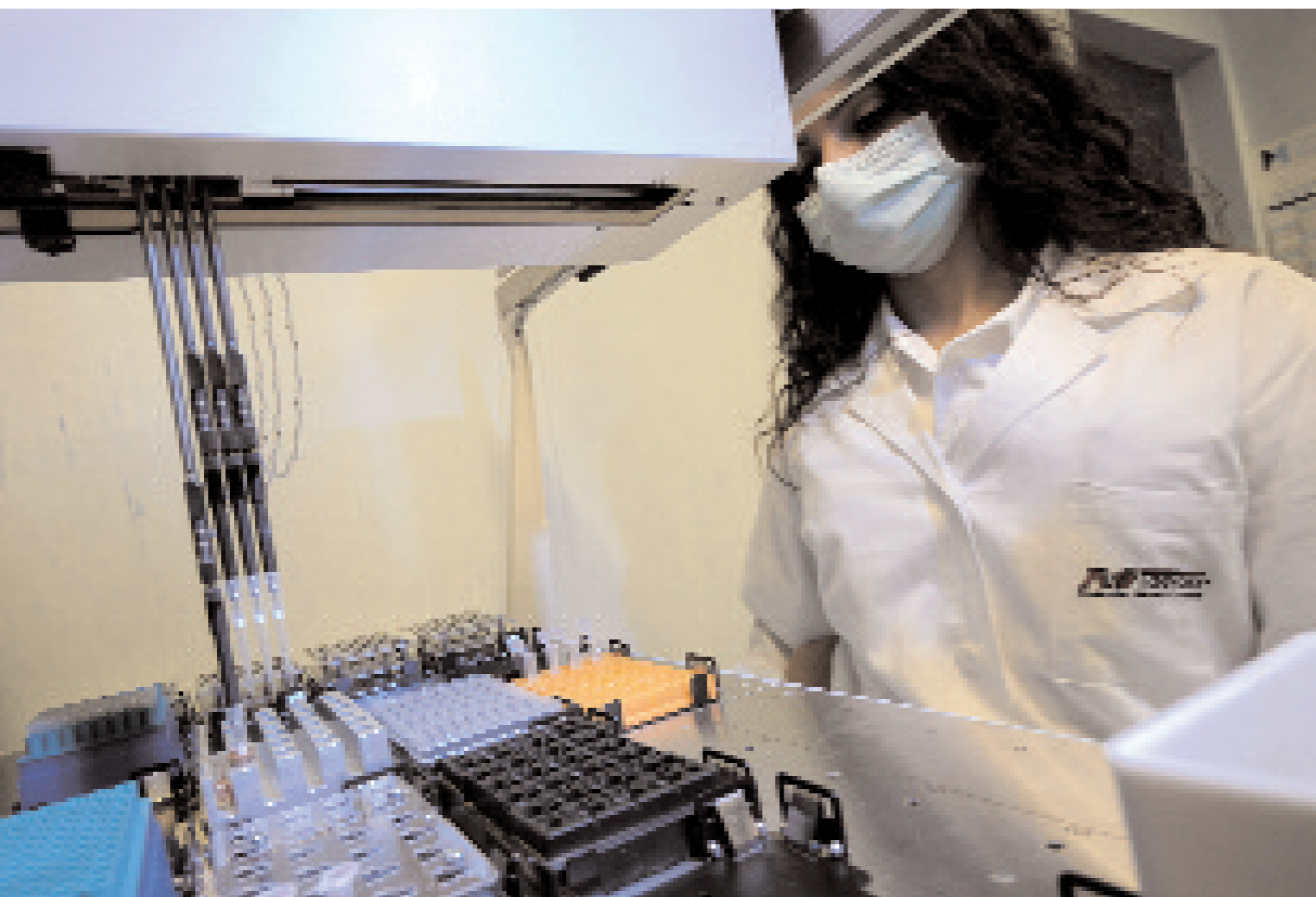
LA TECNOLOGIA STRUMENTALE DI GENOMA

L'evoluzione tecnologica nel settore della diagnosi preimpianto impone un continuo aggiornamento delle strumentazioni. Questo è diventato uno dei nostri punti di forza.

Strumento fondamentale del modello organizzativo del Laboratorio **GENOMA** è rappresentato dalla dotazione strumentale, quanto di più moderno ed avanzato sia oggi reperibile, continuamente aggiornata ai progressi della tecnica ed alle nuove esigenze diagnostiche emergenti.

Tecnologie d'avanguardia e soluzioni robotiche, applicate all'intero processo analitico, contribuiscono ad elevare il livello qualitativo degli esami genetici, garantendo la massima affidabilità dei risultati ottenuti.

Il tutto è coordinato ed integrato da un moderno sistema informatico che costituisce il tessuto connettivo di tutta l'attività.



IL SISTEMA DI QUALITÀ

*Una continua sfida verso il progressivo miglioramento dei nostri servizi
Un continuo impegno per mirare all'eccellenza qualitativa*

Il sistema di qualità del laboratorio **GENOMA** è un processo ben integrato e consolidato in tutte le procedure aziendali.

Implementare un sistema di qualità non significa solo adeguamento a procedure standardizzate volte all'ottimizzazione dei processi. Nel nostro Centro, la qualità è più di un risultato, è un valore aziendale. I nostri laboratori sono concepiti in modo da ottimizzare ogni fase del processo di lavorazione: dalla accettazione dei campioni, alla loro analisi, alla gestione informatizzata dei referti. Al fine di garantire la massima affidabilità dei risultati, l'intera procedura analitica è soggetta a costante controllo da parte di operatori specificatamente dedicati. Grazie al suddetto modello organizzativo ed alle strumentazioni d'avanguardia in dotazione, siamo in grado di garantire elevati standard di qualità.

Il Laboratorio **GENOMA**, è certificato **ISO 9001:2000** e partecipa regolarmente a controlli di qualità esterni - affidati ad istituzioni riconosciute a livello internazionale - che interessano in particolare le analisi molecolari del settore di diagnosi preimpianto. Il centro, inoltre, è in fase di implementazione per l'ottenimento della certificazione **ISO/IEC 15189**.



LA NOSTRA ÉQUIPE

Formazione, Qualificazione e Motivazione sono il segreto di un team di elevata professionalità, con riconoscimenti internazionali

Il fattore umano è stato sempre di primaria importanza per il nostro Centro. Consapevoli di ciò, abbiamo posto il nostro staff al centro della vita aziendale, curandone soprattutto la formazione ed il coinvolgimento in attività che sviluppassero appieno le competenze di ciascun professionista.

Il risultato è la realizzazione di un *team* altamente qualificato che mette la propria professionalità al servizio dei pazienti. Il confronto con la comunità scientifica internazionale, una continua formazione specialistica, supportata da una dotazione strumentale moderna ed avanzata, consente a ciascun componente della struttura di operare ad un livello di competenze estremamente elevato.

I professionisti che operano in **GENOMA** lavorano nel campo della diagnosi preimpianto e della Procreazione Medicalmente Assistita da oltre dodici anni. Un gruppo di oltre **50 professionisti**, tra genetisti, biologi molecolari, ginecologi, ricercatori, tecnici di laboratorio, operano sotto la guida del **Dott. Francesco Fiorentino**, all'interno di una struttura ad alto coefficiente tecnico e scientifico che si dedica alla diagnosi preimpianto sia sotto il profilo dell'applicazione clinica che della ricerca.

Al laboratorio dedicato all'attività clinica si affianca un settore finalizzato espressamente allo sviluppo della ricerca in campo embriologico e genetico. A tal fine **GENOMA** è in collegamento con istituti, clinici e di ricerca, sia in Italia che all'estero. Per questo motivo sono costanti le attività di aggiornamento scientifico alle quali i suoi operatori partecipano. Ne sono testimonianza i numerosi contributi scientifici di cui sono autori gli operatori di **GENOMA**.



L'ATTIVITÀ SCIENTIFICA DI GENOMA

L'attività di ricerca è considerata un elemento essenziale per mirare costantemente all'eccellenza qualitativa.

L'impegno scientifico del Laboratorio **GENOMA** è parte integrante delle attività quotidiane e coinvolge la maggior parte dei professionisti, genetisti, biologi molecolari e ginecologi, che considerano tale settore di primaria importanza.

I risultati più rilevanti dell'attività di ricerca svolta si traducono nella pubblicazione di articoli e capitoli di libri su riviste nazionali e internazionali. Genetisti e biologi molecolari di **GENOMA** hanno espletato diverse collaborazioni scientifiche con prestigiosi istituti di ricerca internazionali, sono stati autori di diverse pubblicazioni scientifiche su riviste internazionali specializzate, presenziando in qualità di *speaker* a numerosi congressi nazionali ed internazionali.

I medici e i biologi di **GENOMA** sono inoltre membri di diverse associazioni scientifiche, tra cui:

- **ASRM - American Society for Reproductive Medicine**
- **ESHRE - European Society of Human Reproduction and Embryology**
- **PGDIS - Preimplantation Genetic Diagnosis International Society**

Il **Dr. Francesco Fiorentino**, direttore del Centro, è inoltre membro del consiglio direttivo del Consorzio Europeo per la Diagnosi Genetica Preimpianto (**ESHRE PGD Consortium Steering Committee**) ed ha contribuito, in qualità di esperto nel settore, a redigere le linee guida internazionali sulla PGD, criteri di qualità seguiti dai migliori centri di diagnosi preimpianto. Il Dr. Fiorentino è anche revisore per diverse riviste scientifiche internazionali, quali:

- **Human Reproduction**
- **Molecular Human Reproduction**
- **Prenatal Diagnosis**
- **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**
- **Fertility and Sterility**
- **Reproductive Bio-Medicine Online**

PUBBLICAZIONI “PEER-REVIEWED” SU RIVISTE SCIENTIFICHE INTERNAZIONALI CON IMPACT FACTOR

- 1 Fiorentino F, Magli MC, Podini D, Ferraretti AP, Nuccitelli A, Vitale N, Baldi M, Gianaroli L. The minisequencing method: an alternative strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders. *Mol Hum Reprod.* 2003 Jul;9(7):399-410.
- 2 Gianaroli L, Magli MC, Fiorentino F, Baldi M, Ferraretti AP. Clinical value of preimplantation genetic diagnosis. *Placenta.* 2003 Oct;24 Suppl B:S77-83
- 3 M Iacobelli, E Greco, L Rienzi, F Ubaldi, D Podini, A Nuccitelli, Jan Tesarik, M Baldi and F Fiorentino Preimplantation genetic diagnosis for Charcot-Marie-Tooth type X *Reproductive BioMedicine Online* 2003 Vol. 7, No. 5 558-562
- 4 Biroccio A., Fiorentino F., et al. (2004) "Glutathione Depletion Induced by c-Myc Down-regulation Triggers the Apoptotic Pathway Upon Treatment with Alkylating Agents" *Neoplasia* May-Jun; 6(3):195-206
- 5 Fiorentino F., Biricik A., Karadayi H.; Berkil H., Karlıkaya G., Sertyel S., Podini D., Baldi M., Magli MC., Gianaroli L. and 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.
- 6 Fiorentino F., Kahraman S., Karadayi H., Biricik A., Sertyel S., Karlıkaya G., Saglam Y., Nuccitelli A. and Baldi M. (2005) Short tandem repeats haplotyping of the HLA region in preimplantation HLA matching. *Eur J Hum Genet.* 13: 953-958.
- 7 Guercini F, Pajoncini C, Bard R, Fiorentino F, Bini V, Costantini E, Porena M. Echoguided drug infiltration in chronic prostatitis: results of a multi-centre study. *Arch Ital Urol Androl.* 2005 Jun;77(2):87-92.
- 8 Benkhalifa M, Kasakyan S, Clement P, Baldi M, Tachdjian G, Demiroglu A, Gurgan T, Fiorentino F, Mohammed M, Qumsiyeh MB. (2005) Array comparative genomic hybridization profiling of first-trimester spontaneous abortions that fail to grow in vitro. *Prenat Diagn.* Oct;25(10):894-900.
- 9 Benassi B, Fanciulli M, Fiorentino F, Porrello A, Chiorino G, Loda M, Zupi G, Biroccio A. c-Myc Phosphorylation Is Required for Cellular Response to Oxidative Stress. *Mol Cell.* 2006 Feb 17;21(4):509-19.
- 10 Fiorentino F., Biricik A., Nuccitelli A., De Palma R., Kahraman S., Iacobelli M., Trengia V., Caserta D., Bonu M.A., Borini A., Baldi M. Strategies and clinical outcome of 250 cycles of preimplantation genetic diagnosis for single gene disorders *Hum Reprod* (2006) 21: 670-684
- 11 Kahraman S, Findikli N, Karliklaya G, Sertyel S, Karadayi H, Saglam Y, Fiorentino F. Medical and social perspectives of PGD for single gene disorders and human leukocyte antigen typing *Reprod Biomed Online.* 2007 Feb;14 Suppl 1:104-8.
- 12 Fiorentino F, Biricik A, Nuccitelli A, De Palma R, Kahraman S, Sertyel S, Karadayi H, Cottone G, Baldi M, Caserta D, Moscarini M. Rapid protocol for pre-conception genetic diagnosis of single gene mutations by first polar body analysis: a possible solution for the Italian patients *Prenatal Diagnosis* 2008 28(1):62-64

- 13 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 What next for preimplantation genetic screening? *Hum Reprod.* 2008 Mar;23(3):478-80.
- 14 Caserta D, Benkhalifa M, Baldi M, Fiorentino F, Qumsiyeh M, Moscarini M. Genome profiling of ovarian adenocarcinomas using pangenomic BACs microarray comparative genomic hybridization. *Mol Cytogenet.* 2008 May 20;1(1):10.
- 15 Van de Velde H, De Rycke M, De Man C, De Hauwere K, Fiorentino F, Kahraman S, Pennings G, Verpoest W, Devroey P, Liebaers I. The experience of two European preimplantation genetic diagnosis centres on human leukocyte antigen typing. *Hum Reprod.* 2009 Mar;24(3):732-40.
- 16 Fusco C, Frattini D, Farnetti E, Nicoli D, Casali B, Fiorentino F, Nuccitelli A, Giustina ED. Hereditary spastic paraplegia and axonal motor neuropathy caused by a novel SPG3A de novo mutation. *Brain Dev.* 2009 Sep 5
- 17 Fiorentino F, Kokkali G, Biricik A, Stavrou D, Ismailoglu B, De Palma R, Arizzi L, Harton G, Sessa M, Pantos K. PCR-based detection of chromosomal imbalances on embryos: the evolution of PGD for chromosomal translocations *Fert Steril* (in press).
- 18 Joyce Harper, Edith Coonen, Martine De Rycke, Francesco Fiorentino, Joep Geraedts, Veerle Goossens, Gary Harton, Celine Moutou, Tugce Pehlivan, Pam Renwick, Sioban SenGupta, Joanne Traeger-Synodinos, Katerina Vesela. What next for Preimplantation Genetic Screening (PGS)? A position statement from the ESHRE PGD Consortium Steering Committee. *Hum Reprod* (in press)
- 19 Harton, GL, De Rycke, M, Fiorentino, F, Moutou, C, SenGupta, S, Traeger-Synodinos, J, and Harper, JC ESHRE PGD Consortium Best Practice Guidelines for Amplification-Based Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) *Human Reprod* (in press)

LIBRI NAZIONALI ED INTERNAZIONALI

Francesco Fiorentino

Preimplantation genetic diagnosis, current status and future prospects da 24[^] Recent advances in obstetrics and gynaecology - W. Dunlop, W. Ledger - The Royal Society of Medicine Press

Francesco Fiorentino

La diagnosi genetica preimpianto: problemi pratici e questioni applicative in campo medico Da Tecnologie riproduttive e tutela della persona - G. Baldini, M. Soldano - Firenze University Press

F. Fiorentino, M. Baldi, M. Benkhalifa, L. Chessa, D. Caserta, M. Moscarini

The genetics of polycystic ovarian syndrome da polycystic ovarian syndrome ed. Gautam N Allahbadia, Rina Agrawal

Francesco Fiorentino Alan H. Handyside, Mark D. Robinson

Preimplantation genetic diagnosis using whole genome amplification Whole Genome Amplification, Chapter 11, edited by S.Huges and R. Lasken, 2006.

F. Fiorentino, M. Baldi, M. Benkhalifa, D. Caserta, M. Moscarini.

Diagnosi Preimpianto Da "Diagnosi Prenatale", Carmine Nappi, felice Pretraglia, ed. Poletto

Genoma s.r.l.

Sede Principale:

Laboratori e Studi Medici

Via Castel Giubileo, 11 - 00138 Roma

Tel. +39 06 8811270 (6 linee)

Fax +39 06 64492025

Sede legale e Studi Medici:

Via Po, 102 - 00198 Roma

Tel. +39 06 85304150 • + 39 06 85358425

Fax. +39 06 85344693

info@laboratorigenoma.eu
www.laboratorigenoma.eu
www.diagnosipreimpianto.info

