

**DICHIARAZIONE DI INFORMAZIONE E CONSENSO ALLO SCONGELAMENTO DI EMBRIONI
CRIOCONSERVATI
con TEST GENETICO PRE-IMPIANTO PER ANEUPLOIDIE (PGT-A)
e PER MALATTIE MONOGENICHE EREDITARIE (PGT-M)**

Approvato dalla Direzione Sanitaria dell'IRCCS Istituto Clinico Humanitas

Ai sensi del DECRETO 28 dicembre 2016, n. 265. **Regolamento recante norme in materia di manifestazione della volontà di accedere alle tecniche di procreazione medicalmente assistita, in attuazione dell'articolo 6, comma 3, della legge 19 febbraio 2004, n. 40 – GU 18 febbraio 2017.**

Io sottoscritta _____ nata a _____ il _____

Io sottoscritto _____ nato a _____ il _____

Desideriamo procedere allo scongelamento di tutti gli embrioni crioconservati presso il vostro Istituto

- prima dell'approvazione della legge 40/2004 o dopo le modifiche apportate alla luce della sentenza n° 151 della Corte Costituzionale.
- crioconservati a seguito di un grave impedimento imprevisto che non ha consentito il trasferimento a fresco.
- trasportati da altro Istituto Italiano o Estero rispondente alla normativa CE a fini procreativi.

Sappiamo che la percentuale di sopravvivenza degli embrioni dopo crioconservazione non è stimabile e può variare dallo 0 al 100%.

Ne consegue che il test genetico pre impianto per malattie monogeniche ereditarie (PGT- M) potrà essere effettuato solo sugli embrioni sopravvissuti.

Siamo stati informati che non si è riscontrato un aumento di difetti congeniti dopo crioconservazione, scongelamento e biopsia del trofoectoderma degli embrioni.

Queste condizioni preliminari mi / ci sono state spiegate in sede di crioconservazione degli embrioni e sono state oggetto del consenso allegato alla cartella clinica di ricovero, al momento del prelievo degli ovociti e/o oggetto di approfondita discussione antecedente al trasporto degli embrioni da altro Istituto.

Dichiariamo di desiderare che gli embrioni siano scongelati al fine di eseguire, sui sopravvissuti, il test genetico pre-impianto per malattie monogeniche ereditarie.

Siamo consapevoli che gli embrioni sopravvissuti alla biopsia del trofoectoderma ai fini della PGT- M saranno crioconservati in attesa della diagnosi e del successivo trasferimento.

Diamo atto di aver sostenuto un colloquio preliminare, durante il quale i sanitari hanno soddisfatto le nostre domande e chiarito i dubbi riguardo alla procedura che stiamo per affrontare, inclusa la percentuale di successo, ed abbiamo compreso le indicazioni della tecnica prevista.

Sappiamo inoltre che durante il trattamento l'équipe sarà disponibile a rispondere alle nostre domande e a prendere in considerazione i nostri problemi.

Siamo informati di poterci ritirare da questo programma in ogni momento e per qualsiasi ragione sino al momento dello scongelamento degli embrioni, che dovranno, quindi, in ogni caso, se sopravvissuti, essere sottoposti a PGT-M.

CONSENSO AL TRATTAMENTO DI FECONDAZIONE ASSISTITA PER PAZIENTI CON PATOLOGIE SPECIFICHE IN CORSO O POTENZIALI E CONDIZIONI DI AUMENTATO RISCHIO

(Attenzione: QUESTA SEZIONE VIENE COMPILATA IN COLLABORAZIONE CON LO SPECIALISTA DI HUMANITAS FERTILITY CENTER)

Io sottoscritto _____ certifico che gli accertamenti non hanno evidenziato una condizione di aumentato rischio specifico per le patologie oggetto dello screening e dall'anamnesi fornita dalla coppia non sono presenti condizioni di aumentato rischio rispetto alla popolazione generale.

TEST GENETICI PREIMPIANTO

I test genetici preimpianto sono proposti a coppie che hanno richiesto di essere sottoposte ad un ciclo di concepimento assistito denominato “fecondazione in vitro e trasferimento in utero degli embrioni” e che vogliono avere informazioni sullo stato di salute degli zigoti e degli embrioni formati nel trattamento indicato.

I test di seguito elencati vengono raccomandati alla coppia dal Medico del Fertility Center in funzione del rischio della presenza nell’embrione dell’anomalia cromosomica o genetica rilevata dal singolo esame genetico.

Si ricorda che:

- il ricorso allo screening preimpianto, legittima il medico/biologo, se necessario, ad iniettare tutti gli ovociti ottenuti (purché risultati idonei come da piano terapeutico concordato con la coppia);
- sarà necessario procedere al congelamento degli embrioni in attesa dell’esito della diagnosi genetica e al trasferimento differito;
- il numero di embrioni che subiranno la biopsia e l’analisi in oggetto non può essere concordato a priori perché dipendente dal numero di ovociti recuperati, dal numero di ovociti fecondati e dal numero di embrioni che giungerà alla formazione di blastocisti.

CONSENSO INFORMATO AL TEST GENETICO PREIMPIANTO PER ANEUPLOIDIE (PGT-A)

La PGT- A (Pre- Implantation Genetic Test- A) è una metodica diagnostica che si esegue sull’embrione prima del suo trasferimento in utero. Per le coppie ad aumentato rischio di trasmettere all’embrione alterazioni cromosomiche, la PGT- A, informa sullo stato di salute di ciascun embrione e permette di individuare quelli non affetti da anomalie cromosomiche prima del loro trasferimento in utero.

La tecnica della PGT-A è il risultato della combinazione di:

- fecondazione “in vitro” con iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo nella cellula uovo
- biopsia di cellule embrionali mediante micromanipolazione
- tecniche diagnostiche basate su metodiche molecolari specifiche

eseguite a favore di coppie per le quali sia indicata un’analisi cromosomica e nelle quali il test genetico PGT- A permetterà di identificare anomalie cromosomiche negli embrioni che presentano un normale numero di cromosomi (44 più due cromosomi sessuali).

INDICAZIONI AL PRELIEVO DI CELLULE EMBRIONALI PER L’IDENTIFICAZIONE DI ANOMALIE NUMERICHE DEL CARIOTIPO EMBRIONALE (PGT-A)

Il test delle anomalie cromosomiche (Pre- implantation Genetic Test - Aneuploidy PGT- A) è indicato, se richiesto dalla coppia stessa, quando siano presenti le seguenti condizioni che si associano a un aumentato rischio di sviluppare embrioni con anomalie numeriche dei cromosomi:

- Età riproduttiva avanzata della donna (generalmente definita come > 35 anni);
- Precedenti gravidanze con feto affetto da anomalie cromosomiche;
- Ripetuti aborti spontanei (definiti come > 2 aborti consecutivi);
- Ripetuti fallimenti d’impianto embrionale (RIF) durante precedenti cicli di fecondazione assistita (generalmente definiti come assenza d’impianto in seguito a trasferimento di almeno 6 embrioni in due o più trasferimenti di embrioni).

Per la prima e più frequente indicazione, è ben noto che con l’avanzare dell’età della donna aumentano progressivamente le anomalie numeriche dei cromosomi. La più nota, quanto anche la meno grave, è la sindrome di Down, o trisomia del cromosoma 21, che si osserva quando sono presenti 3 copie del cromosoma 21, invece che 2 come normalmente succede per tutti i cromosomi autosomici. Questa causa è alla base anche dell’indicazione alla diagnosi genetica prenatale (villocentesi o amniocentesi). Tuttavia, al momento dell’amniocentesi (15- 16 settimane di epoca gestazionale) il rischio di avere un feto affetto da anomalia cromosomica è relativamente basso, mediamente dell’ordine di grandezza di 1 a 200/300, proprio perché la maggior parte degli embrioni con anomalie cromosomiche esitano in fallimento di impianto o aborto

nelle prime 12 settimane. Al contrario, le anomalie cromosomiche sono molto più frequenti nella fase di sviluppo dell'embrione prima dell'impianto, proprio perché in questi primi giorni di crescita dell'embrione è avvenuta solo una parziale selezione naturale. Le anomalie cromosomiche avvengono più frequentemente negli ovociti che negli spermatozoi e sono poi ereditate dall'embrione. Questo spiega il decadimento della capacità riproduttiva della donna che si osserva con l'avanzare dell'età e in maniera progressiva durante tutto il periodo riproduttivo e l'aumentato rischio di gravidanze con feti affetti da sindromi cromosomiche. In una donna di 40 anni, la probabilità che gli embrioni prodotti abbiano una anomalia cromosomica si attesta intorno al 70/80%. Anche quando gli embrioni sono prodotti in vitro, dopo accurata selezione morfologica degli ovociti, degli spermatozoi e degli embrioni fino allo stadio di blastocisti (5/7 giorni di sviluppo dopo la fecondazione), questo rischio rimane elevatissimo. Il trasferimento inconsapevole di questi embrioni affetti può, quindi, risultare in fallimento dell'impianto o in gravidanza che poi termina con un aborto o in una gravidanza in cui il feto è portatore di un'anomalia cromosomica alla nascita. Per quanto riguarda la poliabortività, è ben noto che circa i 2/3 degli aborti spontanei sono dovuti a cause di anomalie cromosomiche insorte de novo nell'embrione e in assenza di evidenti patologie a carico della coppia. Questo fenomeno è tanto più marcato quando gli aborti si osservano nelle prime settimane di gravidanza. In questi casi, l'analisi permette di trasferire embrioni privi della maggior parte delle anomalie cromosomiche che determinano l'aborto, aumentando significativamente la percentuale di gravidanze che portano a una nascita.

Il ripetuto fallimento d'impianto può essere esso stesso conseguenza di un'aumentata incidenza di anomalie cromosomiche che spiegano il mancato successo in precedenti cicli di PMA. Tassi elevati di embrioni con anomalie cromosomiche sono stati riportati in coppie che avevano eseguito un ciclo di screening preimpianto dopo precedenti tentativi falliti di fecondazione in vitro convenzionale (Fragouli et al., 2010). In questo caso l'analisi cromosomica degli embrioni permette sia di individuare quelli cromosomicamente normali per il trasferimento, aumentando le probabilità di gravidanza per trasferimento, sia di avere una valutazione di natura diagnostica sulle caratteristiche degli embrioni prodotti dalla specifica coppia.

PROCEDIMENTO

1. **Ottenimento di embrioni.** Si tratta di ottenere gli embrioni che saranno oggetto della diagnosi. Si devono produrre «in Vitro» mediante convenzionali tecniche di riproduzione assistita di secondo livello. Per eseguire la diagnosi sarà necessario, in particolare, ricorrere a un'iniezione intracitoplasmatica dei gameti (ICSI) al fine di ridurre il rischio di contaminazione del campione.
2. **Biopsia del trofoectoderma allo stadio di blastocisti (giorno 5 - 7).** In base alle evidenze scientifiche, il miglior stadio evolutivo sul quale è possibile fare un'analisi genetica preimpianto è rappresentato dalla blastocisti che si forma in quinta – settima giornata di sviluppo embrionale. Il prelievo di cellule in questa fase è potenzialmente molto utile alla diagnostica, poiché è possibile prelevare un discreto numero di cellule senza creare problemi allo sviluppo successivo dell'embrione che in questo stadio è cresciuto fino a 200/300 cellule. Inoltre, la biopsia è effettuata su cellule esclusivamente del trofoectoderma che daranno origine dopo l'impianto agli annessi placentari. La massa delle cellule interne (inner cell mass) che darà origine all'embrione nelle fasi successive all'impianto, non è coinvolta dalla biopsia, riducendo in questo modo potenziali rischi per lo sviluppo dell'embrione. La tecnica di prelievo (biopsia) consiste nel praticare un foro nella zona pellucida, parete che avvolge l'embrione fino allo stadio di blastocisti. L'apertura della zona pellucida è effettuata mediante l'azione di un raggio laser, di cui è stata comprovata la sicurezza sia in modelli animali che umani (Rienzi et al., 2001). Le cellule embrionali da utilizzare per la diagnosi sono prelevate mediante aspirazione con una pipetta da biopsia o provocando un'erniazione delle cellule del trofoectoderma all'esterno. Tali cellule vengono, quindi, poste all'interno di una provetta analitica per eseguire l'analisi genetica. Le blastocisti dopo biopsia vengono crioconservate. Uno studio condotto recentemente ha evidenziato che l'analisi allo stadio di blastocisti rappresenta oggi un gold standard per queste analisi nei centri specializzati in questa pratica (Capalbo et al., Human Reproduction 2013), principalmente per i seguenti importanti vantaggi:
 - Affidabilità dei risultati dell'analisi genetica;
 - Riduzione significativa del rischio di mosaicismo cromosomico;
 - Assenza di compromissione dello sviluppo embrionale dovuto dalla biopsia.
3. **Diagnosi genetica – PGT- A.** Dopo la biopsia, le cellule ottenute sono processate per l'analisi genetica. Quando il laboratorio riceve i campioni, li processa per l'analisi molecolare mediante sequenziamento massivo (NGS). Se il campione contiene materiale genetico insufficiente, sarà necessario sottoporre l'embrione ad una seconda biopsia, ove possibile, al fine di ottenere un risultato. In generale, gli embrioni anomali NON sono raccomandati per il trasferimento anche questo deve essere oggetto di dettagliata valutazione tra la coppia e lo specialista.
4. **Trasferimento embrionale.** Con il risultato dell'analisi molecolare, la coppia consultante è informata sul risultato dell'analisi molecolare dall'équipe medica ed è programmato il trasferimento in funzione anche delle caratteristiche di vitalità embrionale. Il trasferimento degli embrioni crioconservati dopo biopsia è eseguito,

generalmente, nel ciclo seguente a quello in cui è avvenuto il prelievo oocitario (o nel minor tempo possibile non appena le condizioni psicofisiche della donna lo permettano). Posticipare il trasferimento è necessario sia per motivi tecnici legati alle tempistiche dell'analisi molecolare sia per motivi clinici. La decisione di quando è più opportuno trasferire gli embrioni è soggetta, comunque, a valutazione finale del medico e in particolari casi può essere possibile il trasferimento degli embrioni in assenza di congelamento dopo la biopsia.

EFFICIENZA E VANTAGGI DELL'ANALISI DI ANOMALIE NUMERICHE DEL CARIOTIPO EMBRIONALE

Molti sforzi sono stati fatti negli ultimi 20 anni per sviluppare nuove tecnologie in grado di individuare le anomalie cromosomiche prima che l'embrione sia trasferito in utero durante i cicli di fecondazione assistita, dato che la maggior parte degli embrioni anomali non si distingue dagli embrioni normali quando si valuta la morfologia al microscopio nel laboratorio IVF. Pertanto, la morfologia normale dell'embrione non può essere considerata un indicatore di assenza di anomalie cromosomiche. È noto che TUTTE le coppie possono produrre embrioni anomali, nonostante esistano categorie a maggior rischio di anomalie cromosomiche, come ad esempio le donne di età superiore ai 35 anni, le pazienti con un'anamnesi di aborto spontaneo ricorrente, con ripetuti fallimenti dell'impianto o che hanno avuto una gravidanza con un'anomalia cromosomica, o gli uomini con una bassa concentrazione di spermatozoi. Poiché il PGT- A rileva le copie in più o in meno di tutti i cromosomi o alterazioni cromosomiche strutturali di grandi dimensioni, gli embrioni con anomalie cromosomiche avranno una diagnosi pressoché certa sul loro outcome in caso di impianto. L'accuratezza di questo test è superiore al 98%, quindi il tasso di diagnosi errata per le anomalie cromosomiche analizzate è inferiore al 2%. La maggior parte degli embrioni con anomalie cromosomiche sono destinati a non impiantarsi o a dare aborti clinici principalmente nel primo trimestre gestazionale. L'efficacia dello screening preimpianto dipende, da un lato, dal numero di embrioni disponibili e dal loro grado di sviluppo e, dall'altro dal metodo diagnostico molecolare impiegato.

I risultati ottenuti in diversi studi clinici prospettici randomizzati dimostrano in modo consistente che il trasferimento di embrioni normali all'analisi cromosomica si traduce in aumento della probabilità d'impianto e sviluppo a termine del singolo embrione con una significativa diminuzione delle probabilità di aborto clinico (Forman et al., 2013; Scott et al., 2013). Dal Registro Europeo ESHRE (Desmyttere et al., Human Reproduction 2012), non è riportato un aumento delle anomalie alla nascita in relazione all'uso della tecnica di biopsia embrionale, dimostrando l'efficacia e sicurezza del procedimento.

1. **Aumento del tasso di impianto.** Essendo le anomalie cromosomiche le principali cause di fallimento di impianto in un ciclo IVF, il trasferimento di embrioni cromosomicamente normali, identificati grazie allo studio di PGT- A, si traduce in un significativo aumento del tasso di impianto come dimostrato da recenti studi randomizzati e meta-analisi della letteratura scientifica (Dahdouh et al, Fertility and Sterility, 2015).
2. **Riduzione del tasso di aborto spontaneo.** Nella popolazione generale, il 20% di tutte le gravidanze cliniche terminano in aborto e circa la metà sono cromosomicamente anomali. Queste percentuali di aborto sono strettamente correlate all'età riproduttiva della donna e possono raggiungere anche il 50- 60% nelle donne sopra i 40 anni. Di conseguenza, soprattutto nei gruppi ad alto rischio, il trasferimento di embrioni normali cromosomicamente dopo PGT- A permette di ridurre l'abortività in modo consistente come dimostrato da recenti studi randomizzati e meta- analisi della letteratura scientifica (Rubio et al, Fertility and Sterility, 2017; Chen et al, Plos One, 2015). Oggi queste metodiche rappresentano una strategia efficace per individuare le anomalie numeriche cromosomiche mediante l'analisi molecolare di un campione bioptico dell'embrione a uno stadio avanzato (blastocisti) in maniera non invasiva per le cellule dell'embrione. Dati presenti in letteratura suggeriscono che quando l'embrione cromosomicamente normale è trasferito allo stadio di blastocisti (fresco e/o dopo congelamento), la probabilità di impiantarsi aumenta di due/tre volte e la probabilità di aborto si riduce dal 30/40%, generalmente osservato in donne di 40 anni, a percentuali inferiori al 10% (Scott et al., 2013; Forman et al., 2012; Schoolcraft et al., 2010). Nella popolazione di pazienti che eseguono l'analisi, circa il 35% dei casi non ha embrioni normali da un punto di vista cromosomico in quello specifico ciclo. In questo caso la coppia può richiedere di non trasferire gli embrioni con anomalie cromosomiche, evitando di esporsi al rischio di aborto qualora giungano a un impianto. Inoltre, non utilizzare embrioni affetti da anomalie cromosomiche permette di evitare ripetuti trasferimenti di embrioni che non hanno possibilità di portare ad una gravidanza e le relative implicazioni psicologiche del fallimento del trattamento. Trovare tutti embrioni con anomalie cromosomiche non preclude la possibilità che ci siano embrioni non affetti da anomalie cromosomiche in un ciclo di fecondazione assistita successivo, permettendo così di accedere in tempi brevi, ove indicato, ad un nuovo ciclo di terapia (Pgidas et al., J Assist Reprod Genet. 2008). Considerato l'elevato tasso d'impianto degli embrioni dopo PGT- a, un altro possibile beneficio è la possibilità di trasferire un solo embrione anche in donne con età riproduttiva avanzata, evitando così gravidanze multiple e le severe complicanze ostetriche e neonatali ad esse associate. I nostri risultati pubblicati alla fine del 2019, mostrano che per le coppie con età femminile avanzata, la probabilità di gravidanza ad evoluzione favorevole ed il numero di gravidanze ad esito negativo erano statisticamente favorevoli in caso di esecuzione di test preimpianto, sebbene in un elevato numero di cicli il numero di ovociti

e/o embrioni non consentissero di accedere a questa tecnica (Laura Sacchi, Elena Albani, Amalia Cesana, Antonella Smeraldi, Valentina Parini, Marco Fabiani, Maurizio Poli, Antonio Capalbo, Paolo Emanuele Levi-Setti Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy Improves Clinical, Gestational, and Neonatal Outcomes in Advanced Maternal Age Patients Without Compromising Cumulative Live-Birth Rate. Journal of Assisted Reproduction and Genetics).

POTENZIALI CRITICITÀ E LIMITI DELLA PTG-A

1. **Preparazione delle cellule.** Quando le cellule sono rimosse dall'embrione, sono trasferite in una provetta per l'analisi. È possibile che il materiale cellulare sia deteriorato (bassa qualità) e che quindi non possa essere amplificato con successo. In qualsiasi caso, NON sarà possibile ottenere i risultati del PGT- A per quell'embrione specifico.
2. **Trasporto.** Le cellule sono inviate per l'analisi genetica via corriere. Gli imprevisti durante il viaggio possono ritardare la ricezione del campione o, raramente, provocare danni al campione. È possibile, anche se poco probabile, che il campione si perda.
3. **Limiti di rilevazione:**
 - *Aneuploidie parziali.* Il Next Generation Sequencing (NGS) è un test sviluppato per rilevare aneuploidie complete (alterazioni del numero dei cromosomi, ossia un numero maggiore o minore di cromosomi rispetto allo standard), può anche rilevare aneuploidie parziali, comprese delezioni e duplicazioni di parte di un cromosoma, a seconda della dimensione del segmento interessato. Il PGT- A tramite NGS non riesce normalmente a rilevare perdite o aggiunte di segmenti di cromosoma inferiori a 10 MB.
 - *Altri difetti o anomalie genetiche dello sviluppo non identificabili con PGT- A.* Il rischio di difetti alla nascita è del 3- 5% nella popolazione generale e può essere dovuto ad altre cause genetiche o non genetiche, ma non necessariamente alle alterazioni del numero di cromosomi. Tutte le anomalie non oggetto del test cromosomico di PGT- A spiegato in questo consenso non sono ovviamente coperte dall'analisi.
 - *Anomalie strutturali bilanciate.* Il PGT- A riesce ad identificare solo anomalie strutturali sbilanciate, ovvero dove la perdita o la duplicazione di un cromosoma o parte di un cromosoma non è compensata da un'altra anomalia di tipologia opposta (anomalia bilanciata).
 - *Malattie monogeniche.* Non tutte le anomalie genetiche sono dovute ad anomalie cromosomiche. Ad esempio, per individuare la presenza di disturbi di singoli geni, come la fibrosi cistica, l'anemia falciforme o l'emofilia, si devono realizzare i test per rilevare la variazione del gene familiare specifico (mutazione). Tutte le alterazioni genetiche familiari conosciute devono essere discusse con il medico curante.
 - *Disomia uniparentale (UPD).* È la presenza di due copie di un cromosoma dello stesso partner ed è associata a sindromi genetiche mediche, cognitive o disabilità. Tale anomalia non può identificare l'UPD tramite PGT-A.
 - *Ploidia.* le tecniche di PGT- A non consentono di individuare le anomalie cromosomiche definite come aploidia, triploidia o tetraploidia, che consistono nell'alterazione di tutto l'insieme dei cromosomi, con la presenza di una, tre o quattro copie di ognuno dei cromosomi contenuti in una cellula. Questo tipo di alterazioni cromosomiche, che non è possibile identificare, potrebbe portare ad aborti spontanei, ma la sua incidenza negli embrioni umani preimpianto è inferiore all'1%. In aggiunta al test PGT- A standard di primo livello, in cui si analizza il numero di copie di ciascun cromosoma dell'embrione, è possibile eseguire un test PGT- A di secondo livello per rilevare anche alterazioni della ploidia sulla stessa biopsia embrionale. Per alterazioni di ploidia si intendono variazioni del numero di assetti cromosomici rispetto al normale 2N (46 cromosomi totali, 2 copie di ciascun cromosoma, una di origine materna e una di origine paterna). Le variazioni del numero di assetti cromosomici possono essere: aploidia 1N (una singola copia di ciascun cromosoma per un totale di 23 cromosomi) o poliploidia (triploidia 3N, tetraploidia 4N). Il test PGT- A in NGS non è in grado di definire lo stato di ploidia degli embrioni a causa della normalizzazione durante l'analisi bioinformatica dei dati. Contrariamente a quanto succede in una normale fecondazione dove sono presenti due pronuclei 2PN (maschile e femminile) di uguali dimensioni, in un numero ridotto di casi (in circa il 5%), gli ovociti possono presentare un quadro atipico di fecondazione, caratterizzato dalla presenza di un singolo pronucleo (1PN) o di pronuclei di diverse dimensioni (2.1PN). Gli embrioni derivanti da ovociti con fecondazione anomala sono generalmente esclusi dal successivo utilizzo in quanto presentano rischio aumentato di anomalie cromosomiche di diverso genere, in particolare triploidie e tetraploidie

(presenza di 69 e 92 cromosomi rispettivamente invece di 46). Qualora vengano trasferiti inconsapevolmente embrioni con triploidia e tetraploidia, questi embrioni esiteranno in aborto clinico poiché incompatibili con la vita. Nella letteratura attuale (Capalbo et al. 2017) sono riportati molti casi di gravidanze a termine con cariotipo normale, derivate da embrioni originati da ovociti con fecondazione atipica. Il test di ploidia permette di includere nella coorte di embrioni utilizzabili per il ciclo di PMA anche embrioni originati da ovociti con fecondazione atipica, ma con una configurazione diploide (46 cromosomi), altrimenti esclusi dall'impiego clinico.

- **Malattie multifattoriali.** Si verificano a causa di una combinazione di influenze genetiche ed ambientali. Possono comparire come difetti fisici alla nascita, ad esempio alterazioni cardiache, che non sono correlate ad anomalie cromosomiche. Attualmente, il monitoraggio in gravidanza di queste malattie multifattoriali, come l'autismo, la schizofrenia e il diabete, non è possibile poiché la causa esatta non è nota. Per questi motivi, si consiglia un esteso monitoraggio ecografico e clinico della gravidanza, in particolare in presenza di specifici fattori di aumentato rischio.
 - **Mosaicismo.** È un fenomeno per cui nel medesimo organismo si ha la presenza contemporanea di cellule con cariotipi differenti. Un embrione a mosaico diploide/aneuploide presenta, quindi, una combinazione di cellule con cariotipo normale e altre con cariotipo aneuploide e può risultare in gravidanze normali come patologiche. In altri casi il mosaicismo può definirsi mosaico/aneuploide quando tutte le cellule che compongono l'embrione sono anomale anche se con cariotipi differenti. Il mosaicismo avviene casualmente e spontaneamente durante lo sviluppo embrionale. Durante il processo di divisione cellulare, i cromosomi potrebbero non essere distribuiti equamente nelle cellule embrionali, dando luogo a cellule con un numero alterato di cromosomi. Per la valutazione dei livelli di mosaicismo il laboratorio Igenomix Italia ha identificato un cut-off del livello di aneuploidia intorno al 50% con considerazioni cromosoma- specifiche. Le biopsie del trofoectoderma sono riportate come euploidi se presentano un livello di aneuploidia inferiore a questo cut-off per tutti i cromosomi; al contrario, sono riportate come aneuploidi se presentano un livello di aneuploidia superiore a questo cut-off per almeno un cromosoma o un segmento cromosomico (Capalbo et al., Am J Hum Genet. 2021).
4. **Errori nella diagnosi.** Esiste una probabilità dell'1- 2% di errore di precisione a causa della presenza di falsi positivi, ossia embrioni normali che possono essere riportati come anomali, e/o falsi negativi, ossia embrioni anomali che possono essere diagnosticati come normali. Ciò può essere dovuto a problemi come il mosaicismo, nel quale le cellule possono non essere rappresentative dell'intero embrione o, come per tutte le metodiche diagnostiche, per la natura imperfetta della diagnosi. Il falso positivo può essere stimato da studi controllati intorno al 1- 2% (Capalbo et al., European Journal of Human Genetics, 2015) mentre il falso negativo (rischio di trasferire un embrione cromosomicamente anomalo) è stato stimato essere inferiore allo 0,2% in gravidanze cliniche con follow-up (Werner et al., Fertility and Sterility, 2014). Il tasso di errore della diagnosi preimpianto non è in questo momento noto, di conseguenza nel caso di una gravidanza deve essere comunque considerata e consigliata un'analisi citogenetica prenatale per stabilire il cariotipo fetale. L'obiettivo dell'analisi è di individuare aneuploidie che comportino la perdita o la duplicazione di grandi pezzi di cromosomi o cromosomi interi. Anomalie cromosomiche che coinvolgono pezzi più piccoli potrebbero non essere rilevate. Inoltre alcuni casi di mosaicismo cromosomico possono passare inosservati.
 5. **Assenza di diagnosi conclusiva.** È possibile non ottenere il risultato di un embrione. Il rischio di non ottenere alcun risultato è inferiore al 2%. I motivi più comuni sono l'assenza di cellule nella provetta o materiale genetico di bassa qualità (comune in cellule danneggiate o morte). A causa di difetti nel campione, è possibile che il modello statistico utilizzato per determinare il numero di cromosomi non consenta l'ottenimento di un risultato; in questo caso i risultati saranno segnalati come non conclusivi. Alcune coppie scelgono di trasferire gli embrioni senza alcun risultato. I benefici associati al PGT- A non si applicano a questi embrioni. In alternativa e in accordo con il centro di PMA referente, gli embrioni senza diagnosi possono essere bioptizzati nuovamente e processati per analisi cromosomica.
 6. **Possibilità di contaminazione.** È possibile che nel corso della fase analitica possano verificarsi contaminazioni di materiale genetico che falsino l'analisi molecolare. Tuttavia con le moderne tecnologie e con la buona pratica laboratoristica questo rischio è stimato essere inferiore all'1% dei casi in base ai dati riportati dal registro europeo di PGD (Harper et al., Human Reproduction 2008).

CONSAPEVOLI ED INFORMATI SU:

- esecuzione e/o controllo dei test di PGT- A per i quali l'Humanitas Fertility Center si potrà avvalere di strutture esterne Nazionali o Internazionali certificate per l'attività diagnostica in questo settore specifico. In caso di

esecuzione dei test presso strutture esterne l'Humanitas Fertility Center è responsabile esclusivamente dello sviluppo di embrioni mediante tecniche di PMA e non ha alcuna responsabilità circa l'operato del Laboratorio di Diagnosi molecolare che effettua i test genetici effettuati sulle cellule

- eventuale Struttura Certificata quale sede esterna di esecuzione dell'esame
- vantaggi e limitazioni della procedura come sopra riportate potrebbero subire variazioni, in relazione all'evoluzione scientifica di questa tipologia di analisi, delle quali lo specialista del Fertility Center ci darà informazione
- trasporto del materiale da analizzare presso sede esterna tramite un vettore specializzato e che tale trasporto non è totalmente privo di rischi per i quali Humanitas Fertility Center non si assume la responsabilità in caso di perdita e/o deterioramento dei campioni durante il trasporto
- costi della prestazione, a totale carico della coppia
- alternative alla tecnica PGT- A, come l'esecuzione della IVF senza PGT- A seguita, eventualmente, da diagnosi prenatale
- distruzione del DNA residuo dell'analisi PGT- A dopo 36 mesi dalla conclusione della gravidanza, per l'esecuzione di eventuali test di conferma della diagnosi, oppure donazione a fini di ricerca, in caso di consenso liberamente espresso di seguito dalla coppia
- interruzione della procedura in qualunque momento della sua realizzazione, sia per motivi medici che su richiesta dei pazienti, purché ciò non comporti alcun danno agli stessi o agli embrioni vitali prodotti
- disponibilità del personale sanitario del Fertility Center ad approfondire qualunque aspetto delle informazioni che non sia sufficientemente chiaro
- possibilità da parte della donna di richiedere il trasferimento anche in presenza di un'anomalia cromosomica embrionale dopo consulenza con gli specialisti del Fertility Center e firma di uno specifico consenso

CONSENSO PER TEST GENETICO PRE-IMPIANTO (PGT-M) PER MALATTIE MONOGENICHE EREDITARIE

DESCRIZIONE, INDICAZIONE E VANTAGGI

La PGT- M è un metodo diagnostico prenatale che si esegue nell'embrione prima del suo trasferimento in utero affinché possano essere selezionati unicamente embrioni sani. Per le coppie a rischio di trasmettere a discendenti alterazioni cromosomiche o genetiche, la PGT- M fornisce informazioni sullo stato di salute di ciascun embrione e permette di selezionare gli embrioni non affetti da malattia monogenica da trasferire nell'utero ai sensi dell'Art. 14 comma 5 della Legge 40/2004. In presenza di una malattia monosomica oggetto di indagine è l'associazione dell'analisi della presenza della mutazione (single gene diagnosis o SGD) e dell'analisi cromosomica (comprehensive chromosome screening o CCS). È un test indicato per le coppie a rischio di trasmettere ai discendenti alterazioni genetiche e risulta dalla combinazione di:

- fecondazione "in vitro" con iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo nella cellula uovo
- biopsia di cellule embrionali mediante micromanipolazione
- tecniche diagnostiche basate su metodiche molecolari specifiche.

Nelle coppie la cui indicazione è una malattia monogenica, la diagnosi molecolare consente di individuare gli embrioni geneticamente normali o che potranno essere affetti dalla malattia oggetto di studio mediante tecniche di genetica molecolare.

Questa tecnica è indicata per l'individuazione di malattie ereditarie gravi che appaiono precocemente e non soggette a trattamento curativo postnatale sulla base delle conoscenze scientifiche attuali, allo scopo di procedere al trasferimento di embrioni non affetti dalla patologia oggetto dell'esame e, in generale, per l'individuazione di alterazioni che possono compromettere la vitalità dell'embrione.

La decisione di procedere alla metodica è affidata al giudizio del Responsabile Medico dell'Humanitas Fertility Center, sentito il parere degli specialisti in genetica medica, psicologi e altri consulenti ritenuti utili nel caso in esame, avendo come linea guida quanto definito dalla Sentenza della Corte Costituzionale del maggio 2015 in relazione 'ai criteri di gravità di cui all'art. 6, comma 1, lettera b), della legge 22 maggio 1978, n. 194 (Norme per la tutela sociale della maternità e sull'interruzione volontaria della gravidanza).

Un parere negativo a procedere alla metodica verrà motivato per iscritto alla coppia a cura del Direttore dell'Humanitas Fertility Center.

La decisione di quando è più opportuno trasferire gli embrioni è soggetta, comunque, a valutazione finale del medico e in particolari casi può essere possibile il trasferimento degli embrioni in assenza di congelamento dopo la biopsia.

PROCEDIMENTO

1. **Fase preliminare (set- up).** In questa fase, le coppie portatrici di malattia monogenica sono sottoposte a test genetici (SNP- array e SNP- genotyping) ampliati anche alle due famiglie dei partner, per individuare i marcatori prossimi alla regione genica di interesse e per identificare le migliori condizioni analitiche per ottenere la massima sensibilità diagnostica prima dell'applicazione della PGT-M.
2. **Ottenimento di embrioni.** Si tratta di ottenere gli embrioni che saranno oggetto della diagnosi. Questi vengono prodotti «in Vitro» mediante tecniche di riproduzione assistita. Gli embrioni vengono mantenuti in coltura nelle migliori condizioni possibili, fino al 5°- 6° giorno di sviluppo in vitro (blastocisti) e poi biotizzati.
3. **Biopsia embrionale.** La biopsia embrionale è fatta il 5°- 7° giorno dopo la fecondazione, quando l'embrione si trova allo stadio di blastocisti fecondazione (vedi sotto). Consiste nel prelievo di 2- 3 cellule dell'embrione senza compromettere il suo normale sviluppo. Eseguita la biopsia, gli embrioni vengono crioconservati mediante vitrificazione per mantenerli integri in attesa del risultato diagnostico.
4. **Biopsia del trofoectoderma allo stadio di blastocisti (5°- 7° giorno di sviluppo in vitro).** Il prelievo di cellule in questa fase costituisce il gold standard per l'analisi PGT- M, poiché è possibile prelevare un discreto numero di cellule (2- 3) senza creare problemi allo sviluppo successivo dell'embrione. Inoltre, poiché la biopsia è effettuata su cellule esclusivamente del trofoectoderma, che daranno origine esclusivamente agli annessi placentari dopo l'impianto, la massa delle cellule interne che darà poi origine al feto vero e proprio non viene coinvolta, con indiscussi vantaggi biologici ed etici. La tecnica di prelievo (biopsia) consiste nel praticare un foro nella zona pellucida, parete che avvolge l'embrione fino allo stadio di blastocisti. L'apertura della zona pellucida è effettuata mediante l'azione di un raggio laser, di cui è stata comprovata la biosicurezza sia in modelli animali che umani (Rienzi et al., 2001). Le cellule embrionali da utilizzare per la diagnosi sono prelevate mediante aspirazione con una pipetta da biopsia o provocando un'erniazione delle cellule del trofoectoderma all'esterno. Tali cellule vengono, quindi, poste all'interno di una provetta analitica per eseguire l'analisi genetica.
5. **Diagnosi genetica.** Il campione ottenuto è elaborato per l'analisi e sottoposto a studio genetico.
6. **Trasferimento embrionale.** Con il risultato dell'analisi genetica, l'équipe medica del Fertility Center decide, insieme alla coppia consultante, quali embrioni saranno trasferiti, in funzione dell'esito della diagnosi genetica effettuata e delle caratteristiche di vitalità embrionale.

EFFICIENZA E VANTAGGI DELL'ANALISI DI ANOMALIE MONOGENICHE

L'efficacia globale della PGT- M dipende, da un lato, dal numero di embrioni disponibili e dal loro grado di sviluppo e, dall'altro dal rendimento del metodo diagnostico molecolare impiegato. Inoltre, quando l'indicazione è per malattia monogenica, il tipo di eredità (recessiva o dominante) influirà sull'efficacia, condizionando il numero di embrioni sani disponibili alla fine del processo diagnostico.

Il registro dei nati vivi dopo l'applicazione della PGT- M presenta una percentuale di gestazioni a termine superiore al 30%. Parimenti, non si sono descritte anomalie associate all'uso della tecnica della PGT- M, dimostrando l'efficacia e sicurezza del procedimento.

POTENZIALITÀ CRITICITÀ E LIMITAZIONI

La PGT- M minimizza la probabilità di gestazione d'individui portatori di alterazioni genetiche oggetto di studio. Tuttavia, a causa della natura e della quantità del campione usato nell'analisi (2- 3 cellule), si consiglia alla madre di sottoporsi anche a una diagnosi prenatale invasiva classica (villo centesi o amniocentesi) per confermare la diagnosi.

CONSAPEVOLI ED INFORMATI SU:

- esecuzione e/o controllo dei test di PGT- M per i quali l'Humanitas Fertility Center si potrà avvalere di strutture esterne Nazionali o Internazionali certificate per l'attività diagnostica in questo settore specifico. In caso di esecuzione dei test presso strutture esterne l'Humanitas Fertility Center è responsabile esclusivamente dello sviluppo di embrioni mediante tecniche di PMA e non ha alcuna responsabilità circa l'operato del Laboratorio di Diagnosi molecolare che effettua i test genetici effettuati sulle cellule
- eventuale Struttura Certificata quale sede esterna di esecuzione dell'esame
- vantaggi e limitazioni della procedura come sopra riportate potrebbero subire variazioni, in relazione all'evoluzione scientifica di questa tipologia di analisi, delle quali lo specialista del Fertility Center ci darà informazione
- trasporto del materiale da analizzare presso sede esterna tramite un vettore specializzato e che tale trasporto non è totalmente privo di rischi per i quali Humanitas Fertility Center non si assume la responsabilità in caso di perdita e/o deterioramento dei campioni durante il trasporto
- costi della prestazione, a totale carico della coppia
- alternative alla tecnica PGT-M sono l'IVF senza PGT-M seguita, eventualmente, da diagnosi prenatale legale
-

distruzione del DNA residuo dell'analisi PGT- M dopo 36 mesi dalla conclusione della gravidanza, per l'esecuzione di eventuali test di conferma della diagnosi, oppure donazione a fini di ricerca, in caso di consenso liberamente espresso di seguito dalla coppia

- interruzione della procedura in qualunque momento della sua realizzazione, sia per motivi medici che su richiesta dei pazienti, purché ciò non comporti alcun danno agli stessi o agli embrioni vitali prodotti
- disponibilità del personale sanitario del Fertility Center ad approfondire qualunque aspetto delle informazioni che non sia sufficientemente chiaro
- possibilità da parte della donna di richiedere il trasferimento anche in presenza di un'anomalia cromosomica embrionale dopo consulenza con gli specialisti del Fertility Center e firma di uno specifico consenso

Desideriamo ed acconsentiamo quindi a partecipare a questo programma terapeutico di procreazione assistita e confermiamo le condizioni espresse al momento della crioconservazione:

1. Noi sottoscritti dichiariamo di essere nella piena capacità giuridica di riconoscere il nascituro quale figlio legittimo o naturale.
2. Dichiariamo inoltre, consci delle conseguenze legali di una dichiarazione mendace, di essere una coppia di sesso diverso, maggiorenni, di essere coniugati e/o conviventi ed entrambi viventi al momento di iniziare il procedimento terapeutico (articolo 76, commi 1 e 2, del testo unico delle disposizioni legislative e regolamentari in materia di documentazione amministrativa, di cui al decreto del Presidente della Repubblica 28 dicembre 2000, n. 445.).
3. Dichiariamo che queste condizioni specificate nei punti 1 e 2 non hanno subito modifiche rispetto al momento in cui gli embrioni sono stati crioconservati.
 - o Ci impegniamo in modo irrevocabile al riconoscimento congiunto del nascituro in sede di consenso prima della procedura ed a rinunciare ad ogni possibile futuro disconoscimento di paternità/maternità.
 - o Abbiamo preso visione, compreso, accettato ed espresso la nostra scelta consapevole per tutte le clausole espresse nel presente consenso.
4. Rispetto alla destinazione del DNA residuo dall'esecuzione dei test genetici (PGT- A, PGT- SR, PGT- M) dopo 36 mesi dalla conclusione della gravidanza (nascita) la nostra volontà di:

SI donare il DNA residuo a fini di ricerca

NO richiederne la distruzione al termine del periodo previsto

Rozzano, li

Firma della paziente

Firma del paziente

Eventuale interprete

(copia documento d'identità)

NB: a tutela della particolare consapevolezza che deve essere garantita agli aspiranti genitori, ai sensi dell'art. 6- comma III- L. 40/2004, Humanitas garantisce un periodo di 7 (sette) giorni decorrenti dalla manifestazione della volontà fino l'applicazione della tecnica di PMA entro cui i richiedenti possono liberamente revocare il loro consenso, senza alcuna conseguenza sul piano giuridico. In particolare, il trattamento non avrà inizio prima del decorso del suddetto periodo. Invitiamo, inoltre, la coppia a prendere visione del testo completo della legge n. 40/2004 pubblicata sulla Gazzetta Ufficiale del 24 febbraio 2004, del decreto Ministeriale del 11 luglio 2015 "Linee guida contenenti le indicazioni delle procedure e delle tecniche di procreazione medicalmente assistita, e del testo della sentenza n.151 della Corte Costituzionale dell'8 maggio 2009.

Lo specialista Ostetrico-Ginecologo del Fertility Center

.....

Il Direttore del Fertility Center o suo delegato

Prof. Paolo Emanuele Levi-Setti o suo delegato

Il presente documento di consenso informato, in conformità al DM 265/2016, è stato personalmente redatto dal Direttore del Fertility Center e approvato dalla Direzione dell'Istituto Clinico Humanitas.

Una volta sottoscritto dai richiedenti e dal medico che gestisce il colloquio, il presente documento è sottoposto, insieme alla documentazione clinica, al vaglio del Direttore del Fertility Center. Quest'ultimo, nell'esercizio della sua responsabilità in vigilando, verifica la sussistenza dei necessari presupposti e sottoscrive a sua volta il documento. Copia del documento firmato è messa a disposizione dei richiedenti in occasione della visita successiva o dell'inizio della terapia presso l'Istituto Clinico Humanitas.

Si ricorda che il Direttore del Fertility Center ha la facoltà di non procedere alla procreazione medicalmente assistita, esclusivamente per motivi di ordine medico-sanitario, rendendo in tal caso ai richiedenti motivazione scritta di tale decisione.

ALLEGATO 1

CONSENSO IN ASSENZA DEL PARTNER MASCHILE

Io sottoscritta _____ nata a _____ il _____

richiedo il trasferimento degli embrioni crioconservati presso il vostro Istituto in assenza di **rinnovo** da parte del mio partner del consenso allo scongelamento e trasferimento in utero al fine di ottenere una gravidanza, consapevole che questa condizione necessita di una specifica procedura di approvazione, essendo difforme da quanto previsto dall'interpretazione comune di una Normativa complessa e spesso contraddittoria.

Rozzano, li

Firma della paziente

La Direzione del Fertility Center sentito il parere e ottenuta l'approvazione della Direzione Sanitaria e dei Consulenti Legali e/o del Magistrato acconsente alla richiesta di procedere allo scongelamento e trasferimento embrionario a fini procreativi.

Rozzano, li

Lo specialista Ostetrico-Ginecologo del Fertility Center

.....

Il Direttore del Fertility Center o suo delegato

Prof. Paolo Emanuele Levi-Setti

Il Direttore Sanitario IRCCS Istituto Clinico Humanitas

Dr. Michele Lagioia
