

CONSENSO ALLO SCREENING GENETICO PREIMPIANTO

Ai sensi della Legge 40/2004 "Norme in materia di procreazione medicalmente assistita" pubblicata in G.U. n.45 del febbraio 2004, del Decreto 1 Luglio 2015 "Linee guida contenenti le indicazioni delle procedure e delle tecniche di procreazione medicalmente assistita" pubblicato in G.U. n. 161 del 14 Luglio 2015, della Sent. Corte Costituzionale n. 151/2009, pubblicata in G.U. il 13 Maggio 2009, e della Sent. Corte Costituzionale 96/2015, pubblicata in G.U. il 10 Giugno 2015.

La PGS (Pre Implantation Genetic Screening) é 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 PGS, informa sullo stato di salute di ciascun embrione e permette di individuare gli embrioni non affetti da anomalie cromosomiche prima del loro trasferimento in utero.

La tecnica della PGS è il risultato della combinazione di:

1. fecondazione "in vitro" con iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo nella cellula uovo
2. biopsia di cellule embrionali mediante micromanipolazione, e
3. tecniche diagnostiche molecolari specifiche eseguite nelle coppie per le quali sia indicata un'analisi cromosomica in cui, la diagnosi molecolare (PGS per anomalie cromosomiche) permette di identificare gli embrioni che presentano un normale numero di cromosomi (44 più due cromosomi sessuali).

Il sottoscritto.....Nato ail.....

La sottoscritta.....Nata a.....il.....

PREMESSO

- che in data __ / __ / __ abbiamo richiesto di essere sottoposti ad un ciclo di concepimento assistito denominato "fecondazione in vitro e trasferimento in utero degli embrioni", come da consenso sottoscritto
- che ai sensi dell'art. 14 c.5 della L. 40/2004, abbiamo richiesto di avere informazioni sullo stato di salute degli zigoti e degli embrioni formati nel trattamento indicato.

Siamo stati informati delle seguenti circostanze:

- il ricorso allo screening preimpianto, legittima il medico/biologo, se necessario, ad iniettare tutti gli ovociti ottenuti (purché risultati idonei come da piano terapeutico con Voi concordato);
- che 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, dal numero di embrioni che giungerà alla formazione di blastocisti;

La PGS si avvale principalmente dell'utilizzo di quattro tecniche molecolari:

PCR (Polymerase Chain Reaction) che permette di evidenziare tratti molto piccoli dei cromosomi (sequenze di geni, singoli geni o pezzi di un singolo gene), attraverso un sofisticato sistema di amplificazione del DNA. E' indicata principalmente per la diagnosi di malattie monogeniche;

Array CGH (Array Comparative Genomic Hybridization) che è una tecnica indicata principalmente per la valutazione dell'intero assetto cromosomico e si ottiene dall'amplificazione dell'intero genoma mediante la variante della PCR, conosciuta come WGA (Whole Genomic Amplification). Il prodotto così ottenuto è analizzato per tutti i cromosomi questa metodica, che è in grado di fornire un'informazione completa sull'assetto cromosomico. L'impiego di Microarrays noti anche con il termine di Microchips, è una delle possibili varianti di questa tecnica, che consente di effettuare, assieme all'analisi cromosomica, anche la ricerca di una serie di geni implicati in alcune patologie, che tuttavia devono essere definite prima della procedura.

Next Generation Sequencing anche in questo caso vi é una amplificazione dell'intero genoma (WGA). Successivamente il DNA embrionale viene sequenziato e controllato mediante una sofisticata analisi bioinformatica, che consente di individuare la presenza di eventuali malattie genetiche o aneuploidie cromosomiche.

qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) in cui si analizzano le anomalie numeriche della totalità dei cromosomi che compongono il nostro genoma. L'intero assetto cromosomico dell'embrione viene esaminato tramite una tecnica basata su real time PCR e la metodica analizza il numero delle copie di ogni singolo cromosoma. Tale procedura permette di identificare anomalie cromosomiche di tipo numerico (aneuploidie) a carico dei 22 autosomi (cromosomi dal nr. 1 al nr. 22) e dei cromosomi sessuali (X e Y), ma non variazioni del contenuto di piccole porzioni dei cromosomi, come amplificazioni (duplicazioni), delezioni e traslocazioni sbilanciate che esulano dallo scopo della PGS e che quanto potrebbero essere di dubbia interpretazione.

Attualmente la metodica utilizzata è la qPCR, sebbene siano in corso di validazione altre metodiche diagnostiche.

Quando è indicato il prelievo di cellule embrionali per l'identificazione di anomalie numeriche del cariotipo embrionale (PGS)?

Lo screening o test delle anomalie cromosomiche (Pre Implantation Genetic Screening o Test) 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 della donna avanzata (generalmente definita come > 38 anni);

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 PGS 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.

Efficienza e benefici dell'analisi di anomalie numeriche del cariotipo embrionale:

In considerazione di questi fattori, 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. 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 trasferire embrioni affetti da anomalie cromosomiche permette di evitare i ripetuti trasferimenti di embrioni senza possibilità di portare a una gravidanza e che avrebbero dilazionato nel tempo il raggiungimento di un risultato positivo con le implicazioni psicologiche e di prognosi evidenti soprattutto per le coppie meno giovani. 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 e permette 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 PGS, 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 a esse associate.

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 effettuare la diagnosi sarà necessario, in particolare, ricorrere ad una 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 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. 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 (vedi sotto);

Assenza di compromissione dello sviluppo embrionale dovuto dalla biopsia.

3. **Diagnosi genetica.** Il campione ottenuto è processato per l'analisi molecolare.

4. **Trasferimento embrionale.** Con il risultato dell'analisi molecolare, la coppia consultante viene informata sul risultato dell'analisi molecolare dall'équipe medica e viene programmato il trasferimento in funzione anche delle caratteristiche di vitalità embrionale. Il trasferimento degli embrioni crioconservati dopo biopsia viene 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.

Risultati ottenuti con la PGS

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 un 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 viene riportato un aumento delle anomalie alla nascita in relazione all'uso della tecnica di biopsia embrionale, dimostrando l'efficacia e sicurezza del procedimento.

Limiti della PGS

- I cosiddetti "embrioni non informativi": data la natura e la quantità del campione cellulare usato esiste una percentuale variabile di embrioni dai quali non è possibile ricavare nessun risultato informativo che si attesta con la metodica qPCR a circa il 2% dei campioni analizzati. Nel caso di una diagnosi cromosomica può succedere che non si ottengano risultati per uno, vari o addirittura per la totalità dei cromosomi analizzati. In questi casi l'équipe medica raccomanda che gli embrioni siano rianalizzati. Tuttavia, secondo il cromosoma di cui si tratta e della situazione della donna ricevente, si potrebbe arrivare al transfer in determinati casi specifici, con il consenso dei pazienti senza la piena conoscenza del risultato dell'analisi.
- Mosaicismo cromosomico: È altresì possibile che le cellule esaminate non presentino alterazioni ma che altre cellule dell'embrione sottoposto a biopsia contengano delle anomalie genetiche. Questo fenomeno prende il nome di mosaicismo, cioè quando diverse linee cellulari sono presenti nello stesso embrione. Questo fenomeno biologico può limitare l'accuratezza diagnostica e l'efficacia clinica della tecnica. Il fenomeno del mosaicismo è notevolmente meno incidente quando l'analisi è eseguita sul trofoectoderma allo stadio di blastocisti rispetto all'analisi in terza giornata di sviluppo embrionale e allo stadio attuale delle conoscenze, interessa circa il 2/3% degli embrioni analizzati (Fragouli et al., 2008; Northrop et al., 2010; Capalbo et al., 2013).
- Errore diagnostico: come tutte le metodiche analitiche anche l'analisi molecolare mediante qPCR può essere soggetta ad errori diagnostici che possono risultare in falsi positivi e falsi negativi diagnostici nell'assegnazione del numero dei cromosomi. L'accuratezza diagnostica della qPCR è tuttavia riportata essere superiore al 99% (Treff et al., Fertility and Sterility 2012).
- 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).
- Limiti di risoluzione dell'analisi di anomalie del cariotipo embrionale mediante qPCR: l'analisi cromosomica mediante qPCR è finalizzata prettamente a determinare il numero di copie cromosomiche presenti nel cariotipo embrionale per la totalità dei cromosomi che compongono il nostro genoma (22 coppie di autosomi + cromosomi sessuali) essendo queste le anomalie cromosomiche preponderanti negli embrioni umani preimpianto come anche nelle gravidanze con anomalie genetiche. Non sono invece rilevabili le seguenti minori anomalie cromosomiche che comunque avrebbero un dubbio significato interpretativo in considerazione della natura e quantità cellulare su cui è condotta l'analisi preimpianto:

- Riarrangiamenti cromosomici bilanciati e sbilanciati;
- Mutazioni puntiformi ed epigenetiche;
- Duplicazioni/delezioni di porzioni cromosomiche;
- Disomie uniparentali;
- Mosaicismi cromosomici inferiori al 50%;
- Poliploidie;

L'incidenza di queste alterazioni genetiche con significato patologico è stimata essere inferiore all'1% in gravidanze che evolvano sino alla nascita (Faas et al., Journal of Medical Genetics, 2010; Wapner et al., New England Journal of Medicine, 2012) e alcune di queste non sarebbero diagnosticabili con sufficiente accuratezza diagnostica anche con altri metodi d'indagine molecolare sull'embrione data la natura e la quantità di materiale cellulare che si utilizza.

L'incidenza di anomalie non evidenziabili con qPCR è in ogni caso molto inferiore al rischio riproduttivo generale di avere un figlio con anomalie congenite alla nascita che nella nostra specie è circa del 3% e che rimane comunque non diagnosticabile sull'embrione pre impianto come in molti casi anche dopo diagnosi prenatale mediante villocentesi o amniocentesi o studio morfologico ecografico o post natale.

Si suggerisce comunque di discutere degli eventuali approfondimenti e accertamenti da effettuare nel corso della gravidanza con l'ausilio di specialisti nella diagnosi prenatale.

▪ Il tasso di errore della diagnosi preimpianto non è attualmente 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 il guadagno 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.

Siamo consapevoli che:

▪ per l'esecuzione e/o controllo dei test di PGS 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 Procreazione Medicalmente Assistita e non ha alcuna responsabilità circa l'operato del Laboratorio di Diagnosi molecolare che effettua i test genetici effettuati sulle cellule.

▪ l'esecuzione dei test presso terzi prevede un trasporto del materiale da analizzare tramite un vettore specializzato e che tale trasporto non è totalmente privo di rischi.

▪ L'Humanitas Fertility Center non si assume la responsabilità per la perdita di campioni durante il trasporto.

▪ **Il Servizio Sanitario Nazionale (SSN) non si fa carico delle spese della predetta procedura, pertanto i costi per la gestione di questa tecnica sono a completo carico dei pazienti.**

Alternative alla tecnica PGS

- Gestazione naturale o mediante IVF in assenza di PGS seguita, eventualmente, da diagnosi prenatale.
- Adozione legale.

DICHIARIAMO

Di aver letto il presente modulo nella sua totalità, di averne compreso completamente il contenuto, e di aver ricevuto tutte le informazioni in maniera dettagliata, sia sui metodi che sulle percentuali di successo e di errore diagnostico. Dichiariamo di aver avuto un colloquio preliminare con il personale del centro, durante il quale sono state soddisfatte tutte le nostre domande e sono stati chiariti i nostri dubbi.

Di essere stati debitamente informati:

- Sulle indicazioni, la procedura, le probabilità di successo, le limitazioni, i rischi e le complicazioni del programma di diagnosi preimpianto proposto.
- Che le procedure possono essere interrotte in qualunque momento della loro realizzazione, sia per motivi medici che su richiesta dei pazienti, purché ciò non comporti alcun danno agli stessi o agli embrioni vitali prodotti.
- Sul costo economico del trattamento.
- Sulla disponibilità del personale sanitario di questo centro ad approfondire qualunque aspetto delle informazioni che non sia sufficientemente chiaro.
- Che la donna potrà in ogni caso decidere di procedere al trasferimento anche in presenza di un'anomalia cromosomica embrionale dopo consulenza con gli specialisti della Struttura e firma di uno specifico consenso.

Di essere favorevoli allo scongelamento, analisi cromosomica e ricongelamento di embrioni che sono risultati senza risultato o che necessitano di una successiva valutazione.

Rischi particolari legati al caso specifico della paziente/coppia:

CHIEDIAMO

di essere sottoposti ad un ciclo di concepimento assistito denominato: Fecondazione in Vitro e Trasferimento in utero degli Embrioni con tecnica di Screening e/o Diagnosi Preimpianto su cellule del Trofoectoderma.

Firma della paziente

Firma di eventuale interprete

Firma del Partner

Firma di eventuale interprete

Firma dello specialista del Fertility Center

Sottoscritto in data
