

La procreazione tra scienza e tecnica

Il desiderio di un figlio e le risposte della medicina

Novara, 21 marzo 2005, Sede de *La Nuova Regaldi*

Relazione del Dott. Cesare Tacani

INDICE

Riassunto.....	2
1. Definizione di infertilità e sterilità.....	2
2. Epidemiologia della sterilità.....	3
3. Fattori predisponenti la sterilità.....	3
3.1. Età.....	4
3.2. Durata infertilità.....	4
3.3. Aborti.....	5
3.4. Frequenza del coito.....	5
3.5. Stress.....	5
3.6. Stile di vita.....	6
3.7. Abitudini voluttuarie.....	6
3.8. Agenti chimici.....	6
3.9. Farmaci.....	6
3.10. Malattie sessualmente trasmesse.....	6
4. Cause di sterilità.....	7
Femminile meccanica 35%.....	7
Femminile ormonale 15%.....	7
Maschile 35%.....	7
Di coppia 5%.....	7
Idiopatica 10%.....	7
5. Iter della coppia.....	8
5.1. Anamnesi.....	8
5.2. Esame obiettivo.....	8
5.3. Esami ematici.....	8
5.4. Indagini sull'infertilità femminile.....	9
5.5. Indagini sull'infertilità maschile.....	10
6. Tecniche di procreazione medico-assistita (pma).....	11
6.1. 1° livello.....	12
6.1.1. Rapporti sessuali programmati.....	12
6.1.2. Inseminazione intrauterina.....	12
6.1.3. Crioconservazione degli spermatozoi.....	12
6.2. 2° livello (anestesia locale e/o sedazione profonda).....	12
6.2.1. FIVET (Fecondazione in vitro ed embrio-transfer).....	12
6.2.1.1. Induzione dell'ovulazione multipla.....	13

6.2.1.2.	Pick-up ovocitario	13
6.2.1.3.	Inseminazione in vitro.....	13
6.2.1.4.	Coltura dei pre-embrioni.....	13
6.2.1.5.	Transfer embrionario.....	14
6.2.1.6.	Sostegno della fase luteale.....	14
6.2.1.7.	Eventuale crioconservazione degli ovociti soprannumerari.....	14
6.2.1.8.	ICSI (Iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo)	15
6.2.2.	Risultati FIVET/ICSI.....	15
6.2.3.	Rischi FIVET/ICSI.....	16
6.2.4.	Prelievo testicolare dei gameti.....	17
6.2.5.	Trasferimento intratubarico per via transvaginale ecoguidata o isteroscopica	17
6.3.	3° livello (anestesia generale con intubazione)	18
6.3.1.	Prelievo microchirurgico di gameti dal testicolo	18
6.3.2.	Prelievo degli ovociti per via laparoscopica.....	18
6.3.3.	Trasferimento intratubarico per via laparoscopica.....	18
7.	Tecniche vietate con la legge 40.....	18
7.1.	Crioconservazione di embrioni soprannumerari (Art. 14 comma 1).....	18
7.2.	Differenze prima e dopo la legge	19
7.3.	Fecondazione eterologa (Art. 4 comma3).....	21
	Donazione di liquido seminale	21
	Donazione di ovociti.....	22
	Donazione di embrioni.....	23
7.4.	Maternità surrogata (Art. 12 comma 6).....	23
7.5.	Riduzione embrionaria (Art. 14 comma 4).....	24
7.6.	Diagnosi pre-impianto (Art. 13 comma 3b)	24
	Indicazioni	25
	Tecnica	27
7.7.	Utilizzo di cellule staminali embrionali (Art. 13 comma 1).....	28
7.8.	Clonazione terapeutica e riproduttiva (Art. 13 comma 3c).....	29
7.9.	Produzione di ibridi e chimere (Art. 13 comma 3d).....	30
8.	La legislazione per le tecniche di pma in europa	32

RIASSUNTO

Si illustra lo stato dell'arte delle tecniche di procreazione assistita e le limitazioni poste dalla Legge 40 alla pratica medica e alla ricerca.

1. DEFINIZIONE DI INFERTILITÀ E STERILITÀ

Secondo l'organizzazione Mondiale della Sanità (O.M.S.) e l'American Fertility Society (A.F.S.) una coppia è da considerarsi **infertile** quando non è in grado di concepire e di avere un bambino dopo un anno o più di rapporti sessuali; viceversa, è da considerarsi **sterile** quella coppia, nella quale, uno od entrambi i coniugi sono affetti da una condizione fisica permanente che non renda possibile avere dei bambini. Il termine "sterilità" si riferisce, quindi, ad una condizione più grave e comunque assoluta di "infertilità" riguardante la coppia e non il singolo membro di essa. Secondo la definizione italiana l'infertilità è definita invece come l'incapacità della donna a proseguire la gravidanza fino ad un'epoca di vitalità fetale,

per difetti di annidamento o di sviluppo embrionale, mentre la sterilità è definita come l'assenza di concepimento dopo un anno di rapporti volutamente fecondanti e viene distinta in *primitiva* nel caso la coppia non abbia mai concepito e *secondaria* se in passato vi è stato un periodo di accertata fertilità. Nelle linee guida italiane i due termini, infertilità e sterilità, sono usati come sinonimi. Tutte le coppie che non ottengono gravidanza, dopo 12/24 mesi di regolari rapporti sessuali non protetti, costituiscono la popolazione delle coppie infertili.

Questa popolazione è costituita da:

- **coppie sterili nelle quali siano stati accertati fattori di sterilità di almeno uno dei due**
- **coniugi**
- **coppie con sterilità idiopatica, nelle quali non sia stato possibile accertare un definito**
- **fattore responsabile**
- **coppie subfertili, per ragioni biologiche o per ripetuta abortività spontanea**

2. EPIDEMIOLOGIA DELLA STERILITÀ

Le limitazioni all'applicazione dell'epidemiologia a questa condizione sono legate al fatto che non si tratta di analizzare le caratteristiche e la diffusione di un agente eziologico ben preciso; l'infertilità e la sterilità sono, infatti, espressione di fattori maschili e/o femminili diversi, spesso asintomatici da un punto di vista clinico. Esiste, inoltre, il rischio di una sovrastima nei Paesi industrializzati, dove la scelta contraccettiva è più diffusa, mentre, nei Paesi in via di sviluppo, le differenti condizioni socio-culturali non hanno portato ancora ad una completa separazione della sessualità dalla procreazione. Ci si basa, dunque, su stime legate all'analisi dei dati demografici e attraverso l'utilizzo di inchieste che, vista la delicatezza dell'argomento, peccano assolutamente di affidabilità. Dall'insieme dei dati raccolti, si ritiene, comunque, che nei Paesi occidentali il tasso di sterilità tra le coppie in età potenzialmente fertile sia all'incirca del 15%, dato che assume particolare rilevanza se si considera che, nei Paesi in via di sviluppo, tale valore non supera il 3%, sovrapponendosi, con stime retrospettive, a quello dell'Europa nel 1600. Attualmente, almeno 150 milioni di coppie sono afflitte da problemi di infertilità, vale a dire il 2% dell'intera popolazione mondiale. In Italia le coppie sterili sono il 20% e dunque ogni anno si assommano circa 60.000 nuove coppie senza figli (in Piemonte sono circa 5000/anno), il 40% delle quali (25.000/anno) richiede una consulenza specialistica presso i circa 300 Centri per la procreazione assistita censiti dal Ministero della Salute. Si calcola che, attualmente, i bambini nati con tecniche di procreazione medico-assistita siano oltre un milione, dei quali oltre 50.000 in Italia e che ogni anno in Europa nascano "in provetta" circa il 3,5% dei bambini.

3. FATTORI PREDISPONENTI LA STERILITÀ

E' assodato il fatto che la diminuzione delle nascite non sia dovuta esclusivamente a scelte sociali, ma che esista un reale incremento dei casi di sterilità e infertilità.

A questo incremento possono contribuire numerosi fattori predisponenti quali:

3.1. Età

In questi ultimi decenni si è registrata in Italia, come pure negli altri Paesi occidentali, una diminuzione della natalità, più marcata nelle classi d'età tra i 21 e i 29 anni che nelle classi d'età superiori, testimonianza di una progressiva tendenza della donna a concepire più tardivamente a causa del nuovo ruolo sociale che la induce ad anteporre gli studi e la carriera alla maternità. In Italia l'età media della donna per il primo figlio è di 30 anni, negli anni '90 era di 29 anni. E' noto che l'età della donna, più di quella dell'uomo, rappresenta un fattore che si correla negativamente con la capacità riproduttiva: il picco massimo della fertilità femminile si verifica tra i 20 e i 24 anni, un primo declino avviene verso i 30 e un vertiginoso picco in basso superati i 40 anni. Una ragazza di 20 anni, con rapporti sessuali regolari, ha circa il 30 % di probabilità per ciclo di avere una gravidanza, il 25% quando arriva a 30 anni, il 20% 5 anni dopo e il 10% a 40 anni. Questo significa che, se una coppia giovane, dopo un anno non è riuscita a concepire, può, con serenità, attendere ancora qualche mese, dato che l'orologio dell'età gioca ancora a suo favore. La prospettiva è diversa per una paziente dopo i 35 anni: le si "concede" un periodo di tentativi di concepimento non superiore ai 12 mesi, ma una volta superato tale termine, non deve perdere tempo e consultare tempestivamente uno specialista. Una significativa esperienza legata all'età della paziente, prima dell'entrata in vigore della legge 40, è stata quella dei centri Cecos, nei quali è stato possibile trattare 2193 donne con inseminazione artificiale eterologa essendo i coniugi di queste pazienti affetti da azoospermia. In queste donne l'impiego di liquidi seminali, considerati normali in base alle caratteristiche standard di riferimento, permise di rilevare una diversa fecondabilità, cioè una diversa possibilità di successo dell'inseminazione, a seconda dell'età delle pazienti: mentre nelle donne con età < 25 anni la probabilità di successo era dell'11 % per tentativo, in quelle tra i 36 e i 40 anni questa probabilità non superava il 6,5% (Tab.1)

Tab. 1: relazione età fecondabilità in 2193 donne trattate con inseminazione eterologa

Età	<25	26-30	31-35	36-40
Fecondabilità (%)	11,0	10,5	9,1	6,5

L'effetto negativo dell'età sulla riproduzione ed in particolare sul sistema riproduttivo femminile sembra legato ad una sempre maggiore possibilità di fallimento dei fini sistemi di regolazione dell'unità ipotalamo-ipofisi-ovaio, ad una riduzione progressiva della sensibilità ovarica allo stimolo ipofisario (riserva ovarica), all'invecchiamento degli ovociti che subiscono ripetuti processi di riparazione del DNA nucleare, alla maggior incidenza di polipi e fibromi uterini, flogosi pelviche, ecc. che sfavoriscono l'impianto o il proseguimento della gravidanza.

3.2. Durata infertilità

Rappresenta il criterio che seleziona la prognosi riproduttiva della coppia a prescindere dalla diagnosi di sterilità. Coppie con una condizione di sterilità di lunga durata hanno una prognosi riproduttiva sfavorevole. Si deve stabilire, pertanto, da quanto tempo la coppia ha incominciato ad avere rapporti sessuali miranti ad

ottenere una gravidanza. Nelle coppie fertili, il rapporto tra il tempo richiesto per il concepimento e la percentuale media di gravidanza è il seguente (Tab. 2):

Tab. 2: Rapporto tempo ricerca gravidanza/ %media coppie fertili che ottengono il concepimento

Tempo per il concepimento	% media coppie gravide
3 mesi	57% coppie
6 mesi	72% coppie
1 anno	85% coppie

Quando si superano i 40 mesi la percentuale di gravidanze attese subisce una riduzione del 2% ogni mese successivo.

3.3. Aborti

Si intende la perdita spontanea di una gravidanza prima della 24^a settimana di gestazione. Ha un'incidenza del 15-20% (30% considerando anche i microaborti dimostrati solamente da un test di gravidanza positivo) e nel 95% dei casi avviene nel primo trimestre. Tale rischio aumenta con l'età, per cui risulta essere pari al 10% circa per donne di età inferiore ai 30 anni, al 18% per i soggetti con età compresa fra i 30 e i 39 anni, al 34% per le donne intorno ai 40 anni. Donne di età superiore ai 35 anni hanno una più elevata probabilità di avere difficoltà riproduttive in relazione ad aneuploidie determinate da non-disgiunzioni cromosomiche. L'aborto viene definito "ricorrente" quando si verificano tre o più interruzioni di gravidanza consecutive. Ha un'incidenza dell'1% ed è provocato da cause genetiche (60%), anatomiche, immunologiche, endocrine, infettive, metaboliche ed ambientali. Si è osservato che, quanto più numerosi sono gli aborti spontanei, tanto più è probabile che una donna possa averne altri, per cui dopo il 3° aborto nelle nullipare si ha il 40-45% di ulteriore recidiva. Un'attenta valutazione diagnostica e una terapia mirata, seguita da continui tentativi di concepimento, è solitamente ricompensata dalla gravidanza nel 70-75% dei casi.

3.4. Frequenza del coito

Dato, non secondario, ai fini della diagnosi di infertilità, è rappresentato dalla frequenza dei rapporti sessuali, in particolare in corrispondenza dell'ovulazione. Si è visto che almeno tre rapporti la settimana, meglio se a giorni alterni, durante il periodo periovulatorio, presentano un'eccellente efficacia per il concepimento, un solo rapporto riduce le possibilità del 50%.

3.5. Stress

Lo stress sia fisico che psichico ha un importante ruolo nell'infertilità. Le endorfine aumentano sensibilmente durante l'evento stressante e questo incremento è probabilmente responsabile dell'innalzamento dei livelli di prolattina e della riduzione dei livelli di LH. Nella donna lo stress può provocare anovulazione, ipogonadismo e amenorrea, mentre nell'uomo il quadro clinico è molto meno evidente, anche se, dal punto di vista endocrino, si osservano riduzione dei livelli di testosterone e gonadotropine con conseguenze sulla qualità del liquido seminale. Non trascurabile il ruolo che lo stress

può giocare nella sessualità della coppia contribuendo a patologie quali riduzione della libido, vaginismo (contrazione involontaria della muscolatura della vagina che non consente la penetrazione del pene), impotenza (deficit di erezione del pene), eiaculazione precoce, ecc. che rappresentano il 5% delle cause di sterilità. Inoltre, la sterilità prolungata e gli eventuali fallimenti dopo trattamenti di procreazione assistita, determinano sovente sentimenti quali rabbia, colpa, isolamento e frustrazione che, se non adeguatamente supportati a livello psicologico, possono, a volte, sfociare in crisi di coppia irreversibili.

3.6. Stile di vita

Esercizio fisico, dieta, variazioni del peso corporeo sono spesso associati ad irregolarità mestruali nella donna e variazioni dei parametri seminali nell'uomo. In particolare nella donna variazioni del BMI (indice di massa corporea derivato dividendo il peso in kg per il quadrato dell'altezza in metri) al di sotto di 16 e sopra i 30 possono determinare alterazioni importanti del quadro ormonale e della funzionalità ovarica .

3.7. Abitudini voluttuarie

Fumo (oltre 15 sigarette al giorno), abuso di alcool e caffè determinano nella donna un aumento significativo del rischio di sterilità, aborti spontanei, malformazioni congenite, ritardo di crescita fetale e lesioni placentari di tipo aterosclerotico, mentre nell'uomo provocano una riduzione degli spermatozoi mobili e di forma normale. In particolare negli alcolisti maschi è stato descritto un tasso di sterilità di circa l'80% per riduzione dei livelli di testosterone, iperestrogenismo e atrofia dei tubuli seminiferi

3.8. Agenti chimici

Metalli pesanti quali piombo e mercurio, le citotossine, gli idrocarburi policiclici, l'ossido nitroso, ecc. presenti nell'ambiente e nelle industrie, i pesticidi, gli additivi, le sostanze simil-ormonali quali i fitoestrogeni presenti nei cibi e nell'acqua, ecc. determinano un impatto negativo sul processo riproduttivo ancora oggetto di studio.

3.9. Farmaci

Agiscono negativamente sulla sterilità antistaminici (riduzione lubrificazione vaginale), antiipertensivi (interferenza con il meccanismo erettivo), barbiturici (inibizione rilascio gonadotropine), FANS (blocco rilascio ovulo), chemioterapici (danno gonadico). Inoltre, specie nelle prime fasi di gestazione, moltissime molecole risultano dannose per l'embrione o per il feto, provocando effetti teratogeni (malformazioni) o abortivi. La contraccezione ormonale non sembra avere effetti negativi sulla capacità riproduttiva della donna, diverso è il problema per quel che concerne l'uso dei dispositivi intrauterini: il rischio, nell'utilizzo di questi sistemi, è quello di infezioni sia a livello cervicale che endometriale ed in particolare di contrarre flogosi pelviche con frequenti ripercussioni sulla funzionalità tubarica.

3.10. Malattie sessualmente trasmesse

Le flogosi dell'apparato genitale costituiscono un grave problema per la riproduzione.

Per quel che concerne il sesso femminile le flogosi cervico-vaginali alterano le condizioni microambientali locali ed hanno talvolta un effetto spermiotossico diretto; inoltre, per via ascendente, possono essere

responsabili di endometriti (infiammazioni dell'utero) e di salpingiti con possibile occlusione tubarica. E' noto che negli ultimi decenni la maggiore liberalizzazione dei costumi ed una diversa visione della sessualità ha favorito un incremento delle malattie sessualmente trasmesse ed accanto alle malattie veneree comunemente conosciute quali la Sifilide e la Gonorrea, sono emersi nuovi agenti patogeni, anche più insidiosi, fra i quali, per rilevanza clinica, va ricordata la Chlamydia.

4. CAUSE DI STERILITÀ

Come detto, circa il 15% delle coppie in età potenzialmente fertile è portatrice di severe disfunzioni riproduttive alcune di origine genetica, altre risultato di influenze esterne.

La valutazione percentuale delle cause di sterilità di coppia è molto difficile e i dati ricavati dalla letteratura non sono facilmente confrontabili. Mediamente le cause di sterilità sono così distribuite:

Femminile meccanica 35%

Per occlusione o malfunzionamento delle salpingi; malformazioni, fibromi, polipi, processi infiammatori della cavità uterina; stenosi, conizzazioni, crio- o diatermo-coagulazioni del collo uterino con alterazioni biochimiche del muco cervicale

Femminile ormonale 15%

Per mancata ovulazione o difetti della fase luteale con deficitaria produzione post-ovulatoria di progesterone essenziale per l'impianto dell'embrione

Maschile 35%

- Secretoria: patologia primitiva o secondaria dei testicoli con alterazione degli spermatozoi oppure patologia delle ghiandole accessorie e dei dotti di deflusso spermatico con alterazione del plasma seminale
- Escretoria: patologia delle vie escrettrici di origine congenita o acquisita con normali caratteristiche degli spermatozoi e del plasma seminale

Di coppia 5%

Per incompatibilità biochimica muco-sperma o immunologica tra gli antigeni presenti nel muco cervicale e/o sulla membrana ovocitaria e gli anticorpi presenti sugli spermatozoi del partner

Idiopatica 10%

Mancato concepimento in assenza di anomalie di entrambi i partner. E' pertanto una diagnosi per esclusione e rappresenta probabilmente il risultato di gradi minori di sterilità di coppia combinati tra loro in grado di determinare una condizione di subfertilità. Alcune volte il ritardato concepimento può essere semplicemente dovuto al caso.

5. ITER DELLA COPPIA

Per le coppie nelle quali la paziente ha un'età **superiore ai 35 anni** e che ricercano figli da **più di 1 anno** il consiglio è quello di richiedere una consulenza specialistica per cercare di scoprire e superare il problema in tempi brevi. La valutazione e il trattamento della sterilità richiede una preparazione superspecialistica da parte di ginecologi, dell'andrologi e ove necessario, da parte di biologi, laboratoristi e ed eventualmente psicologi, oltre che una disponibilità di tempo e di energie da parte della coppia e dell'equipe stessa (week-end e festività incluse). Uno dei doveri più importanti per il medico che si occupa di sterilità non è necessariamente quello di vantarsi di aver ottenuto una gravidanza ma di aver abbreviato il periodo necessario per ottenerla. L'iter della coppia che si presenta per la prima volta presso un Centro di Sterilità prevede quindi la raccolta accurata dell'anamnesi, seguita da un accurato esame obiettivo e da una serie di esami di laboratorio e strumentali che alla fine consentano allo specialista di trarre una precisa diagnosi e di attuare le tecniche più adeguata al fine di ottenere la gravidanza.

5.1. Anamnesi

E' fondamentale per raccogliere dati sulle abitudini di vita, precedenti patologie, interventi chirurgici, abitudini sessuali, trattamenti per la sterilità ed altre informazioni che possono rilevarsi importantissime per il futuro approccio diagnostico e terapeutico. E' buona norma che, al primo incontro, la coppia porti con sé tutti gli esami o le copie degli interventi eseguiti in precedenza, raggruppandoli, se possibile, in ordine cronologico e separandoli tra uomo e donna.

5.2. Esame obiettivo

Si procede alla visita che non deve limitarsi all'esame dell'apparato riproduttivo ma deve riguardare tutti gli organi ed apparati per escludere eventuali cause extragenitali di sterilità.

L'esame ginecologico è di fondamentale importanza perché fornisce indicazioni sulla presenza di malformazioni, infiammazioni, endometriosi ed altre condizioni potenziali cause di sterilità. E' necessaria una visita andrologica per i pazienti con anamnesi positiva per patologie dell'apparato genitale o qualora risulti uno spermioγραμμα patologico.

5.3. Esami ematici

Oltre agli esami ematochimici di routine e agli esami sierologici per escludere epatite B e C, HIV e sifilide, rosolia, toxoplasmosi, citomegalovirus, ecc. occorre richiedere l'elettroforesi dell'emoglobina per riconoscere i portatori sani di Beta talassemia. L'esame del cariotipo deve essere eseguito in tutti i maschi infertili con un numero di spermatozoi nel seminale inferiore a 10 milioni/ml e ciò in considerazione che le anomalie cromosomiche sono dieci volte più frequenti nei maschi infertili (5,3%) rispetto alla popolazione normale (0,6%). Lo studio delle microdelezioni del cromosoma Y è consigliato a tutti i soggetti con un numero di spermatozoi inferiore a 5 milioni/ml; l'analisi della letteratura mostra un'incidenza di circa il 10% di microdelezioni nei soggetti azoospermici (assenza di spermatozoi) e del 5-7% nei soggetti oligozoospermici (meno di 20 milioni/ml) mentre non si ritrovano generalmente microdelezioni nei soggetti

con seminale normale. Lo screening per la fibrosi cistica è richiesto in caso di azoospermia per agenesia dei dotti deferenti con eventuale consulenza genetica.

5.4. Indagini sull'infertilità femminile

Occorre escludere patologie che possano interferire sull'ovulazione o imperfezioni anatomico-funzionali che impediscano l'incontro dei gameti o l'incapacità dell'utero ad accogliere il prodotto del concepimento.

- **Tampone batteriologico vaginale:** consiste nel prelievo del secreto vaginale esaminandolo subito su un vetrino al microscopio, oppure seminandolo in laboratorio in appositi "terreni" di coltura e osservando, dopo qualche giorno, l'eventuale crescita di germi, miceti o protozoi responsabili dell'infezione.
- **Valutazione ovulazione:** l'approccio più semplice consiste nell'applicazione del metodo della temperatura basale, fondato sull'osservazione di caratteristiche variazioni della temperatura corporea in dipendenza delle diverse fasi del ciclo. Tale metodo è però tutt'altro che affidabile, in quanto impreciso e soggetto facilmente ad errori di misurazione. Con maggiore precisione, è possibile valutare il normale andamento della follicologenesi attraverso *dosaggi ormonali* volti a stabilire i livelli di FSH, LH, estrogeni e progesterone, unitamente ad altri ormoni, quali prolattina, ormoni tiroidei ed androgeni, che a vario titolo possono influire sul meccanismo dell'ovulazione.
- **Ecografia transvaginale:** esame semplice ed innocuo, consente una buona definizione delle strutture studiate evidenziando eventuali malformazioni uterine, fibromiomi, cisti ovariche ed endometriosiche, dilatazioni tubariche, ecc. E' fondamentale nel monitorare la crescita follicolare nei programmi di PMA e nel prelievo ecoguidato degli ovociti in caso della fecondazione in vitro con trasferimento di embrioni in utero.
- **Isterosonosalpingografia:** ecografia transvaginale associata ad iniezione intrauterina di soluzione fisiologica che consente la visualizzazione della cavità uterina e di eventuali miomi sottomucosi o polipi endometriali ed indirettamente la pervietà tubarica. Esame indolore è meno sensibile rispetto agli esami successivi.
- **Isterosalpingografia:** esame di riferimento per l'infertilità femminile, consiste nell'iniettare in utero mediante una sonda con palloncino un mezzo di contrasto idrosolubile. Vengono scattate lastre radiografiche durante le fasi essenziali di riempimento della cavità uterina, delle tube e del deflusso in peritoneo evidenziando eventuali malformazioni dell'utero e difetti di riempimento delle tube. Il limite di questo esame è che fornisce un'immagine indiretta dell'anatomia di utero e tube senza alcuna informazione sulla loro funzionalità, sull'aspetto della parete tubarica e sull'eventuale presenza di aderenze.
- **Isteroscopia:** si esegue nei casi in cui i precedenti esami abbiano evidenziato alterazioni della cavità uterina oppure durante la laparoscopia. L'esame, che richiede ricovero giornaliero, viene eseguito in anestesia locale o generale. Introducendo una piccola sonda a fibre ottiche attraverso il collo dell'utero è possibile visualizzare la cavità uterina e gli orifizi delle due tube e asportare eventuali polipi endometriali, miomi sottomucosi, aderenze e anomalie congenite intrauterine che possono ostacolare l'impianto embrionario.

- *Laparoscopia*: tecnica eseguita in anestesia generale, richiede ricovero ospedaliero di 1-3 giorni e rappresenta la procedura diagnostica finale di ogni indagine di sterilità. E' indicata quando l'isterosalpingografia abbia evidenziato alterazioni oppure in caso di infertilità inspiegata quando dopo almeno 6 mesi di tentativi (rapporti sessuali mirati o inseminazioni intrauterine) non sia sopraggiunta una gravidanza o per donne meno giovani che non possono aspettare altro tempo. Introducendo una sonda a fibre ottiche attraverso la parete addominale all'altezza dell'ombelico e distendendo l'addome mediante CO₂ si visualizzano gli organi addominali, l'utero, le ovaie e le tube consentendo di eseguire interventi quali lisi di aderenze, asportazione di cisti o miomi, vaporizzazione o folgorazione di nidi endometriosisi. Inoltre mediante la *salpingocromoscopia* è possibile osservare l'aspetto delle pareti e la mobilità delle tube nonché la reale pervietà tubarica mediante iniezione in cavità uterina di un colorante (blu di metilene) che di norma fuoriesce dalle tube in peritoneo. In caso di occlusione è possibile eseguire ricanalizzazione delle tube (difficile) o asportazione delle stesse qualora il danno irreparabile comporti il rischio di gravidanze extrauterine.

5.5. Indagini sull'infertilità maschile

Può avere origine da disfunzioni correlate alla produzione, emissione o funzionalità degli spermatozoi.

- *Dosaggi ormonali*: livelli alterati di FSH, LH, testosterone, estradiolo e ormoni tiroidei possono influire sulla funzionalità testicolare e sulla spermatogenesi
- *Spermiogramma*: è lo studio dettagliato della concentrazione, motilità e morfologia degli spermatozoi e rappresenta lo strumento diagnostico fondamentale, attraverso il quale è possibile stabilire se l'incapacità di procreare è legata a qualche anomalia del liquido seminale e valutare l'eventuale trattamento terapeutico. Il campione va raccolto in un contenitore sterile mediante masturbazione dopo un'astinenza di 2-5 giorni. I diversi parametri del liquido seminale (concentrazione, motilità e morfologia) fluttuano nel tempo, nello stesso individuo, in funzione di diversi fattori, quindi, in caso di spermiogramma patologico, occorre la ripetizione dell'esame dopo un paio di mesi. L'OMS considera normale un eiaculato con concentrazione ≥ 20 milioni di spermatozoi/ml, $\geq 40\%$ di forme mobili, di cui $\geq 25\%$ di spermatozoi con motilità progressiva rapida e $\geq 30\%$ di forme normali. I termini *oligospermia*, *astenospermia* e *teratospermia* si riferiscono alle anomalie di numero, motilità e forma degli spermatozoi.
- *Spermiocoltura e tampone uretrale*: consente di identificare infezioni da batteri, miceti e virus che possono modificare la fertilità alterando direttamente o per aumentata viscosità del plasma seminale la capacità fecondante degli spermatozoi. Occorre ricordare che anche processi infiammatori non infettivi conseguenti ad irritanti chimici quali fumo, alcool, marijuana, ecc. possono alterare gli spermatozoi mediante produzione di radicali liberi che danneggiano la loro membrana.
- *Capacitazione del liquido seminale*: consiste nel "lavaggio" e centrifugazione degli spermatozoi attraverso terreni di coltura che inducono le stesse modificazioni biochimiche e strutturali prodotte nelle vie genitali femminili. Al termine della capacitazione del liquido seminale si ha l'eliminazione degli spermatozoi morti o poco mobili e di tutte le impurità presenti nell'eiaculato nonché il miglioramento

della motilità degli spermatozoi meno mobili. Il test di selezione degli spermatozoi mobili permette di preparare gli spermatozoi per una inseminazione intrauterina o per una fecondazione in vitro (FIVET/ICSI).

- *Test di penetrazione degli spermatozoi nel muco cervicale*: il muco cervicale abbondante fluido e filamentoso (simile all'albume dell'uovo) durante l'ovulazione può essere facilmente penetrato dagli spermatozoi che sfuggono così all'ambiente acido della vagina. Alterazioni del muco, evidenziate mediante il *post-coital test* o il *test di penetrazione in vitro*, determinano il cosiddetto fattore cervicale di infertilità.
- *Anticorpi anti-spermatozoi*: l'immunizzazione contro gli spermatozoi può essere provocata da anticorpi presenti nel liquido follicolare o nel muco cervicale della donna (isoimmunizzazione) oppure nel testicolo o nella prostata del paziente (autoimmunizzazione) determinando l'aggregazione spermatica che altera la loro funzionalità. Il MAR test o l'immunobead test evidenziano l'eventuale presenza di anticorpi anti-spermatozoi.
- *Ecografia prostatica e dei testicoli*: è utilizzata dall'andrologo per evidenziare eventuali anomalie anatomico-funzionali a carico dell'apparato genitale maschile. Mediante ecocolordoppler è possibile diagnosticare la presenza di varicocele ovvero la dilatazione del plesso pampiniforme della vena spermatica che surriscaldando il testicolo determina severa riduzione di numero e motilità degli spermatozoi, a volte reversibile con intervento chirurgico.

6. TECNICHE DI PROCREAZIONE MEDICO-ASSISTITA (PMA)

Una volta formulata la diagnosi di sterilità ovvero l'impossibilità di rimuovere altrimenti le cause impedenti la gravidanza, occorre utilizzare la tecnica di PMA più opportuna, tenendo conto dell'età della paziente, di eventuali tecniche già utilizzate, del grado di attesa della coppia, con un criterio di gradualità che permetta di utilizzare le metodiche più complesse, con maggiori probabilità di successo, solo dopo eventuale fallimento di quelle più semplici. Occorre ricordare che fisiologicamente, nel corso di un ciclo ovulatorio spontaneo, solamente il follicolo dominante giunge a maturazione e l'ovocita contenuto in esso può essere fecondato, mentre gli altri 15-20 follicoli che avevano cominciato la fase di crescita vanno incontro all'atresia (degenerazione senza maturazione). Scopo dell'induzione farmacologica dell'ovulazione nelle tecniche di PMA è quello di indurre una crescita follicolare multipla portando a maturazione più follicoli mediante l'utilizzo per via orale del clomifene citrato (Clomid® o Serofene®) che ha un effetto anti-estrogenico oppure per via intramuscolare o sottocutanea delle gonadotropine estratte dall'urina di donne in menopausa (Fostimon® o Menogon®) o quelle, più recenti, ricavate per ingegneria genetica (Gonal-F® o Puregon®) che mimano l'effetto dell'FSH o dell'LH, stimolando l'ovaio a far crescere anche i follicoli destinati all'atresia. Le metodiche di PMA vengono distinte dalle linee guida attuali in *tre livelli* in relazione alla complessità e invasività delle tecniche.

6.1. 1° livello

6.1.1. Rapporti sessuali programmati

Rappresenta il primo approccio in coppie relativamente giovani, che ricercano un figlio da più di 18 mesi, con diagnosi di sterilità idiopatica, per le quali potrebbe essere sufficiente monitorare per qualche mese il preciso momento dell'ovulazione, spontanea o indotta farmacologicamente, mediante ecografie transvaginali indicanti il numero e il diametro dei follicoli in fase di maturazione, associate ad eventuali dosaggi ormonali su sangue o urine, suggerendo quindi alla coppia di avere rapporti sessuali nel momento più idoneo (36-40 ore dopo il picco di LH o la somministrazione di HCG o dopo la rottura del follicolo maturo). Le percentuali di successo oscillano tra il 2-3% e il 10-15% per mese a seconda delle cause, della durata della sterilità, dell'età della paziente, dei valori del liquido seminale e del tipo di stimolazione effettuata.

6.1.2. Inseminazione intrauterina

E' indicata per coppie che abbiano già cercato la gravidanza con rapporti sessuali programmati e in caso di sterilità da fattore cervicale o da fattore maschile lieve. Necessita la presenza di almeno una tuba aperta. L'inseminazione intrauterina comporta una moderata stimolazione farmacologica della crescita follicolare multipla. Sono richiesti controlli ecografici e dosaggi ormonali per seguire l'andamento della follicologenesi durante il trattamento. In coincidenza dell'ovulazione, al partner maschile viene richiesta la produzione di un campione di liquido seminale, i cui spermatozoi capacitati, vengono trasferiti in cavità uterina tramite un sottilissimo catetere in plastica. L'eventuale fecondazione dell'ovocita da parte degli spermatozoi avviene quindi "naturalmente" a livello tubarico. Le percentuali di successo oscillano tra il 2-4% e il 15-18% per mese, di poco inferiore alla percentuale fisiologica di gravidanza in coppie giovani senza problemi.

6.1.3. Crioconservazione degli spermatozoi

Tecnica relativamente semplice consiste nella raccolta del liquido seminale, nella sua capacitazione e nella sua crioconservazione in azoto liquido a -196°C , mediante un procedimento e delle attrezzature particolari. Tale tecnica è utilizzata per pazienti che devono sottoporsi a chemioterapia, per pazienti sottoposti a prelievo degli spermatozoi mediante biopsia o aspirazione testicolare o per pazienti che per motivi psicologici avrebbero delle difficoltà alla raccolta del seme il giorno dell'inseminazione o della fecondazione in vitro. La percentuale degli spermatozoi decongelati vitali è di circa il 50% e consente di eseguire tecniche di PMA con risultati simili a quelli ottenuti con spermatozoi appena eiaculati. Vari studi dimostrano che la crioconservazione non danneggia geneticamente gli spermatozoi, dato confermato dal fatto che negli ultimi 50 anni sono nati migliaia di bambini perfettamente sani.

6.2. 2° livello (anestesia locale e/o sedazione profonda)

6.2.1. FIVET (Fecondazione in vitro ed embryo-transfer)

Tecnica di fecondazione assistita più usata nel mondo, rappresenta la metodica d'elezione per occlusione tubarica bilaterale non risolvibile con tecnica microchirurgica, endometriosi grave, patologia

seminale di lieve o media entità, presenza di anticorpi antispermatozoi e fallimento di metodiche più semplici. Consiste nel ricreare “in vitro” la situazione che avviene normalmente nelle tube, ovvero la fecondazione e l’inizio della segmentazione embrionale, mettendo gli ovociti e gli spermatozoi trattati in una provetta o in una piastra contenente terreno di coltura. La fecondazione dei gameti avviene “naturalmente” poiché gli spermatozoi circondano l’ovocita e uno di essi penetra spontaneamente al suo interno fondendo il proprio patrimonio cromosomico con quello femminile.

La FIVET comprende 7 fasi fondamentali:

6.2.1.1. Induzione dell’ovulazione multipla

Presuppone il blocco del rilascio ipofisario di FSH ed LH mediante iniezioni di GnRH analogo o antagonista per evitare l’ovulazione spontanea ovvero la rottura dei follicoli prima del prelievo ovocitario. La stimolazione ovarica, mediante iniezioni sottocutanee di FSH ricombinante, ha lo scopo di indurre la crescita di più ovociti e consentire quindi lo sviluppo degli embrioni, aumentando le possibilità complessive di ottenere una gravidanza. La risposta ovulatoria viene monitorizzata ogni 2-3 giorni mediante ecografie transvaginali indicanti il numero e il diametro dei follicoli in fase di maturazione, associate a dosaggi ormonali di estradiolo per valutare la buona qualità dei follicoli in fase di crescita ed evitare il rischio di iperstimolazione. Nel momento in cui un numero sufficiente di follicoli raggiunge uno stadio adeguato di crescita, viene indotta la fase finale di maturazione follicolare tramite la somministrazione della gonadotropina corionica umana (HCG), la cui azione simula quella svolta dall’LH nei cicli naturali.

6.2.1.2. Pick-up ovocitario

Dopo circa 36-37 ore dalla somministrazione di HCG, gli ovociti vengono prelevati dai follicoli. Ciò viene effettuato tramite una semplice tecnica chirurgica, nella quale gli ovociti vengono aspirati tramite un ago fatto penetrare attraverso la parete vaginale, sotto controllo ecografico. Il prelievo viene eseguito in anestesia endovenosa, ha una durata variabile tra i 5 e i 20 minuti e nel 95% dei casi consente il recupero di almeno un ovocita. In genere la paziente viene dimessa dopo circa due ore dall’intervento.

6.2.1.3. Inseminazione in vitro

Poco dopo il prelievo degli ovociti, al partner maschile viene chiesto di produrre tramite masturbazione un campione seminale che, dopo adeguata preparazione, viene utilizzato per inseminare gli ovociti. La fecondazione in vitro viene effettuata ponendo a contatto gli spermatozoi con **tre ovociti** (Legge 40/2004 art.14 comma 2) per un periodo di circa 16-20 ore ricreando la situazione che avviene fisiologicamente nelle tube. Viene poi accertato l’esito della fecondazione determinato dalla presenza dei due pronuclei, di origine materna e paterna, non ancora fusi tra loro, per cui a questo stadio l’ovocita prende il nome di **ootide**.

In genere il 60-70% degli ovociti si feconda. Si noti, comunque, che il risultato complessivo di questa fase può variare notevolmente da caso a caso, senza una spiegazione possibile.

6.2.1.4. Coltura dei pre-embrioni

Gli ootidi o pre-zigoti vengono quindi rimessi in coltura per altre 24-48 ore, periodo nel quale avviene dapprima la fusione dei pronuclei (anfimissi o singamia) con lo sviluppo di un patrimonio genetico diploide

(zigoti) e successivamente la prima divisione mitotica dalla quale originano i pre-embrioni a 2 cellule che proseguono la segmentazione fino a 6-8 cellule. E' importante notare che i pre-embrioni con la più elevata capacità di impianto, hanno caratteristiche morfologiche e ritmo di divisione cellulare particolari.

6.2.1.5. Transfer embrionario

A 48-72 ore dal prelievo degli ovociti, i pre-embrioni fecondati (massimo tre) vengono trasferiti nella cavità uterina della paziente. Si noti che ciascun pre-embrione può impiantarsi indipendentemente dagli altri. Così, trasferendo più di un pre-embrione è possibile aumentare le probabilità complessive di ottenere una gravidanza in un determinato ciclo di trattamento, benché aumenti, parallelamente, anche il rischio di una gravidanza bi- o trigemellare. Per la maggioranza delle pazienti il trasferimento risulta veloce e indolore (senza anestesia), comportando semplicemente l'inserimento in cavità uterina di un sottile catetere contenente i pre-embrioni. In genere la paziente è dimessa dopo circa due ore dall'intervento. Successivamente, è consentito uno stile di vita del tutto normale evitando sport e sforzi eccessivi.

6.2.1.6. Sostegno della fase luteale

Da questo momento in poi tutto è affidato alle cure di madre natura. Si noti che il processo di impianto degli embrioni nell'ambiente uterino è una partita a due. Infatti, il buon esito del trattamento non dipende esclusivamente dalla qualità degli embrioni, ma anche dalla capacità dell'utero di accoglierli. Ai fini di migliorare la qualità dell'endometrio e quindi di aumentare i tassi di impianto embrionario, occorre un supporto ormonale di progesterone locale o intramuscolare dal giorno del prelievo ovocitario fino all'eventuale test di gravidanza e in caso di positività, è consigliabile proseguire fino al terzo mese di gestazione. Trascorse circa due settimane dal trasferimento, l'esito del trattamento viene in un primo momento evidenziato tramite il dosaggio della β -HCG, un ormone prodotto dall'embrione che si è impiantato e successivamente, mediante un'ecografia transvaginale per visualizzare la camera gestazionale e la vitalità dell'embrione.

6.2.1.7. Eventuale crioconservazione degli ovociti soprannumerari

Gli ovociti soprannumerari ai tre utilizzati per l'inseminazione in vitro possono essere immediatamente crioconservati in azoto liquido a -196°C , mediante sofisticate tecniche che ne bloccano lo stadio maturativo. Il vantaggio teorico è che, con una sola stimolazione ormonale e un solo prelievo ovocitario, è possibile eseguire nella stessa paziente un transfer nel ciclo di stimolazione e i successivi a distanza di mesi o di anni, come avviene per gli embrioni congelati, ma senza implicazioni etiche. Tuttavia, il congelamento degli ovociti rimane una tecnica ancora sperimentale, che incontra molte difficoltà a causa della struttura dei gameti femminili. Infatti, gli ovociti essendo cellule molto grandi e piene d'acqua, tendono a rovinarsi facilmente durante la procedura di congelamento-scongelo per cui la percentuale di sopravvivenza è di circa il 50% e la fertilizzazione del 60% e dunque bisogna congelarne moltissimi per sperare di ottenere una gravidanza (si parla di 3 bambini nati ogni 100 ovociti maturi congelati!). Gli ovociti che sopravvivono al scongelamento vengono fecondati (massimo 3 per ciclo) mediante ICSI e gli embrioni ottenuti sono trasferiti in utero, 2-3 giorni dopo l'ovulazione spontanea oppure nel corso di un ciclo artificiale di preparazione dell'endometrio, "pilotato" tramite farmaci. Gli studi attuali non dimostrano un aumento

statisticamente significativo del tasso di anomalie genetiche nei nati da embrioni ottenuti dopo crioconservazione ovocitaria, tuttavia, è raccomandata l'esecuzione di villocentesi o amniocentesi durante le prime fasi di gravidanza. E' consentito crioconservare gli embrioni sviluppati dai 3 ovociti inseminati dopo il pick-up solamente quando non è possibile il loro immediato trasferimento per gravi e non prevedibili problemi di salute della paziente come l'iperstimolazione ovarica (Legge 40/2004 art.14 comma 3).

6.2.1.8. ICSI (Iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo)

L'ICSI è una tecnica messa a punto nella prima metà degli anni novanta per fornire una soluzione alla maggioranza dei problemi di infertilità maschile. Essa comporta l'iniezione di un singolo spermatozoo all'interno dell'ovocita. E' applicata nei casi in cui le caratteristiche del seme non sono compatibili con la normale tecnica di fecondazione in vitro o a seguito di un precedente trattamento FIVET risoltosi in una mancata fertilizzazione. Le 7 fasi sono simili a quelle della FIVET tradizionale eccetto quella della inseminazione degli ovociti. Infatti, grazie ad un sofisticato sistema di micromanipolazione lo spermatozoo selezionato viene iniettato all'interno di un ovocita maturo mediante un microago sottilissimo. La percentuale di fertilizzazione degli ovociti iniettati è di circa l'80%, mentre il rischio di danneggiare irrimediabilmente gli ovociti è del 5% circa.

6.2.2. Risultati FIVET/ICSI

Premesso che la percentuale di fertilizzazione ovocitaria è di circa il 70% con la FIVET e dell'80% con la ICSI e che nel 10% dei casi è possibile che si interrompa in ogni momento la divisione cellulare degli embrioni, il dato più importante è rappresentato comunque dal *pregnancy rate* ossia la percentuale di gravidanze cliniche che portano alla nascita di un bambino. Per ogni ciclo FIVET o ICSI, ossia nel caso dei trattamenti di fecondazione in vitro più frequentemente applicati, è lecito attendersi una percentuale di successo intorno al 25%, a condizione che il numero di embrioni trasferiti sia pari o superiore a due. Tale valore sembrerebbe a prima vista modesto, se non si tenesse in considerazione, che nei concepimenti spontanei, ad ogni ciclo ovulatorio, la probabilità di ottenere una gravidanza non supera il 20%. Bisogna anche ricordare che i trattamenti possono essere ripetuti, con la possibilità di raggiungere un tasso cumulativo di gravidanza, ossia derivante dalla somma dei risultati di singoli trattamenti, di circa il 70% entro 4 tentativi, per cui si può considerare l'eventuale insuccesso di queste tecniche solamente dopo tale numero di transfer. Occorre, tuttavia, considerare che i pazienti, per loro natura, non costituiscono una classe omogenea. E' facile così immaginare che le probabilità di successo che una coppia può attendersi da un trattamento di fecondazione in vitro possono in specifici casi discostarsi notevolmente in senso positivo o negativo dal valore medio, in dipendenza di una serie numerosa di fattori. L'età della donna è un fattore fondamentale nel determinare la qualità degli ovociti e in ultima analisi l'esito del trattamento. Conseguentemente, mentre la percentuale di gravidanze nelle pazienti al di sotto di 20-25 anni può raggiungere il 30-35%, al contrario nelle donne al di sopra dei 40 anni questo valore non supera il 10-15%. Infine, è cruciale sottolineare che la percentuale di gravidanze dipende in notevole misura dal numero di embrioni utilizzati ad ogni trasferimento, tenendo conto che, potenzialmente, ciascun embrione di buona qualità ha circa il 15% di probabilità di portare alla nascita di un bambino. Per esempio, negli Stati Uniti, dove si tende a trasferire un numero elevato di embrioni (talvolta anche 4-6), a parità di altre condizioni si

registrano percentuali di gravidanze generalmente superiori a quelle dei centri europei ma ciò viene ottenuto a costo di un'incidenza inaccettabile di gravidanze multiple.

6.2.3. Rischi FIVET/ICSI

- *Iperstimolazione ovarica*: rappresenta la principale complicanza della fase di stimolazione ovarica. Le cause alle origini della sua insorgenza non sono ancora del tutto conosciute. Può presentarsi in forme più o meno gravi. La forma lieve interessa una proporzione significativa di pazienti (8%) e comporta distensione addominale, nausea, e ingrossamento delle ovaie. In genere questa forma non richiede ospedalizzazione e si risolve spontaneamente. La forma più grave interessa un'esigua minoranza delle pazienti (circa 0,6%) e si presenta con dolori addominali, ascite, concentrazione di elettroliti nel sangue e ipercoagulabilità ematica. Poiché le potenziali complicazioni di questa forma possono essere serie, è necessario il ricovero ospedaliero e un attento monitoraggio di vari parametri.
- *Prelievo ovocitario*: può causare complicanze operatorie in circa lo 0,1% dei casi e l'insorgenza di infezioni utero-annessiali nell'1-2% dei casi.
- *Aborti spontanei*: l'incidenza maggiore sembra correlata all'età materna e all'eventuale fecondazione di ovociti con una maturazione non ottimale che forniscono di conseguenza embrioni di qualità non eccelsa, tuttavia il tasso di anomalie cromosomiche non è stato dimostrato essere superiore a quello degli embrioni spontanei.
- *Gravidanze extrauterine*: si possono verificare nel 2-3% dei casi, con una frequenza simile a quella delle gravidanze naturali ma il rischio materno è più basso poiché le gravidanze ectopiche sono individuate precocemente, prima dell'insorgenza di eventuali complicazioni.
- *Gravidanze multiple*: uno dei dilemmi più assillanti della fecondazione in vitro riguarda la ricerca di un delicato equilibrio tra la tendenza a fecondare 2 o 3 pre-embrioni allo scopo di garantire percentuali di gravidanze sufficientemente elevate e la opposta necessità di minimizzare i rischi di gravidanze multiple. Ogni sforzo va esercitato per evitare specialmente le gravidanze trigemellari, poiché queste, con una frequenza significativa, si risolvono in parti molto prematuri, comportando una serie di gravi conseguenze per il neonato e di complicazioni ostetriche per la madre. Purtroppo, allo stato attuale, non è possibile stabilire con assoluta certezza la capacità di sviluppo di ogni singolo pre-embrione. Di conseguenza, in tutti quei casi in cui viene adottata la scelta di trasferire più di un pre-embrione, il rischio di gravidanze multiple rimane inevitabile e si attesta intorno al 15-20% di gravidanze gemellari e 2-4% di trigemine.
- *Malformazioni*: i bambini nati in tutto il mondo in seguito a trattamenti di PMA sono attualmente oltre 1 milione (in Italia circa 50.000). Gli studi compiuti sull'incidenza di malformazioni congenite (2-4%), la crescita e lo sviluppo neurologico di questi bambini non hanno evidenziato differenze rispetto a quelli concepiti spontaneamente. In ogni caso giova ricordare che l'incidenza delle malformazioni congenite risente significativamente dell'età della madre e che le donne che ricorrono alla fecondazione in vitro sono mediamente meno giovani di quelle che riescono a concepire spontaneamente. Sembra che queste conclusioni possano essere tratte anche per i bambini nati in seguito ad ICSI, trattamento che, allo stato attuale, si può definire ancora sperimentale. Tuttavia, utilizzando la ICSI non si può escludere che

anomalie numeriche dei cromosomi sessuali (es. microdelezioni del cromosoma Y) e determinate disfunzioni riproduttive paterne di tipo congenito possano essere trasmesse al nascituro. Ancora una volta, più che il trattamento terapeutico, possono essere certe caratteristiche delle coppie a costituire un potenziale rischio. In caso di gravidanza ottenuta con queste tecniche è quindi consigliabile eseguire amniocentesi o villocentesi.

- *Neoplasie*: occorre precisare che le gonadotropine utilizzate attualmente per la stimolazione ovarica sono, nella maggior parte dei casi, ottenute con tecniche di DNA ricombinante, prive quindi delle impurità presenti in quelle ottenute dalle urine di donne in menopausa. La maggior parte degli studi più recenti, condotti allo scopo di verificare eventuali associazioni tra uso di gonadotropine e tumori dell'apparato genitale femminile, tendono ad escludere un'associazione significativa. Uno studio caso-controllo effettuato in Italia nel periodo 1992-1999 (quindi con maggioranza di farmaci di estrazione urinaria) ha dimostrato che non esiste un'incidenza significativamente maggiore di tumori ovarici in donne che hanno fatto uso di gonadotropine.

6.2.4. Prelievo testicolare dei gameti

In caso di azoospermia ostruttiva per occlusione congenita o post-infiammatoria dei vasi deferenti o fallimenti di ricanalizzazione dopo sterilizzazione volontaria, gli spermatozoi possono essere recuperati direttamente dai testicoli tramite le seguenti tecniche, in anestesia locale:

- *PESA*: Aspirazione Percutanea di Spermatozoi dall'Epididimo
- *TESA*: Aspirazione Percutanea di Spermatozoi per via Testicolare
- *MESA*: Aspirazione Microchirurgica di Spermatozoi dall'Epididimo
- *TESE*: Estrazione di Spermatozoi per via Testicolare (biopsia testicolare)

Gli spermatozoi recuperati dall'epididimo o dal testicolo, anche se in numero esiguo, possono essere microiniettati mediante ICSI negli ovociti e in parte crioconservati per successivi tentativi.

6.2.5. Trasferimento intratubarico per via transvaginale ecoguidata o isteroscopica

Tecniche oggi meno utilizzate, dopo l'avvento di FIVET ed ICSI, in quanto più invasive e con risultati simili alle suddette.

In queste tecniche la stimolazione ovarica e il prelievo ovocitario sono identici a quelli della fecondazione in vitro tradizionale, successivamente si procede per via transvaginale ecoguidata o per via isteroscopica a diverse tecniche:

- *GIFT (Gamete Intrafallopian Transfer)*: ovociti e spermatozoi capacitati sono trasferiti nelle tube con il vantaggio che la fertilizzazione avviene fisiologicamente nell'ambiente ideale. E' necessario che le tube siano sane e perfettamente funzionanti per evitare il rischio di una gravidanza extrauterina
- *ZIFT (Zigote Intrafallopian Transfer)*: gli ovociti vengono fecondati come nella FIVET o nella ICSI e gli zigoti ottenuti sono trasferiti nelle tube

- **TET** (*Tubal embryo transfer*): simile alla ZIFT ma con trasferimento nelle tube di embrioni a più cellule

6.3. 3° livello (anestesia generale con intubazione)

6.3.1. Prelievo microchirurgico di gameti dal testicolo

Le stesse tecniche di II livello, raramente oggi, possono essere eseguite in anestesia generale, intubando il paziente:

- **MESA**: Aspirazione Microchirurgica di Spermatozoi dall'Epididimo
- **TESE**: Estrazione di Spermatozoi per via Testicolare (biopsia testicolare)

6.3.2. Prelievo degli ovociti per via laparoscopica

Tecnica utilizzata con successo nel 1978, con la nascita della prima bambina ottenuta con la fecondazione in vitro, ma ormai desueta per la sua complessità ed invasività rispetto al prelievo ovocitario per via transvaginale ecoguidato. Consiste nel prelievo degli ovociti mediante aspirazione, per via laparoscopica, dei follicoli ottenuti dopo stimolazione dell'ovulazione multipla.

6.3.3. Trasferimento intratubarico per via laparoscopica

GIFT, **ZIFT** e **TET** con trasferimento di gameti, zigoti o embrioni per via laparoscopica con ulteriori svantaggi rispetto alle analoghe tecniche di II livello in termini di invasività.

7. TECNICHE VIETATE CON LA LEGGE 40

7.1. Crioconservazione di embrioni soprannumerari (Art. 14 comma 1)

Prima dell'entrata in vigore della legge 40/2004 era possibile fecondare **tutti** gli ovociti recuperati (adesso solo tre) e crioconservare gli embrioni soprannumerari a quelli trasferiti consentendo di aumentare considerevolmente la "resa" per ciclo. Infatti, con una sola stimolazione ormonale e un solo prelievo ovocitario era possibile eseguire nella stessa paziente un transfer nel ciclo di stimolazione e i successivi a distanza di mesi o di anni. Se nell'ambito di un ciclo di FIVET o ICSI si recuperavano 10-12 ovociti, tutti quelli considerati idonei venivano immediatamente fecondati, ottenendo più embrioni di quanti potessero essere trasferiti in quel ciclo (per esempio 8-10 embrioni laddove se ne trasferivano al massimo 3-4). Gli embrioni rimanenti potevano essere congelati per essere trasferiti in cicli successivi. Il timing del congelamento può avvenire 18-20 ore dopo la fecondazione allo stadio in cui i due pronuclei, maschile e femminile, sono ancora separati (**ootidi**) oppure al 2°-3° giorno allo stadio di 4-8 cellule o infine, al 5-6° giorno allo stadio di blastocisti (centinaia di cellule). Gli embrioni soprannumerari vengono posti in paillettes sigillate e sottoposti ad un processo di crioconservazione a -196°C in azoto liquido dove possono rimanere inalterati per anni. Il successivo scongelamento e transfer può avvenire 2-3 giorni dopo un ciclo ovulatorio spontaneo oppure nel corso di un ciclo artificiale di preparazione dell'endometrio, "pilotato" tramite farmaci. Occorre ricordare che, per lo "stress" da crioconservazione, la percentuale di

sopravvivenza degli embrioni risulta del 70% circa e non è possibile garantire a priori la successiva divisione cellulare. Gli studi attuali non hanno dimostrato un aumento statisticamente significativo del tasso di anomalie genetiche nei nati ottenuti dopo crioconservazione degli embrioni. Ricordiamo che tale metodica è consentita dalla legge 40 solamente in caso di impedimento al loro immediato trasferimento per grave e documentata causa di forza maggiore, relativa allo stato di salute della paziente, non prevedibile al momento della fecondazione (per esempio iperstimolazione ovarica). Una delle proposte del disegno di legge Amato sarebbe di consentire la crioconservazione degli ootidi che forniscono risultati analoghi a quelli degli embrioni crioconservati ma che, essendo ovociti pronucleati, non hanno ancora eseguito la “fusione dei gameti”, ovvero, conservano patrimoni genetici separati.

7.2. Differenze prima e dopo la legge

La letteratura scientifica al riguardo è ancora scarsissima. Il primo studio multicentrico italiano ha posto a confronto i risultati di 961 cicli di fecondazione in vitro eseguiti nel periodo 10.03.2003-10.07.2003 (periodo pre-legge) vs i 900 cicli nel periodo 10.03.2004-10.07.2004 (periodo post-legge) (Tab. 3).

Tab. 3: Centri partecipanti e numero di cicli pre- e post-legge

Centro	N. Cicli prelievo ovocitario		Totale (%)
	Pre-Legge	Post-Legge	
Bari	83	93	176 (9.5)
Bologna	179	156	335 (18.0)
Genova	61	60	121 (6.5)
Milano	241	242	483 (26.0)
Palermo I	113	110	223 (12.0)
Palermo II	44	49	93 (5.0)
Totale	961	900	1861 (100.0)

L'outcome primario era la percentuale di gravidanze cliniche (visualizzate ecograficamente) per ciclo di prelievo ovocitario e per ciclo di trasferimento embrionale. Si è assistito, nel periodo post-legge, ad una significativa riduzione dell'utilizzo di farmaci per l'induzione dell'ovulazione, del numero di ovociti recuperati, del numero di ovociti utilizzati, del numero di embrioni ottenuti e del numero di embrioni trasferiti. La percentuale di gravidanze cliniche, per ciclo di prelievo ovocitario, nei periodi pre- e post-legge è stata del 27.0% e del 24.2%, rispettivamente ($p=0.18$) mentre per ciclo di trasferimento embrionale negli stessi periodi è stata del 30.5% e del 27.2%, rispettivamente ($p=0.14$) (Figura 1).

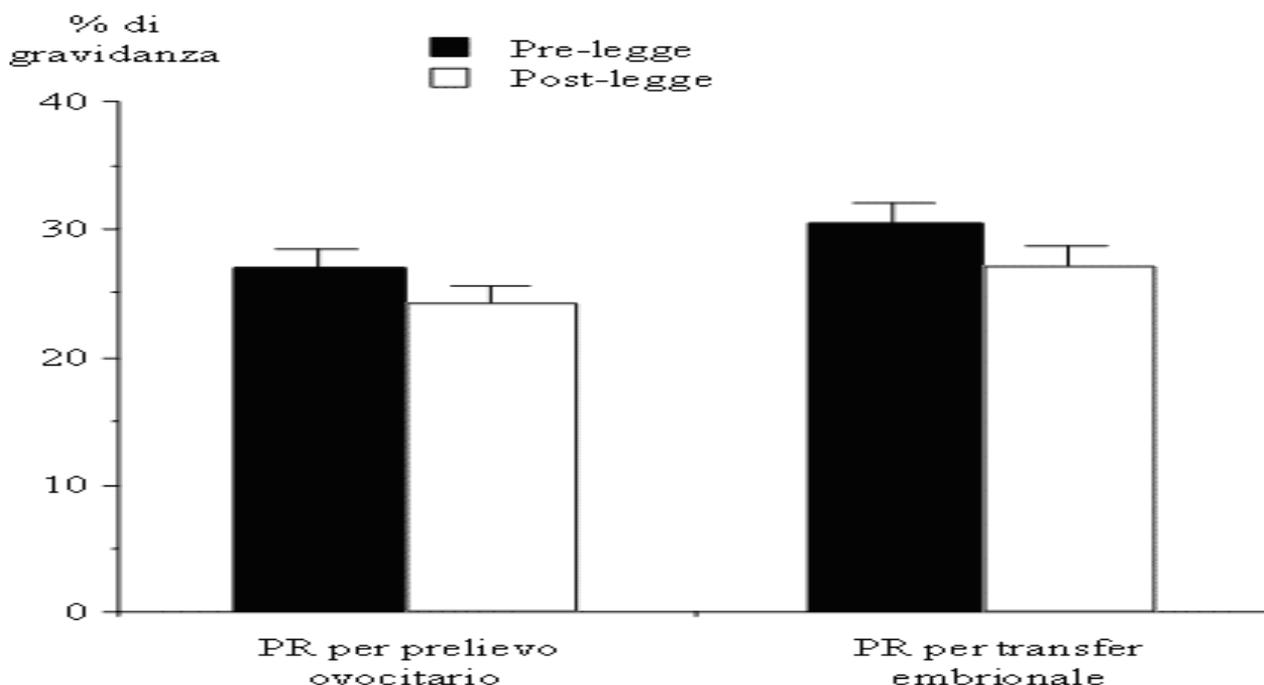


Figura 1: Percentuale di gravidanza (PR) per ciclo di prelievo ovocitario e per ciclo di trasferimento embrionale. Le gravidanze ottenute utilizzando embrioni e/o ovociti congelati non sono state incluse. La differenza non è risultata statisticamente significativa ($p=0.18$ e $p=0.14$). Le percentuali nel periodo antecedente e successivo all'introduzione della legge 40/2004 sono rappresentati in nero ed in bianco, rispettivamente.

Questa riduzione è risultata simile in tutte le classi d'età. In nessuno dei 7 Centri coinvolti è stata osservata una riduzione della probabilità di successo statisticamente significativa.

I risultati preliminari di questo studio vanno però interpretati con attenzione: se da un lato l'ipotesi di limitare a tre il numero di ovociti fertilizzabili non sembra ridurre in modo drammatico la probabilità di successo delle tecniche di fecondazione in vitro a fresco, occorre sottolineare che la dimensione del campione consente di evidenziare, come statisticamente significative, solo differenze superiori al 6%. Differenze inferiori a questo limite, seppur apparentemente di scarsa rilevanza, possono avere invece un impatto importante a livello di Salute Pubblica. Comunque, lo studio ha documentato una riduzione della probabilità di gravidanza del 3,3%: se confermato, tale dato equivale, in realtà, ad una riduzione del numero di gravidanze di circa il 10% (ridurre la percentuale di successo dal 30% al 27% significa ottenere 9 gravidanze anziché 10). In altre parole, se ipotizziamo che nascano in Italia 3000 bambini all'anno con tecniche di fecondazione in vitro, l'introduzione di questa normativa porterà alla nascita di 2700 bimbi (300 in meno per anno). In secondo luogo, nello studio sono state confermate le evidenze scientifiche che evidenziano come l'impiego di ovociti congelati abbia una resa significativamente minore in termini di probabilità di gravidanza rispetto al congelamento degli embrioni. Nei due periodi di studio considerati, sono stati eseguiti in totale 205 congelamenti di embrioni e 126 congelamenti di ovociti. Gli embrioni congelati sono stati successivamente utilizzati in 114 pazienti e sono state ottenute 39 gravidanze. Gli ovociti congelati sono stati utilizzati in 32 donne e sono state ottenute 5 gravidanze. Le percentuali di gravidanze per utilizzo di materiale congelato è risultata significativamente più elevata utilizzando embrioni congelati (34.2% versus 15.6%, $p=0.05$).

Un secondo studio, pubblicato il 20 febbraio 2005 su “Il Sole 24 ore”, pone a confronto i dati di altri sei centri italiani di fecondazione assistita nel periodo pre-legge (2003) e in quello post-legge (Marzo-Dicembre 2004). Si evidenzia che dopo la legge la percentuale di gravidanze è calata in media dal 35,6% al 21,5% e i cicli sono passati da 2418 a 1746 (Tab. 4).

Tab. 4: Centri partecipanti e risultati (Tecnobios di Bologna, Centro Demetra di Firenze ed European Hospital Di Roma)

	Centro di Biologia della Riproduzione di Palermo		Centro Simer di Bologna		Centro Universitario Mdr di Torino		Centri Cecos*		Totale Centri	
	Prelegge	Postlegge	Prelegge	Postlegge	Prelegge	Postlegge	Prelegge	Postlegge	Prelegge	Postlegge
Età media	35.8	36.1	36.4	36.9	34.7	34.5	36	35	35.7	35.6
N. cicli in cui si è giunti al prelievo di ovociti	428	289	534	358	256	274	1200	825	2418	1746
N. totale di gravidanze	143	54	173	66	91	79	453	177	860	376
% di gravidanze per prelievo di ovociti	33.4	18.6	32.4	18.4	35.5	28.8	37.7	21.5	35.6	21.5

Inoltre, lo studio ha evidenziato come l’obbligo di fecondare solo tre ovociti ha ridotto le possibilità di ottenere embrioni di buona qualità, costringendo a trasferire anche quelli con basso potenziale d’impianto o alto potenziale abortivo. Gli aborti, infatti, sono passati dal 17,2% al 23,1% e i parti gemellari dal 14,2% al 18,6%. Per quanto riguarda le gravidanze cliniche ottenute da ovociti decongelati, il Gruppo di ricerca dell’Istituto Superiore di Sanità, ha evidenziato al momento poco più del 9% di successi. I dati esposti in un recente incontro scientifico ad Abano Terme, abbassano questo numero al 5,94%. Sono ora necessari ulteriori ampi studi per determinare precisamente la percentuale di questa riduzione, al fine di meglio chiarire l’impatto a livello di Salute Pubblica della Legge 40/2004. Intanto, come prevedibile, le coppie che si rivolgono ai Centri di PMA italiani sono diminuite del 25% circa, raddoppiando i cicli dei Centri della vicina Svizzera e Slovenia o di Centri più lontani quali Barcellona, Bruxelles e Londra.

7.3. Fecondazione eterologa (Art. 4 comma3)

Consiste nella donazione di liquido seminale, ovociti o embrioni e rappresenta meno del 10% delle tecniche di PMA.

Donazione di liquido seminale

può essere utilizzato per eseguire un’inseminazione intrauterina eterologa o una fecondazione in vitro eterologa, con tecniche identiche a quelle omologhe ma utilizzando spermatozoi di donatori selezionati, crioconservati in apposite banche del seme. I vantaggi, rispetto al seme fresco, sono di poter disporre rapidamente di campioni appartenenti a donatori con differenti caratteristiche somatiche, differenti gruppi sanguigni e controllati non solo per malattie genetiche ma anche, a distanza di tempo, per malattie a trasmissione sessuale. Gli spermatozoi donati devono essere conservati per sei mesi, dopodiché i donatori

vengono testati per infezioni quali HIV, epatite B e C, sfilide, ecc. Soltanto se questi test risultano negativi, gli spermatozoi diventano disponibili per l'inseminazione.

Indicazioni assolute:

- - Sterilità assoluta ed irreversibile dell'uomo (azoospermia)
- - Anomalie cromosomiche e patologie ereditarie
- - Pregressa esposizione a fattori potenzialmente mutageni
- - Grave isosensibilizzazione della donna (incompatibilità ABO o Rh)
- - Infezioni a trasmissione sessuale incurabili (HIV)

Indicazioni relative:

- Ripetuti fallimenti FIVET/ICSI con sperma del marito
- Tutti i tipi di infertilità resistenti alle altre terapie

Con questa metodiche l'ovulo della partner viene fecondato mediante inseminazione intrauterina o ICSI con lo sperma di un donatore estraneo alla coppia, con risultati simili a quelli delle tecniche omologhe. Il bambino è geneticamente figlio del donatore, però legittimamente appartiene al partner della donna. Il rapporto tra il donatore e la banca del seme cessa automaticamente dopo un certo numero di donazioni o dopo la nascita di massimo 5 bambini. Anche se ancora oggi l'inseminazione da donatore rappresenta una tecnica facilmente accessibile in Europa (tranne Italia e Germania) e Stati Uniti, metodi quali la ICSI, associata al prelievo testicolare degli spermatozoi, consentono di superare anche le più gravi patologie maschili, rendendo necessaria tale metodica solamente nell'1% dei casi.

Donazione di ovociti

L'ovodonazione è la tecnica di scelta per avere la possibilità di avere una gravidanza quando si pongono:

Indicazioni assolute:

- asportazione chirurgica di ambedue le ovaie
- chemioterapia o radioterapia della pelvi femminile
- terapia di malattie tumorali
- menopausa precoce, in cui si assiste al prematuro esaurimento della funzione ovarica (in inglese POF = Premature Ovarian Failure)
- malattie genetiche con rischio di trasmissione al nascituro

Indicazioni relative:

- sviluppo ripetuto di embrioni patologici in corso di FIVET - ICSI
- ripetuto fallimento di fertilizzazioni in corso di FIVET - ICSI
- ripetuti test di gravidanza negativi dopo transfer di embrioni di buona qualità

La menopausa precoce (POF) consiste nell'esaurimento della funzione ovarica al di sotto dei 40 anni e colpisce circa l'1% delle donne. Essa può essere la conseguenza di una carente quota follicolare iniziale, di una degenerazione precoce dei follicoli, di una resistenza alle sostanze stimolanti (gonadotropine) o di patologie insite nell'ovocita o delle cellule che lo circondano. Nella maggioranza dei casi la POF è idiopatica o determinata geneticamente. Il presupposto indispensabile per poter ricorrere all'ovodonazione è una integrità anatomica dell'utero.

La procedura di ovodonazione prevede che:

1. Gli ovuli donati vengono fecondati con gli spermatozoi congelati del coniuge o convivente della ricevente. In caso di avvenuta fecondazione, gli embrioni ottenuti vengono crioconservati per sei mesi.
2. Alla ricevente viene comunicata, per iscritto, la data del prelievo ovocitario, il numero degli ovuli fecondati e numero degli embrioni congelati.
3. Se gli esami delle malattie infettive, effettuati sulla donatrice dopo sei mesi di quarantena, dimostrano che al momento della donazione non c'erano infezioni in atto, alla ricevente, dopo un'adeguata preparazione ormonale, vengono trasferiti massimo 3 embrioni congelati.

Le chance di gravidanza con l'ovodonazione sono relativamente alte (25-30% circa) in pazienti con meno di 45 anni, purché ci sia un'integrità uterina e vengano fertilizzati 4-8 ovuli possibilmente di buona qualità (donatrice di età inferiore ai 30 anni). Le probabilità nelle pazienti oltre i 45 anni sono minime anche con l'ovodonazione e associate a minacce per la salute del nascituro e della madre stessa. La donazione ovocitaria è vietata in Austria, Germania, Italia e Svizzera mentre è consentita in Francia, Spagna, Inghilterra, Stati Uniti e paesi dell'est.

Donazione di embrioni

Può essere richiesta in caso di sterilità assoluta della coppia o nel caso, più raro, in cui il coniuge o convivente che ha conservato la fertilità rinunci all'utilizzo dei propri gameti per non creare una condizione di disequilibrio all'interno della coppia. E' possibile richiedere una doppia donazione di gameti, con tutte le regole separatamente descritte e con tassi di successo simili a quelli delle ovodonazioni (25-30%), oppure, più frequentemente, la donazione di embrioni non utilizzati da un'altra coppia, con tassi di successo estremamente variabili (7-30%) in base all'età della donatrice, al numero e alla qualità degli embrioni, ecc. La donazione ovocitaria è vietata in Austria, Germania, Italia e Svizzera mentre è consentita in Francia, Spagna, Inghilterra, Stati Uniti e paesi dell'est.

7.4. Maternità surrogata (Art. 12 comma 6)

Definita anche "utero in affitto" tale metodica ha ricevuto enormi critiche relative all'immoralità dell'atto in sé, ai rischi psicologici dei vari soggetti, all'assenza quasi completa di informazioni sui risultati, tanto da essere vietata in tutta Europa (eccetto l'Inghilterra). Teoricamente trova indicazione per coppie in cui la donna ha un patrimonio follicolare normale ma è priva dell'utero per difetti congeniti o asportazione chirurgica oppure per malattie gravi che controindicano una gravidanza. La tecnica consiste nella

fecondazione in vitro dei gameti della coppia e nel trasferimento degli embrioni nella madre surrogata trattata con ormoni specifici per preparare l'utero a riceverli.

7.5. Riduzione embrionaria (Art. 14 comma 4)

L'incidenza di gravidanze multiple nel 63% dei casi avviene in seguito a concepimenti spontanei e la sua probabilità si può calcolare con la formula di Hellin nel modo seguente:

gravidanza gemellare	1:80 gravidanze singole
gravidanze trigemine	1:80 ² (6400)
gravidanze quadrigemine	1:80 ³ (512.000)
gravidanze quinquigemine	1:80 ⁴ (50.960.000)

Con l'avvento dei farmaci induttori dell'ovulazione (Clomifene citrato e gonadotropine) e successivamente con l'avvento delle tecniche di procreazione assistita la tipologia delle gravidanze multiple è completamente cambiata. Si è visto, però, che nella maggior parte dei casi (29%) è l'induzione dell'ovulazione per rapporti mirati o l'inseminazione la maggior responsabile delle gravidanze multiple, mentre solo l'8% del totale deriva da tecniche di fecondazione in vitro in quanto i follicoli periovulatori vengono tutti aspirati e il numero di embrioni trasferiti (massimo tre) porta al 15-20% di gravidanze gemellari e al 2-4% di trigemine. In caso di gravidanza gemellare o trigemina il rischio di parto pretermine (28-36 settimane) è rispettivamente del 51% e del 73% con conseguente nascita di bambini di peso inferiore a 2500 e ai 1800 grammi associata a maggior incidenza di malformazioni congenite, di morbidità fetale e di mortalità neonatale (19% di tutte le morti dopo la nascita). Alla luce di questi dati, in caso di gravidanze multiple (trigemine o superiori), la paziente poteva ricorrere all'embrion-riduzione. Tale tecnica consiste nell'interruzione di una o più gravidanze mediante iniezione intracardiaca o intratoracica fetale di soluzione ipertonica di cloruro di potassio oppure tramite fetto-distruzione o suzione sotto guida ecografia. Tale intervento, eseguito tra la 9-12^o settimana di amenorrea, viene ripetuto fino a ridurre la gravidanza plurigemellare ad una bigemina o per problematiche materne o malformazioni fetali ad una gravidanza singola. Occorre ricordare che il 10-20% delle embrion-riduzioni finisce con l'interruzione di tutte le gravidanze. Questa tecnica, oggi vietata con la legge 40/2004, era ultimamente meno utilizzata grazie alla migliore conoscenza dei farmaci per l'induzione dell'ovulazione e alla prudenza nel numero di embrioni trasferiti.

7.6. Diagnosi pre-impianto (Art. 13 comma 3b)

Circa il 3% dei neonati è affetto da malattie o anomalie congenite. In molti casi possono essere previste, diagnosticate, trattate o prevenute attraverso la conoscenza e l'identificazione dei fattori di rischio che ne sono alla base e l'adozione di opportune tecniche di indagine. La **diagnosi prenatale** comprende l'insieme di procedure che permettono, durante la gravidanza, di riconoscere o escludere la presenza nel feto di anomalie congenite. Tali procedure possono essere sostanzialmente divise in:

1) **tecniche dirette** (amniocentesi, villocentesi e funicolocentesi) che prevedono il campionamento di cellule fetali, dalle quali potrà essere estratto il DNA per effettuare l'analisi di mutazione di specifici geni e/o la determinazione del cariotipo fetale ma hanno lo svantaggio di essere invasive e di portare ad un rischio d'aborto variabile dallo 0,5 al 1%

2) **tecniche indirette** (tritest e bitest) che attraverso la valutazione nel sangue materno di determinate sostanze di origine fetale o placentare o mediante l'ecografia (translucenza nucale), consentono di individuare i casi a rischio più elevato, da indirizzare alla diagnosi prenatale diretta. Il vantaggio di tali tecniche è la mancanza di invasività sul feto, il limite è dato dal fatto di non dare una diagnosi diretta, ma solo una indicazione di rischio che, in ultima analisi, non risolve l'attesa diagnostica della gravida.

Tabella 5: Incidenza alla nascita delle principali anomalie cromosomiche

Anomalie cromosomiche	Incidenza alla nascita /1000
Trisomia 13 (S. di Patau): 47, +13	0,07
Trisomia 18 (S. di Edwards): 47, +18	0,12
Trisomia 21 (S. di Down): 47, +21	1,5
Altre anomalie autosomiche	0,4
S. di Klinefelter : 47,XXY o mosaici	2,0
S. di Turner, 45,X o mosaici	0,4
S. del triplo X, 47,XXX	0,65
S. del doppio Y: 47,XYY	1,5
TUTTE LE ANOMALIE CROMOSOMICHE	6,6

Si consiglia alle coppie ad elevato rischio di trasmissione di malattie genetiche di ricorrere alle tecniche di diagnosi diretta, in modo da permettere l'identificazione di anomalie genetiche entro le prime 10-16 settimane di gestazione. Nel caso il feto risulti affetto dalla specifica malattia e non si desideri arrivare al parto, l'inevitabile conseguenza, devastante dal punto di vista psicologico, etico, morale e religioso, rimane l'interruzione terapeutica della gravidanza, entro la 24^a settimana, ai sensi della legge 194/1978. E' noto come molte coppie siano state costrette a ripetute interruzioni di gravidanza prima di generare un bambino sano. Lo sviluppo delle conoscenze sul genoma umano con l'identificazione dei geni coinvolti nell'insorgenza di malattie ereditarie, l'avanzamento della tecnologia diagnostica strumentale, unitamente all'applicazione clinica delle tecniche di fecondazione in vitro, hanno consentito di proporre la **Diagnosi Genetica Preimpianto (PGD)** come scelta alternativa alla diagnosi prenatale, evitando il doloroso ricorso all'interruzione di gravidanza. Questa tecnica consente di identificare, nelle coppie ad elevato rischio riproduttivo, la presenza di malattie genetiche nell'embrione generato in vitro, prima dell'impianto in utero.

Indicazioni

- pazienti di età superiore a 38 anni, in cui il rischio di aneuploidie (cioè di una
- alterazione numerica dei cromosomi) è notevolmente aumentato e in cui la possibilità di ogni singolo embrione di impiantarsi è ridotta
- coppie con rischio di trasmissione di alcune malattie genetiche
- pazienti che hanno eseguito più di 3 cicli di concepimento assistito senza aver mai ottenuto una gravidanza
- pazienti con aborti ripetuti

Dal primo caso di PGD per la fibrosi cistica, eseguito nel 1992, le strategie diagnostiche si sono evolute notevolmente ed oggi esistono protocolli diagnostici per oltre 50 malattie monogeniche, autosomiche dominanti, recessive o legate al cromosoma X.

Le patologie genetiche in cui la PGD oggi trova una valida applicazione comprendono quelle indicate in Tabella 6.

Tab. 6: Esempio di malattie genetiche trasmissibili alla prole che possono essere analizzate mediante diagnosi genetica dopo biopsia degli ovociti ed embrioni

Acondroplasia	Malattia del core centrale
Agammaglobulinemia	Malattia di Gaucer
Anemia falciforme	Malattia di Huntington
Anemia di Fanconi	Malattia di Alport
Atrofia muscolare spinale / bulbare	Malattia di Tay-Sachs
Deficienza di antitripsina a1	MELAS
Deficienza della catena lunga dell'enzima idrossiacil CoA DH	Miopatia miotubolare legata al cromosoma X
Deficienza dell'enzima ornitina-transcarbamilasi	Neurofibromatosi I e II
Deficienza della proteina trifunzionale mitocondriale	Neoplasia endocrina multipla tipo II
Displasia efisiale multipla	Osteogenesi imperfetta I e IV
Distrofia miotonica	Poliposi coli adenomatoso familiare (FAP)
Distrofia muscolare di Becker	Retinite pigmentosa
Distrofia muscolare di Duchenne	Rhesus (Rh D)
Emofilia A e B	Sclerosi tuberosa
Epidermolisi bullosa	Sindrome di Cruzon
Huntington	Sindrome di Di George
FAP-Gardner	Sindrome di Hunter MPS II
Fenilchetonuria	Sindrome di Lesch-Nyhan
Fibrosi cistica	Sindrome di Marfan
Idrocefalo legato al cromosoma X	Sindrome oro-facciale-digitale tipo 1
Incontinentia pigmenti	Sindrome di Stickler
Ipoglicemia iperinsulinemica PHH1	Sindrome dell' X fragile
Insorgenza precoce malattia di Alzheimer	Sindrome di Wiskott-Aldrich
Malattia di Charcot-Marie-Tooth 1° e 2A e CMTX	Talassemia beta

Tecnica

I pazienti che richiedono la PGD, vengono sottoposti alle procedure di fecondazione in vitro per permettere la manipolazione dell'embrione 3 giorni dopo la fecondazione, prima del relativo impianto in utero. È importante ottenere un adeguato numero di embrioni al fine di aumentare le probabilità di identificarne almeno uno o due che risultino all'analisi genetica privi della specifica malattia ricercata. Una o due cellule (blastomeri) vengono rimossi da ciascun embrione allo stadio di 6-8 cellule. Se la tecnica è eseguita correttamente non vi sono rischi per l'embrione, come comprovato da diversi studi eseguiti sugli animali e sull'uomo. La cellula rimossa viene poi inserita all'interno di una provetta alla quale viene aggiunta una soluzione che consente la liberazione del DNA dal nucleo cellulare. La messa a punto di sofisticate tecniche di citogenetica permette oggi di eseguire una indagine cromosomica su una unica cellula in tempi brevissimi (5-6 ore), quando normalmente sono richiesti 10-15 giorni ed un numero elevatissimo di cellule in divisione (amniocentesi, villocentesi). Le tecniche principali di lettura della cellula sono due: la FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) e la PCR (Polymerase Chain Reaction).

La FISH serve per mettere in evidenza i cromosomi, colorandoli in maniera diversa e osservandoli attraverso un microscopio a fluorescenza. La PCR (che, per inciso, ha fruttato il premio Nobel al suo inventore) serve a mettere in evidenza pezzi molto piccoli dei cromosomi (sequenze di geni, singoli geni o, addirittura, pezzi di un singolo gene) attraverso un sofisticato sistema di amplificazione della minima quantità di DNA prelevato dal nucleo della singola cellula. Una volta ottenuto il prodotto amplificato è possibile arrivare ad identificare la presenza di mutazioni, anche puntiformi, responsabili della patologia in oggetto. Dopo aver effettuato l'analisi di mutazione nei blastomeri in esame, vengono trasferiti alla paziente gli embrioni che sono risultati normali all'esame genetico, cioè privi delle mutazioni ricercate. Un'altra recente indicazione della PGD è la tipizzazione del sistema di immunocompatibilità (HLA) dell'embrione. Questa tecnica trova indicazione per coppie con un figlio malato di una malattia genetica quale Beta Talassemia, Anemia falciforme ed altre emoglobinopatie, la cui cura necessita il trapianto di cellule staminali da un soggetto perfettamente compatibile. In questi casi la PGD rappresenta una strategia che consente di individuare e trasferire embrioni che saranno, contemporaneamente, privi di mutazioni e HLA-compatibili con il figlio malato. Alla nascita del bambino, le cellule staminali presenti nel cordone ombelicale del nascituro potranno essere prelevate e trapiantate nel figlio malato della coppia, per consentirne la guarigione. Questa recente applicazione della PGD si è rivelata di estrema importanza per i pazienti: per la prima volta un metodo di diagnosi genetica è diventato uno "strumento di cura". In verità bisogna ricordare che la probabilità di ottenere embrioni normali ed HLA compatibili non è molto alta, circa 2 embrioni ogni 10 (circa il 19%), il che potrebbe implicare la ripetizione di più cicli di fecondazione assistita prima di individuare un embrione con le suddette caratteristiche, tuttavia, nei paesi del medio oriente e del bacino del mediterraneo, l'applicazione di questa particolare indicazione della PGD potrebbe risultare di fondamentale importanza in quanto l'incidenza di Beta Talassemici è di circa il 3% e i matrimoni tra consanguinei sono frequenti (21%). Queste tecniche, allo stato attuale, riducono di almeno il 90% il trasferimento di embrioni affetti da patologie trasmissibili o non in grado di impiantarsi, per cui devono essere considerate ancora complementari alla diagnostica prenatale diretta. Nella letteratura mondiale sono stati segnalati alcuni casi, se pur pochi, di discordanza tra i risultati ottenuti dopo biopsia dell'embrione e quelli registrati alla diagnosi

prenatale o alla nascita. Possibile alternativa alla biopsia del blastomero, ma più limitata (es. malattie recessive legate al cromosoma X come la distrofia muscolare di Duchenne), potrebbe essere l'analisi dell'ovocita che solleva operatori e futuri genitori da implicazioni etiche, morali e religiose. Attraverso la rimozione del primo globulo polare (46 cromosomi) espulso prima della sua fecondazione o del secondo globulo polare (23 cromosomi) dopo la formazione dei pronuclei è possibile eseguire l'analisi genetica consentendo di selezionare e mettere in coltura solo i gameti femminili sani, per cui, se anche lo spermatozoo fecondante fosse portatore di una patologia l'embrione risulterebbe solo portatore sano. In realtà la PGD è virtualmente consentita dalla legge 40/2004 con finalità esclusivamente diagnostiche e terapeutiche ma, attualmente, nessuna delle patologie diagnosticate può essere risolta in maniera terapeutica. E' possibile che, in futuro, qualcuna delle 5000 malattie monogeniche identificate possa essere trattata con la sostituzione del gene anomalo rendendo la PGD una tecnica legalmente riconosciuta.

7.7. Utilizzo di cellule staminali embrionali (Art. 13 comma 1)

La capacità di eseguire riparazioni occasionali di parti usurate o difettose della macchina umana è un sogno della medicina vecchio di secoli. Con i primi trapianti di organi, eseguiti circa mezzo secolo fa, questo sogno ha cominciato ad avverarsi. Oggi è la scarsità degli organi stessi a costituire un fattore limitante, il che spiega l'attenzione sempre maggiore che viene rivolta alla terapia cellulare. Questa è oggi ampiamente usata nel campo dell'ematologia (trapianto di cellule staminali emopoietiche), delle ustioni (trapianti di pelle) mentre è ancora allo stadio sperimentale per il trapianto di epatociti nelle malattie del fegato, di cellule endocrine del pancreas nel diabete e di cellule neuronali nelle malattie neurodegenerative. Le cellule staminali sono cellule immature potenzialmente in grado di differenziarsi in tessuti o organi e si distinguono in totipotenti in grado di diventare tutto, come le cellule embrionali e in pluripotenti, meno differenziate, come quelle presenti nei tessuti dell'organismo adulto. Le prospettive terapeutiche aperte dall'uso delle due linee cellulari hanno aperto un dibattito mondiale sia sui loro rispettivi vantaggi sia sulle ripercussioni etiche di ciascuna delle due strategie. I paladini delle cellule embrionali tentano di minimizzare i possibili meriti delle cellule tessutali differenziate, mentre coloro che, per ragioni religiose o etiche, si oppongono alla distruzione di embrioni umani per ottenere cellule staminali tendono ad attribuire ogni virtù alle cellule tessutali progenitrici. Obiettivamente, nessuno oggi può affermare che le promesse della medicina rigenerativa saranno effettivamente realizzate, né su quale scala o grazie all'utilizzo di quale tecnica. Da un punto di vista puramente scientifico, è ragionevole sviluppare i due approcci simultaneamente, anche se tutti sperano, senza dubbio, che il successo nell'uso di cellule progenitrici adulte non implichi più l'uso degli embrioni umani, che richiedono la distruzione o perfino la loro creazione a questo scopo. Oggi almeno una sessantina di linee cellulari staminali embrionali umane sono state selezionate e numerose altre verranno progressivamente derivate nei Paesi che autorizzano queste ricerche (Spagna, Inghilterra, Francia, Stati Uniti). Tali linee cellulari potrebbero ovviamente risolvere il problema della bassa disponibilità di organi. Tuttavia, derivando dalla dissezione microchirurgica della massa cellulare interna di un embrione, che ha già antigeni specifici di superficie, persiste il problema dell'incompatibilità immunologica e quindi del rigetto. La tolleranza immunologica nei confronti di queste cellule potrebbe, in futuro, essere risolta mediante manipolazione genetica che modifichi l'espressione delle principali molecole coinvolte nell'attivazione della risposta immune. Inoltre, siamo ancora lontani dall'essere in grado di

controllare a piacere la differenziazione di queste cellule staminali embrionali nel tipo di cellule differenziate che desideriamo trapiantare con il rischio che tali cellule diventino cancerogene. Ciò significa che sono ancora necessari un numero considerevole di studi preliminari prima che le speranze riposte in queste cellule possano essere confermate e si possa dare il via ai primi studi clinici. E' indubbio che l'utilizzo degli embrioni rispetto alle cellule staminali tissutali comporti problematiche etiche, morali e religiose enormi. Occorre premettere che nel classico scenario della riproduzione assistita, gli embrioni ottenuti non sono tutti trasferiti nell'utero materno e che otto su dieci sono destinati alla naturale estinzione. Gli embrioni crioconservati in Italia prima dell'entrata in vigore della legge 40/2004 sono circa 30.000 e se non verranno utilizzati dai loro proprietari, poichè la legge vieta la loro donazione ad altre coppie, avranno come destino inevitabile la soppressione. Una soluzione alternativa all'utilizzo delle cellule staminali embrionali potrebbe essere rappresentata dalle cellule staminali pluripotenti dotate di forte potenziale rigenerativo presenti in numerosi tessuti, anche nell'adulto. Queste cellule staminali, inizialmente considerate come irreversibilmente impegnate in uno specifico percorso di differenziazione, possiedono in effetti una plasticità maggiore di quanto si fosse immaginato. Per esempio nella zona subventricolare del sistema nervoso centrale ci sono cellule neurali che, nell'adulto, mantengono una continua neurogenesi. La pluripotenza di questa popolazione è illustrata dalla sua capacità di differenziarsi in vivo in neuroni e neuroglia. Com'è prevedibile, l'abbondanza di tali cellule diminuisce sensibilmente con l'età. Le cellule staminali ematopoietiche possono dare origine non solo a diversi tipi di cellule ematiche ma anche a tessuto muscolare, epatico, ecc. Anche il midollo spinale contiene cellule staminali che possono dare origine a cartilagini, ossa, tendini, tessuti adiposi, muscoli e cardiomiociti. La pelle e il derma sono un tessuto facilmente accessibile il cui uso per pazienti ustionati è oggi pratica consolidata. E' probabile che nei prossimi anni vengano scoperte altre fonti di cellule progenitrici che posseggono plasticità di differenziazione. Perciò la soluzione alla terapia cellulare può benissimo risiedere in ciascuno di noi in quanto le cellule staminali autologhe di tessuti differenziati sono perfettamente immunocompatibili col ricevente e senza dubbio meno cancerogene, tuttavia, la loro capacità proliferativa può essere estremamente limitata e il loro numero diminuisce con l'età. È molto probabile che il sequenziamento del genoma umano, ci permetterà di migliorare la nostra comprensione della gamma di fattori che permettono il controllo della rigenerazione tissutale usando popolazioni minoritarie di cellule staminali. In certi casi, l'efficacia della ripopolazione cellulare richiederà l'aggiunta di transgeni alle cellule trapiantate per dare loro un vantaggio selettivo.

7.8. Clonazione terapeutica e riproduttiva (Art. 13 comma 3c)

La produzione di embrioni umani per clonazione, finora ancora sperimentale, potrebbe avere due obiettivi: uno terapeutico, l'altro riproduttivo. Il primo obiettivo sarebbe di ottenere cellule embrioniche identiche, a livello genetico e probabilmente immunologico, a quelle del paziente che attende un trapianto cellulare. La realizzazione di un programma simile richiederebbe un controllo molto preciso della differenziazione delle cellule staminali isolate da un embrione clonato ma questo, come abbiamo visto, non è stato ancora realizzato. In futuro, ad esempio un uomo che soffre di morbo di Parkinson o di diabete potrebbe chiedere a sua moglie o a sua figlia di donare ovociti oppure potrebbe ottenerli da un'altra donatrice. Il medico sostituirebbe i nuclei di questi ovociti con nuclei di una qualsiasi delle cellule del paziente. Gli embrioni clonati così creati sarebbero coltivati per sei-sette giorni in condizioni di laboratorio

fino alla loro trasformazione in blastociti. Se a questo stadio, le cellule staminali embrionali della massa interna potessero essere indotte a differenziarsi in cellule cerebrali o pancreatiche manipolando le condizioni di cultura, esse potrebbero essere trapiantate nel paziente per curare il suo morbo di Parkinson o il suo diabete. La sopravvivenza del trapianto dovrebbe in linea di principio essere perfetta, dato che le cellule trapiantate sono teoricamente identiche a quelle del ricevente. Tuttavia, ci si chiede se questo tipo di terapia sarà mai realizzato vista la difficoltà e le problematiche citate per l'utilizzo delle cellule staminali embrionali e i maggiori scienziati ritengono che, nel migliore dei casi, questa strategia rimarrà sempre altamente sperimentale, limitata a pazienti selezionati. Inoltre, va notato che la descrizione precedente di un protocollo di clonazione terapeutica negli umani è puramente accademica. Secondo i rapporti scientifici, gli embrioni clonati trasferendo nuclei in ovociti di primati non umani (macaco e scimmia rhesus) sono degenerati molto rapidamente, dopo solo alcune divisioni cellulari e anomalie cromosomiche si sono accumulate negli embrioni per ragioni ignote. Questi risultati negativi suggeriscono che qualsiasi tentativo di clonare embrioni umani avrebbe scarse possibilità di successo se tentato oggi. La società americana Advanced Cell Technology il 25 novembre 2001, ha rivelato di aver ottenuto un embrione clonato allo stadio di 4 cellule e un altro a 6 cellule, dopo 71 tentativi. In tutti i casi, lo sviluppo di questi embrioni è fallito spontaneamente dopo circa 24 ore. Considerando che le cellule staminali embrionali sono isolate dalle blastocisti, ovvero a uno stadio di sviluppo di oltre 100 cellule corrispondente al 6-7° giorno dopo la fecondazione, è evidente che siamo ancora molto lontani dall'ottenere un embrione umano idoneo alla clonazione umana, sia essa terapeutica o riproduttiva. Per quanto riguarda la clonazione a fini riproduttivi, la setta Raeliana ha trovato una società statunitense di biotecnologia, Clonaid, dedicata a questo progetto. Il gruppo, guidato dall'italiano Severino Antinori, ha annunciato di avere ricevuto da duecento coppie sterili la richiesta di intraprendere la clonazione riproduttiva usando le cellule dei padri azoospermici. Il movimento settario, ha messo a disposizione dei Raeliani diverse centinaia di donne "volontarie" pronte a donare uova o a prestare il loro utero per l'impianto di embrioni clonati. Il grosso ostacolo di fronte a questi potenziali clonatori è che, per quanto ci è noto, essi sono ancora incapaci di fabbricare embrioni umani clonati capaci di portare alla nascita di un bambino. E' inevitabile, quindi, che l'eventuale successo della clonazione terapeutica porti al rischio della clonazione umana a fini riproduttivi.

7.9. Produzione di ibridi e chimere (Art. 13 comma 3d)

La formazione di chimere si ottiene unendo due o più embrioni umani, la formazione degli ibridi trasferendo una cellula embrionale umana in un embrione animale o il nucleo di una cellula umana in una cellula uovo animale, privata del suo materiale genetico.

La legge 40/2004 vieta la formazione, in un unico corpo, di due embrioni della stessa specie oppure di specie diverse ma già nel 1997 il Comitato nazionale di bioetica, giudicava "aberrante e moralmente illecita" la realizzazione di chimere con embrioni umani o di ibridi uomo-animale". Anche il Consiglio d'Europa vieta la creazione di esseri ottenuti a partire da due razze differenti.

Stati Uniti e in Cina, ove non esiste una legislazione al riguardo hanno pubblicato i seguenti esperimenti:

- *il pollo-quaglia*: 1997, a San Diego, vengono trapiantate cellule nervose dall'embrione di una quaglia giapponese nell'embrione di un pollo, ottenendo un animale che cinguetta come la quaglia ma che continua a muovere la testa come una gallina
- *l'uomo-scimmia*: 1997, a San Francisco vengono trasferiti nuclei di cellule umane all'interno di ovociti di scimpanzé e gorilla. L'esperimento fallisce, dicono i ricercatori, a causa dell'incompatibilità fra il Dna umano e il Dna mitocondriale degli animali. Il Dna mitocondriale resta infatti all'interno dell'ovocita anche quando questo viene privato del nucleo e si trasmette da un individuo all'altro solo per via materna.
- *il minotauro*: 1998, nel New Jersey viene trasferito il nucleo di cellule umane della pelle e del sangue all'interno di ovociti di mucca in precedenza privati del loro nucleo., ma non si ottengono embrioni.
- *l'uomo ermafrodita*: 2003, nei Centri di Chicago e New York si ottiene la fusione di due embrioni umani di sesso diverso per creare una chimera ermafrodita in grado di combattere alcune malattie congenite.
- *l'uomo-coniglio*: 2003, a Shanghai viene trasferito il nucleo di cellule umane della pelle all'interno di ovociti di coniglio. Gli embrioni si svilupparono fino allo stadio di blastocisti e furono raccolte le loro cellule staminali.
- *l'uomo-maiale*: 2004, nel Minnesota sono stati creati maiali con sangue umano
- *l'uomo-topo*: 2004, in California è stato eseguito un esperimento per generare topi con neuroni umani. Gli scienziati sostengono che iniettando neuroni umani nel cervello di embrioni di topo si possa giungere, in futuro, allo sviluppo di un cervello umano utile nel trattamento di malattie come il morbo di Parkinson o di Alzheimer

Tali tecniche hanno sollevato enormi questioni morali, etiche e religiose suscitando interrogativi preoccupanti: quale nuova combinazione subumana dovrebbe essere prodotta e per quale scopo? In che modo sarebbe considerato l'umano? E quali diritti dovrebbe avere, all'occorrenza? I sostenitori ritengono che le chimere ottenute utilizzando la fusione degli embrioni crioconservati e abbandonati nei Centri di Sterilità di tutto il mondo, potrebbero fornire un ottimo serbatoio di cellule staminali totipotenti. Inoltre, gli ibridi uomo-animale potrebbero servire come modello di ricerca per salvare migliaia di vite umane mediante test farmacologici o la creazione di organi da trapiantare ricordando che, già oggi, è ampiamente accettato che un cardiopatico possa sostituire le proprie valvole cardiache difettose con quelle di un maiale o di una mucca. Gli oppositori a questo settore delle biotecnologie sostengono che gli animali abbiano il diritto di esistere senza essere alterati o essere incrociati con un'altra specie e che modelli sofisticati al computer possono sostituire gli esperimenti sugli animali vivi. Eminentissimi esponenti del mondo scientifico, etico e religioso italiano si interrogano su questo tipo di ricerche. Secondo Edoardo Boncinelli della Scuola Italiana di Studi Avanzati di Trieste, "andrebbero fatte prima sugli animali mettendo a punto meccanismi di riprogrammazione cellulare sicuri, utilizzabili nell'uomo solo in un secondo tempo". Il direttore dell'Istituto di Medicina Generale dell'Università La Sapienza di Roma Bruno Dalla Piccola afferma, inoltre, che "anche se gli ovuli di coniglio usati nell'esperimento cinese sono stati privati del Dna del nucleo, rimane sempre il Dna dei mitocondri e si verrebbe a creare comunque un ibrido". Il presidente del Comitato Nazionale di

Bioetica Francesco d'Agostino sostiene, invece, che "l'inviolabilità dell'identità e dell'unicità genetica dell'uomo e' un principio cardine della bioetica, che va rispettato come tale e che tali esperimenti aprirebbero la porta alla manipolazione genetica dell'uomo". Per Monsignor Elio Sgreccia "la creazione di un ibrido uomo-animale sarebbe una aberrante mostruosità e un motivo in più per vietare la clonazione di qualsiasi tipo a livello internazionale".

8. LA LEGISLAZIONE PER LE TECNICHE DI PMA IN EUROPA

La Tabella 7 mostra sinteticamente le differenze esistenti, in materia di procreazione medicalmente assistita, tra le legislazioni vigenti nei paesi europei.

Tab. 7: Esempio di malattie genetiche trasmissibili alla prole che possono essere analizzate mediante diagnosi genetica dopo biopsia degli ovociti ed embrioni

LEGISLAZIONE	GERMANIA 1990	FRANCIA 1994	INGHILTERRA 1990	SPAGNA 1988	ITALIA 2004
SPERIMENTAZIONE EMBRIONARIA	VIETATA	CONSENTITA ECCEZIONALMENTE A SCOPI TERAPEUTICI CON IL CONSENSO DELLA COPPIA	PERMESSA SOLO FINO A 14 GIORNI	PERMESSA SOLO FINO A 14 GIORNI	VIETATA
OVOCITI INSEMINATI	MASSIMO 3	PERMESSA	PERMESSA	PERMESSA	MASSIMO 3 (non si possono ottenere piu' di 3 embrioni)
OVODONAZIONE	VIETATA	PERMESSA (obbligo di conoscenza del donatore e motivi sanitari con autorizzazione del giudice)	PERMESSA	PERMESSA	VIETATA
DONAZIONE SPERMA	VIETATA	PERMESSA (obbligo di conoscenza del donatore e motivi sanitari con autorizzazione del giudice)	PERMESSA FINO A 10 ANNI, POI DISTRUTTI	PERMESSA	VIETATA
CRIOCONSERVAZIONE EMBRIONI	VIETATA	CONSENTITA (limite di 5 anni. in caso di decesso di un componente della coppia devono essere distrutti)	PERMESSA	PERMESSA	VIETATA
DONAZIONE EMBRIONI	VIETATA	PERMESSA (obbligo di non conoscenza dei donatori e di autorizzazione del giudice)	PERMESSA	PERMESSA	VIETATA
INSEMINAZIONE POST-MORTEM	VIETATA	VIETATA	PERMESSA	PERMESSA	VIETATA
MADRE SURROGATA	VIETATA	VIETATA	PERMESSA CON IL CONSENSO DELLE PARTI E AUTORIZZAZIONE DEL GIUDICE (almeno un componente della coppia deve fornire i gameti)	VIETATA	VIETATA