

## DICHIARAZIONE DI INFORMAZIONE E CONSENSO AL PROGRAMMA DI SCONGELAMENTO E INIEZIONE INTRACITOPLASMATICA DEGLI OVOCITI con TEST GENETICO PRE-IMPIANTO PER ANEUPLOIDIE (PGT-A) e PORTATORI DI ALTERAZIONI CROMOSOMICHE STRUTTURALI (PGT-SR)

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 \_\_\_\_\_

Sono/Siamo stata/i informata/i della possibilità di crioconservazione degli ovociti e ho/abbiamo richiesto la crioconservazione degli ovociti, il cui congelamento ho/abbiamo autorizzato (CONSENSO) prima del prelievo degli ovociti e/o abbiamo richiesto il trasporto da altro istituto Italiano o Estero autorizzato dalla normativa di ovociti e/o spermatozoi crioconservati.

Sappiamo che la percentuale di sopravvivenza degli ovociti dopo crioconservazione non è stimabile e può variare dallo 0 al 100% e che per il loro utilizzo sarà necessaria una tecnica di microiniezione (ICSI).

Dopo aver compiuto un iter diagnostico finalizzato all'identificazione delle cause e delle possibili alternative terapeutiche alla procreazione medica assistita (PMA) e dopo essere stati adeguatamente informati sulla tecnica di PMA e aver preso visione dell'opuscolo "Programma di Procreazione Medica Assistita – Istruzioni per la coppia" ([www.humanitas.it/fertility](http://www.humanitas.it/fertility)), richiediamo di sottoporci alla procedura per trovare una possibile soluzione alla nostra infertilità/sterilità di coppia.

### Sezione A

In particolare, richiediamo di sottoporci a una procedura di PMA, poiché dagli accertamenti eseguiti e sottoposti allo specialista Ostetrico Ginecologo \_\_\_\_\_ e ove indicato dopo consulenza dell'Andrologo/Psicologo/Genetista dell'Humanitas Fertility Center è stata posta e/o è stata confermata una diagnosi di sterilità/infertilità:

\_\_\_\_\_

Dichiariamo di aver effettuato uno o più colloqui con il \_\_\_\_\_ dell'Istituto Clinico Humanitas nel corso del/i quale/i siamo stati informati, in modo chiaro ed esaustivo, in merito ai seguenti punti:

- Alternative alla PMA:** siamo stati informati che per legge è possibile e legittimo ricorrere a pratiche di affidamento e adozione, come alternative alla procreazione medicalmente assistita;
- Requisiti di accesso alla PMA:** siamo stati informati per legge possono accedere a PMA coppie di maggiorenni di sesso diverso, coniugate oppure conviventi, in età potenzialmente fertile, entrambi viventi, laddove sussista sterilità o infertilità inspiegate o comunque accertate da atto medico;
- Conseguenze giuridiche dell'applicazione della PMA:** siamo stati informati che dall'applicazione di tecniche di PMA dipendono i seguenti effetti giuridici:
  - i bambini nati con tecniche di PMA godono dello stato legale di figli legittimi o riconosciuti della coppia;
  - in relazione alla madre del nato da PMA vige il divieto di anonimato (cioè la madre non può dichiarare la volontà di non essere nominata nella dichiarazione di nascita ai sensi dell'art.30 del DPE 396 del 2000)
  - nel caso di PMA di tipo eterologo, per il coniuge o il convivente vige il divieto di disconoscere la paternità;
- Sanzioni:** siamo stati informati che sono previste sanzioni pecuniarie per chiunque a qualsiasi titolo, applichi tecniche di procreazione assistita in violazione delle prescrizioni della Legge 40.
- Problemi bioetici:** Nonostante la giurisprudenza costituzionale abbia ripetutamente posto l'accento sui limiti che alla *discrezionalità legislativa pongono le acquisizioni scientifiche e sperimentali, che sono in continua*

evoluzione e sulle quali si fonda l'arte medica: sicché, in materia di pratica terapeutica, la regola di fondo deve essere la autonomia e la responsabilità del medico, che, con il consenso del paziente, opera le necessarie scelte professionali (sentenze n. 338 del 2003, n. 282 del 2002), la Sentenza Corte Costituzionale 151/2009 dichiara "l'illegittimità costituzionale dell'art. 14, comma 2, della legge 19 febbraio 2004, n. 40 (Norme in materia di procreazione medicalmente assistita), limitatamente alle parole «ad un unico e contemporaneo impianto, comunque non superiore a tre»; dichiara l'illegittimità costituzionale dell'art. 14, comma 3, della legge n. 40 del 2004 nella parte in cui non prevede che il trasferimento degli embrioni, da realizzare non appena possibile, come stabilisce tale norma, debba essere effettuato senza pregiudizio della salute della donna; la Sentenza Corte Costituzionale 96/2015 dichiara "l'illegittimità costituzionale degli artt. 1, commi 1 e 2, e 4, comma 1, della legge 19 febbraio 2004, n. 40 (Norme in materia di procreazione medicalmente assistita), nella parte in cui non consentono il ricorso alle tecniche di procreazione medicalmente assistita alle coppie fertili portatrici di malattie genetiche trasmissibili, rispondenti 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), accertate da apposite strutture pubbliche." e la Sentenza della Corte Costituzionale 162/2014 dichiara l'illegittimità costituzionale dell'art. 4, comma 3, della legge 19 febbraio 2004, n. 40 (Norme in materia di procreazione medicalmente assistita), nella parte in cui stabilisce per la coppia di cui all'art. 5, comma 1, della medesima legge, il divieto del ricorso a tecniche di procreazione medicalmente assistita di tipo eterologo, qualora sia stata diagnosticata una patologia che sia causa di sterilità o infertilità assolute ed irreversibili".

**L'Istituto** pone grande attenzione all'orientamento etico-religioso delle singole coppie e ne riconosce e supporta la libera scelta di intraprendere una metodica che presuppone la fertilizzazione extracorporea dei gameti, la possibile crioconservazione di embrioni sovrannumerari, la diagnosi di anomalie congenite pre impianto, la crioconservazione o donazione di gameti (sperma e ovociti) sovrannumerari (consenso specifico).

6. **Tecniche impiegabili:** siamo stati informati che il programma di procreazione assistita che prevede lo scongelamento degli ovociti necessita di varie fasi che ci sono state illustrate attraverso il documento informativo fornito alle coppie:
- siamo consapevoli che per ottenere una fertilizzazione sarà necessario impiegare una micro- iniezione dello sperma (ICSI). Siamo consci che le possibilità di fertilizzazione degli ovociti, divisione ed impianto della gravidanza non sono uniformi e possono variare in base alla metodica utilizzata ed alle condizioni cliniche specifiche della coppia (età della partner femminili, gravità del fattore maschile);
  - siamo inoltre consapevoli che sarà necessario, se non verrà deciso un trasferimento su ciclo spontaneo, assumere farmaci (estrogeni e progesterone) per via orale o transdermica, vaginale o intramuscolare al fine di favorire lo sviluppo della mucosa endometriale. La terapia non è esente, sebbene raramente, da effetti collaterali anche maggiori di cui siamo consci e che accettiamo al fine di sottoporci al programma riproduttivo;
  - preparazione del liquido seminale mediante tecniche atte a favorire la capacità fecondante degli spermatozoi. Gli ovociti prelevati saranno inseminati in vitro o iniettati con gli spermatozoi trattati e in seguito (2- 5 giorni), gli embrioni saranno trasferiti in utero per via transvaginale sotto guida ecografica;
  - eventuale necessità di crioconservazione degli embrioni/ovociti ottenuti;
7. **Impegno dei richiedenti:** La coppia dovrà eseguire una volta posta una diagnosi e un'indicazione alla tecnica di PMA gli accertamenti previsti a tutela della madre e del nascituro e dalla normativa Europea delle Banche delle Cellule e Tessuti (DECRETO LEGISLATIVO 25 gennaio 2010, n. 16 e successive modifiche). I Test Infettivologici (Anti- HIV- 1,2 HBsAg Anti- HBc, Anti- HCV Ab, Sifilide) devono essere compresi nei limiti di validità previsti da questa normativa prima dell'inizio/esecuzione della procedura. La firma del presente consenso necessita della presenza di entrambe i partner. La durata della terapia di preparazione, scongelamento, fertilizzazione e trasferimento embrionario impegna la coppia per un periodo di circa 2 settimane, periodo nel quale gli accertamenti ambulatoriali non necessitano della presenza del partner maschile, mentre dovrà essere presente il giorno del prelievo degli ovociti (raccolta dello sperma), ove non sia impiegato seme crioconservato.
8. **Effetti indesiderati:** Nel caso siano riscontrate formazioni cistiche ovariche al momento del primo controllo ecografico o nei controlli successivi, potrà rendersi necessaria la loro aspirazione oppure la sospensione del trattamento. Anche quando i parametri ormonali e biologici riguardanti i gameti maschili e femminili fossero normali, non può essere garantita né la fecondazione né la divisione degli ovociti fecondati e il loro sviluppo successivo.
- Ottenuta la gravidanza, non vi è una maggiore incidenza di abortività spontanea (aumentata percentuale in rapporto all'età materna) ed è stato osservato un aumento di alcune complicanze ostetriche (parto prematuro, anomalie d'impianto della placenta, ridotto peso alla nascita). Deve essere considerato che l'aumentato rischio di

complicanze ostetriche è osservabile nelle pazienti infertili che concepiscono a prescindere dal fatto che si siano sottoposte a tecniche di riproduzione assistita. Vi sono numerosi dati che confermano che le pazienti infertili rappresentano un gruppo a maggior rischio, a prescindere dalle modalità di insorgenza della gravidanza.

Esiste un'aumentata incidenza di gravidanze plurime (sino a un 30% in rapporto all'età materna) e questa probabilità è in diretto rapporto al numero di embrioni trasferiti; l'équipe medica **si adopera** per ridurre questa possibilità di grave rischio sia per la madre che per il nascituro.

9. **Probabilità di nascita di un bimbo vivo:** siamo stati informati che non è possibile per l'équipe medica garantire l'esito positivo del trattamento; infatti, le percentuali di successo dei differenti trattamenti sono legate, ad esempio, all'età della coppia o alla patologia che ha indicato il trattamento e possono variare notevolmente da coppia a coppia e da ciclo a ciclo. Un dettaglio delle probabilità di gravidanza è presente nel libretto informativo e aggiornamenti costanti sono visibili su [www.humanitas.it/fertility](http://www.humanitas.it/fertility).
10. **Rischi per la madre:** Siamo stati informati e abbiamo compreso che la PMA non è esente da possibili, sebbene rare, complicanze:
  - effetti collaterali indesiderati correlati alle terapie atte ad ottenere uno sviluppo della mucosa uterina atto all'impianto della gravidanza;
  - insorgenza d'infezioni utero ovariche (<0,1% nella nostra casistica, pari a quanto riportato nelle maggiori esperienze internazionali);
  - possibilità che la gravidanza s'impianti in sede anomala (gravidanze extrauterine) con una frequenza stimabile sino al 4%;
11. **Rischi per il/i nascituro/i:** siamo stati informati che gli esiti di gravidanze spontanee in pazienti infertili e gravidanze da PMA non mostrano differenze nell'incidenza di malformazioni congenite o di difetti neonatali. Si evidenzia invece un aumento seppur modesto in rapporto alla popolazione generale, presumibilmente per le specifiche delle coppie con difficoltà riproduttive pazienti, che paiono per questo motivo avere un'incidenza maggiore di complicanze (Davies MJ et al, New England Journal of Medicine, 2012). Calcolando un'incidenza dell'1- 3% di malformazioni congenite nella popolazione generale è possibile stimare un rischio di anomalie tra l'1.3% e il 3.9% nella popolazione infertile sia che concepisca spontaneamente che attraverso una tecnica di PMA. I dati della nostra casistica indicano un rischio di anomalie congenite neonatali in una percentuale pari al 3,7% (105/2800 bimbi nati), non statisticamente diverso tra coppie infertili che concepiscono spontaneamente o tramite procedure di PMA (Levi-Setti et al. JARG, 2016).
12. **Rischi associati alla PMA di tipo eterologo:** Il decreto Ministeriale del 11 luglio 2015 e il testo del decreto legislativo n.16/2010 e suoi aggiornamenti illustrano il procedimento di selezione del donatore/donatrice, illustrando alla coppia ricevente il significato e i risultati degli esami clinici cui il donatore/donatrice deve essere sottoposto, inclusa la visita di genetica medica e limiti e attendibilità dei relativi test specifici impiegati ed il numero massimo di nascite consentito dallo stesso donatore/donatrice ed eventuali deroghe per coppie che già hanno avuto un figlio tramite procreazione assistita di tipo eterologo.
13. **L'impegno di comunicare al centro**, in caso di accesso a tecniche PMA di tipo eterologo, eventuali patologie insorte, anche a distanza di tempo, nella donna, nel nascituro o nel nato, e di cui è ragionevole ipotizzare la presenza antecedentemente alla donazione.
14. **Conseguenze della mancata comunicazione delle modalità di concepimento al nato da fecondazione eterologa:** siamo stati informati della possibilità che il nato da fecondazione di tipo eterologa, una volta adulto, potrebbe incorrere in una ricostruzione errata della propria storia clinica (anamnesi), laddove non venga messo a conoscenza delle modalità del proprio concepimento.
15. **Volontarietà e gratuità della donazione di gameti:** siamo stati informati che laddove acconsentissimo alla donazione dei gameti, tale donazione avrebbe carattere volontario e gratuito; siamo stati inoltre informati che, nel rispetto della legge, l'identità della persona o delle persone che ricevono la donazione di gameti non sarà rivelata al donatore o alla sua famiglia e viceversa.
16. **Possibili effetti psicologici per i singoli richiedenti per la coppia e per il nato, conseguenti all'applicazione delle tecniche di PMA, con particolare riguardo alle specificità delle tecniche di PMA di tipo eterologo:** Numerosi studi hanno indagato il vissuto psicologico delle coppie e dei nati da tecniche di PMA omologhe, provate spesso da un lungo e difficile percorso di ricerca, insistendo su una maggiore armonia della coppia, un maggiore attaccamento ai figli ed un ridotto numero di separazioni/divorzi rispetto alle coppie con figli concepiti senza ricorso alle tecniche di PMA, fatto salvo un maggior grado di ansia per la salute dei bimbi nati, con richiesta di ricoveri ospedalieri spesso ingiustificati, nei primi anni di vita. Un supporto psicologico è consigliato ed è offerto dal nostro Istituto in preparazione e nel corso dei cicli di terapia. Condizione che necessita particolare attenzione è l'impatto negativo di un insuccesso, che conduce spesso a rinunciare a ulteriori tentativi sebbene la prognosi sia ancora favorevole alla coppia. Sebbene non abbiamo riscontrato differenze significative

nella probabilità di successo nelle coppie con patrimonio ovarico conservato sino oltre il sesto tentativo, solo un numero molto limitato di coppie si avvale di questa opportunità (drop-out).

17. **Possibilità di crioconservazione dei gameti maschili e femminili:** siamo stati informati della possibilità di crioconservare gameti femminili e maschili per successivi trattamenti di fecondazione assistita, ed, eventualmente, anche al fine della donazione per fecondazione di tipo eterologo; siamo stati informati che potremo esprimere il nostro consenso alla crioconservazione embrionaria nella sezione B del presente documento, e alla donazione di gameti soprannumerari per fini di ricerca e/o per fecondazione di tipo eterologo.
18. **Possibilità di revoca del consenso da parte dei richiedenti fino al momento della fecondazione dell'ovulo:** siamo stati informati che una volta espressa la nostra volontà di accedere alle tecniche di procreazione medicalmente assistita devono passare sette giorni prima che sia effettuata la fecondazione dell'ovocita/i, e che durante questi sette giorni saremo legittimati a revocare il nostro consenso alla fecondazione dell'ovocita/i.
19. **Possibilità per il medico responsabile della struttura di non procedere alla PMA per motivi di ordine medico- sanitario:** siamo stati informati che il medico responsabile della struttura potrà, in qualsiasi fase di applicazione della tecnica, decidere di non procedere alla PMA per motivi di ordine medico- sanitario, motivando tale scelta per iscritto;
20. **Limiti all'applicazione delle tecniche su embrioni di cui all'art.14 della legge 19 febbraio 2004 n.40 e modifiche apportate dalle Sentenze della Corte Costituzionale:**
  - siamo stati informati che ai sensi dell'art.14 della legge 40/2004 in tema di PMA è vietata la riduzione embrionaria di gravidanze plurime, salvo nei casi previsti dalla legge 22 maggio 1978, n. 194.
  - Siamo legittimati a essere informati sul numero e sullo stato di salute degli embrioni prodotti e da trasferire nell'utero; anche attraverso procedure di diagnosi/screening pre- impianto ove sussistano le condizioni previste dalla Normativa e dalla buona pratica clinica e la coppia abbia richiesto l'esecuzione di queste procedure opzionali, ottenuto l'assenso della Direzione del Fertility Center e firmato i consensi specifici.
  - È consentita la crioconservazione dei gameti maschili e femminili, previo consenso informato e scritto.
21. **Trasferimento degli embrioni:** siamo stati informati che saranno trasferiti un numero di embrioni variabile in rapporto alla storia clinica e all'età della partner femminile, in modo da garantire un'ottimale probabilità di successo rapportata alla necessità di ridurre il rischio di gravidanze multiple e le complicanze ad esse correlate. Le tecniche di produzione degli embrioni utilizzate non creano un numero di embrioni superiore a quello necessario per la procreazione, e il trasferimento degli embrioni così creati è effettuato appena possibile, senza pregiudizio della salute della partner femminile ed al fine di creare le condizioni per un ottimale sviluppo della gestazione.
22. **Criocervazione degli embrioni soprannumerari:** siamo stati informati che a seguito di PMA è possibile la produzione di eventuali embrioni evolutivi soprannumerari. Tali embrioni potranno essere crioconservati, previa espressione del nostro consenso per iscritto (vedi sezione B). L'opportunità di crioconservare eventuali embrioni soprannumerari è legata alle seguenti circostanze:
  - a. Limitazione del rischio di gravidanze multiple: il contemporaneo trasferimento di tutti gli embrioni fecondati e sviluppati in vitro può comportare un alto rischio di gravidanza multipla con le connesse complicazioni per la paziente e per il feto; per tale motivo si rende opportuno crioconservare gli embrioni soprannumerari; La crioconservazione in questi casi è finalizzata a consentire alla coppia il conseguimento di una probabilità ottimale di successo di gravidanza riducendo i rischi correlati all'insorgenza di gravidanze multiple (rischi sia per la paziente e sia per il feto). Alternativamente, l'equipe medica, per evitare il rischio di gravidanze multiple, dovrà utilizzare solo un numero ridotto di ovociti, riducendo le possibilità di ottenere embrioni evolutivi, sino alla possibile assenza di embrioni da trasferire
  - b. Possibilità di avvalersi di embrioni crioconservati nel caso di primo tentativo di PMA fallito: La presenza di embrioni crioconservati consentirà di avere una probabilità di gravidanza, in caso d'insuccesso del trasferimento a fresco, consentendo alla paziente di evitare di sottoporsi a successive induzioni dell'ovulazione, anestesie e prelievi degli ovociti.
  - c. Possibilità di avvalersi di embrioni crioconservati per ottenere una seconda gravidanza: nel caso di una prima gravidanza ottenuta con il trasferimento a fresco, consentirà di poter ottenere un'altra gravidanza, senza sottoporsi a ulteriori induzioni dell'ovulazione, anestesie e prelievi degli ovociti.
  - d. Necessità di crioconservare gli embrioni in casi di patologie particolari che rendano opportuno rimandare l'impianto dell'embrione: in caso di particolari di patologie la crioconservazione consentirà il trasferimento degli embrioni in un secondo momento;

- e. **Altri casi di necessità di crioconservare gli embrioni:** la crioconservazione degli embrioni si rende necessaria, oltre ad evitare la reiterazione di cicli di stimolazione ovarica, anche nei casi di:
- grave impedimento o rischio per la paziente;
  - potenziale rischio per il feto;
  - condizioni che riducono o annullano le possibilità d'impianto dell'embrione.

Riguardo al trasferimento nei cicli a fresco e crioconservazione l'équipe medica agirà secondo:

- a. le indicazioni del "Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology" e del "Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine" (Fertil Steril 2017;107:901–3), in base alle quali viene trasferito 1 solo embrione nelle pazienti di età inferiore a 38 anni con buona prognosi, soprattutto se viene trasferito in embrione allo stadio di blastocisti, in condizioni particolari, come il trasferimento di embrioni sottoposti a screening pre impianto e di blastocisti crioconservate verrà proposto il trasferimento di 1 solo embrione.
  - b. le indicazioni sulle modalità procedurali della PMA elaborate da "Società Italiane di Medicina della Riproduzione" dopo la sentenza della Corte Costituzionale sulla Legge 40/2004 (Corte Costituzionale sent. n.151, 8 maggio 2009). In base a tali indicazioni, in tutti i casi in cui non sia auspicabile eseguire ripetuti cicli di induzione della crescita follicolare multipla a causa di una pregressa o persistente patologia presente al momento in cui la coppia fa richiesta di accesso ad un programma di PMA e la coppia abbia firmato un consenso alla eventuale crioconservazione embrionaria, si cercherà di ottimizzare un ciclo di PMA utilizzando tutti gli ovociti idonei (salvo condizioni particolari non verranno utilizzati comunque più di 10- 12 ovociti), procedendo con l'eventuale crioconservazione degli embrioni soprannumerari da trasferire in tempi successivi.
  - c. Al fine di ridurre il numero degli embrioni non evolutivi crioconservati verranno crioconservati (salvo condizioni eccezionali) solo gli embrioni che raggiungono lo stadio di blastocisti (5- 6 giornata) che saranno crioconservati singolarmente.
23. **Conseguenze del rifiuto alla crioconservazione degli embrioni soprannumerari:** siamo stati informati che il rifiuto della possibilità di crioconservazione degli embrioni, comporta che l'equipe medica possa procedere allo scongelamento di un numero limitato di ovociti (3- 4 ovociti in relazione alle condizioni specifiche della coppia) per limitare il rischio di gravidanze multiple, e che tutti gli embrioni formati debbano essere trasferiti a fresco immediatamente. Non essendo in nessun modo prevedibile la probabilità di fertilizzazione e divisione degli ovociti, potrebbe verificarsi la condizione di non avere embrioni da trasferire.
24. **Anomalie di sviluppo dell'embrione:** Siamo stati informati che qualora l'analisi microscopica evidenziasse anomalie irreversibili dello sviluppo dell'embrione (embrioni sviluppati dopo divisione di zigoti con numero anomalo di pronuclei), la coppia sarà informata prima del trasferimento e potrà indicare o confermare la volontà di non procedere al trasferimento degli embrioni anomali (vedi sezione apposita in questo consenso).
25. **Accertamenti per le coppie che si sottopongono a PMA:** siamo consci che la Normativa Nazionale (legge 40/2004 e linee guida della legge stessa) non indica, per le coppie che si sottopongono a cicli d'assistenza medica con metodiche ad alta tecnologia, accertamenti diversi da quelli richiesti alle coppie alla ricerca di un concepimento spontaneo o in cui la gravidanza sia insorta spontaneamente. Non sono quindi richiesti accertamenti specifici a tutela della coppia e del nascituro diversi da quelli comunemente prescritti come accertamento preconcezionale. Accertamenti specifici sono indicati solo in presenza di particolari fattori di rischio presenti nell'anamnesi della coppia e che devono essere specificati nei colloqui preliminari con l'equipe medica. In generale sono richiesti accertamenti genetici (cariotipo e microdelezioni cromosoma Y) solo in presenza di una grave dispermia. l'età materna può condizionare i risultati. Una consulenza genetica, l'amniocentesi o la villocentesi sono consigliate se l'età materna è superiore ai 35 anni o se esistono specifiche condizioni patologiche familiari su base genetica.
26. **Follow up:** siamo consapevoli che la Normativa Nazionale impone l'obbligo del follow up (inteso come insieme di visite ed esami condotti in maniera sistematica nel contesto di programmi predefiniti) delle gravidanze e dei bimbi nati attraverso le tecniche di assistenza medica alla riproduzione. A tal fine la coppia s'impegna:
- a. a fornire tutte le notizie utili per conoscere l'evoluzione, la conclusione della gravidanza e lo sviluppo post natale dei bimbi nati attraverso queste tecniche;
  - b. a consentire all'équipe medica, nei limiti imposti dal rispetto del segreto professionale e della normativa vigente, di contattare i medici curanti (ginecologo, pediatra etc.) al fine di poter completare il lavoro di follow up.

Il controllo sia prenatale e sia post natale verrà effettuato nel rispetto della privacy della coppia, per cui non saranno rese note le specifiche della tecnica che ha dato origine al concepimento.

La presa in carico della coppia per un programma d'assistenza medica alla ricerca della gravidanza non esime la

coppia dal sottoporsi agli accertamenti di screening generale ritenuti opportuni e previsti dal medico curante, dal ginecologo di fiducia o altri specialisti con cui la coppia deve rimanere in costante contatto. l'équipe medica di Humanitas Fertility Center è disponibile in ogni momento a collaborare con i medici di fiducia della coppia e, ove richiesto espressamente, di farsi carico di richiedere o eseguire gli accertamenti di loro competenza.

Ai sensi art. 11 della legge n. 40 del 19.1.2004 è istituito presso l'Istituto Superiore di Sanità, il registro delle strutture autorizzate all'applicazione delle tecniche di procreazione medicalmente assistita degli embrioni formati e dei nati a seguito dell'applicazione delle tecniche medesime. L'iscrizione al registro è obbligatoria.

27. **Costi economici:** siamo stati informati in merito ai costi della procedura di PMA da noi prescelta. Siamo consapevoli e informati dei costi delle procedure sia in regime di solvenza e per i cicli erogati in Convenzione con il SSN e siamo informati che il passaggio della PMA nei livelli essenziali di assistenza (LEA) potrebbe modificare criteri di erogazione e la quota/e a carico della coppia per i vari aspetti delle procedure e come questa condizione non dipenda dalle decisioni della Direzione dell'Humanitas Research Hospital.

## Sezione B

### CONSENSO ALLA CRIOCONSERVAZIONE EMBRIONARIA

I. Siamo stati informati e abbiamo compreso le motivazioni e le implicazioni connesse alla crioconservazione di embrioni:

1. laddove il contemporaneo trasferimento di tutti gli embrioni fecondati e sviluppati in vitro possa comportare un alto rischio di gravidanza multipla con le connesse complicazioni per la paziente e per il feto;
2. laddove le condizioni di salute della paziente non consentano l'impianto dell'embrione, se non con grave rischio di complicazioni sia per la paziente che per l'embrione stesso;
3. che questa tecnica consentirà di procedere a un ulteriore tentativo di impianto ove il primo dovesse fallire, evitando in tal modo il ricorso ad un nuovo ciclo di stimolazione ovarica;
4. che la percentuale di sopravvivenza degli embrioni dopo la crioconservazione non è stimabile e può variare dallo 0 al 100%;
5. che le possibilità di impianto della gravidanza non possono essere garantite e sono variabili in base al numero e qualità degli embrioni;
6. che non si è riscontrato un aumento di difetti congeniti e di sviluppo nelle gravidanze insorte dopo crioconservazione degli embrioni rispetto a quanto osservato in concepimenti spontanei nelle coppie infertili;
7. che il trasferimento potrà essere eseguito su ciclo spontaneo o, in alternativa, è prevista l'assunzione di farmaci (estrogeni e progesterone) per via orale o transdermica, vaginale o intramuscolare al fine di favorire lo sviluppo della mucosa endometriale e che la terapia, sebbene in rari casi, non sia esente da effetti collaterali;
8. la domanda di crioconservazione degli embrioni è espressa in modo consensuale da entrambi i partner;
9. la coppia non avrà diritto ad alcun indennizzo nel caso in cui, per qualsiasi motivo e/o nonostante le cure di Humanitas, si verificasse il deterioramento o la perdita del materiale depositato.

II. 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 dovremo nel futuro affrontare, inclusa la percentuale di successo.

III.

1. Abbiamo preso visione, capito, accettato ed espresso la nostra scelta consapevole per tutte le clausole espresse nel presente consenso, compresa la clausola in forza della quale viene chiarito che gli embrioni crioconservati non potranno in ogni caso essere distrutti o eliminati, se considerati vitali o evolutivi.
2. Humanitas non potrà proseguire a tempo indefinito la crioconservazione degli embrioni, salvo specifiche condizioni che dovranno essere singolarmente sottoscritte con la Direzione dell'Istituto. Humanitas potrà decidere in ogni momento di consegnare gli embrioni crioconservati alla coppia/paziente, che dovranno/dovrà provvedere e sostenere i costi del loro trasferimento presso altro Istituto dei Tessuti, secondo la normativa di Legge prevista per il loro trasporto e stoccaggio.
3. Siamo consapevoli che gli embrioni crioconservati dovranno essere in futuro trasferiti in utero. Gli embrioni non utilizzati (abbandonati), saranno mantenuti presso Humanitas per un tempo non definibile in base all'attuale legislazione o spostati in un Centro collettore, in caso di modifiche dell'attuale legislazione.

4. Al momento attuale e salvo modifiche alle condizioni previste dalla attuale normativa, il congelamento embrionario non comporta per la coppia il pagamento di alcun costo correlato al processo di crioconservazione. Al momento del deposito (data della crioconservazione o trasferimento da altra struttura) sarà richiesto un contributo annuale alle spese di mantenimento della crioconservazione. La Direzione potrà decidere autonomamente se esentare per uno o più anni la coppia dal versamento del contributo al mantenimento della crioconservazione. La durata del deposito è di dodici mesi (dal momento del congelamento o trasferimento da altra struttura) al termine dei quali il presente contratto dovrà essere rinnovato; in mancanza di una richiesta, da parte della paziente, di rinnovo e pagamento del deposito, **il Centro sarà autorizzato a considerare gli embrioni in stato di abbandono**; Siamo consapevoli che il procedimento di scongelamento e trasferimento potrebbe non essere erogabile a carico del Sistema Sanitario Nazionale.

**Siamo consapevoli** che in particolari condizioni la sola partner femminile avrà la possibilità di richiedere lo scongelamento ed il trasferimento in utero degli embrioni crioconservati e che il Fertility Center acconsentirà solo dopo un parere vincolante specifico dei propri consulenti legali e ove necessario dopo sentenza del magistrato.

La richiesta di trasferimento degli embrioni crioconservati ad altro Centro può essere effettuata solo dalla coppia, salvo condizioni che saranno oggetto di una specifica decisione della Direzione. La coppia si farà carico delle procedure previste e del costo del trasferimento stesso, secondo le norme previste dalla normativa.

Alla luce di quanto sopra esposto, letto e compreso:

- SI Esprimiamo il nostro consenso alla crioconservazione di eventuali embrioni sviluppati nel laboratorio di Humanitas e non trasferiti in utero a seguito di valutazione da parte dell'équipe medica e intendiamo quindi avvalerci della possibilità di crioconservazione degli embrioni soprannumerari.
- NO Non intendiamo usufruire della possibilità di crioconservazione degli embrioni soprannumerari e siamo quindi consapevoli delle condizioni che impongono all'équipe medica l'utilizzo di un numero ridotto di ovociti.

#### Sezione D

#### **CONSENSO ALLA DONAZIONE DEI GAMETI SOPRANNUMERARI PER FINI DI STUDIO E RICERCA (OVOCITI E SPERMATOZOI NON UTILIZZABILI PER LA COPPIA E IMPIEGATI IN STUDI NON PROCREATIVI)**

- SI ACCONSENTIAMO ALLA DONAZIONE
- NO NON ACCONSENTIAMO ALLA DONAZIONE

#### Sezione E

#### **DICHIARAZIONE AI SENSI dell'articolo 14, legge 40/2004**

Siamo stati informati a cura del Medico Responsabile della Struttura o da un suo incaricato, della possibilità di sviluppo di embrione/i che presenta/presentano una grave e irreversibile anomalia dello sviluppo (numero anomalo di pronuclei). Siamo stati informati che, in questi casi, il trasferimento embrionario può essere rifiutato. Qualora venissero osservati dallo staff embriologico, embrioni con grave ed irreversibile anomalia dello sviluppo, richiediamo che:

- NO Gli embrioni anomali NON vengano trasferiti in utero
- SI Gli embrioni anomali vengano comunque trasferiti in utero

## Sezione F

### **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.

## Sezione G

### **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, legittimo 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 - Aneuploidies 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 ovocitario (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 biotico 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 INFORMATO PER TEST GENETICO PRE-IMPIANTO PGT-SR PER LA RILEVAZIONE DI RIARRANGIAMENTI CROMOSOMICI NELLE ALTERAZIONI STRUTTURALI BILANCIATE PRESENTI NEL CARIOTIPO PERIFERICO**

### **DESCRIZIONE, INDICAZIONE E VANTAGGI**

I test genetici preimpianto per riarrangiamenti strutturali (PGT- SR) sono offerti ai pazienti nei quali si rileva, previamente al trattamento IVF, un riarrangiamento strutturale bilanciato, come una traslocazione o una inversione. Le informazioni relative alle aneuploidie descritte per la PGT- A si applicano anche per lo screening di riarrangiamenti sbilanciati (PGT-SR), con le seguenti descrizioni di seguito riportate.

L'analisi della presenza di un riarrangiamento sbilanciato (PGT- SR) è indicata per i soggetti portatori di una traslocazione o un'inversione bilanciata precedentemente identificata.

Le traslocazioni e le inversioni sono due tipi di riarrangiamenti cromosomici strutturali generalmente bilanciati.

Un individuo con inversione ha un segmento di cromosoma che ha cambiato posizione all'interno di quel cromosoma.

Una traslocazione è causata dal trasferimento di materiale genetico tra 2 cromosomi. I portatori di riarrangiamenti strutturali bilanciati presentano anomalie strutturali nella struttura dei cromosomi, senza perdite o aggiunte di materiale genetico.

Un portatore di un riarrangiamento bilanciato normalmente non presenta problemi clinici, anche se può talvolta avere difficoltà a concepire per aumentata abortività nelle donne e ipospermatogenesi negli uomini. I fattori di rischio per i portatori di una traslocazione o inversione bilanciata includono l'infertilità idiopatica maschile, gli aborti spontanei multipli e l'anamnesi familiare dei difetti congeniti.

Nei portatori di riarrangiamenti strutturali bilanciati, c'è il rischio di produrre ovociti e spermatozoi con alterazioni sbilanciate che potrebbero essere trasmesse alla prole.

Gli embrioni di portatori di tali anomalie possono presentare riarrangiamenti strutturali sbilanciati (aggiunta o perdita di un segmento cromosomico) che possono portare a fallimenti dell'impianto, aborto spontaneo o nascita di bambini con problemi cognitivi e/o fisici. Se i figli ereditano il riarrangiamento strutturale bilanciato, non dovrebbero avere problemi di salute, proprio come il loro genitore portatore.

L'identificazione degli embrioni che hanno ereditato un riarrangiamento sbilanciato può aiutare i pazienti e i medici a prendere decisioni su quali embrioni trasferire.

Sia le inversioni che le traslocazioni, bilanciate e sbilanciate, possono essere rilevate prima della nascita attraverso una villocentesi (CVS) o un'amniocentesi. Lo screening prenatale nel siero materno non riesce a rilevare riarrangiamenti sbilanciati.

### **PROCEDIMENTO**

L'analisi di PGT- SR verrà eseguito utilizzando lo stesso campione biologico utilizzato per la PGT- A. Per la rilevazione degli sbilanciamenti cromosomici, viene utilizzata una piattaforma NGS ottimizzata per rilevare sbilanciamenti superiori a 6Mb.

**Requisiti aggiuntivi:** prima di iniziare il ciclo di trattamento, si devono eseguire il cariotipo del portatore di traslocazione o inversione bilanciata, in un laboratorio citogenetico certificato, e del/della partner, e i risultati devono essere inviati dal centro PMA al laboratorio che esegue l'analisi genetica per una revisione e per valutazione della presa in carico o meno del caso.

#### POTENZIALI CRITICITÀ E LIMITAZIONI

Le criticità della diagnosi dei riarrangiamenti sbilanciati attraverso PGT-SR sono gli stessi indicati per la PGT-A.

Tutte le altre limitazioni del PGT per aneuploidie si applicano anche alla selezione di riarrangiamenti sbilanciati.

1. **Il PGT- SR non può rilevare sbilanciamenti molto piccoli.** Questa tecnologia è stata sviluppata per verificare l'aneuploidia (cromosomi completi). Può anche rilevare aneuploidie parziali, comprese le delezioni, le duplicazioni, i riarrangiamenti e gli sbilanciamenti ereditati da un genitore con una traslocazione o un'inversione, a seconda della dimensione del segmento cromosomico in questione. Se i riarrangiamenti sbilanciati hanno segmenti di cromosoma generalmente inferiori ai 6 MB, di solito non possono essere rilevati.
2. **Il PGT- SR non può individuare anomalie strutturali bilanciate.** Le anomalie strutturali non possono essere rilevate se non esiste uno sbilanciamento nel materiale genetico. Esistono molteplici anomalie cromosomiche, incluse le traslocazioni bilanciate e le inversioni, che non possono essere rilevate. La tecnologia utilizzata per il PGT- SR non è in grado di distinguere un embrione che non eredita un riarrangiamento da un embrione che eredita un riarrangiamento bilanciato, anche se entrambi questi casi individuano un embrione con normale prognosi.

#### CONSAPEVOLI ED INFORMATI SU:

- esecuzione e/o controllo dei test di PGT- SR 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- SR sono l'esecuzione della IVF senza PGT- SR seguita, eventualmente, da diagnosi prenatale
- distruzione del DNA residuo dell'analisi PGT- SR 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

Alla luce di tutto quanto precede dichiariamo:

- a. che la nostra richiesta di sottoporci alla tecnica di PMA segue alle informazioni ottenute durante i colloqui sostenuti con i sanitari;
- b. che i sanitari hanno soddisfatto le nostre domande e chiarito i dubbi riguardo alla procedura che stiamo per affrontare, inclusa la percentuale di successo;
- c. di aver compreso le indicazioni della tecnica prevista nel nostro caso specifico;
- d.

- di aver ottenuto informazioni adeguate sulle alternative al trattamento e sull'opzione di procedere ad una domanda di adozione;
- e. di essere consapevoli dei rischi, anche psicologici, correlati ad un programma di PMA e delle possibili alternative, compresa la rinuncia a ricercare una gravidanza;
  - f. di essere consapevoli di poter richiedere un'attività ulteriore di consulenza al fine di supportare le decisioni che sono state espresse; a tal fine Humanitas Fertility Center è in grado di assicurare un supporto e/o una consulenza psicologica dedicata come previsto dalla normativa (DM. 1.07.2015 "Linee Guida in materia di procreazione medica assistita");
  - g. di essere consapevoli che durante il trattamento l'équipe sarà disponibile a rispondere alle nostre domande e a prendere in considerazione i nostri problemi.
  - h. 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

**Dichiariamo, inoltre,** di aver eseguito tutti gli accertamenti preliminari richiesti e di aver fornito all'équipe medica tutte le informazioni indicative di un possibile aumento di rischio.

Acconsentiamo, quindi, a partecipare a questo programma terapeutico di procreazione assistita, del quale oltre alle spiegazioni fornite dall'équipe medica, abbiamo ricevuto e valutato tutte le clausole riportate nel presente consenso alla PMA.

Dichiariamo altresì di riconoscere il nascituro quale figlio legittimo o naturale; per tanto, ci impegniamo in modo irrevocabile al riconoscimento congiunto e a rinunciare a ogni possibile futuro disconoscimento di paternità/maternità. Consci delle conseguenze legali di una dichiarazione mendace, dichiariamo di essere una coppia di sesso diverso, maggiorenne, 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).

Abbiamo preso visione, compreso, accettato ed espresso la nostra scelta consapevole per l'informativa inerente il trattamento dei dati personali e per tutte le clausole espresse nel presente consenso.

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.