

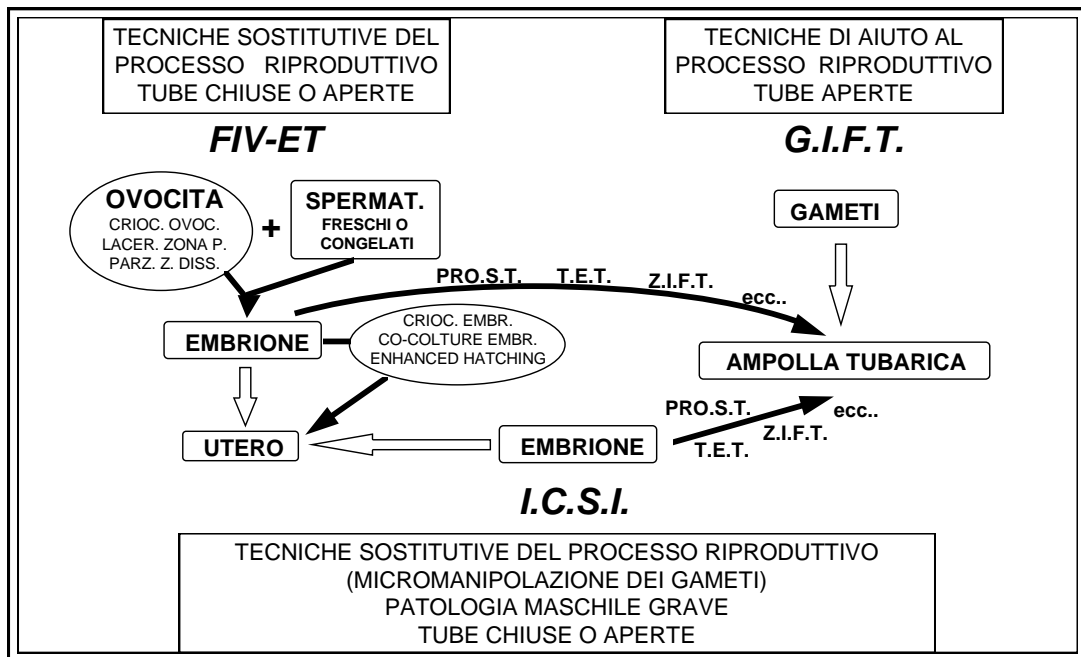
LE TECNICHE DI FECONDAZIONE ASSISTITA

Nicola Garcea

INTRODUZIONE

Con una lettera all'Editore pubblicata su Lancet nel 1978 è iniziata la storia della procreazione assistita. Con essa il ginecologo P.C. Steptoe e il biologo R.G. Edwards annunciavano alla comunità scientifica mondiale la nascita della piccola Louise Brown, primo essere umano concepito in "provetta da un ovocita aspirato in laparoscopia il 10 novembre 1977 in un ciclo ovulatorio spontaneo, in una donna sterile per occlusione bilaterale delle tube" (1). Da allora la strada fatta dalla procreazione assistita è stata veramente tanta (fig. 1).

Fig. 1 - *Tecniche di procreazione assistita e possibili varianti*



Innanzitutto il ciclo spontaneo è confinato all' 1% delle procreazioni assistite e ormai si preferisce l'induzione dell'ovulazione multipla con gonadotropine ricombinanti, prevalentemente FSH ricombinante. Inoltre quasi sempre viene inibita la paziente con analoghi del GnRH spesso a long action. Più recentemente

è insorto l'uso di utilizzare i GnRH antagonisti al posto dei GnRH analoghi sempre per inibire l'ipofisi ed impedire che l'eccessiva produzione di estrogeni da parte dell'ovaio possa provocare un picco endogeno di LH e quindi l'ovulazione quando non opportuno.

Inibizione con GnRH analogo o antagonisti o agonisti

Usualmente l'organismo femminile ad un incremento in circolo di produzione di estrogeni (250-350 pg/ml) risponde, per un feed back positivo, con un picco di LH che fa scoppiare il follicolo. Durante una ovulazione fisiologica il follicolo dominante raggiunge valori di 18-20 mm quando gli estrogeni arrivano a 250-300 pg/ml. Al suo interno l'ovocita è ben maturo, come si evidenzia da una relativa dissociazione delle cellule del cumulo ooforo che lo contornano e che poi formeranno le cellule della corona raggiata dopo la sua fuoriuscita dal follicolo. Quando noi facciamo ovulare più follicoli il livello di estradiolo da feed back positivo si raggiunge quando i follicoli sono molto piccoli e gli ovociti immaturi. Per questo è invalso l'uso di provocare una "inibizione" (down-regulation) dell'ipofisi con analoghi del GnRH. Questi vengono somministrati per via intramuscolare, sottocute o per spray nasale a partire dalla fase luteale del ciclo precedente o dal primo giorno del ciclo mestruale. Poiché l'inibizione avviene dopo 7-10 giorni di lieve iperstimolazione ipofisaria, nel primo caso si partirà subito dopo la prima mestruazione successiva, nel secondo caso dopo circa 15 giorni, verificando con un dosaggio di E_2 l'avvenuta inibizione. Oltre agli analoghi del GnRH è possibile usare gli agonisti o gli antagonisti del GnRH. L'inibizione ipofisaria con queste sostanze è rapida e si verifica entro 6-12 ore. Possono essere somministrati in dose unica o doppia oppure in dose multipla. Nel primo caso si somministrano 2-3 mg sottocute all'8° giorno del ciclo stimolato ed eventualmente una seconda dose dopo 72 ore, se non è avvenuta l'ovulazione. Nel secondo caso la somministrazione di 0,25 mg/die sottocute inizia al 7-8° giorno del ciclo stimolato e dura alcuni giorni, 3-5 di solito. L'incidenza di picchi anomali di LH endogeno con tali sostanze e dosaggi è inferiore al 2%.

Induzione dell'ovulazione multipla

La maggior parte degli Autori oggi usa le gonadotropine ricombinanti, prevalentemente l'FSH. Questa sostanza permette il reclutamento di molti follicoli fino anche a 20 o più e quindi di molti ovociti, considerato che l'85-90% dei follicoli contiene un ovocita. Usualmente la stimolazione avviene per 10-15 giorni fino a che non si giunge ad avere alcuni o molti follicoli superiori a 16-18 mm e valore di E_2 compresi tra 500 e 2000 pg/ml o anche di più. A questo punto si dà uno stimolo ovulatorio di LH, con HCG ricombinante e, prima che si aprano spontaneamente i follicoli dopo 36-38 ore dalla iniezione di HCG, questi vengono aspirati e gli ovociti vengono recuperati. Poiché la donna è stata "inibita" con analoghi, agonisti o antagonisti del GnRH, la risposta allo stimolo con gonadotropine risulta quasi sempre lineare. Gli ovociti vengono aspirati sotto

controllo ecografico (FIVET e ICSI) o visivo laparoscopico (GIFT), vengono selezionati per la loro maturità e quindi messi ad incubare con gli spermatozoi (FIVET) o inoculati con uno spermatozoo per mezzo di una microsiringa (ICSI) o inseriti nella tuba insieme agli spermatozoi (GIFT).

Preparazione del seme

Poiché il seme è ricco di prostaglandine, scorie e batteri, è opportuno purificarlo e selezionare gli spermatozoi più mobili e vitali. Infatti se usassimo il seme così come viene eiaculato, avremmo più infezioni e distruzioni di ovociti che fecondazioni. Il metodo più semplice è quello che si basa su due centrifugazioni o su gradienti di sostanze che facilitano la sua selezione e recupero. Il seme selezionato dopo opportune diluizioni è pronto per essere usato ed è il più mobile.

FIVET – LA PRIMA VIA DELLE ART

La FIVET è la prima via delle ART (Assisted Reproductive Technologies), sia per motivi cronologici che di importanza perché è stata la prima adoperata da Steptoe ed Edwards ed è la più usata attualmente.

L'indicazione all'uso di questa tecnica e le controindicazioni sono riportate nelle tabelle 1 e 2.

Tab. 1 - Indicazioni alla FIVET

Assolute
✓ Occlusione tubarica bilaterale già inutilmente sottoposta a intervento di microchirurgia o di tale entità da sconsigliare l'intervento
Relative
✓ Endometriosi grave (III e IV stadio AFS) ✓ Patologia seminale di lieve o media entità * ✓ Sterilità immunologica non risolvibile con terapia medica * ✓ Sterilità sine causa **

* Risolvibile anche con l'uso di seme di donatore

** Risolvibile anche con altre tecniche di procreazione assistita (IUI, IPI, GIFT)

Tab. 2 - Controindicazioni alla FIVET

Assolute
<ul style="list-style-type: none">✓ Mancanza di ovaie congenita o in seguito ad interventi chirurgici *✓ Ovaie streak-like o ipoplasia grave non rispondente a terapia medica *✓ Inaccessibilità alle ovaie *✓ Presenza di ovaie consumate (menopausa precoce) *✓ Mancanza di utero congenita (sindrome di Rokitanski-Kuster-Hause) **✓ Mancanza di utero acquisita (isterectomia totale o parziale) **✓ Malformazioni uterine non risolvibili chirurgicamente **✓ Malattie sistemiche gravi che sconsigliano la gravidanza **
Relative
<ul style="list-style-type: none">✓ Endometriosi grave✓ Età della donna superiore a 43-45 anni

* *Risolubile con ovodonazione*

** *Risolubile con madre surrogata*

Dopo aver inibito la donna, la si stimola con gonadotropine fino ad ottenere la maturazione di numerosi follicoli e quindi di ovociti. Questi vengono aspirati sotto ecografia e quindi confrontati con gli spermatozoi selezionati. A seconda della validità degli uni e degli altri si hanno differenti percentuali di embrioni fino ad un massimo di 60-70% nelle donne più giovani e con spermatozoi molto validi. Gli embrioni migliori e cioè quelli con aspetto dei blastomeri (cellule) regolari o uguali, senza o con scarsi frammenti citoplasmatici, vengono trasferiti in utero. Usualmente dopo 16-20 ore (mediamente 18) dalla penetrazione dello spermatozoo nell'ovocita, è possibile evidenziare i due pronuclei, maschile e femminile, che si fondono e formano lo zigote dopo circa 24 ore. Successivamente questa unica cellula si divide in 2-4-8-16 ecc. Allo stadio di 4-8 cellule avviene il trasferimento in utero. Sono passati circa 2 giorni e mezzo-3 dalla aspirazione degli ovociti e il trasferimento in utero viene effettuato in uno stadio di sviluppo più precoce di quanto avviene in natura. Vi è infatti in vitro un rallentamento di maturazione dell'embrione. Il trasferimento può essere fatto anche più tardivamente, a 5-7 giorni, quando l'embrione si è trasformato in blastocisti, ma i risultati in termini di bambini in braccio non cambiano significativamente, mentre il lavoro e l'impegno per l'équipe medica è molto più gravoso. E' stato evidenziato che quanti più embrioni si trasferiscono in utero (fino ad un massimo di 5-6) tanto maggiore è la possibilità di gravidanze, ma anche maggiore la possibilità di gravidanze gemellari o multiple. Pertanto si è addivenuti alla convenzione, o in alcuni stati alla legiferazione, di non riporre in utero più di 3 embrioni. In tal modo si hanno un maggior numero di gravidanze

singole, un numero accettabile di gravidanze gemellari, scarse gravidanze trigemine. Ma si ha comunque un relativo spreco di embrioni, perché se ne trasferiscono 3 nella speranza e parziale certezza che nella maggioranza dei casi 1 o 2 di essi non attecchiscano.

RISULTATI DELLA FIVET

I risultati della FIVET sono riportati nella tabella 3 (2) e nelle figure 2 e 3 (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12). Da esse risulta che gli U.S.A. sono lo stato che ha i migliori risultati dopo la Svezia e che essi vanno migliorando di anno in anno aumentando le gravidanze cliniche, diminuendo il numero di aborti percentuali e di gravidanze ectopiche e quindi aumentando il numero di parti percentuali per ritrovamento di ovociti. Gli ultimi dati del 1997 (13) arrivano a circa il 28% di parti per ritrovamenti. I parti multipli sembrano in costante aumento e sono comunque molto maggiori che in natura. Infatti si aggirano attorno al 20-30% e più, mentre in natura sono l'1,2%. Per la maggior parte si tratta di parti gemellari, spesso graditi dalle pazienti, ma esiste un 10-15% delle gravidanze plurime che sono trigemine e ancora un 2-4% di quadrigemine o più. Quello che è opportuno sottolineare è che molti di questi parti plurigemellari si possono accompagnare a patologie materne o fetali piuttosto gravi, queste ultime legate all'occasione e all'esigenza di parti prematuri. Inoltre molti consigliano ed eseguono il cosiddetto aborto selettivo dei feti soprannumerari, superiori a 2 o 3. Il numero dei malformati non si discorda da quello che si riscontra in natura. Questi dati ovviamente si riferiscono a donne giovani di età minore a 38-40 anni e con partner normospermici, altrimenti le percentuali nell'uno e nell'altro caso si abbassano notevolmente.

Tab. 3 - Cicli IVF-ET e loro esito in gravidanza (%). Valori mondiali dei 10 stati con maggiore casistica e dell'Italia (2)

DATI	A- Cicli iniziati	B- Cicli con ritrov. (% A)	C- Cicli con trasf. (% B)	D- Grav. clin. (% A-% B)	E- Parti di bambini vivi (% A-% B- % C)
MONDIALI	132.273	115.314 (87)	96.732 (84)	22.899 (17-20)	17.021 (13-15-17)
U.S.A.	31.900	27.443 (86)	24.410 (89)	6.321 (20-23)	5.047 (16-18-21)
Francia	-	23.875 -	18.955 (79)	4.797 (-20)	3.637 (-15-19)
Gran Bretagna	18.224	13.904 (76)	11.796 (85)	3.087 (17-22)	2.333 (13-17-20)
Germania	13.288	12.941 (97)	9.665 (75)	1.523 (11-12)	736 (5-6-8)
Giappone	8.412	7.796 (93)	6.173 (79)	1.512 (18-19)	1.286 (15-16-21)
Corea	7.484	6.626 (88)	5.832 (88)	1.505 (20-23)	1.000 (13-15-17)
Australia	7.143	6.054 (85)	4.939 (82)	761 (11-13)	546 (8-9-11)
Israele	6.386	5.787 (91)	4.708 (81)	1.022 (16-18)	749 (12-13-16)
Svezia	4.254	3.890 (91)	3.515 (90)	1.128 (26-29)	854 (20-22-24)
Grecia	4.199	3.728 (89)	3.172 (85)	839 (20-22)	640 (15-17-20)
Italia	878	728 (83)	638 (88)	144 (16-20)	78 (9-11-12)

Fig. 2 - Risultati IVF-ET negli anni (dati U.S.A. e U.S.A.-Canada)

(3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12)

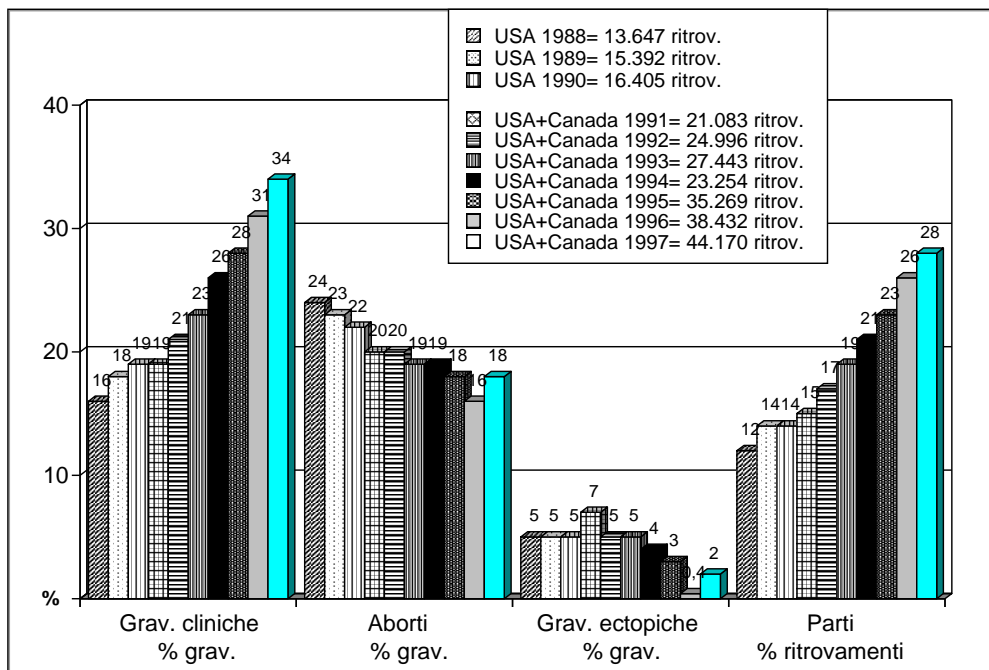
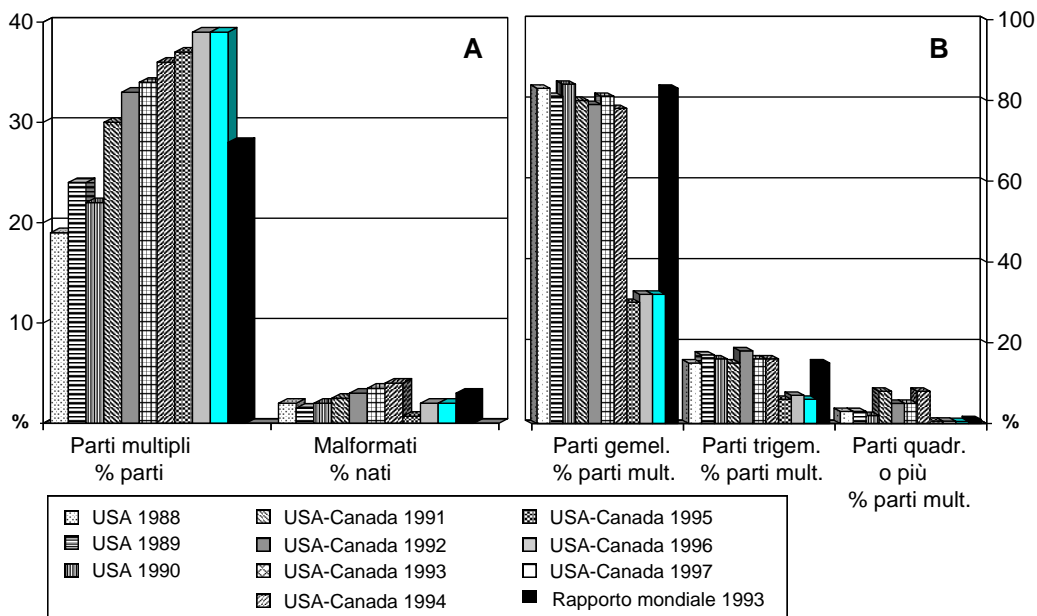


Fig. 3 - Risultati IVF-ET negli USA (anni 1988-90); USA-Canada (anni 1991-97) e mondiali (anno 1993) in termini di gravidanze multiple e malformazioni fetali alla nascita (A) e tipologie delle gravidanze multiple (B)



TENTATIVI PER INCREMENTARE I RISULTATI DELLA FIVET

Crioconservazione degli embrioni e degli ovociti – Conservando in azoto liquido a temperatura di -196°C gli ovociti o gli embrioni, è possibile indirettamente incrementare i risultati della FIVET (13) (14). Infatti sommando i risultati degli embrioni utilizzati a fresco con quelli ottenuti utilizzando gli embrioni surgelati nei cicli successivi, nelle donne in cui non si è verificata la gravidanza, è possibile portare il numero dei bambini in braccio al 47% dei ritrovamenti (12). Nel progetto di legge in gestazione in Italia la possibilità del freezing è attualmente negata.

Micromanipolazione dei gameti – Un'altra tecnica per facilitare la fecondazione degli ovociti, specie nelle donne meno giovani o con mariti oligo-astenospermici (con pochi spermatozoi e o con spermatozoi poco mobili), è quella di effettuare delle lacerazioni (zona drilling) o parziali dissezioni della zona pellucida (partial zone dissection) per favorire la penetrazione di uno spermatozoo nell'ovocita (15) (16) (17).

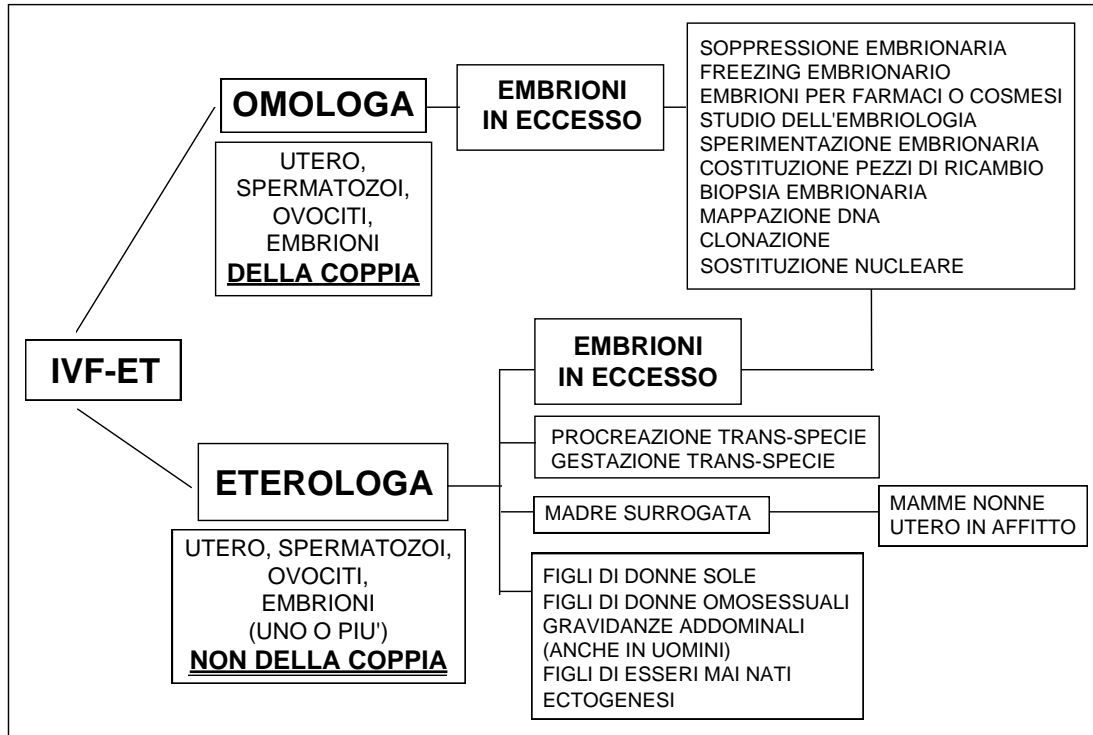
Micromanipolazione dell'embrione – Nella convinzione che le cellule della tuba producano delle sostanze che facciano maturare più rapidamente gli embrioni, si è pensato di effettuare delle co-colture embrionarie in cellule tubariche o altro (18) (19) (20). Un altro tentativo è stato effettuato in embrioni di donne in età più avanzata o con embrioni sviluppati in modo non ottimale e cioè l' "impianto assistito" (assisted hatching) (21). Si tratta di praticare un'apertura per favorire la parziale fuoriuscita di frammenti o cellule embrionarie e quindi il suo attecchimento. Il primo tentativo non ha riportato successi significativi mentre il secondo è ancora usato per facilitare l'attecchimento di embrioni in utero di donne meno giovani.

PRO.S.T., Z.I.F.T., T.E.T. – Altri tentativi per incrementare la percentuale di impianto sono stati rappresentati dal trasferimento degli embrioni a vari stadi nella tuba, nella convinzione di ottenere in questo modo una più rapida e ottimale maturazione dell'embrione stesso. Così sono stati trasferiti dopo circa 20 ore embrioni allo stadio di due pronuclei (PRO.S.T. - Pronuclear Stage Transfer) (22); dopo circa 24 ore allo stadio di zigote (Z.I.F.T. - Zigote Intra Fallopian Transfer) (23) o dopo 36 ore allo stadio di due cellule (T.E.T. - Tubal Embryo Transfer). Questi tentativi non hanno riscosso grandi successi.

FIVET eterologa – Tutte e tre le componenti necessarie alla riproduzione possono nella FIVET essere prese all'esterno della coppia sterile e cioè: l'ovocita, lo spermatozoo, o un embrione fresco o frizzato di altra coppia, e anche l'utero. In teoria è possibile prendere i gameti di due donatori estranei alla coppia e ottenere un embrione, quindi impiantarli in un utero di una donna sempre estranea alla coppia ed infine affidare questo neonato alla coppia sterile originaria. Si avrebbe così un orfano di 5 genitori, come titolava anni fa un giornale in occasione della realizzazione di questo "caso teorico". La procreazione eterologa rende possibile la procreazione transspecie, la madre surrogata con il fenomeno delle mamme-nonne e dell'utero in affitto, la

possibilità di figli di donne sole o di figli di donne omosessuali, di gravidanze addominali, queste ultime eventualmente anche in uomini se opportunamente preparati con ormoni, il concepimento o gestazione transspecie o, infine, l'ectogenesi (gestazione al di fuori del corpo, in macchine appositamente create) (vedi fig. 4).

Fig. 4 - Schema delle possibilità della IVF-ET



ICSI – LA SECONDA VIA DELLE ART

Negli uomini affetti da pochissimi spermatozoi o con spermatozoi morti o addirittura senza spermatozoi, è stata realizzata la ICSI o iniezione intracitoplasmatica dello sperma (Intra-Cytoplasmic Sperm Injection). Questa tecnica consente di iniettare in un ovocita, trattenuto da una micropipetta con blanda aspirazione, un solo spermatozoo dentro il citoplasma per mezzo di una microsiringa con un microago. Pertanto è possibile effettuarla in uomini azoospermici in cui si sia ottenuto uno spermatozoo con l'aspirazione microchirurgica epididimale o MESA (Microchirurgical Epididymal Sperm Aspiration) o con aspirazione percutanea o PESA (Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration) o infine con biopsia testicolare o TESE (TEsticular Sperm Extraction). In quest'ultimo caso è possibile utilizzare addirittura spermatidi di secondo ordine. La microiniezione avviene sotto microscopio, essendo l'ovocita

grande circa 150 µm e lo spermatozoo circa 20 volte più piccolo (fig. 5). Il 90% e oltre degli ovociti viene sottoposti ad ICSI non subisce danno e la metà o più di essi viene fertilizzato. Dato l'alto numero di ovociti che usualmente si raccolgono in ogni donna, più del 90% di esse hanno embrioni. I risultati in termini di gravidanze oscillano dal 20 al 30% o più (tab. 4) e non esiste differenza sostanziale a seconda della provenienza degli spermatozoi (Eiaculati, MESA, PESA e TESE). Anche questi risultati sono condizionati dal numero di embrioni trasferiti e ancora una volta la percentuale di gravidanze è maggiore quanti più embrioni si trasferiscono, ma aumentano anche le gravidanze gemellari o plurime. Poiché la ICSI, tra le ART, è quella che non consente la pur minima selezione degli spermatozoi, si è a lungo temuto su una possibile maggiore incidenza di malformazioni fetali. Esistono dati discordanti in letteratura, ma sostanzialmente non sembra sussista questo pericolo (26) (27) (28) (29) (30) (31). L'incidenza delle gravidanze multiple è legata al numero di embrioni trasferiti e anche gli aborti e le gravidanze extrauterine sono contenuti, come nella FIVET. In effetti la ICSI non fa altro che utilizzare una tecnologia ancora più avanzata per permettere la fecondazione dell'ovocita, poi per il resto tutto procede in modo identico che nella FIVET.

Tab. 4 - Risultati della Società Europea per la Riproduzione Umana (ESHRE) - Gruppo di studio per la ICSI (25)

	SPERMATOZOI		
	EIACULATI	EPIDIDIMALI	TESTICOLARI
N° di cicli	13 187	539	193
N° di ovociti iniettati	111 291	5 744	2 057
% di ovociti intatti dopo ICSI	90.3	91.9	89.6
% di ovociti intatti con 2PN	58.5	50.4	50.9
% di embrioni trasferiti o frizzati	69.2	61.4	71.9
% di embrioni trasferiti	91.1	93.3	87.6
% HCG positivo/ciclo	28.7	34.9	33.2

2PN = Due pronuclei; HCG = Gonadotropina Corionica Umana

ICSI eterologa - Anche per la ICSI vale quanto detto per la FIVET e cioè che una o più componenti necessarie alla riproduzione possono essere prese in prestito da donatori estranei alla coppia sterile.

MANIPOLAZIONI RESE POSSIBILI DALLE TECNICHE FIVET E ICSI

La FIVET e la ICSI hanno portato alla produzione di embrioni in eccesso. In teoria sarebbe possibile contenere il numero di embrioni a 2 o 3, ma questo è più facile nella ICSI che nella FIVET. Infatti, mentre nella prima si possono scegliere gli ovociti migliori e per esempio microiniettarne 4 con possibilità di formazione di 2 o 3 embrioni, raramente di più o di meno, nel caso della FIVET, dove tale fenomeno avviene spontaneamente, si ha una "resa" di embrioni del 60-70% degli ovociti esposti, ma questo numero è fortemente influenzato dalla qualità degli ovociti e degli spermatozoi e dall'età della donna, per cui usualmente si espongono alla fecondazione tutti gli ovociti trovati. Questo provoca il fenomeno degli embrioni in eccesso che possono essere distrutti immediatamente o frizzati, usati per farmaci o cosmetici, per lo studio dell'embriologia o per sperimentazione embrionaria, per la costituzione di pezzi di ricambio, per la biopsia embrionaria e successiva mappazione del DNA, per la clonazione o per la sostituzione nucleare.

Soppressione embrionaria - Può avvenire per embrioni soprannumerari (più di 3) quando non li si voglia o possa congelare. Oppure si può effettuare sugli embrioni congelati dopo un certo numero di anni di conservazione. Per esempio l'Australia vieta di conservarli per più di 10 anni, l'Inghilterra per più di 5, ecc.

Freezing embrionario - Permette di utilizzare gli embrioni da parte della stessa coppia nel caso di insuccesso del trasferimento di embrioni freschi o per l'esigenza di successive gravidanze. Tuttavia la maggior parte finisce per rimanere in freezer e si arriva quindi alla loro soppressione successiva. Il concetto del freezing può essere anche positivo, ma ha due grossi limiti: il primo è che molti embrioni vengono perduti al momento del congelamento o più spesso dello scongelamento; il secondo è che spesso vengono abbandonati dalla coppia e finiscono poi per essere distrutti. Si potrebbe ovviare all'inconveniente chiedendo alla coppia l'obbligo di transfer anche se si è avuta una gravidanza con embrioni freschi, anche a costo di costringerli ad una penale finanziaria.

Embrioni per farmaci o cosmesi - Embrioni di aborti spontanei o provocati sono da tempo utilizzati per farmaci o cosmesi. Qualche tempo fa sui mass media comparvero degli articoli scandalistici perché alla frontiera erano stati fermati TIR che trasportavano embrioni umani morti e placenti.

Studio dell'embriologia - La procreazione assistita ci ha permesso di capire a fondo la fisiologia della riproduzione umana per lo studio delle prime fasi di sviluppo dell'embrione, il cosiddetto pre-embrione, fino al 14° giorno. Si potrebbe cercare di portare più avanti la sopravvivenza embrionaria e con lo sviluppo dell'ectogenesi arrivare ad uno studio analitico e cronologico dello sviluppo embrionale.

Sperimentazione embrionaria - Viene sussurrato che nei laboratori di tutto il mondo vengono fatte sperimentazioni embrionarie di ogni tipo su embrioni congelati e abbandonati.

Costituzione di pezzi di ricambio - E' prevedibile che si possa realizzare lo sviluppo dell'embrione fino ad ottenere la formazione di organi che possono essere utilizzati come pezzi di ricambio. Se associamo a questa la possibilità della clonazione è possibile ottenere in futuro individui e contemporaneamente una serie di pezzi di ricambio per il loro futuro.

Clonazione - Con il termine clonazione viene impropriamente definita la produzione di una "fotocopia" di un individuo adulto, vedi pecora Dolly. In effetti questa è stata ottenuta con la sostituzione nucleare (vedi oltre). La clonazione è la produzione di più gemelli omozigoti e viene ampiamente sfruttata in veterinaria. Si tratta di dividere l'embrione allo stadio di 16-32 cellule nelle sue cellule costitutive, le quali sono totipotenti e quindi possono portare a sviluppare ognuna un individuo adulto se impiantate in uteri in prestito. Se noi prendessimo un embrione umano di 4 cellule e facessimo la clonazione di queste cellule facendo sviluppare un embrione e facendo arrestare gli altri a varie fasi di sviluppo, potremmo avere un individuo con una riserva di organi autologhi.

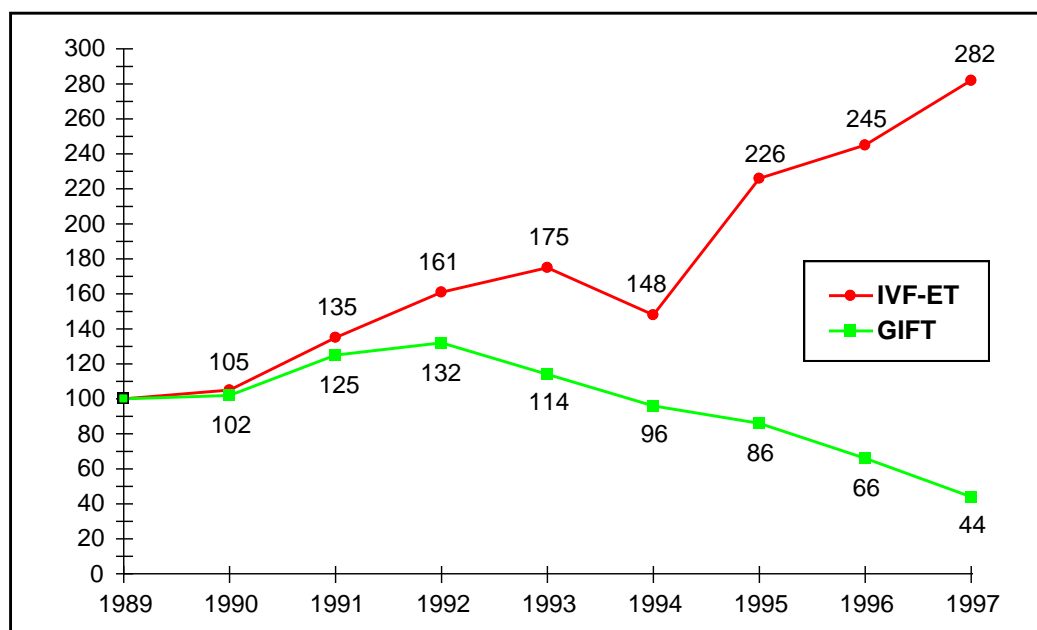
Biopsia embrionaria e mappazione DNA - Questa viene ampiamente effettuata anche oggi per la ricerca di patologie familiari, ereditarie. Si tratta di asportare poche cellule da un embrione di 4-8-16 cellule ed analizzarne il corredo cromosomico o genico. Tra appena qualche anno sarà possibile prevedere i caratteri somatici globali di un individuo prima che venga riposto nell'utero materno, sia per scopi medici che non.

Sostituzione nucleare - Si è ormai scoperto che i nuclei di cellule altamente differenziate possono ritornare ad essere completamente indifferenziate e quindi totipotenti se inserite in un ovocita. Per cui è possibile mettere in un ovocita di pecora o di donna un nucleo di un individuo vivo o morto anche da moltissimi anni (vedi mummie egiziane). Si potrebbe ottenere così la fotocopia di un individuo adulto. Infatti il nucleo della cellula di adulto sdifferenziandosi completamente assume la totipotenzialità delle cellule dell'embrione nelle sue fasi iniziali di sviluppo. Si formano così le cosiddette cellule staminali che esistono già parzialmente differenziate in piccolissime quantità in ogni tessuto di individuo adulto (cellule multipotenti) e che sono necessarie alla ricostituzione parziale degli organi. In questo caso noi potremmo produrre miliardi di cellule staminali autologhe per l'individuo fornitore del nucleo e queste cellule staminali sono ancora più sdifferenziate e quindi totipotenti. Queste cellule è prevedibile che possano essere indirizzate alla differenziazione verso cellule di vari organi e quindi possano essere immesse negli organi affetti da processi degenerativi dell'individuo che ha fornito il nucleo originario, senza la minima reazione di rigetto. Questa è quella che è stata chiamata, impropriamente, la via italiana alla formazione di cellule staminali. Con la sostituzione nucleare si potrebbero far rivivere individui colpiti da malattie inguaribili, per esempio bambini leucemici, oppure individui del passato di particolari capacità somatopsichiche. E' intuitivo che la similitudine genetica non significa uguaglianza fenotipica o di sviluppo psichico.

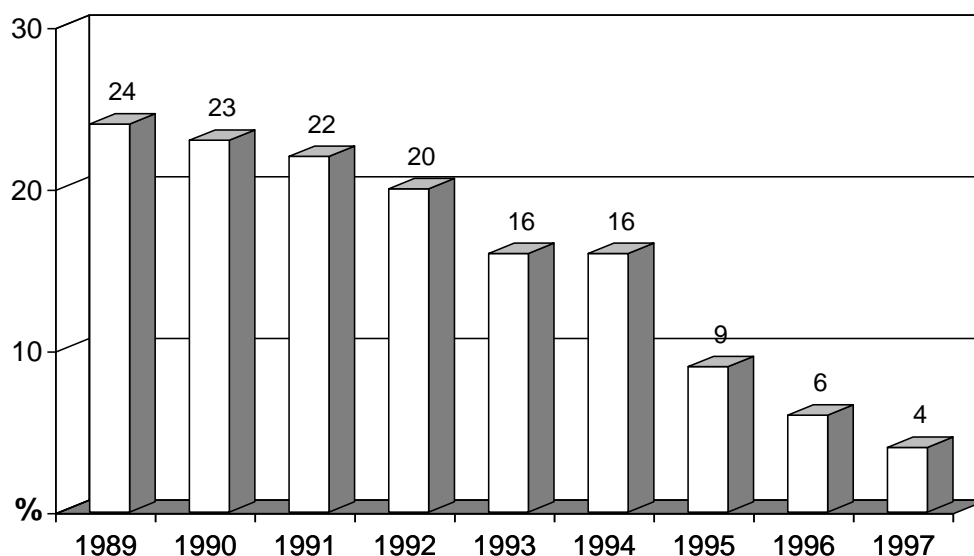
GIFT – LA TERZA VIA DELLE ART

A differenza delle altre due tecniche, in cui la medicina si sostituisce al processo riproduttivo, il GIFT (Gamete Intra Fallopian Transfer) porta solo un aiuto al processo di fecondazione e pertanto finora non sembra costituire una tecnica eticamente non accettabile. Il suo uso negli anni è andato sempre più diminuendo per almeno tre ordini di motivi: 1) la tecnica è invasiva, infatti il trasferimento dei gameti usualmente avviene per mezzo di una laparoscopia; 2) necessita di una équipe capace di effettuare con tranquillità una laparoscopia; 3) i migliori successi che si avevano in passato rispetto alle altre ART si sono progressivamente ridotti per il migliorare dei risultati ottenuti con la FIVET e con la ICSI. Per esempio nei dati U.S.A. 1997 i parti per ritrovamento di cicli FIVET è del 28%, nei cicli GIFT del 30% (12). Per cui negli anni è andato diminuendo in numero di GIFT effettuati per cento FIVET e contemporaneamente si è ridotto il delta dei risultati ottenibili con GIFT rispetto alle FIVET (fig. 6 e 7).

Fig. 6 - Utilizzazione tecniche IVF-ET e GIFT in U.S.A. e Canada
Variatione percentuale annua rispetto al 1989 (=100)



**Fig. 7 - Incidenza percentuale dei GIFT rispetto alle IVF-ET
- dati U.S.A. e Canada -**



Tuttavia nel 1997 negli U.S.A e Canada sono stati effettuati 1.993 cicli GIFT (12) e nel 1993 in tutto il mondo 11.877 (2). Le indicazioni e le controindicazioni sono riportate nella tabella 5.

Tab. 5 - Indicazioni e controindicazioni all'utilizzazione della tecnica GIFT

Indicazioni
<ul style="list-style-type: none"> • <u>Sterilità sine causa</u> • Endometriosi grave (III e IV stadio AFS) con pervietà di almeno una tuba • Lieve oligo o astenospermia • Sindrome aderenziale pelvica con almeno una tuba pervia • Sindrome della luteinizzazione follicolare (LUF-Sindrome) • Fallimenti di precedenti ripetute inseminazioni (IUI o IPI) • Ovodonazione
Controindicazioni
<ul style="list-style-type: none"> • <u>Tube chiuse</u> • Mancanza di ovaie (da intervento chirurgico o congenita: sindrome di Turner, ecc.) * • Patologia uterina che rende impossibile l'inizio e il proseguimento di una gravidanza (fibromi, malformazioni, mancanza congenita o acquisita, ecc.) ** • Patologia di apparati che rendono impossibile o pericolosa una gravidanza (cardiopatie, nefropatie, ecc.) **

* Risolvibile con ovodonazione

** Risolvibile con madre surrogata

La preparazione all'esecuzione del GIFT è identica che per le altre due ART. Al momento opportuno, quando la maturazione follicolare è giudicata sufficiente, dopo circa 36 ore dallo stimolo ovulatorio dell'HCG, si effettua una laparoscopia, che spesso ha anche valore diagnostico trattandosi di donne sterili e che comunque consente il recupero degli ovociti. Anche in questo caso si selezionano gli ovociti più maturi e questi, nel numero di 2 o 3, insieme agli spermatozoi, nel numero di 200-700 mila, vengono riposti in ogni tuba in un volume totale di 30-50 μ ml. Usualmente il trasferimento avviene in tutte e due le tube, quando questo è possibile.

Risultati - I risultati sono condizionati da vari fattori quali la risposta della donna alla stimolazione ovarica, dall'età della paziente, dalle indicazioni al GIFT, dal numero di ovociti trasferiti, dalla durata della sterilità, dalla qualità dei gameti maschili e femminili trovati, dall'eventuale congelamento e successivo utilizzo degli ovociti e degli embrioni nei cicli successivi. I risultati da noi ottenuti in circa 10 anni sono riportati nella tabella 6 (32). In essa risulta che nella sterilità sine causa abbiamo circa il 32% di gravidanze cliniche per cicli iniziati e il 25% di parti per cicli con trasferimento, mentre tale percentuale è fortemente diminuita nelle coppie con patologia maschile (15 e 13% rispettivamente). Nella nostra casistica il 58% delle coppie era affetta da patologia maschile isolata o congiunta a patologia femminile poiché, per problemi etici, molte delle coppie da noi trattate non accettavano di effettuare altri tipi di ART. Questo incide i nostri risultati globali che sono stati per le gravidanze il 22% e per i parti il 16% di tutti i cicli iniziati. È importante sottolineare che malgrado questa spiccata diminuzione nei risultati ottenuti nelle coppie con sterilità maschile, la percentuale di aborti nei differenti tipi di sterilità maschile, femminile e mista è praticamente sovrapponibile. Questo dovrebbe significare che la gravidanza in caso di patologia maschile ha difficoltà ad insorgere, ma una volta iniziata ha gli stessi rischi che nelle altre gravidanze.

Il GIFT può essere effettuato anche per via transcervicale previa aspirazione degli ovociti ecoguidata. Tuttavia i risultati non sono stati né costanti né incoraggianti per cui si è finito con il non utilizzare questa possibilità. Alcuni effettuano il GIFT o la ZIFT insieme alla FIVET ottenendo in questo modo risultati percentuali ancora migliori. Tuttavia questo accoppiamento è poco utilizzato perché comporta un duplice impegno per l'équipe medica. Recentemente è in uso accoppiare l'utilizzo del GIFT ad una laparoscopia diagnostica o ad una minilaparoscopia.

Anche nel caso del GIFT è possibile che lo si effettui in modo eterologo, usualmente utilizzando il seme di un donatore, ma questa possibilità è scarsamente utilizzata.

Tabella 6 - Risultati GIFT nell' U.C.S.C. (anni 1987-97)

A - CICLI INIZIATI		785
1 - Sterilità sine causa	322 (41%)	
2 - Patologia maschile	220 (28%)	
3 - Patologia maschile e femminile	157 (20%)	
4 - Altro	86 (11%)	
B - CICLI CON RITROVAMENTO		698 (89% A)
<i>Cancellati per risposta non ottimale alla stimolazione</i>	16 (2% A)	
Sterilità sine causa	7	
Patologia maschile	4	
Patologia maschile e femminile	2	
Altro	3	
<i>Cancellati per spiccata patologia seminale al momento del GIFT</i>	32 (4% A)	
Sterilità sine causa	0	
Sterilità maschile	18	
Sterilità maschile e femminile	12	
Altro	2	
<i>Cancellati per follicoli vuoti</i>	39 (5% A)	
Sterilità sine causa	18	
Sterilità maschile	10	
Sterilità maschile e femminile	8	
Altro	3	
1 - Sterilità sine causa	297 (92% A1)	
2 - Patologia maschile	188 (85% A2)	
3 - Patologia maschile e femminile	135 (86% A3)	
4 - Altro	78 (91% A4)	
C - CICLI CON TRASFERIMENTO		696 (89% A)
<i>Trasferimento impossibile per non viabilità delle tube</i>	2 (0.3% B)	(99.7% B)
1 - Sterilità sine causa	297 (92% A1)	
2 - Patologia maschile	188 (85% A2)	
3 - Patologia maschile e femminile	135 (86% A3)	
4 - Altro	76 (88% A4)	
D - GRAVIDANZE CLINICHE		174 (22% A)
1 - Sterilità sine causa	102 (31.6% A1)	(25% B)
2 - Patologia maschile	33 (15% A2)	(25% C)
3 - Patologia maschile e femminile	15 (10% A3)	
4 - Altro	24 (28% A4)	
E - ABORTI		50 (28% D)
1 - Sterilità sine causa	29 (28% D1)	
2 - Patologia maschile	9 (27% D2)	
3 - Patologia maschile e femminile	5 (33% D3)	
4 - Altro	7 (29% D4)	
F - PARTI		123 (16% A)
1 - Sterilità sine causa	73 (72% D1) (25% C)	(18% B e C)
2 - Patologia maschile	24 (73% D2) (13% C)	(71% D)
3 - Patologia maschile e femminile	10 (67% D3) (7% C)	
4 - Altro	16 (67% D4) (21% C)	
G - PARTI SINGOLI		105 (85% F)
Parti gemellari	16 (89%)	
Parti trigemini	2 (11%)	
Parti plurimi	-	
H - GRAVIDANZE ECTOPICHE		1 (1% F)
1 - Sterilità sine causa	-	
2 - Patologia maschile	-	
3 - Patologia maschile e femminile	-	
4 - Altro	1	
I - NEONATI CON MALFORMAZIONI		

CONCLUSIONI - Le tecniche di procreazione assistita (ART) hanno rivoluzionato negli ultimi 25 anni le possibilità terapeutiche della sterilità. Esse hanno consentito di dare figli a coppie che sarebbero rimaste altrimenti sterili. Hanno promosso un enorme slancio nello studio e nelle conoscenze della fisiopatologia della riproduzione, ma hanno anche permesso, nelle due tecniche FIVET ed ICSI, di "maneggiare" l'embrione nelle sue prime fasi di sviluppo, permettendo possibilità insperate alla medicina diagnostica e terapeutica. Nei prossimi anni l'ingegneria genetica potrà ottenere risultati eclatanti nella guarigione di malattie ereditarie su base genetica. Tuttavia ha permesso anche possibili interferenze variamente finalizzate nella fase iniziale dello sviluppo dell'essere umano e contemporaneamente un grosso spreco di embrioni e quindi di vite umane. Questo ha dato sviluppo ad una nuova disciplina, la bioetica, che cerca di interpretare e controllare sotto il profilo morale tutte le opportunità rese possibili dalle ART, ma questo sarà sviluppato da altri Autori. Si vuole infine ricordare che non tutto ciò che è possibile fare è lecito realizzare.

Bibliografia

- 1) Steptoe P.C. and Edwards R.G.. Birth after the reimplantation of human embryo. The Lancet, August 12, 1978.
- 2) International Working Group for Registers on Assisted Reproduction by J. de Mouzon and P. Lancaster. World Collaborative Report 1993. 15th World Congress on Fertility and Sterility. Montpellier, September 17-22, 1995.
- 3) Medical Research International and the Society for Assisted Reproductive Technology, The American Fertility Society. In vitro fertilization-embryo transfer in the United States: 1988 results from the IVF-ET Registry. Fertil. Steril. 53: 13, 1990.
- 4) Medical Research International, Society for Assisted Reproductive Technology, The American Fertility Society. In vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET) in the United States: 1989 results from the IVF-ET Registry. Fertil. Steril. 55: 14, 1991.
- 5) Medical Research International, Society for Assisted Reproductive Technology (SART), The American Fertility Society. In vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET) in the United States: 1990 results from the IVF-ET Registry. Fertil. Steril. 57: 15, 1992.
- 6) Society for Assisted Reproductive Technology, The American Fertility Society. Assisted reproductive technology in the United States and Canada: 1991 results from the Society for Assisted Reproductive Technology generated from The American Fertility Society Registry. Fertil Steril. 59: 956, 1993.
- 7) The American Fertility Society, Society for Assisted Reproductive Technology. Assisted reproductive technology in the United States and Canada: 1992 results generated from The American Fertility Society/Society for Assisted Reproductive Technology Registry. Fertil Steril. 62: 1121, 1994.
- 8) Society for Assisted Reproductive Technology, American Society for Reproductive Medicine. Assisted reproductive technology in the United States and Canada: 1993 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology Registry. Fertil Steril. 64: 13, 1995.

- 9) Society for Assisted Reproductive Technology and The American Society for Reproductive Medicine. Assisted reproductive technology in the United States and Canada: 1994 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology Registry. *Fertil Steril.* 66: 697, 1996.
- 10) Society for Assisted Reproductive Technology and The American Society for Reproductive Medicine. Assisted reproductive technology in the United States and Canada: 1995 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology Registry. *Fertil Steril.* 69: 389, 1998.
- 11) Society for Assisted Reproductive Technology, The American Society for Reproductive Medicine. Assisted reproductive technology in the United States: 1996 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology Registry. *Fertil Steril.* 71: 798, 1999.
- 12) SART Registry. Assisted reproductive technology in the United States: 1997 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology Registry. *Fertil Steril.* 74: 641, 2000.
- 13) Trounson A., Mohr L. Human pregnancy following cryopreserved, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 305: 707, 1983
- 14) Zeilmaker G.H., Alberda A.T., Van Gent I., Rijikmans C.M.P.M. Dro-Gendij A.C. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil. Steril.* 42: 293, 1984.
- 15) Quinn P., Kerin J.S., Warnes G.M.. Improved pregnancy rates in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil. Steril.* 44: 493-498, 1985.
- 16) Gordon J.W., Grunfeld L., Garrisi G.J., Talansky B.E., Richards C., Laufer N. Fertilization of human oocyte by sperm from infertile males after zona pellucida drilling. *Fertil. Steril.* 50: 68, 1998.
- 17) Feichtinger W., Strohmer H., Fuhrberg P., Radivojevic K., Antinori S., Pepe G. et al. Photoablation of oocyte zona pellucida by erbium-yag laser for in vitro fertilization in severe male infertility. *Lancet* 339: 811, 1992.
- 18) Malter H.E., Cohen J. Partial zona dissection of human oocyte: a non traumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. *Fertil. Steril.* 51: 139, 1989.
- 19) Bongso A., Fong C.Y.. The effect of coculture on human zygote development. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 5: 585-593, 1993.
- 20) Ménéz Y.J.R., Guerin J.F., Czyba J.C.. Improvement of human early embryo development in vitro by coculture on monolayers of vero cells. *Biol. Reprod.* 42: 301-306, 1990.
- 21) Cohen J., Alikani M., Trowbridge J., Rosenwaks Z.. Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis. *Hum. Reprod.* 7: 658-691, 1992.
- 22) Devroey P., Braeckmans P., Smits J. et al. Pregnancy after translaparoscopic zygote intra-Fallopian transfer in a patient with sperm antibodies. *Lancet*, i, 1329, 1986.
- 23) Ménéz Y.J.R., Janny L. Is there a rationale for tubal transfer in human ART? *Hum. Reprod.* 11: 1818, 1996.
- 24) Palermo G., Joris H., Derde M.P. et al. Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* 59: 826, 1993.
- 25) The ESHRE Capri Workshop Group (1995). Infertility revisited: The states of the art today and tomorrow. *Hum. Reprod.* 11: 1779, 1996.

- 26) Liebaers I., Bonduelle M., Van Assche E. et al. Sex chromosome abnormalities after intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 346: 1095, 1995.
- 27) Palermo G.D., Cohen J., Rosenwaks Z. Intracytoplasmic sperm injection: a powerful tool to overcome fertilization failure. *Fertil. Steril.* 65: 899, 1996.
- 28) Kupker W., Al Hasani S., Schulze W., Kuhnel W., Schill T., Felberbaum R., Diedrich K. Morphology in intracytoplasmic sperm injection: preliminary results. *J. Assist. Reprod. Genet.* 12: 620, 1995.
- 29) Wennerholm U.B., Bergh C., Hamberger L., Nilsson L., Reismer E., Wennergren M., Wikland M. Obstetric and perinatal outcome of pregnancies following intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 11: 1113, 1996.
- 30) Los F.J. Increased incidence of cytogenetic abnormalities in chorionic villus samples from pregnancies established by in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET). *Prenat. Diagn.* 15: 975, 1995.
- 31) Bonduelle M., Aytöz A., Wilikens A., Buysse A., Van Assche E., Devroey P., Van Steirteghem A., Liebaers I. Genetic problems and congenital malformations in 4987 ICSI children. *Hum. Reprod.* 13 (Abs Book 1): 108, 1998.
- 32) N. Garcea. *La riproduzione assistita. Da Louise Brown ad oggi.* Verduci Editore, 1999.

Figura 5 - A, Fissazione dell'ovocita con pipetta per mezzo di blanda aspirazione.
B, Iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo.

