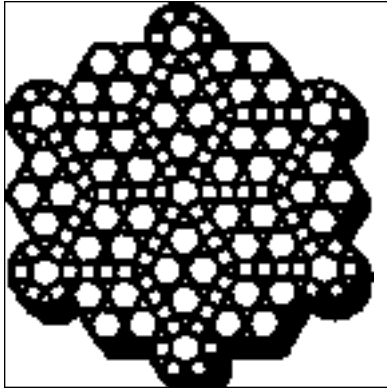
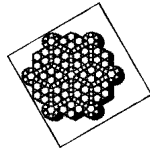


# Caleidoscopio

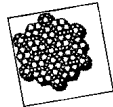
*Italiano*



**Gaetano Guastella**  
**Eleonora Cefalù**  
**Matilde Carmina**



## **La fecondazione in vitro**



**Direttore Responsabile**  
**Sergio Rassu**

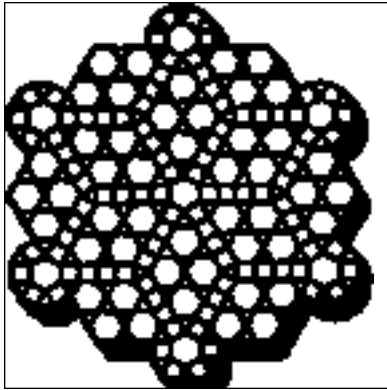


---

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401  
Stampato a Genova 1988

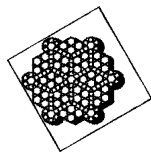
# Caleidoscopio

*Italiano*

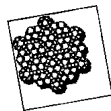


**Gaetano Guastella**  
**Eleonora Cefalù**  
**Matilde Carmina**

Clinica Ostetrica e Ginecologica - Università degli Studi e  
divisione di ostetricia e ginecologia Ospedale "V. Cervello"  
Palermo



## La fecondazione in vitro



Direttore Responsabile  
**Sergio Rassu**



---

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401  
Stampato a Genova 1988

## ISTRUZIONI PER GLI AUTORI

**INFORMAZIONI GENERALI.** *Caleidoscopio* pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'*International Committee of Medical Journal Editors*. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, redatte secondo le regole della Collana.

**TESTO.** La monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi e chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare proprie opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte. Si prega di dattilografare su una sola facciata del foglio formato A4 con margini di almeno 25 mm. Usare dovunque doppi spazi e numerare consecutivamente. Ogni sezione dovrebbe iniziare con una nuova pagina.

**FRONTESPIZIO.** Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, conciso ma informativo, la Clinica o Istituto cui dovrebbe essere attribuito il lavoro, l'indirizzo, il nome e l'indirizzo dell'Autore (compreso telefono, fax ed indirizzo di E-mail) responsabile della corrispondenza.

**BIBLIOGRAFIA.** Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'Index Medicus e lo stile illustrato negli esempi:

1) Björklund B., Björklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. A preliminary report. *J. Nucl. Med. Allied. Sci* 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.

2 Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): *The Endocrine Hypothalamus*. London. Academic Press, 1978.

Le citazioni bibliografiche vanno individuate nel testo, nelle tabelle e nelle legende con numeri arabi tra parentesi. La Redazione è collegata on-line con le più importanti Banche Dati (Medline, Cancerlit, AIDS etc) e fornisce ogni eventuale assistenza agli Autori.

**TABELLE E FIGURE.** Si consiglia una ricca documentazione iconografica (in bianco e nero eccetto casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di citazione nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento, il nome dell'Autore ed il numero. Le figure realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, se ridotti, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro e dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro. Titoli e spiegazioni dettagliate appartengono alle legende, non alle figure stesse.

Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le figure e le tabelle.

**UNITÀ DI MISURA.** Per le unità di misura utilizzare il sistema metrico decimale o loro multipli e nei termini dell'International system of units (SI).

**ABBREVIAZIONI.** Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

**PRESENTAZIONE DELLA MONOGRAFIA.** Riporre le fotografie in busta separata, una copia del testo e dei grafici archiviati su un dischetto da 3.5 pollici preferibilmente Macintosh.

Il dattiloscritto originale, le figure, le tabelle, il dischetto, posti in busta di carta pesante, devono essere spediti al Direttore Responsabile con lettera di accompagnamento. L'autore dovrebbe conservare una copia a proprio uso. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cinquanta copie della monografia. Inoltre l'Autore avrà l'opportunità di presentare la monografia nella propria città o in altra sede nel corso di una serata speciale.

L'Autore della monografia cede tutti i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera, così come previsti dagli artt. 12 e segg. capo III sez. I L. 22/4/1941 N. 633, alla Rivista *Caleidoscopio* rinunciando agli stessi diritti d'autore (ed acconsentendone il trasferimento ex art. 132 L. 633/41). Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al Direttore Responsabile al seguente indirizzo:

**Dott. Sergio Rassu**  
**Via Pietro Nenni, 6**  
**07100 Sassari**

# Caleidoscopio

*Italiano*

## Editoriale

Per questo volume sulla fecondazione artificiale abbiamo invitato il gruppo di lavoro della Clinica Ostetrica e Ginecologica dell'Università di Palermo e della Divisione dell'Ospedale V. Cervello diretto dal Professor Ettore Cittadini.

Questo gruppo occupa un posto di avanguardia in Italia nel campo della fecondazione assistita riuscendo, pur con le innumerevoli difficoltà imposte dal nostro sistema sanitario nazionale e dalle problematiche sollevate dalla mancanza di legislazione ad inserirsi tra gruppi avanzati europei e mondiali.

Lo scopo di questo volume è proprio quello di fornire l'opportunità di valutare in modo globale e critico il problema e riflettere sulle problematiche mediche, legislative ed etiche che questi temi sollevano. Riteniamo l'acquisizione di una "cultura" su questi problemi assolutamente indispensabili per tutti i medici. La disponibilità di queste nuove possibilità ci sta trovando impreparati. Il rischio è quello di trovarsi investiti dallo sviluppo di queste tecniche e rimanerne coinvolti prima ancora di capirne tutti gli aspetti del possibile impatto sul nostro futuro che ormai è dietro l'angolo e non solo opera di uno scrittore di fantascienza.

L'affascinante avventura di questo gruppo, nel settore, ha inizio nel Marzo 1982, il primo in senso assoluto in Italia, con un programma di fecondazione *in vitro* ed embrio transfer che si è concretizzato nella nascita, il 18 Maggio 1984, della prima bambina concepita in provetta in Italia.

Dal gennaio 1985 il gruppo ha esteso i Suoi interessi ed attività ad una nuova tecnica di concepimenti assistiti: il trasferimento tubarico dei gameti, proposto in sede di realizzazione in campo umano da Riccardo ASCH sulla base di sperimentazioni precedentemente eseguite su animali di specie diverse.

Nell'Ottobre 1985 nasceva il primo bambino concepito mediante ilGIFT. Nel Marzo 1986 sperimentava, per primo in Italia, una tecnica di fecondazione intraperitoneale e nel Febbraio 1987 nasceva il primo bambino concepito con questa tecnica.

Nel Gennaio 1986, sempre primo in Italia, applicava la tecnica di congelamento embrionale e nel Maggio 1987 nasceva la prima bambina dopo due reinserimenti differiti nell'utero materno in embrioni congelati e scongelati.

I risultati globali sono rappresentati da circa 300 gravidanze ottenute dai

programmi FIV-ET e GIFT e 200 di esse si sono felicemente concluse. Più difficile è la valutazione della tecnica del/a fecondazione intraperitoneale con centinaia di casi eseguiti mensilmente.

Tutto questo grazie alla stretta collaborazione di dodici ginecologi, sei biologi ed un chimico oltre al personale di coordinazione che hanno ottenuto dei risultati di assoluto prestigio per la ricerca scientifica italiana nel mondo.

Ringrazio quindi vivamente tutta la Scuola del Professor Ettore Cittadini per aver accettato di preparare questa monografia che non potrà che rappresentare l'opportunità di un attento studio di questi temi per molti di noi.

Due precisazioni in fine sul Concorso Fotografico. La prima è che il termine ultimo per la presentazione delle è stato spostato al 30 Settembre 1988. La seconda, in risposta a numerose telefonate di chiarimento sul tema (La medicina è vita), è che questo va inteso nel senso più ampio ed è quindi difficile dare indicazioni che ne restringano il significato che ciascun medico, con la propria esperienza saprà dare. Potrà trattarsi del concetto dell'evoluzione e del progredire della Medicina, del Suo cammino avendo per fine l'uomo, potrà essere rappresentato dal progresso nel controllo del dolore, potrà ancora essere la comprensione dell'importanza del rapporto umano profondo e della solidarietà tra medico e paziente e mille altre fonti di suggestione cui attingere. Per qualsiasi chiarimento ulteriore i lettori possono comunque telefonarci, siamo a completa disposizione.

**Sergio Rasso**

## La fecondazione *in vitro* con transfer dell'embrione

La storia della fecondazione *in vitro* con transfer dell'embrione (FIV/ET), ha inizio attorno al 1969/70 ad opera di due gruppi di ricercatori diversi, senza alcun collegamento scientifico tra loro: il gruppo inglese di Edwards e Steptoe (Cambridge e Manchester) ed il gruppo australiano della Monash University (Lopata, Trounson e Wood).

L'idea originale era quella di trovare una soluzione al problema della sterilità tubarica *definitiva*, riconosciuta come una delle cause maggiori di sterilità coniugale. I due gruppi di ricercatori diedero inizio alle loro ricerche basandosi sulle esperienze, già numerose e promettenti, effettuate da équipes veterinarie di alto livello scientifico che già a quell'epoca avevano compiuto con successo operazioni di transfer di embrioni di animali dopo fecondazione extracorporea.

Il primo tentativo di FIV nella specie umana è stato praticato nel 1973 al Queen Victoria Centre di Melbourne, ma l'embrione non riuscì a sopravvivere fino alla fase utile per il transfer.

Il primo successo totale si è avuto nel luglio 1978 quando all'Oldham General Hospital di Manchester nacque Louise Brown dopo un procedimento di FIV/ET eseguito da Steptoe e Edwards.

Dopo la nascita in Australia di Candice Reed, grandi progressi sono stati effettuati in ogni singola tappa del procedimento.

Attualmente con i nuovi strumenti e procedimenti si ottiene la raccolta di ovociti maturi nel 95% delle pazienti, e la fecondazione nel 90% di esse.

E' ancora la fase del transfer embrionario quello che causa il maggior numero di fallimenti.

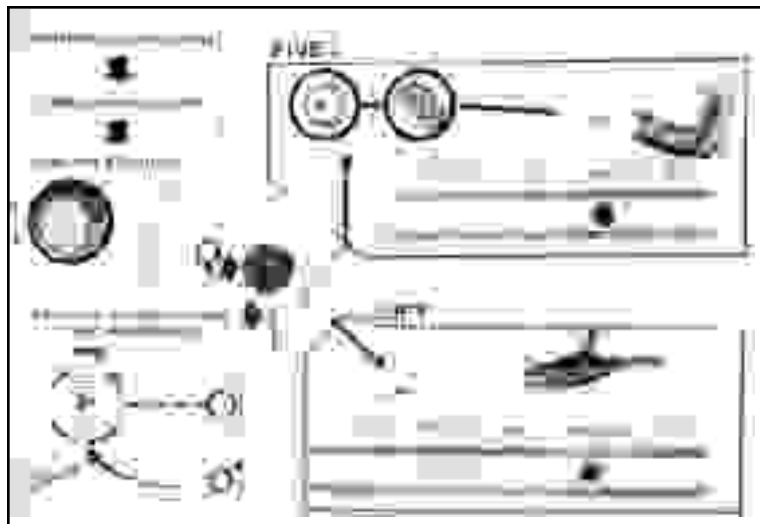
Negli anni successivi ai primi tentativi, le indicazioni alla FIV/ET si sono estese ad altre situazioni cliniche: la sterilità detta idiopatica, la maggior parte delle sterilità su base immunologica, la sterilità associata ad endometriosi, nonché le condizioni di oligospermia o di oligoastenospemia.

Questa estensione delle indicazioni cliniche ha preso vigore dalla constatazione che, benchè la percentuale di successi, come vedremo, non è a tutt'oggi molto elevata, le condizioni per la sua applicabilità sono d'altro canto molto semplici e riguardano: la presenza di almeno un ovaio funzionante, oppure di un ovaio la cui funzionalità può essere indotta nei casi di amenorrea o di oligoamenorrea e/o di anovularietà; di un utero con caratteristiche normali e privo di sinechie e di uno sperma fertile, privo di infezioni batteriche o virali.

La FIV/ET inoltre consente significative applicazioni in molti campi di ricerca quali l'infertilità maschile, la contraccezione, le neoplasie (origine biologica del corion-carcinoma), i fattori regolanti la maturazione dell'ovocita, i fattori che regolano l'impianto ed altri.

Se la FIV/ET ha oggi suscitato in tutto il mondo, malgrado la indubbia complessità del trattamento, un così vasto interesse, ciò è dovuto alla scarsità di alternative che si pongono per queste pazienti, specie nei casi di sterilità di origine tubarica.

Negli ultimi anni con l'applicazione della tecnica del trasferimento tubarico dei gameti (GIFT: gameti intra fallopian transfer) molti gruppi fra i quali il nostro hanno continuato ad utilizzare la FIV/ET solo nei casi di sterilità tubarica mentre hanno utilizzato il GIFT in tutte le altre cause di sterilità (idiopatica, immunologica, da endometriosi, da oligoastenozoospermia ecc.) (Fig. 1).



**Figura 1. Quadro esplicativo dell'esecuzione delle tecniche FIVET e GIFT.**

Successivamente è stata ideata ed utilizzata una tecnica combinata di FIV e GIFT, tale tecnica è stata nominata ZIFT (zygote intra fallopian transfer). Il prelievo ovocitario avviene sotto controllo ecografico mentre il transfer degli zigoti avviene per via laparoscopica. Tale tecnica trova applicazione nei fallimenti del GIFT, allorquando è importante accertarsi dell'avvenuta fecondazione degli ovociti. Si esegue quindi il trasferimento tubarico non più dei gameti ma degli zigoti.

## **Le indicazioni alla FIV/ET e la selezione della pazienti**

### **Fallimento della chirurgia**

Gli insuccessi della chirurgia tubarica sono il motivo più comune per cui le pazienti si rivolgono alla FIV/ET. Uno, due o anche tre pregressi interventi, e di questi una percentuale sempre crescente in microchirurgia, fanno spesso parte del bagaglio anamnestico della paziente.

La microchirurgia può essere usata sia come primo intervento, sia dopo il fallimento della chirurgia convenzionale.

Il fallimento è probabile se la gravidanza non è avvenuta entro 2 anni dall'intervento, è certo se entrambe le tube risultassero occluse al controllo.

In queste circostanze devono essere considerate le varie possibilità, FIV/ET compresa.

### **Intervento chirurgico impossibile**

In pazienti con danno tubarico esteso, soprattutto se determinato da tubercolosi salpingea, non è possibile eseguire una chirurgia riparativa.

Se le pareti tubariche sono ispessite e fibrotiche o eccessivamente sottili, il passaggio dei gameti attraverso le tube è estremamente improbabile anche se il lume è pervio.

Qualche volta le tube sono state rimosse a causa di infezioni gravi o come metodo radicale di sterilizzazione. Se sono stati asportati i tre quarti esterni della tuba non è possibile alcuna riparazione valida.

### **Chirurgia non accettata**

Da una piccola percentuale di pazienti l'intervento chirurgico non è accettato sebbene la coppia desideri risolvere il problema dell'infertilità tubarica.

### **Cause di infertilità sconosciute (Infertilità idiopatica)**

Un esame di routine per l'infertilità che includa l'esame della storia clinica, l'esame fisico, i tests di funzionalità tubarica, il rilievo della temperatura basale, il profilo endocrino, l'analisi seminologica ed il post-coital test, può non rivelare la causa dell'infertilità. E' possibile che vi siano anomalie dei gameti o fattori che inibiscano l'incontro degli stessi.



Molto spesso tali casi di sterilità inspiegata possono essere attribuiti ad una endometriosi infraclinica, malattia che viene oggi considerata come una delle principali indicazioni alla FIV/ET ed al GIFT.

La FIV può essere usata come procedura diagnostica per determinare se anormalità dei gameti o del loro trasporto causino l'infertilità.

Se può essere dimostrato inequivocabilmente per mezzo di ripetuti tests che sia gli spermatozoi che gli ovociti sono anormali e che la fecondazione per la coppia è improbabile si informano i pazienti dell'appropriata alternativa esistente. Nel caso in cui vi sia un difetto dell'ovocita non vi è alcuna terapia, se si esclude la FIV/ET con ovociti di donatrici.

Nel caso invece di difetto dello sperma, la paziente può scegliere di accettare l'embrione fecondato con sperma di donatore, come è già stato sperimentato con successo (Wood et al. 1981); ma se non si ottengono gravidanze viene consigliato di continuare con l'inseminazione artificiale con seme di donatore. Se la fecondazione avviene con lo sperma del marito, ma non si hanno gravidanze dal trasferimento dell'embrione, la coppia è incoraggiata a sottoporsi ad ulteriori cicli di FIV/ET o probabilmente di GIFT o ZIFT.

### **Infertilità maschile**

Si stanno studiando attualmente i limiti della FIV/ET e del GIFT in base alla ridotta qualità del seme. Stabilito che la motilità non sia inferiore al 30% e che gli spermatozoi abbiano una normale attività di progressione e siano morfologicamente normali, si può utilizzare nella FIV/ET e nel GIFT il seme di pazienti oligospermici. Sono state ottenute delle fecondazioni con esito positivo in pazienti con concentrazione spermatica al di sotto di  $5 \times 10^6$  per millilitro o inferiore ad  $1,5 \times 10^6$  per ml. di spermatozoi mobili dopo preparazione del seme con la tecnica standard di centrifugazione e swim-up; l'oligospermia è spesso associata ad una alta incidenza di anormalità spermatica che può ridurre il successo della FIV/ET o del GIFT. Al momento attuale sono state ottenute solo rare gravidanze in pazienti con bassa motilità spermatica.

Nella FIV e nella GIFT può essere usato seme congelato con motilità superiore al 30%.

### **Età delle pazienti**

L'efficacia riproduttiva declina con l'aumentare dell'età e per aumentare il tasso di successi della FIV/ET e del GIFT è necessario che siano escluse dal programma pazienti di età superiore ai 38 anni.

### **Parità**

Le gravidanze precedenti offrono un doppio vantaggio: i fattori contribuenti all'infertilità o al danno tubarico sono improbabili, il transfer dell'embrione nella FIV/ET è facilitato data l'ampiezza del canale cervicale.

### **Stato di salute generale**

La coppia deve essere in grado, sia dal punto di vista emozionale che fisico, di sostenere il programma di FIV/ET, la gravidanza, la nascita e la successiva crescita del bambino. Le coppie infertili spesso soffrono di problemi emotivi che insorgono appunto secondariamente al loro stato di infertilità. Per queste coppie può essere utile un intervento psicologico.

## **Gli accertamenti diagnostici preliminari e la preparazione delle pazienti**

### **L'accertamento dell'ovulazione**

Si esaminano i dati della temperatura basale rilevata in almeno tre cicli per accertarsi che vi sia un'ovulazione regolare, dimostrata dalla bifasicità delle curve. L'adeguata funzionalità del corpo luteo è rilevabile dai dosaggi plasmatici del progesterone nella fase medio-luteale. La possibilità di una iperprolattinemia deve essere esclusa con una serie di dosaggi plasmatici della prolattina. Se vengono riscontrate anovulazioni ed iperprolattinemia, sarà instaurata una terapia adeguata prima di accettare la paziente nel programma FIV/ET.

### **L'esame del liquido seminale**

Il liquido seminale viene esaminato almeno tre volte, a causa delle variazioni dei risultati tra i diversi laboratori. L'ultimo campione deve essere esaminato nel laboratorio associato al centro FIV/ET. Se uno dei campioni non è normale o se il marito ha qualche difficoltà nel produrlo si può congelarlo nel momento in cui risulta soddisfacente. Questo campione potrà sostituire quello ottenuto al momento dell'intervento se quest'ultimo è carente o non prodotto. Se il liquido seminale risulterà infine anormale all'analisi, senza possibilità terapeutiche di miglioramento, si offrirà alla coppia la possibilità di utilizzare il liquido seminale di un donatore.

Oltre alla valutazione dei normali parametri detto spermioγραμμα, bisognerà anche eseguire una coltura del liquido seminale per la rigorosa esclusione di infezioni, anche latenti dello sperma. Una analoga ricerca di infezioni latenti verrà condotta parallelamente sul secreto vaginale della donna con ricerca mirata anche alla esclusione di clamidiasi e micoplasmosi.

### **L'induzione dell'ovulazione**

Malgrado la prima gravidanza nella specie umana con nascita di feto a termine sia stata ottenuta mediante il recupero di un ovocita maturo in un ciclo naturale (Stephoe ed Edwards 1978), tutti i gruppi che lavorano nel campo della fecondazione extra-corporea, ivi incluso il succitato gruppo inglese — hanno ormai riconosciuto l'importanza di una stimolazione ovarica al fine di ottenere più ovociti maturi.

E' merito di Alan Trounson aver dimostrato che ovociti ottenuti dopo stimolazione con citrato di Clomifene possono essere con successo fecondati *in vitro*.

Naturalmente, la stimolazione ovarica comporta dei problemi oltre alle indispensabili esigenze di monitoraggio che citeremo.

In primo luogo è stato dimostrato che i vari metodi di stimolazione riducono notevolmente (dall'89 al 19<sup>0</sup>% circa) la proporzione di follicoli con normale concentrazione steroidea.

Tali anomalie consistono essenzialmente in un eccesso di androgeni ed in una deficienza di progestinici e/o estrogeni.

In alcuni casi questa tendenza può tuttavia essere invertita con: deficienza di androgeni ed eccesso di progestinici ed estrogeni.

I trattamenti di stimolazione modificano anche le concentrazioni dell'FSH nel liquido follicolare. Va, tuttavia, notato che se la percentuale degli embrioni capaci di svilupparsi *in vitro* e la percentuale di transfers di embrioni coronati da successo sembra essere alta nei casi in cui i follicoli aspirati hanno normali livelli steroidei, le differenze non sembrano essere significative, quasi che l'ovocita abbia la capacità di adattarsi ad un ambiente ormonale atipico durante le fasi finali della sua maturazione, senza risentirne in quanto a vitalità.

I vari gruppi di lavoro che hanno messo a punto i vari tempi della fecondazione extracorporea e quelli che successivamente hanno beneficiato di queste complesse puntualizzazioni, si sono imbattuti, come problema prioritario, nella scelta del protocollo di stimolazione e monitoraggio.

In proposito il primo quesito che sorge spontaneo è se adottare un protocollo standard o applicare un trattamento personalizzato.

La seconda ipotesi sarebbe certamente la più conveniente, ma ai fini di una sua attuazione pratica ci si rende facilmente conto di come ciò sia possi-

bile solo nei casi di pazienti accuratamente selezionate i cui cicli siano stati monitorizzati in precedenza per poi decidere la dose ottimale di farmaco durante il ciclo in cui verrà effettuato il prelievo degli ovociti.

Nella nostra esperienza abbiamo, nei primi periodi, indotto l'ovulazione con la sola somministrazione del citrato di Clomifene alla dose di 100 mg al giorno per 5 giorni in rapporto alla lunghezza dei cicli (3° - 7° giorno o 5° - 9°). Il controllo dello sviluppo e della maturità follicolare è stato eseguito mediante ecografie giornaliere, dosaggio giornaliero del 17 Beta Estradiolo ed essenzialmente con la ricerca del picco dell'LH.

Successivamente abbiamo associato alla somministrazione del citrato di Clomifene la somministrazione dell'HMG, prima 150 U. al 6°, 8° e 10° giorno del ciclo, dopo abbiamo preferito somministrare giornalmente 150 U. di HMG dal 6° giorno in poi. L'induzione dell'ovulazione veniva praticata con la somministrazione di 5000 U. di HCG.

La somministrazione del citrato di Clomifene frequentemente era causa di ovulazioni precoci, o di luteinizzazioni follicolari. Abbiamo quindi abbandonato tale schema terapeutico e lo abbiamo sostituito con la somministrazione di 300 U. di FSH purificato al 3° e 4° giorno del ciclo (150 U. al mattino e 150 alla sera). Dal 5° giorno in poi abbiamo somministrato 150 U. di HMG al dì. L'induzione dell'ovulazione veniva eseguita con la somministrazione di 10.000 U. di HCG.

Nel 1987 abbiamo preferito bloccare l'attività ipofisaria mediante somministrazione di Buserelin e successivamente somministrare HMG come si evidenzia nello schema riportato.

SUPREFACT iniettabile. 0,3 ml sottocute la mattina e la sera (preferibilmente alla stessa ora) continuativamente dal 2° giorno del ciclo in poi.

PERGONAL 500 fiale. 3 fiale la sera alle ore 21.00 dal 3° al 6° giorno del ciclo successivo.

Continuare con 2 fiale dal 7° giorno in poi.

## Il monitoraggio della fase preovulatoria

Il monitoraggio della fase preovulatoria è certamente una delle fasi che richiede maggiore cura ed attenzione: la necessità di ottenere giornalmente informazioni riguardanti la modalità di crescita follicolare coinvolge interamente l'equipe che partecipa al programma. Preferiamo dividere questo capitolo in vari paragrafi: parleremo del monitoraggio ultrasonografico, di quello endocrino e della valutazione dei parametri clinici.

### a) Ecografia

La prima difficoltà che può insorgere al momento dell'ecografia è quello del reperimento dell'ovaio: spesso il reperire ecograficamente le ovaie di pazienti a cui sono state asportate le salpingi presenta difficoltà notevoli. A causa dell'asportazione della tuba, infatti, l'ovaio perde la sua posizione originale nello scavo pelvico per la perdita di parte del suo apparato di sostegno. Vi possono essere due condizioni: l'ovaio si può reperire in alto, agli "angoli di visione" ecografici delle pelvi, al limite dei muscoli psoas per l'azione di stiramento da parte del suo legamento infundibolo pelvico, oppure può scivolare posteriormente nel cavo del Douglas per eccessiva lassità dello stesso.

Nel primo caso è necessario l'uso di ecografo munito di sonda rotante e di dimensioni ridotte; l'uso di una sonda lineare è certamente più svantaggiosa perché non permette l'esplorazione degli "angoli pelvi".

Nel secondo caso, invece, si deve usare un ecografo ad alta risoluzione dell'immagine per permettere un maggior contrasto e quindi la visualizzazione dei setti di divisione interfollicolare.

All'ecografista è dovuta inoltre la distinzione, spesso non semplice, tra i follicoli cistici residui, idrosalpingi e cisti dell'idatide del Morgagni.

La dimostrazione di mancato accrescimento giornaliero può indirizzare verso la diagnosi di una di queste condizioni. Inoltre con l'ecografia va dimostrata la regolarità di crescita giornaliera dei follicoli (aumento diametrico medio e forma rotondeggiante degli stessi) (fig. 2).

All'ecografia il follicolo si presenta come una immagine cistica inserita nel contesto ovarico, di dimensioni progressivamente crescenti (a seconda delle casistiche riportate o dei singoli casi) che raggiungono diametri variabili da 17 a 25 mm. In seguito dopo lo scoppio del follicolo, si assiste alla formazione del corpo luteo, riconoscibile per le dimensioni inferiori ed i margini frastagliati. Si può prevedere imminente il picco di LH quando il diametro follicolare ha raggiunto 17 mm.

Le correlazioni tra i valori di estradiolo e crescita follicolare nei cicli stimolati ed a crescita multipla non sono così lineari come nei cicli mono o bifollicolari.

In questi casi si nota una indipendenza dei due parametri per una discreta percentuale di falsi positivi o negativi imputabili all'ecografia da un lato, e per la presenza di crescita multipla, non matura, che inficia la secrezione di estradiolo, da un altro lato, che non è uniforme.

Un limite da ascrivere al monitoraggio ultrasonico è costituito dal fatto che follicoli di uguali dimensioni possono avere un contenuto steroideo intrafollicolare diverso, non quantificabile nemmeno con il monitoraggio endocrino, a causa dell'origine tecale dell'E<sub>2</sub> plasmatico.

Secondo la teoria bicellulare della secrezione estrogenica, la quota intrafollicolare è in rapporto con l'attività aromatasica delle cellule della granulosa che non ha corrispettivo plasmatico.

In fase preliminare si deve accertare l'eventualità di scoppi follicolari prematuri o la loro luteinizzazione.

La prima possibilità può essere diagnosticata mediante la visione di una alterazione dei contorni del follicolo ed anche dalla presenza di una falda liquida del cavo del Douglas. La luteinizzazione può essere accertata invece dimostrando la presenza di "echi interni" al follicolo, la perdita del suo contorno regolare, ed inoltre la presenza di una netta immagine di eco endometriale di tipo francamente secretivo (fig. 3).



**Figura 2. Follicoli in normale evoluzione.**



**Figura 3. Reperto di luteinizzazione follicolare con endometrio di tipo secretivo.**

### **b) Rilievi endocrini**

La valutazione giornaliera dei tassi di estrogeni circolanti o di quelli escreti con le urine è tuttora il parametro più accreditato presso la maggior parte dei gruppi di lavoro FIV/ET, ma è anche la più irta di difficoltà.

La necessità di uno screening endocrino preliminare s'impone per tutte le pazienti, anche per quelle con parametri clinici normali.

Casi di alterazioni della secrezione gonadotropinica o della produzione prolattinica possono indurre in errore l'equipe facendo accettare nel programma pazienti le cui possibilità di successo sono ridotte a causa di queste condizioni.

Va quindi prescritto preliminarmente uno studio endocrino del ciclo mestruale per due motivi principali:

- 1) correggere le alterazioni endocrine;
- 2) valutare l'assetto endocrino del ciclo per l'impostazione della terapia di induzione dell'ovulazione.

E' noto infatti come pazienti con alterazioni della secrezione gonadotropinica, quali ad esempio le PCO, vadano incontro, più facilmente di altre, a risposte abnormi utilizzando alcuni farmaci induttori dell'ovulazione. Il monitoraggio giornaliero degli estrogeni col metodo RIA ci dà inoltre un quadro "funzionale della maturità follicolare". I limiti di questi rilievi sono però rappresentati dalla mancanza di dati esatti sui valori critici degli estrogeni in rapporto al numero di follicoli in maturazione. Gli estrogeni possono essere dosati nelle urine come estrogeni "totali" oppure può essere dosato l'estradiolo nel plasma con il metodo radioimmunologico.

Il dosaggio quantitativo degli estrogeni nelle 24 ore, a causa della metodica della raccolta, può dare risultati che riflettono lo stato ormonale dell'ovaio con un ritardo di 16/24 ore. Esso comunque ha il vantaggio, rispetto ad un isolato dosaggio plasmatico, di essere rappresentativo di un tasso di produzione e di non essere quindi soggetto a quelle variazioni ora per ora" che si osservano nel dosaggio plasmatico. A causa del grande range nei livelli degli estrogeni osservati in cicli fertili, i valori isolati sono di scarso aiuto nella previsione del giorno dell'ovulazione, sebbene valori molto al di sopra di quelli basali in fase follicolare precoce possono essere indicativi dell'imminenza dell'ovulazione.

Col dosaggio giornaliero degli estrogeni il picco estrogenico è, di solito, chiaramente identificabile (tipo I 40% dei casi) (Frydman, 1982). In alcune donne comunque può essere osservato un plateau di valori elevati per più di tre giorni, che induce frequentemente a difficoltà di interpretazione (tipo II nel 35%) o, ancora, una diminuzione progressiva prima del picco dell'LH (tipo III nel 17,5% dei casi). Sebbene vi sia un largo range nei picchi di escre-

zione estrogenica in donne diverse, questi sono abbastanza riproducibili in cicli successivi dei singoli casi. La conoscenza delle medie dei tipi precedenti può migliorare notevolmente l'accuratezza nella ricerca del momento dell'ovulazione. E' necessario, inoltre, accennare ai problemi legati al riconoscimento del momento ovulatorio per mezzo della scoperta del picco dell'LH.

Data per scontata la difficoltà di un monitoraggio dei livelli ematici dell'ormone (la fugacità del suo picco infatti impone prelievi di sangue venoso, serati ogni 3 ore, i risultati non potrebbero essere letti in tempo utile usando le comuni metodiche (RIA). Prevalentemente grazie al kit per il dosaggio immunologico dell'LH nelle urine o mediante inibizioni dell'emoagglutinazione si è potuto avere un monitoraggio preciso della fase preovulatoria. Ciò nonostante sono descritti dei falsi positivi che precedono il picco dell'LH plasmatico ed alcuni falsi negativi quando si ha una diluizione dell'urina (importante nelle pazienti sottoposte ad ecografia). Malgrado ciò esiste una buona correlazione tra i dosaggi plasmatici ed urinari ma con un ritardo di comparsa urinaria di circa sei ore. Ciò è legato alla filtrazione renale o all'accumulo nelle vie urinarie.

Il picco LH, con questa metodica, può essere calcolato riferendoci tanto al punto intermedio tra l'ultimo dosaggio inferiore ed il primo superiore, che all'incremento del 200% rispetto ai valori basali.

Malgrado, quindi, la valutazione dell'LH sia il criterio più costante e preciso nella determinazione dell'ovulazione, il carattere variabile del ritardo tra picco ematico reale ed urinario, la cui importanza è scarsa nella pratica quotidiana, può avere serie conseguenze in un programma FIV/ET.

In base a queste considerazioni, per l'alto costo del kit e per la difficile standardizzazione del timing laparoscopico siamo stati indotti ad abbandonare tale monitoraggio.

Un'altra metodica adoperata da alcuni gruppi FIV/ET è il dosaggio plasmatico dell'LH, il cui picco può presentarsi con 4 aspetti:

- 1) rapido ed ampio (61%)
- 2) rapido e di scarsa ampiezza (7%)
- 3) progressivo ed ampio (20%)
- 4) progressivo e di scarsa ampiezza (12%)

La durata totale della scarica è in media di 32 ore (da 24 a 48).

L'analisi della pulsatilità che è più ampia preovulatoria, fino al massimo è pure di difficile interpretazione, in quanto una oscillazione alta può mimare l'inizio del picco.

Inoltre il livello basale è variabile nelle singole pazienti, in base a queste difficoltà si possono trarre delle conclusioni sul picco iniziale, calcolando il 180% del valore medio basale ricavato dalla media dei quattro ultimi prelievi nelle 24 ore rispetto al primo valore alto (Frydman, 1981), o, ancora, valutando l'incremento del 100% rispetto ai valori basali (Djhabakhch, 1981) dopo ciò l'ovulazione segue da 37 a 39 ore.



E' evidente dunque, che un dosaggio lento dell'LH richieda ad esempio un lungo periodo di incubazione, e poco utilizzabile. Un "assay" di questo tipo è stato riportato usando un RIA in "fase solida": questo metodo, sebbene rapido richiede tecniche sofisticate nella programmazione di immuno-assorbenti. Hay et al. hanno sviluppato un RIA per LH di due ore. Il tempo totale dell'esame è stato accorciato usando un'elevata temperatura di incubazione (37 °C) ed una maggiore concentrazione di antisiero che aumenta la capacità legante dell'ormone; i risultati così ottenuti sono stati comparati positivamente con quelli ottenuti con un "assay" ottimale di tre giorni ( $r = 86$ ). Nel nostro laboratorio utilizziamo un RIA per LH di 4 ore.

### c) I parametri clinici

Largamente utilizzati dal gruppo dei Jones a Norfolk presentano anch'essi diversi problemi. Forma, dimensioni ed aspetto dell'orificio uterino esterno, oltre alla qualità ed alle caratteristiche del muco cervicale, sono spesso di valutazione troppo soggettiva per essere applicati routinariamente.

### Osservazioni sul muco cervicale

Il muco endocervicale subisce cambiamenti nelle caratteristiche fisiche e nella quantità durante il ciclo ovulatorio. Il muco è scarso di quantità durante la fase follicolare precoce; ma aumenta di volume e subisce cambiamenti chimico-fisici, che riguardano la sua viscosità e filanza, quando i livelli estrogenici superano i valori basali e nell'approssimarsi del picco preovulatorio dell'LH. I cambiamenti della struttura micellare del muco possono essere osservati esaminando la felpificazione del preparato essiccato.

Sono stati proposti molti metodi di punteggio nella valutazione dei cambiamenti dinamici della qualità del muco. Il picco semplice e riproducibile di questi è quello di Insler et al.

Questi Autori danno un massimo di tre punti rispettivamente:

- a) alla quantità del muco
- b) al diametro dell'orificio cervicale
- c) alla filanza
- d) al ferning test.

Osservazioni giornaliere di questo punteggio cervicale mostrano che la quantità del muco raggiunge un massimo il giorno prima e lo stesso giorno del picco dell'LH. Kering et al. hanno dimostrato che la penetrazione degli spermatozoi nel muco cervicale è ottimale al giorno 0 (picco di LH) e il

giorno prima. Questi Autori osservano un'occasionale breve durata, da 1 a 2 giorni, del muco cervicale favorevole in molte pazienti infertili e sostengono la importanza dell'osservazione giornaliera del muco nel caso in cui si voglia conoscere il giorno di massima fertilità.

D'altra parte un piccolo ma significativo numero di donne infertili può avere un punteggio cervicale massimo da 3 a 4 giorni prima dell'ovulazione motivo per cui non ci si può fidare soltanto del muco cervicale come unico marker di ovulazione. Sebbene il muco cervicale sia correlato con la produzione estrogenica *in vivo*, la sua qualità spesso non mostra correlazione con i livelli estrogenici endogeni in quanto il coefficiente di correlazione tra i punteggi cervicali totali e livelli di estrogeni al giorno 0 è molto basso.

Malgrado la complessità evidente ed il notevole impegno che i vari protocolli di stimolazione e monitoraggio casi sofisticati impongono alla équipe FIV/ET, va ribadito che essi costituiscono l'elemento chiave per ottenere una accettabile percentuale di successo con questa nuovissima e sofisticata tecnica.

## Il pick-up laparoscopico

La laparoscopia ha rappresentato fino a qualche anno fa la tecnica di elezione per la raccolta di ovociti urinari da avviare a fecondazione extracorporea.

Negli ultimi anni, nella grande maggioranza dei casi è stato preferito il prelievo ecografico degli ovociti, tecnica che permette un buon recupero ovocitario e nel contempo è meno invasiva.

Il prelievo laparoscopico continua ad essere eseguito nel trasferimento dei gameti nelle tube (GIFT).

La tecnica laparoscopica non varia molto da quella tradizionale; ricordiamo tuttavia che non si dovrà porre alcuno strumento nella cavità uterina per la mobilizzazione del viscere durante l'esame e che dunque la paziente potrà essere posta sul letto operatorio con le gambe stese come per qualunque intervento ginecologico. Noi usiamo indifferentemente un laparoscopia a 180° o uno a visione obliqua (30-50) con il quale è possibile ispezionare meglio alcune facce dell'ovaio e tener lontano dalla sua superficie l'intestino o l'omento.

Elemento determinante per un buon pick-up è l'accessibilità chirurgica alle ovaie, per cui molti gruppi sono soliti sottoporre le pazienti ad una laparoscopia preliminare al fine di accertare tale accessibilità. Noi abbiamo negli ultimi tempi accantonato tale prassi in considerazione del fatto che l'unica fase della procedura che comporta un sia pur minimo rischio è proprio la laparoscopia. Nei rari casi di assoluta inaccessibilità proponiamo alla

paziente un successivo prelievo ecografico. semprechè non possa essere praticata una viscerolisi al momento stesso della laparoscopia per pick-up.

All'uomo è sempre necessario disporre dello strumentario necessario per le salpingolisi percelioscopiche.

Particolare cura dovrà essere rivolta alle vie di accesso dato che si tratta spesso di pazienti plurioperate. Noi usiamo apporre l'ago da pneumoperitoneo dentro la cicatrice ombelicale e, a pneumoperitoneo instaurato ritrarlo per introdurre il tre quarti del laparoscopio. La pinza per la prensione del legamento sospensore dell'ovaio verrà introdotta nella linea mediana ombelico-pubica alcuni centimetri sopra il monte di Venere, scegliendo un punto avascolare mediante transilluminazione dall'interno della parete addominale. L'ago per il prelievo ovocitario viene introdotto circa 2 cm. più in alto rispetto alla pinza ed 1-2 cm lateralmente ad essa.

Noi usiamo indurre il pneumoperitoneo mediante CO<sub>2</sub>, gas prontamente solubile e con il quale la probabilità di causare sequele emboliche è minore rispetto all'uso dell'azoto. E' stato prospettato che il biossido di carbonio possa essere dannoso per l'ovocita inducendo un'acidosi del liquido follicolare ma dopo che Wood et al. (1981) hanno ottenuto gravidanze con l'uso di questo gas il suo impiego si è generalizzato.

La via di accesso all'ovaio è garantita da un adeguato volume di gas nella cavità peritoneale. Per visualizzare tutte le facce dell'ovaio si agirà sulla pinza applicata sul legamento sospensore dell'ovaio il più vicino possibile all'ovaio stesso. Qualche volta è necessario agire sulla tuba omolaterale e, solo più raramente e dopo aver aspirato più follicoli, sul tessuto ovarico stesso.

**Per la raccolta di ovociti umani** sono stati utilizzati diversi aghi dei quali i più noti sono quelli a doppio cannello di Steptoe ed Edwards e di Craft ed uno mono cannello realizzato da Renou ed utilizzato da tutti i gruppi australiani e da noi stessi (fig. 4). Nella realizzazione di tali aghi è stata presa in considerazione la grandezza dell'ovocita e dell'intero cumulo ooforo e la natura adesiva di tale cumulo, così come la necessità di utilizzare il minimo spazio per i liquidi e la massima velocità di flusso all'interno del sistema. Tale flusso deve essere continuo per minimizzare la turbolenza del liquido ed evitare la possibilità di aderenze dell'ovocita ed i danni derivati dai traumi durante il suo attraversamento. L'ago di Renou è lungo 23 cm, ha un diametro esterno di 2,2 mm ed uno interno di 2 mm. Esso è foderato con una guaina di teflon n. 19 che riduce il lume interno a 1,7 mm. il tubo di teflon, lungo 52 cm., è continuo e passa dentro l'ago attraverso un tappo sterile di silicone in modo tale da permettere il passaggio dell'aspirato follicolare fin dentro il tubo di raccolta.

La punta dell'ago ha un angolo che varia da 45 a 60; l'ago presenta altresì una tacca a 5 mm dalla punta in modo da avere informazioni sulla profondità della sua penetrazione. Gli aghi a singolo cannello sono più dif-

fusi perché agevolano la pratica del flushing. Dopo l'uso l'ago viene lavato più volte con il mezzo di cultura e risciacquato in acqua bidistillata.

L'aspirazione viene effettuata mediante gli impianti generali di aspirazione ai quali sia stato applicato un riduttore intermedio o mediante apposito aspiratore a microregolazione, tra i quali molto valido è quello di Craft da noi usato (fig. 5). La pressione ottimale di aspirazione è tra i 60 ed i 100 mmHg. Si inizia pungendo il follicolo più grosso del primo ovaio e penetrandovi per circa 5 mm (fig. 6). Contrariamente ad altri Autori che consigliano una puntura apicale del follicolo, noi preferiamo pungerlo verso la base perché la puntura apicale, che interessa la zona più erosa determina a volte un foro di dimensioni superiori a quello dell'ago stesso con fuoriuscita di liquido follicolare e possibile perdita dell'ovocita. Inoltre la puntura apicale comporta un maggior rischio di dilasciar l'uovo nel follicolo e di doverlo recuperare mediante lavaggio (o flushing).

L'aspiratore comandato mediante pedale deve essere avviato prima che l'ago penetri nel follicolo in modo da ridurre rapidamente l'innalzamento di pressione intrafollicolare determinata dall'introduzione dell'ago stesso e che potrebbe determinare la rottura del follicolo. Man mano che il follicolo viene aspirato e che la tensione del follicolo si riduce è opportuno creare con l'ago una conca in modo da farci raccogliere il residuo liquido follicolare ed eventualmente rimuovere l'uovo aderito alla parete dell'ago. Con questa tecnica noi abbiamo una percentuale di recupero del 90-95% senza eseguire il flushing.



**Figura 4. Ago di Renou con tubo di teflon, tappo di silicone e provetta di raccolta.**



**Figura 5. Aspiratore di Craft.**

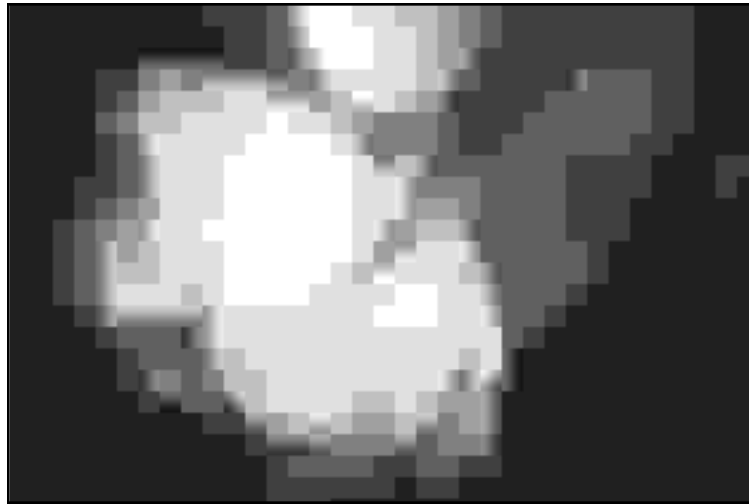
L'aspirazione viene bloccata quando si vede il completo collasso della parete del follicolo.

Se al momento della laparoscopia il follicolo è già scoppiato si può aspirare prima il cavo del Douglas e poi il letto follicolare per tentare di raccogliere l'ovocita. Il reperto occasionale di un follicolo scoppiato in presenza di numerosi follicoli maturi può servire come indicatore della maturità ovarica (fluido follicolare viscoso più strati di corona radiata, etc.). Se in una serie di pazienti non si riscontra mai un follicolo scoppiato, è presumibile che il timing della laparoscopia adottato dal gruppo sia troppo precoce.

Durante l'aspirazione dell'ovocita vi possono essere delle difficoltà. Va tuttavia segnalato che sono state ottenute fecondazioni (e gravidanze) da ovociti aspirati dal Douglas spesso tra aderenze e coaguli ematici. Anche ritardi nei tempi di raccolta dell'ovocita oltre il 50' dall'induzione dell'anestesia si sono accompagnate a gravidanze, ciò conferma che l'uso prolungato di anestesia generale ed il biossido di carbonio intraperitoneale non sono necessariamente dannosi per l'ovocita.

Va infine ricordato che una laparoscopia diagnostica richiede da 10 a 15 minuti per la sua esecuzione, una operatoria da 15 a 30 minuti ma una laparoscopia per prelievo di ovociti può richiedere fino ad un'ora e più.

Per tale motivo la preparazione anestesiológica deve essere del tutto identica a quella per una laparotomia e la paziente deve essere posta sotto monitoraggio continuo per poter cogliere ampiamente gli effetti negativi che possono originare dalla posizione di Trendelenburg, dalla carbossigenazione massima, dal pneumoperitoneo e dal possibile involontario gravare dell'operatore sull'addome della paziente.



**Figura 6.** L'ago di Renou penetra nel follicolo per recuperare l'ovocita.

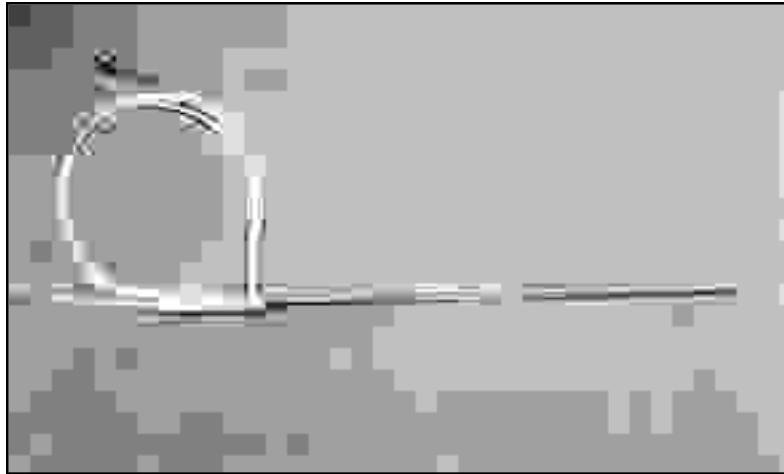
## Il pick-up ecografico

In un primo tempo il prelievo degli ovociti veniva condotto mediante laparoscopia ma adesso a questa tecnica si ricorre per il prelievo ovocitario in corso di un GIFT, di cui parleremo più avanti, o in quei casi in cui l'ovaio si mostra irraggiungibile col metodo ecografico. Non necessitando di anestesia generale, la tecnica di puntura dei follicoli ovarici sotto guida ultrasonografica, si rivela di maggior facilità di esecuzione e di ripetibilità "quasi mensile" rispetto alla laparoscopia.

La paziente viene posta in posizione ginecologica sul lettino operatorio, viene sottoposta ad anestesia locale e cateterizzata, si iniettano in vescica 300 - 400 ml di soluzione fisiologica per consentire una buona ecoriflessione, non appena si localizza il follicolo si inserisce l'ago di aspirazione o per via trans-vaginale o per via trans-uretrale. L'ago di aspirazione è un ago lungo 22,5 cm con un diametro estemo di 1,5 mm, internamente rivestito di teflon che riduce il lume di 1,3 mm (fig. 7).

Nella realizzazione di tali aghi è stata presa in considerazione la grandezza dell'ovocita e dell'intero cumulo ooforo e la natura adesiva di tale cumulo. L'ago è collegato con un aspiratore che viene azionato non appena l'ago va a deformare la parete del follicolo.

Si può seguire l'ago sul monitor durante tutto il suo percorso e lo si può osservare anche all'interno del follicolo grazie all'ecoriflettività della sua punta (fig. 8-9-10).



**Figura 7. Ago di aspirazione per prelievi trans-vaginali.**



**Figura 8. L'ago penetra nel follicolo ed inizia l'aspirazione del liquido.**



**Figura 9.** L'ago viene ritirato per poter penetrare in un altro follicolo.



**Figura 10.** Il follicolo si va collassando per effetto dell'aspirazione esercitata dall'ago.



Sullo schermo ecografico si vedrà quindi il collasso del follicolo e conseguentemente nel tubo di raccolta comparirà il liquido e si potranno effettuare 1 o più lavaggi senza spostare l'ago (fig. 11), successivamente l'ago viene sciacquato nel mezzo di coltura e si procede alla puntura di un altro follicolo. In genere vengono punti i follicoli di diametro superiore ai 15 mm, perché quelli di diametro inferiore non contengono un ovocita maturo e perché l'aspirazione di tutti i follicoli presenti interferisce più pesantemente sulla qualità della fase luteale.

I tassi di recupero di ovociti umani sono abbastanza alti, intorno al 70-75%. L'intervento dura dai 20 ai 30' e la paziente può essere dimessa dopo 3-4 ore, per tornare a ricoverarsi al momento del transfer, cioè 2-3 giorni dopo. Man mano che i follicoli vengono aspirati, le provette contenenti il liquido follicolare e probabilmente l'ovocita, vengono passate al laboratorio di colture cellulari attiguo alla sala operatoria dove il loro contenuto viene versato in una capsula Petri e osservato sotto uno stereo microscopio per il riconoscimento dell'ovocita. Naturalmente queste operazioni vengono effettuate in condizioni di massima sterilità, sotto una cappa a flusso laminare ed evitando sbalzi di temperatura o una troppa lunga esposizione degli ovociti alla luce, in quanto risultano essere fotosensibili (Hirao and Yanagimachi 1978).



**Figura 11.** Attraverso l'ago si inietta mezzo di coltura dentro il follicolo per lavararlo e rimuovere l'ovocita eventualmente adeso alla parete.

## La maturazione dell'ovocita

Nella fecondazione in vitro, il prelievo dell'ovocita umano avviene prima della sua completa maturazione, prima cioè della rottura del follicolo, per cui si parla di ovocita preovulatorio. Questa scelta è dettata dalla necessità di potere aspirare l'ovocita ancora racchiuso nel follicolo e dalla impossibilità di potere trovare l'ovocita quando questo è già fuoriuscito dal follicolo. Prelevare però l'ovocita ad uno stadio di maturazione precoce comporta il rischio, se non si conoscono bene le varie fasi di maturazione, di aggiungere nella fase della fecondazione gli spermatozoi ad un ovocita ancora immaturo, con il risultato che l'ovocita non si feconda, o, se si feconda, lo sviluppo embrionale si arresta alle prime divisioni cellulari, o, se si sviluppa, lo fa in maniera anomala, portando comunque ad un embrione non vitale e che difficilmente si impianterà nell'utero materno.

La morfologia di un ovocita preovulatorio durante la sua maturazione, in un ciclo ovulatorio normale o stimolato con gonadotropine esogene, varia notevolmente.

Si distinguono un nucleo ben visibile (vescicola germinale), i granuli corticali sparsi casualmente all'interno del citoplasma ed una zona pellucida. Attaccati alla zona pellucida vi sono le cellule della corona radiata con delle protuberanze che attraversano la zona pellucida collegandosi direttamente all'ovocita preovulatorio.

Subito dopo l'aumento della concentrazione di LH e dopo l'iniezione di HCG, la vescicola germinale scompare, mentre le cellule del cumulo ooforo hanno perso le loro connessioni con l'ovocita. Procedendo nella maturazione e avvicinandosi il momento dell'ovulazione, i granuli corticali iniziano la loro migrazione verso la periferia dell'ovocita, avviene l'espulsione del primo globulo polare mentre le cellule del cumulo iniziano ad allungarsi ed a muciferare (fig. 12). Al momento dell'ovulazione le pareti del follicolo si tendono sempre più fino alla rottura definitiva che avviene per l'azione di alcuni enzimi che digeriscono, dissolvendolo la teca del follicolo e si ha la dispersione del cumulo.

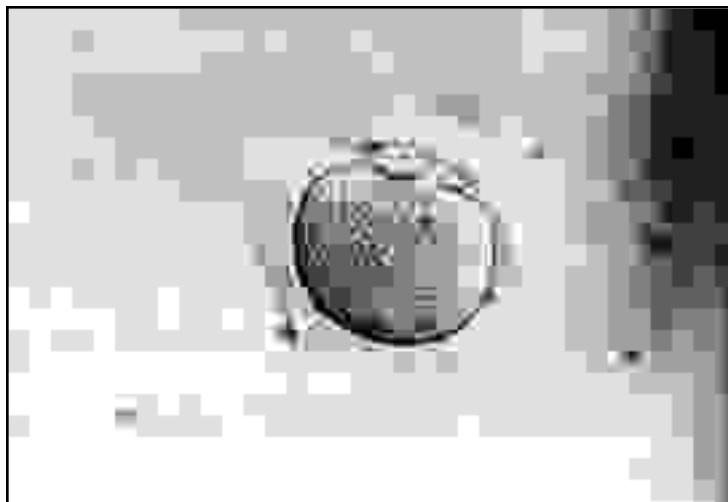
Nella fecondazione in vitro per evitare la rottura del follicolo con conseguente perdita dell'ovocita, si interviene alcune ore prima dello scadere della 36<sup>a</sup> ora dell'iniezione di HCG. L'ovocita in questa fase si presenta generalmente con il primo globulo polare già espulso, i granuli corticali stanno continuando a migrare e hanno quasi completamente raggiunto la loro definitiva sede alla periferia dell'ovocita, mentre all'esterno le cellule del cumulo si sono ulteriormente allungate e circondano l'ovocita, il tutto immerso in un fluido vischioso che servirà da protezione per il trasferimento dell'ovocita dal follicolo all'utero.

Volendo giudicare lo stadio di maturazione dell'ovocita con un'analisi

morfologica ad un microscopio a non forte ingrandimento, si può dire che, quando l'ovocita all'interno di questa massa gelatinosa che lo circonda è ben visibile, ha un buon grado di maturità, mentre quando la massa di cellule intorno all'ovocita è molto densa da non farne vedere bene i contorni, è immaturo.

Un altro metodo che viene adottato per giudicare la maturità dell'ovocita preovulatorio comporta l'isoelettrofocusing del fluido follicolare aspirato al momento del prelievo. Sono state determinate la presenza e le relative concentrazioni di alcune proteine come l'ibrinogeno, complemento, 1-antitripsina, IgG e glicosaminoglicani, il loro variare nella concentrazione viene assunto come un indice di variazione di maturità dei singoli ovociti. Generalmente, nella metodologia della fecondazione in vitro, l'ovocita dopo il prelievo viene ulteriormente incubato in un mezzo di coltura al 10% di siero materno, a 37° C per circa 6 ore. In questo periodo l'ovocita completa la sua maturazione, nel senso che si permette ai granuli corticali di completare la migrazione raggiungendo la loro posizione alla periferia dell'ovocita. A questo stadio si possono aggiungere gli spermatozoi per fare avvenire la fecondazione.

Dai dati in letteratura è noto che si può ottenere la fecondazione anche inseminando gli ovociti dopo un'ora dal prelievo, ma si è notato che in questi casi aumenta la percentuale di polispermia e quindi di sviluppo anomalo dell'embrione. Se l'ovocita infatti, non è completamente maturo, i granuli corticali non rilasciano le loro sostanze al momento della fecondazione, sostanze che modificando la struttura della zona pellucida impediscono, dopo la penetrazione del primo spermatozoo, l'entrata di altri spermatozoi.



**Figura 12. Ovocita con primo globulo polare estruso**

## Trattamento del liquido seminale

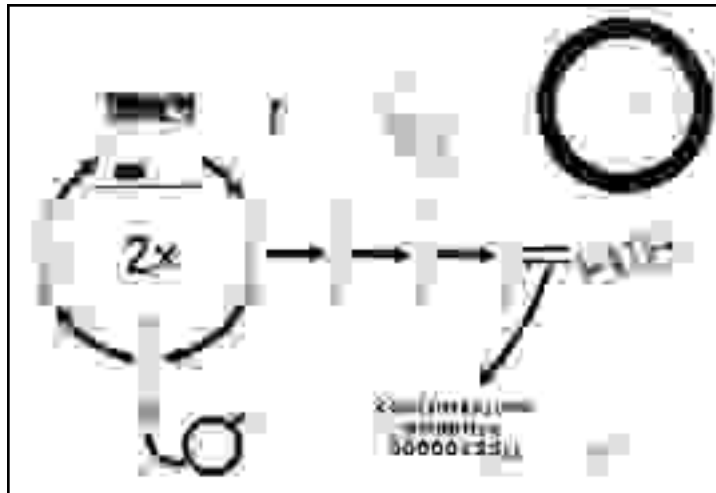
Gli spermatozoi prima di essere aggiunti agli ovociti per la fecondazione, devono andare incontro al processo di capacitazione, processo che normalmente si verifica nell'attraversamento delle vie genitali femminili e che può essere riprodotto in vitro. Gli spermatozoi dell'eiaculato si trovano ricoperti, soprattutto nella zona della testa, della cosiddetta "surface coating material" e si trovano immersi nel plasma seminale dove sono state messe in evidenza glicoproteine che, depositandosi sulla superficie dello spermatozoo inibiscono la capacitazione e la reazione acrosomiale in vitro (Mastroianni and Biggers 1981). La tecnica di capacitazione in vitro consiste quindi, nell'asportazione meccanica del "surface coating material" e del plasma seminale.

Circa due ore prima dell'inseminazione degli ovociti, viene chiesto al coniuge di produrre un campione di liquido seminale, che dovrà essere raccolto in un contenitore di plastica sterile. Dopo la fluidificazione, al liquido seminale viene aggiunto del terreno di coltura, supplementato al 10% con siero umano, nella proporzione di 1:4 e viene centrifugato per due volte a 600 g. (fig. 13).

Dopo l'ultima centrifugazione viene stratificato sul pellet, 1 ml di terreno di coltura e si lasciano migrare gli spermatozoi per 30' a 37° C. Il fatto di supplementare il terreno di coltura col siero umano, dipende dalla constatazione che alcuni componenti del siero possono influenzare la capacitazione. Uno di questi è l'albumina, che stimola la sopravvivenza degli spermatozoi (Lui et al. 1977); spermatozoi umani incubati in vitro in assenza di albumina perdono precocemente il patrimonio enzimatico necessario al prodursi della reazione acrosomiale. L'albumina inoltre potenzia il legame tra le catecolamine e i loro recettori presenti sulle superfici degli spermatozoi, favorendo il flusso di ioni  $Ca^{++}$ .

Questa reazione è mediata dall'AMPc e conduce all'attivazione degli enzimi acrosomiali (Mack et al 1983).

Dato che la capacitazione comporta in definitiva una entrata di ioni  $Ca^{++}$  e un'attivazione dell'AMPc, tutte le sostanze capaci di attivare questa molecola producono un effetto favorente sul processo capacitativo, è il caso della caffeina (Perrault and Rogers 1980) e della teofillina (Fraser 1979) che essendo degli inibitori della fosfodiesterasi, l'enzima che distrugge l'AMPc, aumentano, in definitiva, il contenuto intracellulare di AMPc. Anche gli ormoni steroidei, come gli estrogeni ed in particolare il 17- $\beta$ -estradiolo, stimolano la capacità fertilizzante degli spermatozoi, per questo motivo il siero che viene adoperato per supplementare il terreno di coltura, proviene dalla paziente che è stata sottoposta all'intervento, questo siero infatti, oltre a essere ricco di sieroalbumina, come è logico, presenta anche un elevato contenuto in 17- $\beta$ -estradiolo come conseguenza dell'iperstimolazione cui è



**Figura 13. Tecnica di preparazione degli spermatozoi.**

stata sottoposta precedentemente la paziente. Si è visto che gli spermatozoi di differenti individui possono richiedere tempi differenti di incubazione, ma in linea di massima, un tempo di incubazione di un'ora risulta sufficiente per rendere gli spermatozoi umani capaci di fecondare (Barros and Jedlicki 1984; Aitken et al 1983). Quindi il tempo standard di 30' di migrazione può oscillare da un minimo di 15' ad un massimo di 60', a seconda della qualità del liquido seminale. Dopo il periodo di incubazione si raccoglie il supernatante e si contano gli spermatozoi mobili ottenuti. Per l'inseminazione di un ovocita occorre una concentrazione di spermatozoi mobili che oscilla da 40 a 80.000/mL.

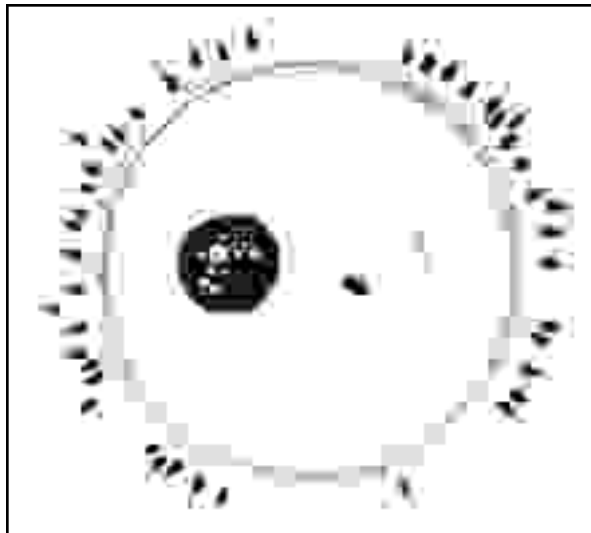
Questa tecnica di coltura, quasi universalmente adottata dai gruppi che praticano la FIV/ET, ha ormai raggiunto quasi l'85% di fecondazione. Lo scopo principale è quello di utilizzare la frazione più mobile e vitale degli spermatozoi lasciando da parte quelli morti e le forme agglutinate. I diversi lavaggi, inoltre, permettono di diminuire la possibilità di contaminazione batterica.

## **Fertilizzazione e coltura in vitro degli embrioni ottenuti**

Raggiunta la concentrazione ottimale di spermatozoi, questi vengono aggiunti agli ovociti che durante la loro permanenza in incubatore hanno

completato la maturazione; le provette vengono riposte in incubatore perché avvenga la fecondazione (fig. 14). L'incubazione avviene a 37° C in contenitori umidificati e sotto atmosfera gassosa che può essere composta da: 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> 90% N.

Rispetto al tempo di incubazione necessario per la capacitazione, quello utile alla fecondazione risulta essere molto più lungo, considerati anche i tempi diversi dei due fenomeni; esso oscilla da 6 a 24 ore (Lopata et al 1980). Dopo tale periodo gli ovociti vengono posti in terreno di coltura fresco, supplementato o al 15 o al 20% di siero. Durante tale "passaggio" l'ovocita viene "liberato" dalle cellule residue del cumulo e dalla fitta nube di spermatozoi che gli si sono addossati. Questa manovra favorisce l'osservazione al microscopio per stabilire l'avvenuta fecondazione mediante l'individuazione dei due pronuclei o del secondo globulo polare.



**Figura 14. Prima fase di fecondazione. Si nota il nucleo ovocitario e la testa dello spermatozoo.**

Gli ovociti fecondati vengono riposti in incubatore ed osservati dalle 18 alle 35 ore dopo la fecondazione, quando si verifica la prima divisione, anche se il processo di divisione è rapido, come abbiamo detto esso non richiede più di 15', può variare molto l'intervallo tra una segmentazione e l'altra; in genere questo intervallo è sempre più lungo per gli embrioni coltivati in vitro.

Nei mammiferi la fecondazione avviene in un luogo protetto e controllato dell'apparato genitale femminile. La ricerca ha messo a punto diversi terreni di coltura per gli ovociti e gli embrioni e per la capacitazione degli spermatozoi. Tra gli elementi più importanti e condizionanti il successo di

questi mezzi di coltura sono da considerare: la quantità e la qualità dei sali presenti (sali di Na, K, Ca, Mg) che a loro volta influenzano il pH del mezzo e la sua osmolarità; una fonte di energia adeguata (glucosio, lattato o piruvato); la presenza di proteine (albumina) e di una atmosfera di gas che mantiene l'equilibrio del mezzo di coltura.

I più comuni mezzi di coltura utilizzati nei centri FIV/ET del mondo sono il Menezo B<sub>2</sub>, l'Earle's, l'Ham's F10, ecc., alcuni di questi terreni necessitano di una supplementazione con antibiotici (streptomicina solfato e penicillina G) e di bicarbonato di sodio come tampone sotto un atmosfera di CO<sub>2</sub>.

L'albumina esercita un'azione protettiva contro gli effetti tossici degli ioni metallici compreso il rame, tutte le ricerche hanno portato ad una standardizzazione dei parametri fisico-chimici che permettono una crescita ottimale degli embrioni. E' stabilito che il pH può oscillare tra 7,2 e 7,4 e l'osmolarità tra 275 e 290 mOsm Kg<sup>-1</sup>

## Il transfer dell'embrione

Quando l'embrione ha raggiunto le 4-8 cellule si procede al suo trasferimento in utero (fig. 15-16). Esso avviene attraverso il canale cervicale, questa via ha il vantaggio di essere semplice, rapida e di non richiedere anestesia.

La situazione ottimale per il transfer sembra essere quella in cui il numero delle cellule sia inferiore a 8, infatti è stato osservato che nei casi in cui sono stati reimpiantati embrioni con più di otto cellule si aveva una percentuale di frammentazione e quindi di arresto maturativo dell'embrione pari al 40-50%.

In genere si usa fare il transfer 48-52 ore dopo la fertilizzazione, quando l'attività secretoria dell'endometrio sembra più favorevole per l'impianto. Anche il numero degli embrioni da trasferire rappresenta un grosso problema: è sempre opportuno trasferire più di un embrione, per aumentare la probabilità d'impianto, in genere però non si supera il numero di 4.

A causa della fotosensibilità dell'embrione, il reimpianto stesso va eseguito in penombra. La paziente viene premedicata con un sedativo o un ipnotico e la procedura viene eseguita in sala operatoria. La paziente in posizione ginecologica, viene inclinata all'indietro in modo che il fondo dell'utero si trovi sempre ad un livello più basso delle cervice.

L'embrione viene caricato su un catetere (fig. 17) con una ventina di microlitri di terreno di coltura e viene inserito nel canale cervicale. Di solito la procedura è indolore; uno speculum bivalve espone la cervice e impedisce alla superficie vaginale di toccare il catetere. La cervice e la parte superiore della vagina vengono deterse in modo da prevenire l'introduzione di materiale nella cavità uterina.



**Figura 15. Embrione a quattro cellule.**

Se si sono avute delle difficoltà nel passaggio del catetere in genere si aspetta alcuni minuti prima di iniettare l'embrione, in modo da far cessare le contrazioni uterine stimulate dal catetere.

Dopo che l'embrione è stato iniettato bisogna aspettare un minuto prima di rimuovere il catetere, in modo da facilitare la deposizione dell'embrione nell'utero.

Il catetere viene quindi ritirato lentamente e viene esaminato al microscopio per verificare che l'embrione sia stato realmente deposto nell'utero.

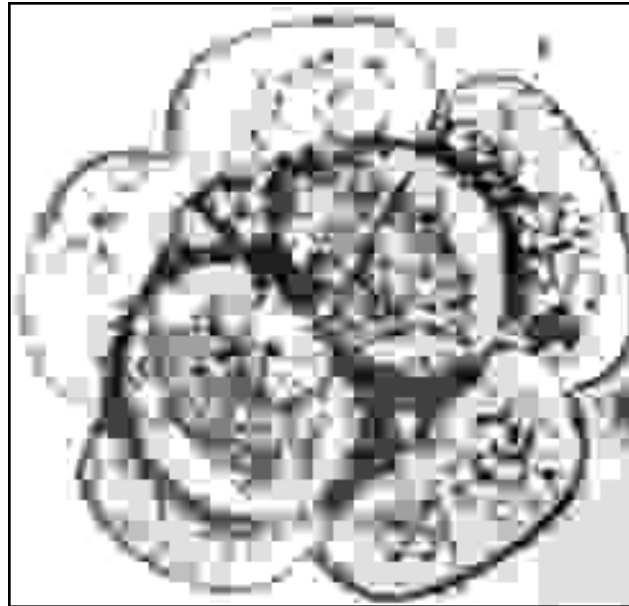
Anche la scelta della cannula con cui effettuare il transfer può presentare diversi problemi: con una cannula soffice si possono avere difficoltà nel superamento dell'orifizio uterino interno; l'uso di una cannula rigida, invece, può determinare delle lesioni con conseguente sanguinamento, che può essere di notevole ostacolo all'impianto dell'embrione.

Dopo il transfer la paziente riposa in ospedale 24 ore. Per tre-quattro giorni dopo il transfer la paziente dovrà limitare la sua attività fisica. Per il concepimento normale non si richiede una diminuzione dell'attività fisica, ma c'è tuttora incertezza sul comportamento dell'embrione dopo il transfer, almeno fino all'impianto.

A partire dal 10° - 12° giorno dal transfer si inizia a controllare il livello ematico della Beta HCG per una evidenziazione precoce della gravidanza.

Se la paziente è gravida si rilevano ogni 7 giorni i livelli del progesterone e dell'HCG per le prime 12 settimane di gravidanza e successivamente si





**Figura 16. Embrione a otto cellule.**



**Figura 17. Catetere di transfer, trans-cervicale di Frydman.**

determina il livello plasmatico del progesterone. Un eventuale sostegno endocrino della gravidanza viene adottato soltanto su indicazioni fornite dal rilievo di questi parametri endocrini. A partire dalla 26<sup>a</sup> settimana si inizia a dosare l'ormone prodotto dall'unità feto-placentare: l'estriolo, per una valutazione della sua normalità. Dall'8<sup>a</sup> settimana di gestazione si inizia il monitoraggio ultrasonografico della gravidanza che viene continuato alla 12<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> settimana per determinare le condizioni fetoplacentari, il numero dei feti, la presenza di malformazioni e lo sviluppo fetale.

L'amniocentesi viene fatta alla 16<sup>a</sup> - 17<sup>a</sup> settimana per lo studio cromosomico, dell'alfa fetoproteina e più in generale dell'eventuale patologia fetale. In considerazione però delle potenzialità abortigene di questo esame con il doppio meccanismo traumatico ed infettivo (amniotiti), la possibilità di eseguirlo ed il suo interesse vengono segnalate alle coppie interessate, di volta in volta.

Le modalità del parto non si discostano da quelle suggerite dalla normale assistenza ostetrica, anche se in questi soggetti l'età spesso avanzata, la lunga storia di infertilità e di pregressi interventi, tendono a spostare la scelta su un parto operativo.

## **Il congelamento dell'embrione**

La possibilità di conservare degli embrioni fecondati in vitro e di poterli utilizzare in un tempo successivo, comporta molti vantaggi.

Gli ovociti raccolti dopo una stimolazione dell'ovulazione e fertilizzati, possono essere superiori al numero di embrioni che possono essere trasferiti in utero. In questo caso gli embrioni in sovrannumero possono essere congelati e, in caso di fallito impianto di quelli trasferiti subito, possono essere scongelati e reimpiantati, evitando così alle pazienti di sottoporsi ad un nuovo intervento; questo inoltre consentirebbe di effettuare il reimpianto durante il ciclo normale della paziente, cioè in assenza di stimolazione.

Contrariamente a quanto si crede, i danni che si possono procurare durante la criopreservazione non sono esclusivamente dovuti alla formazione del ghiaccio.

Le cellule possono anche essere danneggiate da improvvisi cambiamenti di temperatura anche al di sopra del punto di congelamento (Sherman 1960).

Questo tipo di danno viene chiamato "Cold Shock" ed è sia cellulo-specifico che speciespecifico. Il danno da "cold shock" può essere minimizzato da modificazioni del processo di congelamento, una lenta e graduale riduzione della temperatura produce spesso minori effetti gravi di quelli prodotti da rapidi cambiamenti della velocità di raffreddamento (Pope et al. 1984): inol-

tre la presenza di certi composti nel mezzo di congelamento, può ridurre l'effetto del "cold shock".

Un secondo momento critico nella procedura del congelamento si ha quando la cellula viene portata al punto di congelamento. Tra - 5 e -1 5° C le cellule e il mezzo in cui si trovano, possono rimanere non congelati a causa del diminuito punto di congelamento dovuto alla presenza dei soluti. Al di sotto di questo punto il ghiaccio comincia a formarsi spontaneamente nel mezzo extracellulare. La formazione del ghiaccio può essere indotta in una maniera più controllata mediante l'introduzione di germi di cristallizzazione nella soluzione attraverso un processo chiamato "seeding" (Mauer 1984, Whittingham 1977).

La formazione del ghiaccio si ha inizialmente nel compartimento extracellulare e la concentrazione dei soluti aumenta dato che l'acqua viene rimossa sotto forma di ghiaccio. Man mano che si abbassa la temperatura aumenta la quantità di ghiaccio che si va formando e parallelamente aumenta la concentrazione dei soluti.

Di conseguenza l'acqua fuoriesce dalla cellula per gradiente osmotico e la cellula si deidrata e restringe (Mauer 1984).

Un abbassamento relativamente lento della temperatura permette l'estrazione osmotica dell'acqua cellulare ad una velocità tale da mantenere una concentrazione intracellulare di soluti sufficienti a prevenire la formazione di ghiaccio intracellulare man mano che la temperatura continua a scendere.

La prima strategia della criopreservazione è seguire il gradiente osmotico che si forma inizialmente fra il compartimento extracellulare e quello intracellulare per estrarre l'acqua dalla cellula prevenendo la formazione dei cristalli di ghiaccio intracellulari. La velocità ottimale di raffreddamento per ottenere questo effetto è cellulo-specifico dato che le cellule possono differire sia nella quantità di acqua intracellulare, che nella sua permeabilità attraverso la membrana (Mazur 1970). La velocità ottimale di congelamento per gli spermatozoi di mammifero con il loro piccolo volume e la piccola quantità di acqua intracellulare si trova nel range da 10 a 100° C/min. (Leiho et al. 1978), mentre per gli embrioni di mammifero, a causa del loro sostanziale contenuto di acqua intracellulare, è necessaria una velocità di raffreddamento molto più lenta, da 0,1 ad 1° C/min. (Polge).

Un'insufficiente deidratazione comporta una letale formazione di ghiaccio intracellulare ma questo non è la sola causa per cui le cellule possono essere distrutte durante la fase critica del congelamento. Danni si possono anche avere se le cellule sono raffreddate ad una velocità troppo lenta. Anche se questo danno da "Slow Cooling" non è ben compreso, si ipotizza che possa essere il risultato di un'esposizione ad elevate concentrazioni di soluti extracellulari a temperature relativamente alte (Lovelock 1953). Quindi la sopravvivenza di una cellula durante la fase di congelamento (tra - 5 e - 80° C) è legata ad un compromesso tra una velocità di raffreddamento sufficiente a

permettere ad un volume critico di acqua intracellulare di essere osmoticamente estratta dalla cellula, ma al tempo stesso abbastanza veloce da prevenire i danni da "slow cooling" (Farrant).

Spesso questi due processi dannosi si sovrappongono in un punto in cui ha sopravvivenza cellulare è impossibile senza le modificazioni del mezzo di congelamento ad opera di un agente crioprotettivo. Gli agenti crioprotettivi modificano gli effetti dello "slow cooling" (Mazur), essi abbassano il punto di congelamento e quindi ad una data temperatura espongono la cellula ad una soluzione meno ipertonica, allo stesso tempo, questi agenti diminuiscono anche la concentrazione dei soluti nel fluido che circonda la cellula.

E' stato calcolato che le cellule possono essere conservate a - 196° C per secoli (Mauer 1984). Questa stabilità è basata sulla perdita dell'energia termica necessaria ad attivare le reazioni chimiche e la perdita di acqua a temperatura inferiore a - 130° C. Di conseguenza le sole reazioni possibili a - 196° C sono eventi fotofisici prodotti da radiazioni ionizzanti di fondo o radiazioni cosmiche e queste forze richiederebbero secoli per produrre effetti significativi sulle cellule. Nessun danno è stato trovato in embrioni di topo conservati per più di 11 anni a - 196° C (Whittingham et al. 1974; Glenister et al. 1986): dato che il congelamento di embrioni umani è cominciato solo da pochi anni non si posseggono dati al riguardo.

La fase critica dello scongelamento è il passaggio al contrario da - 80 a - 5° C. Se la cellula passa lentamente indietro attraverso il range di temperatura critica, piccoli cristalli si riorganizzano in forme più larghe ed inducono la morte della cellula; d'altro canto una cellula che ha subito una lenta fase di raffreddamento è stata severamente disidratata quindi un rapido scongelamento può non consentire all'acqua di entrare sufficientemente in fretta ed al crioprotettivo di uscire dalla cellula man mano che la temperatura si innalza. In definitiva l'acqua potrebbe essere attirata in conseguenza dell'elevata concentrazione di soluti e si possono avere danni da rigonfiamento (Mauer 1984).

D'altro canto la lenta rimozione degli additivi ad appropriate temperature sembra essere critica per la sopravvivenza di molti embrioni di mammifero (Schneider et al. 1984). Quindi, anche in questo processo, si tratta di trovare il giusto equilibrio che impedisca entrambi gli inconvenienti. Quando le cellule sono congelate e scongelate i fattori che maggiormente influenzano la loro sopravvivenza sono: a) il tipo di cellule e le dimensioni; b) le curve di raffreddamento e di riscaldamento; c) la composizione del mezzo in cui sono congelate e scongelate. Gli embrioni fino allo stadio di blastula sono contenuti nella zona pellucida che è un involucro mucoproteico ed è possibile che sia proprio questa a determinare l'optimum nella curva di congelamento e scongelamento. Se il tempo di raffreddamento è sufficientemente lungo è poco probabile che il ghiaccio si formi dentro le cellule o nello spazio perivitellino, in questo modo l'equilibrio osmotico può essere mantenuto dal

movimento dei soluti. Al contrario, è necessario che lo scongelamento sia abbastanza rapido per impedire la ricristallizzazione dell'acqua rimasta all'interno delle cellule sotto forma di microcristalli che tenderebbero inevitabilmente ad aggregarsi durante il riscaldamento provocando la disgregazione dei gel proteici ed il danneggiamento delle membrane cellulari (Cefalù et al. 1986).

I crioprotettivi più marcatamente usati per il congelamento degli embrioni sono il glicerolo, il DMSO (dimetilsolfossido) e il PROH (propandiole). Quest'ultimo risulta meno tossico rispetto ai precedenti.

Gli embrioni da congelare vengono trasferiti dal terreno di coltura ad un mezzo contenente il 20% di siero umano e 1,5 M di 1,2 propandiole a 20° C per 30' per farli equilibrare con questo mezzo di congelamento. Vengono quindi trasferiti in "paillettes" o "cryovials" che contengono il mezzo di congelamento con 0,1 M saccarosio. Le paillettes vengono poste in un apparecchio in grado di far scendere la temperatura in maniera costante e controllata, e raffreddate dalla temperatura ambiente fino a - 7° C ad una velocità di -2° C/min. Vengono lasciate a - 6° C per 5' e durante questo periodo di tempo viene indotta la formazione di microcristalli di ghiaccio (seeding) toccando le paillettes con una pinza, prima raffreddata in azoto liquido. Si lasciano per 10' a - 6° C per fare avvenire il seeding e quindi si continua il raffreddamento ad una velocità di - 0,3° C/min fino a - 60° C. Le paillettes vengono quindi poste direttamente in azoto liquido a - 196° C. Per lo scongelamento le paillettes vengono poste a 20° C per 30" e a 30° C per 15", quindi si rimuove il propandiole attraverso il passaggio in soluzioni a concentrazioni decrescenti in presenza di saccarosio 0,2 M. Si lavano in terreno di coltura al 20% di siero umano e si pongono in coltura per saggiarne la vitalità. Alla ripresa delle attività vitali si esegue il reimpianto in utero.

Un altro metodo di criopreservazione degli embrioni di mammifero va sotto il nome di vitrificazione (Rall et al. 1985). Questo processo evita gli effetti letali della formazione di cristalli di ghiaccio, sia nel compartimento extracellulare che in quello intracellulare, attraverso l'aggiunta di altissime concentrazioni di crioprotettivi. Alle basse temperature queste soluzioni solidificano senza la formazione di cristalli di ghiaccio.

Questo superraffreddamento porta ad una solidificazione amorfa, conosciuta appunto come vetrificazione. In questo processo diventano importanti i danni osmotici, gli embrioni di topo sopravvivono a questo procedimento ma per il momento non si è avuto alcun successo con gli embrioni umani (Quinn et al. 1986).

Le ultime ricerche si sono indirizzate anche sul congelamento degli ovociti, analogamente a quanto già si fa da tempo per gli spermatozoi. Ma l'attuazione di questo procedimento si scontra con due grossi problemi: il grande contenuto in acqua di queste cellule e l'impossibilità di conoscere esattamente l'assetto cromosomico dell'ovocita al momento del congelamento. Se l'ovocita, infatti, viene congelato durante la metafase, data la struttura ri-

gida del fuso mitotico, al momento dello scongelamento si possono creare delle anormalità cromosomiche che rendono questa tecnica ancora troppo rischiosa. Tra i tanti problemi etico-legali che la tecnica della fecondazione in vitro ha sollevato c'è anche quello dell'identità legate dell'embrione congelato.

Come accade spesso, i progressi medico-scientifici non sono in genere seguiti in tempi brevi da un'appropriata legislatura, è quanto è accaduto in Italia, per esempio, per la legge sui trapianti d'organo che solo di recente è stata resa operativa. Anche per la tecnica della criopreservazione degli embrioni umani si è posto tale problema. L'embrione congelato è un essere vivente? E' un oggetto giuridico? Possiede dei diritti che devono essere tutelati? A tutt'oggi non esiste una legislatura adeguata in proposito. In Australia, in Inghilterra, negli Stati Uniti e in Francia esistono delle norme giuridiche che regolano il congelamento embrionario; in questi paesi è permesso, dopo un anno di congelamento e, naturalmente, con il consenso dei genitori, utilizzare gli embrioni per la ricerca.

In Italia non esiste nulla del genere: il centro FIV/ET di Palermo procede al congelamento dell'embrione dopo un'autorizzazione scritta da parte della coppia, che però è solo un documento informale e non possiede valore legale, e non ha ancora preso provvedimenti per quanto riguarda gli embrioni che rimangono congelati per più di un anno avendo iniziato la pratica da poco più di un anno.

## II GIFT

La tecnica FIV/ET originariamente fu adoperata come terapia per pazienti con tube severamente danneggiate o del tutto assenti dato che riproduce in vitro gli eventi fisiologici (fertilizzazione e prime divisioni) che normalmente avvengono nell'ampolla di quest'organo.

Più recentemente l'uso della FIV/ET è stato esteso al trattamento di coppie con infertilità di differente eziologia in cui le tradizionali forme di terapia erano fallite (Wood et al. 1985). Una gran parte di queste pazienti hanno delle tube anatomicamente intatte e capaci di normale trasporto dei gameti e del precoce sviluppo embrionario.

Ricardo Asch, per primo, sperimentò una nuova tecnica il GIFT (Gamete intra-fallopian transfer) per le pazienti con pervietà tubarica e che consiste in un trasferimento immediato degli ovociti aspirati dai follicoli, assieme al liquido seminale capacitato, dentro la tuba, nel tentativo di riprodurre i precoci processi fisiologici che portano alla gravidanza nella specie umana (Asch et al. 1984). Questa tecnica ha il vantaggio di realizzare l'incontro dei

gameti nel tratto ampollare della tuba e cioè nella sede naturale della fecondazione. Essa comporta un'inversione dei tempi rispetto alla FIV/ET: prelievo di ovocita, attesa, prelievo del seme; in quanto quest'ultimo precede il pick-up laparoscopico per poter disporre di un seme capacitato al momento della laparoscopia.

Il rendimento della tecnica GIFT risulta essere più alto rispetto alla FIV/ET con un 40% di gravidanze rispetto al 20% della FIV/ET. Mediante la GIFT si deposita una frazione concentrata di spermatozoi mobili direttamente nel sito in cui normalmente avviene la fecondazione e per questo risulta indicata in quei casi in cui si ha nel partner maschile un'oligospermia, o in cui nella coppia è presente un problema di natura immunologica o la partner femminile possiede un muco cervicale refrattario alla penetrazione degli spermatozoi, in pratica in tutte quelle situazioni in cui per un motivo o per un altro gli spermatozoi non possono raggiungere l'ovocita per le vie naturali (Asch et al. 1986). Risulta altresì indicata in tutti quei casi in cui anche l'ovocita non riesce a raggiungere l'ampolla nuziale per le vie naturali: mancata discesa del follicolo, danni alle fimbrie delle tube, alterata motilità tubarica.

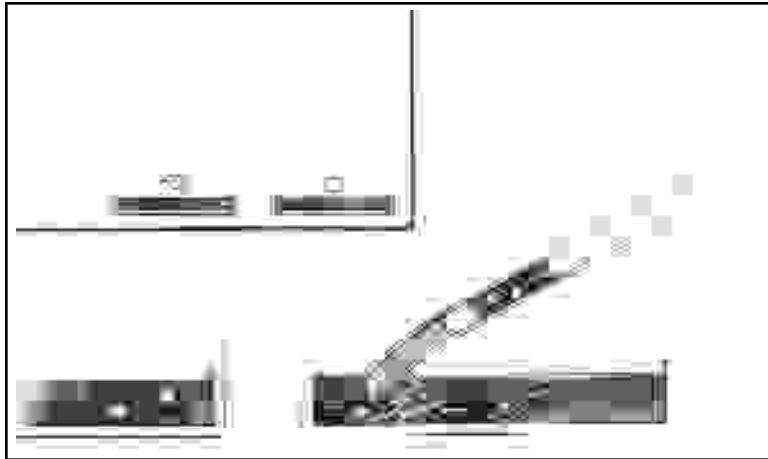
L'intervento viene fatto durante l'aspirazione dei follicoli che, per questo, viene condotta per laparoscopia in anestesia generale, dopo la valutazione delle qualità degli ovociti i migliori vengono posti in un catetere (fig. 18) (delto stesso tipo di quelli adoperati per il trasferimento degli embrioni in utero in seguito alla FIV/ET) con una siringa da tubercolina. collocati in terreno di coltura supplementato al 50% con siero umano.

La successione degli eventi nel caricamento del catetere risulta molto



**Figura 18** Catetere per transfer di Sem. La freccia indica l'anellino distanziatore.

importante, infatti il catetere viene montato con 15  $\mu\text{l}$  di mezzo di coltura contenente 100.000 spermatozoi capacitati, una bolla d'aria di 5  $\mu\text{l}$  e uno o due ovociti materni in 15  $\mu\text{l}$  di terreno, un'altro spazio d'aria di 5  $\mu\text{l}$  e 10  $\mu\text{l}$  di terreno per un volume totale di 50  $\mu\text{l}$  (fig. 19).



**Figura 19. Tecnica di caricamento del catetere.**

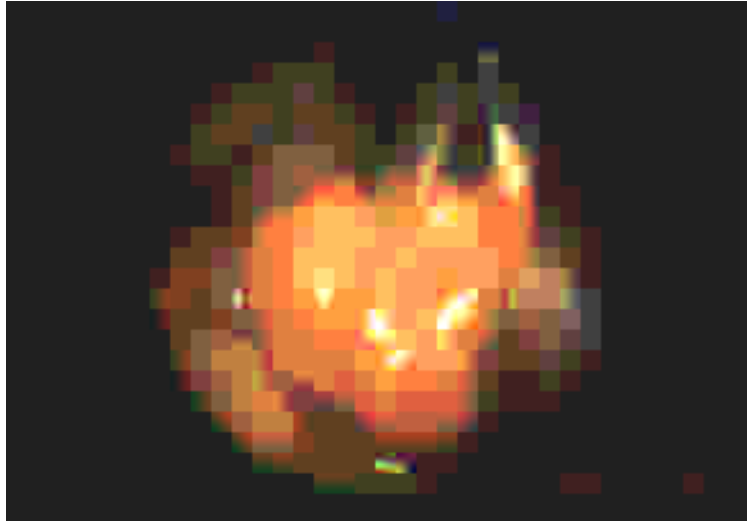
Il catetere viene inserito nella tuba e svuotato delicatamente, (fig. 20-21) quindi riportato in laboratorio e osservato al microscopio per assicurarsi che sia stato completamente svuotato. La stessa procedura può essere applicata per l'altra tuba e non si trasferiscono più di due ovociti per tuba. L'intero intervento richiede dai 40 ai 60'. Le norme da seguire in successione all'intervento sono analoghe a quelle per la FIV/ET.

La presenza della bolla d'aria che separa gli spermatozoi e gli ovociti nel catetere più che un reale significato scientifico ha un importante significato etico, essa infatti impedisce l'incontro dei gameti nel catetere ed assicura che la fecondazione avvenga all'interno della tuba. Un procedimento, quindi, che ha avuto anche il placet dei teologi perché non c'è concepimento fuori dal grembo materno e non si hanno manipolazioni di embrioni. La Chiesa tuttavia non si è pronunciata ufficialmente in merito a queste tecniche che vengono ancora chiamate di fecondazione artificiale nonostante non si costruisca niente in laboratorio ed è sempre e solo nell'utero materno che l'uovo fecondato si impianta come embrione, vi cresce come feto e da questo nasce come bambino (Ferrieri 1986).

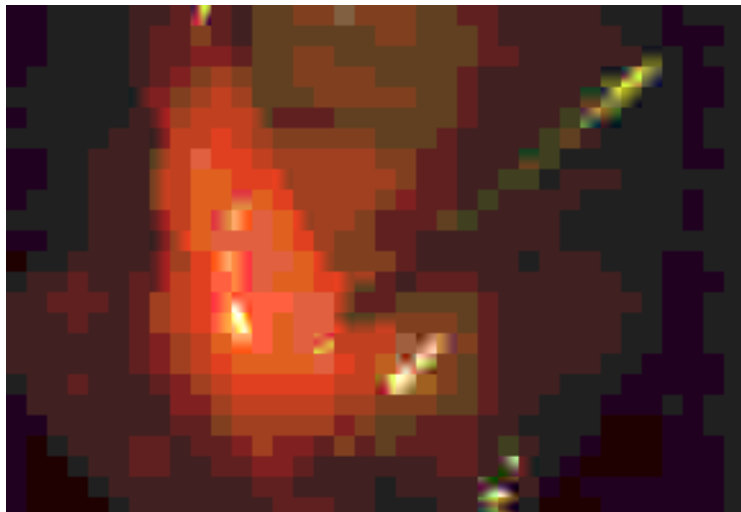
I gruppi considerati pilota per la fecondazione *in vitro*, detti della "prima generazione" sono stati quello inglese di Edwards e Steptoe e quello australiano di Wood e Trounson. A questi si è aggiunto, più tardi, il gruppo americano di Norfolk, dei Jones.

Vi sono poi i gruppi della "seconda generazione" e cioè i viennesi





**Figura 20.** Il catetere penetra nella tuba, attraverso una guida metallica, per depositare i gameti nell'ampolla.



**Figura 21.** Il catetere fuoriesce dalla tuba dopo aver depositato i gameti.

Feichtinger e Kemeter, francesi Testart e Friedman e il tedesco Trotnow. Altri gruppi, quelli della "terza generazione", sono sorti un po' in tutto il mondo Italia compresa. Il programma di fecondazione *in vitro* con transfer dell'embrione (FIV/ET) è stato avviato presso la Clinica Ostetrica dell'Università di Palermo diretta dal Prof F. Cittadini nel 1982. La prima gravidanza clinica è stata ottenuta nel Settembre del 1983, e nel Maggio del 1984 è nata la prima bambina concepita in provetta a Palermo.

Successivamente i miglioramenti apportati alla scelta dei protocolli di induzione della superovulazione, alle tecniche di monitoraggio della crescita follicolare multipla e quelle di prelievo ovocitario, unitamente all'affinamento e perfezionamento delle metodiche di cottura *in vitro* degli embrioni, hanno permesso di raggiungere tassi di gravidanza pressoché sovrapponibili a quelli dei centri più importanti che attualmente operano in diverse parti del mondo.

Dall'1.1.1985 al 30.9.1986 sono stati effettuati 353 pick-up ecografici nei quali sono stati recuperati 1357 ovociti. Il tasso di fertilizzazione è stato del 71,7%. Sono state ottenute 50 gravidanze che rappresentano il 19,8% per paziente sottoposta a transfer. Nello stesso periodo sono stati effettuati 147 interventi di GIFT, in un totale di 133 pazienti, le gravidanze ottenute sono state 48, che rappresentano il 32,6% per intervento e il 36,1% per paziente.

I dati relativi al congelamento embrionale sono ancora preliminari; dal 1.1.1986 sono stati congelati circa 250 embrioni, ne sono stati scongelati 77 e di questi solo 64 sono risultati vitali e reimpiantati. Si sono ottenute nove gravidanze di cui due a termine, tre esitate in aborto e quattro ancora in evoluzione. Questi dati se confrontati con quelli riportati dalle casistiche di altri autori, mettono in evidenza l'ottimo standard di lavoro raggiunto dal centro di Palermo.

## La preselezione del sesso

Accanto alle tecniche di fecondazione artificiale nella terapia della sterilità di coppia si attuano numerose tecniche di inseminazione artificiale che hanno beneficiato delle nuove scoperte fatte con la FIV/ET e la GIFT.

Infatti spesso un ciclo di inseminazione viene condotto con un'induzione dell'ovulazione e con un trattamento del liquido seminale analoghi a quelli riservati alla fecondazione artificiale. Esistono diversi tipi di inseminazione a seconda delle indicazioni, su cui non ci soffermeremo (intracervicale, intrauterina, intraperitoneale); l'inseminazione intraperitoneale o IPI merita però una breve digressione. Si tratta di una nuovissima tecnica, che ha solo un anno di vita e che si basa sulla penetrazione degli spermatozoi, opportunamente capacitati, e in condizioni di sterilità per evitare infezioni. all'interno del

sacco di Douglas, (spazio della cavità peritoneale tra il retto e l'utero), per mezzo di una sottile cannula inserita attraverso il fornice posteriore della vagina (Forrier et al. 1986; Guastella e Cimino 1986). Nella donna il peritoneo è in comunicazione con l'apparato genitale per cui gli spermatozoi vengono aspirati dall'effetto ventosa che le tube creano in quest'ambiente, raggiungendo l'ampolla della tuba o camera nuziale per la stessa via dell'uovo, e non risalendo le vie genitali femminili. Questo con tutti i vantaggi già espressi per il GIFT anche se le possibilità d'incontrare l'ovocita risultano minori in quanto non sono posti quasi a diretto contatto come avviene nel catetere, ma l'ovocita raggiunge la tuba per le vie naturali, in seguito allo scoppio del follicolo.

La possibilità di pretrattare il seme, prima dell'inseminazione ha consentito anche di separare la popolazione degli spermatozoi in due subpopolazioni arricchite in nemaspermi con uno dei due cromosomi sessuali e in definitiva ha reso possibile la predeterminazione del sesso del nascituro.

Quest'ultima è basata su un diverso comportamento degli androspermi, cioè i nemaspermi che portano il cromosoma Y, dai ginospermi, cioè i nemaspermi che portano il cromosoma X. Essi mostrano avere una diversa migrazione in un flusso in movimento. Su questo dato sono state basate diverse tecniche di separazione dato il grande interesse che comporta poter determinare il sesso in tutti quei casi di malattie ereditarie legate al sesso che sono circa 200 almeno quelle più frequenti, (McKusick 1978), tra queste: l'emofilia, la deficienza di glucosio-6-fosfato deidrogenasi, diversi tipi di distrofia muscolare, la deficienza di sulfatasi steroidea placentare, e molte altre. In questi casi sottoporre la donna portatrice ad inseminazione artificiale con il liquido seminale del marito arricchito in nemaspermi con cromosoma X sano eviterebbe la nascita di bambini malati.

Nel 1969 Zech scoprì che la parte distale del braccio lungo del cromosoma Y poteva essere colorata (Zech 1969). Questo permise di distinguere i due tipi di spermatozoi e cominciarono ad essere elaborati diversi metodi di separazione degli androspermi dai ginospermi. Gli androspermi risultano essere più veloci dei ginospermi, infatti studi statistici hanno confermato che più maschi vengono concepiti quando il rapporto avviene immediatamente prima o dopo dell'ovulazione, dato che gli androspermi raggiungono prima l'ovocita, mentre un numero maggiore di femmine risulta da rapporti intercorsi molto tempo prima dell'ovulazione perchè in tal modo anche i ginospermi hanno la possibilità di raggiungere l'ovocita (Shettles 1970).

Le tecniche di laboratorio per separare i due tipi di spermatozoi sono diverse; per esempio una migrazione su gradiente di sieralbumina seleziona una popolazione ricca di androspermi, la filtrazione su colonna di Sephadex invece seleziona una popolazione ricca in ginospermi; centrifugando il liquido seminale su un gradiente appropriato i ginospermi si accumulano nelle regioni del gradiente a più rapida velocità vicino alle pareti mentre gli androspermi si trovano al centro del flusso (Siddharta 1984).

## Possibili varianti della fecondazione artificiale

La FIV/ET nata come tecnica terapeutica per supplire all'assenza anato-funzionale delle tube, ha anche aperto la via a numerose tecniche, alcune delle quali hanno la finalità di riparare ad un'assenza o ad un'insufficienza dei meccanismi naturali (donazione di ovociti o di embrioni, inseminazione eterologa, prestito di utero).

La donazione di sperma in seno ad una fecondazione *in vitro* non comporta problemi diversi da quelli che comporta *in vivo* in un'inseminazione eterologa. Esistono in tutto il mondo e da molto tempo le banche dello sperma in cui viene conservato il seme di diversi donatori congelato in azoto liquido. La prima nascita da un seme congelato e scongelato si ebbe nel 1953 (Bunge et al 1954), anche se i primi tentativi di conservazione dello sperma mediante congelamento erano stati realizzati dallo Spallanzani già nel 1776 (Spallanzani 1799).

Nella pratica mondiale i donatori vengono studiati con lo stesso protocollo che si applica ai donatori di sangue. in più si richiedono altri esami e caratteristiche:

- a) L'analisi cromosomica,
- b) Il test per i geni recessivi.
- d) Età del donatore, che in genere non supera i 40 anni, dato che è stato osservato che la frequenza di certe malformazioni aumenta con l'età paterna.

La donazione di ovociti in una coppia in cui la donna è sterile o portatrice di gravi anomalie ereditarie, rappresenta l'equivalente di ciò che l'inseminazione artificiale con donatore rappresenta per il marito sterile.

Essa può essere ottenuta sia in seguito ad una FIV/ET che non abbia comportato l'utilizzazione di tutti gli ovociti ottenuti, sia da parte di una donna volontaria donatrice, sia da parte di una donna volontaria che si presta all'inseminazione col liquido seminale del marito della coppia, poi qualche giorno dopo, a lavaggio dell'utero, per raccogliere l'embrione da trasferire nell'utero della madre sterile. La donazione di ovociti comporta una necessaria sincronizzazione tra ovulazione della ricevente e della donatrice, per far sì che l'utero della ricevente si trovi in una situazione ormonale ottimale per l'impianto.

Un'altra possibilità è la donazione di embrioni che risultano dalla non utilizzazione della totalità degli embrioni ottenuti dalla fecondazione *in vitro* con, naturalmente, l'accordo dei genitori naturali cui legalmente appartengono gli embrioni. Si tratta in un certo senso di un'adozione antenatale che invece di riguardare un bambino già nato riguarda un embrione nel suo divenire. La donazione di embrioni in favore di terze persone presuppone l'organizzazione di banche di embrioni.

In casi particolari in cui la gravidanza comporti un rischio serio per la madre (per esempio un'ipertensione instabile farmaco-resistente, con aggravamenti in gravidanza) o quando l'utero materno è assente, malformato o patologico si può attuare il prestito dell'utero.

Con l'avvento di tutte queste tecniche nuove si può verificare che un bambino abbia tre tipi di madri (genetica, gestante e sociale) e due tipi di padre (genetico e sociale) (Carollo 1986).

L'esistenza di queste tecniche consentirebbe la ricerca sugli embrioni umani sovrannumerari e lo studio dello sviluppo *in vitro* dell'embrione consentirebbe di comprendere meglio il meccanismo dell'embriogenesi umana ancora mal conosciuto.

La possibilità di applicare le tecniche di ingegneria genetica anche agli ovociti umani così come è stato fatto già in cellule di mammifero, consentirebbe una terapia per le malattie genetiche (Anderson e Diacumakos 1981).

Il ginecologo Edwards di Londra propone di dividere sistematicamente in due, tutti gli embrioni e di ottenere così due embrioni gemelli veri, uno da trasferire in utero e l'altro da coltivare artificialmente ricavandone degli abbozzi tissutali, e di organi, che saranno conservati in azoto liquido, e tenuti come materiale cui potere attingere nel caso in cui l'individuo nato dalla fecondazione *in vitro* dovesse averne bisogno evitando così ogni rischio di rigetto (Carminia et al. 1985).

Infine c'è da considerare la possibilità della clonazione, sostituendo cioè, il nucleo di una cellula uovo con il nucleo di una cellula adulta già differenziata, si può originare un nuovo organismo con una costituzione genetica identica al nucleo donatore. Questa riproduzione asessuale (manca la ricombinazione dei geni materni e paterni) porterebbe alla creazione di un clone, cioè di multiple copie di uno stesso individuo. Da qui la possibilità di creare una "super razza" il passo sarebbe breve! Ma si tratta comunque di un'utopia; scientificamente parlando, non possiamo non considerare l'unicità di ogni individuo anche con un corredo cromosomico identico, prova ne sono i gemelli moncoriali, e, inoltre, non si può non considerare l'ambiente che influisce sullo sviluppo fisico, mentale e psicologico del "clonato" e che lo farà diventare, indubbiamente, un adulto veramente diverso dal suo "identico" genitore.

Senza dubbio possiamo parlare ancora di fantascienza, ma la scienza ci ha insegnato a credere all'impossibile, per questo bisogna rifiutare alla ricerca il diritto di esplorare, senza un codice etico ben preciso, i problemi della vita. Il desiderio di un bambino e la lotta contro la sterilità non possono giustificare l'applicazione di tutte le tecniche di fecondazione. Quello che ci si deve domandare è: "ciò che è tecnicamente possibile è anche moralmente ammissibile?" (Tettamanti 1983). In questo contesto, il ricercatore non deve perdere "per strada", nella ricerca sui misteri della vita e del suo realizzarsi dalla fusione dei due gameti, il suo obiettivo principale, e cioè il rispetto per

la vita anche nel suo divenire, come può essere considerato l'embrione una no.

L'embrione umano è già un essere completo, e prima ancora che il legislatore riconosca ad ogni embrione lo "status di essere umano", il ricercatore deve regolare il suo operato in questa ottica. E come il medico deve adattare la sua etica più, al rispetto del bambino che deve nascere, che alle richieste delle sue pazienti, così il biologo deve adattare la sua etica al rispetto dell'unicità e individualità del singolo embrione, non permettendo che uno, sia pur geneticamente identico, sia destinato ad essere "pezzi di ricambio" di un altro, oppure che embrioni in sovrannumero di una FIV/ET possano essere utilizzati come "cavie" per lo studio dell'azione di certe sostanze medicamentose ed in generale per la sperimentazione.

Anche se la conoscenza della verità scientifica è un bene per la persona umana e per tutta l'umanità, non può e non deve essere raggiunta attraverso la violazione dell'individualità di ogni essere umano.

## Problematica dell'impianto

Durante la fase dell'impianto dell'embrione umano nell'utero materno, i sistemi che interagiscono tra di loro sono l'embrione, l'utero, il sistema endocrino ed il sistema immunologico della madre.

I meccanismi che consentono ad un embrione di impiantarsi con successo non sono stati però ancora oggi completamente chiariti. Non si è in particolare riusciti a capire come l'embrione geneticamente e antigeneticamente diverso dalla madre, non sia da questa rigettato come un qualsiasi corpo estraneo, e la spiegazione più immediata che è stata proposta è che il sistema immunitario materno in questa fase sia in qualche modo represso.

Studiare quali sono i meccanismi o i fattori responsabili del successo di questa relazione "ospite-parassita" durante la gravidanza, oltre che cercare di risolvere uno degli "enigmi della biologia" ancora insoluti, può portare un contributo anche ad altri tipi di relazioni ancora non spiegate come quella "ospite-trapianto" e come quella "ospite-tumore" nel campo oncologico.

Da un punto di vista teorico sono state avanzate alcune spiegazioni:

- 1) Il sistema immunitario della madre durante la fase dell'impianto è represso e non reagisce in generale a stimoli antigenici.
- 2) Il sistema immunitario materno è normale, ma a livello regionale (utero) si verifica una specifica immuno soppressione nei confronti degli antigeni del trofoblasto.
- 3) L'endometrio uterino è un sito immunologicamente privilegiato al pari del cervello, testicolo, ecc., e non può rigettare un tessuto estraneo.

- 4) Gli antigeni espressi dal trofoblasto sono “coperti” da mucoproteine immunocomplessi o altre molecole di varia natura chimica e non sono esposti al sistema immunitario materno.

Alcune di queste teorie sono state smentite dal lavoro sperimentale, altre hanno portato a dei risultati contrastanti, altre non sono state provate sufficientemente.

Per quanto riguarda specificamente la prima ipotesi suggerita, è noto che da un punto di vista evuzionistico i mammiferi sono una specie animale che si è bene affermata sulla terra, per cui è difficile spiegare tale successo ipotizzando un calo di difesa proprio nella fase più importante per tale evoluzione come quella della riproduzione. Se proprio in tale fase cruciale, la specie è più soggetta ad attacchi da parte di agenti patogeni che metterebbero in forse la sopravvivenza dell’embrione, la logica conseguenza dovrebbe essere uno svantaggio evolutivo rispetto ad altre specie, svantaggio che tradotto in fattore selettivo negativo avrebbe dovuto portare alla lunga alla sua estinzione.

La terza ipotesi si è invece dimostrata sbagliata al vaglio dei risultati sperimentali, in quanto si è visto che l’utero è capace di rigettare il trapianto di un tessuto estraneo. Infatti iniezioni intrauterine di cellule o di altri tessuti evocano una risposta immunologica locale, ed al momento dell’impianto nell’utero sono state trovate numerose plasma-cellule ed immunoglobuline, che riescono a penetrare nella cavità blastocelica dell’embrione, e che suggeriscono quindi che l’utero possiede intatte tutte le sue attività immunitarie.

La seconda e la quarta ipotesi sono invece ancora in fase di verifica ed hanno stimolato in questi anni una enorme mole di lavoro da parte di numerosi laboratori, i cui risultati non sempre concordanti suggeriscono comunque che si è forse nella giusta direzione.

Analizzando più da vicino quello che avviene nella donna nella fase dell’impianto, si ha che tra il momento dell’ovulazione e quello dell’impianto passano mediamente sei giorni. Durante questo periodo l’ovocita attraversa le tube, viene fecondato dagli spermatozoi e come embrione che si va sviluppando arriva dopo circa tre giorni nell’utero.

A questo stadio l’embrione è a dodici-sedici cellule, continua a svilupparsi fino allo stadio di blastocisti e dopo altri tre giorni, senza nessuna pausa nel suo sviluppo, si impianta.

Ma non tutti i mammiferi hanno questi tempi di sviluppo, ed in alcuni si è osservato l’interessante fenomeno della “diapausa”, di una fase cioè in cui lo sviluppo embrionale si arresta e l’embrione fluttua per un tempo variabile nell’utero prima di impiantarsi. Questo succede ad esempio nel cervo, nel tasso e nei roditori, e può dipendere dalla lattazione come nei ratti adulti, e da fattori stagionali che impongono un intervallo tra fecondazione ed impianto in altri animali.

Nel periodo della diapausa, che in alcuni animali può durare anche alcuni mesi, la divisione cellulare il metabolismo e quindi lo sviluppo embrionale rallentano notevolmente fino ad arrestarsi. Rallentano le sintesi di macromolecole quali proteine, RNA, DNA, si riduce il consumo di glucosio ecc., per poi riprendere il tutto normalmente quando l'utero è di nuovo pronto per l'impianto. Questo interessante fenomeno ha suggerito un esperimento la cui domanda era: "cosa succede se avendo un utero ed un embrione in diapausa ed un utero ed embrione non in diapausa, si scambiano gli embrioni tra di loro?". Il risultato è stato che l'embrione bloccato nel suo sviluppo in diapausa posto nell'utero non in diapausa riprese attivamente a dividersi ed a svilupparsi, mentre l'embrione che si stava normalmente sviluppando posto nell'utero in diapausa si arrestò smettendo di svilupparsi. Ciò ha portato alcuni autori a trarre la conclusione che nell'impianto chi regola il successo o meno è l'utero, assegnandogli quindi un ruolo primario.

In effetti l'utero durante le varie fasi del ciclo della donna va incontro a dei cambiamenti sia biochimici che morfologici, per cui non è azzardato ipotizzare che soltanto durante una certa specifica fase l'utero è pronto ad accettare l'embrione, regolando quindi la possibilità o meno dell'impianto. Durante la fase dell'impianto inoltre l'utero è soggetto ad una specifica azione degli ormoni steroidei prodotti dall'ovaio durante la fase secretoria precoce. Questo porta ad un rapido cambiamento della composizione biochimica del fluido uterino, con interazioni nuove tra stroma uterino ed epitelio, e cambi nelle secrezioni delle ghiandole uterine. Aumenta il flusso sanguigno, il consumo di ossigeno, il livello di istamina, e questi cambiamenti suggeriscono come il tempo ottimale di risposta dell'utero ad un embrione che si deve impiantare è specifico e forse limitato nel tempo, e come inoltre il corretto evolversi dei vari processi biochimici sia necessario per il successo dell'interazione embrione-utero.

Ma se come abbiamo accennato brevemente, le condizioni uterine sono importanti, un ruolo non indifferente va comunque assegnato all'embrione, alla sua integrità al momento dell'impianto ed al suo sviluppo cellulare. Analizzando quali sono le strutture cellulari che interagiscono specificamente tra di loro, si è visto che benché molti tipi cellulari uterini incontrano la blastocisti, quest'ultima interagisce con l'utero con un solo tipo di tessuto: il trofoblasto (Faulk et al., 1982), tanto e forse sarebbe più appropriato abbandonare il tradizionale termine "materno-fetale" per l'anatomicamente più preciso "materno-trofoblasto".

Osservato secondo un criterio istologico si possono distinguere circa quattro popolazioni cellulari trofoblastiche, che analizzate poi secondo un criterio immunologico presentano delle differenze interessanti, in quanto due sono prive degli antigeni del MHC (major histocompatibility complex) di classe I e II, mentre altri due tipi di trofoblasto hanno la sola classe I di antigeni.



Studiando un pò più in dettaglio le prime fasi di contatto tra un embrione e l'utero, si è determinato, con studi di microscopia elettronica ed immunoistologici, che questo primo contatto essenzialmente tende ad assicurare all'embrione, che deve svilupparsi, il supporto nutritivo del sangue materno. Per cui specificamente il citotroblasto stabilisce una testa di ponte con l'endometrio uterino collegandosi direttamente con le arterie uterine dalla caratteristica forma a spirale, avvolgendole e finendo con il sostituirsi all'endotelio uterino. In definitiva, quello che inizialmente era un primo contatto finisce con l'essere una vera e propria invasione, una sostituzione dell'endotelio uterino ricco di arterie e spirali con il trofoblasto endovascolare.

Che una tale sostituzione avvenga realmente in questa fase è stata confermata anche con dati immunologici, determinando la presenza su questi tessuti degli antigeni del MHC, e dimostrando contrariamente a quanto si pensava, che il trofoblasto endovascolare è positivo ad anticorpi monoclonali contro la classe I, ma negativo alla classe II degli antigeni del MHC.

E tornando al quesito iniziale della interazione immunologica embrione-utero, è molto plausibile ipotizzare che i componenti del sistema immunitario materno incontrano le cellule del trofoblasto endovascolare prima che queste penetrino negli spazi intervillosi ricchi di sangue della placenta materna, per cui l'assenza degli antigeni HLA-A, B, C sul trofoblasto placentare può non avere questa grande importanza nello spiegare il non rigetto dell'embrione, dal momento che le cellule immunocompetenti possono avere già incontrato questi antigeni sul trofoblasto endovascolare.

Grazie alla possibilità di ottenere sufficienti quantità di epitelio amniotico umano, sono stati prodotti una vasta serie di anticorpi monoclonali. Uno di questi è specifico per le glicoproteine delle cellule epiteliali amniotiche, ma fatto più importante, è specifico anche per il citotrofoblasto, per cui sarebbe la prima volta che si riesce a dare ai due sistemi, trofoblasto ed epitelio amniotico, un comune antenato grazie al prodotto di un gene in comune (Hsi, 1983).

Una ulteriore popolazione di cellule trofoblasto che si viene a trovare ad tessuto connettivo dell'utero è il trofoblasto interstiziale. Esso è immunoistologicamente un citotrofoblasto, ma non è correlato né alla placenta né alle arterie a spirali, e non deriva dall'amniocorion per la semplice ragione che è stato trovato ed identificato prima che l'amniocorion si espanda fondendosi con la decidua. A volte queste strutture del trofoblasto interstiziale si fondono tra di loro dando origine alle caratteristiche cellule uterine giganti.

Da un punto di vista immunologico, negli anni passati si era arrivati alla conclusione che le varie popolazioni trofoblastiche mancassero degli antigeni del MHC, in quanto i primi risultati sul sincitiotrofoblasto dei villi corionici aveva portato alla conclusione che questa popolazione fosse MHC-negativa. Questa conclusione era stata estesa sia al trofoblasto interstiziale

presente nel miometrio sia a quello endovascolare presente tra le arterie a spirali. Ma questa estrapolazione è risultata sbagliata in quanto antigeni della classe I del MHC non solo sono stati trovati sul trofoblasto endovascolare ma anche su quello interstiziale. Resta comunque confermato che il sincitiotrofoblasto manca di antigeni del MHC, come riportato recentemente da Sundenland (Sundenland et al., 1981), usando anticorpi monoclonali.

Tutti questi studi immunologici sugli antigeni del trofoblasto (TA) sono stati resi possibili dallo sviluppo delle tecniche per isolare membrane trofoblastiche, ed avendo con tecniche immunochimiche purificato alcuni di questi antigeni, dopo accurati studi si è arrivati alla conclusione che gli antigeni del gruppo TA1 sono implicati nella relazione "materno-trofoblasto" fin dalle prime fasi della gravidanza, restando presenti nel siero della madre ed aumentando fino al momento del parto, per poi diminuire una settimana dopo il parto.

La presenza di questi antigeni della membrana del trofoblasto capaci di inibire una reazione MLC (mixed lymphocyte culture), può forse durante la fase d'impianto giustificare la coesistenza di cellule di individui diversi.

Un'altra ipotesi di ricerca per spiegare il successo dell'impianto embrionale e su cui in questi anni hanno lavorato diversi laboratori, è basata sul ruolo che possono avere molecole come l'HCG secrete durante le prime fasi della gravidanza. Nei primati la secrezione di CG (chorionic gonadotropin) da parte del trofoblasto è responsabile del sostentamento del corpo luteo che normalmente declinerebbe alla fine della fase luteale del ciclo, trasformandolo nel corpo luteo della gravidanza. Il sistema endocrino materno riconosce una nuova gravidanza attraverso questo meccanismo, con conseguente secrezione di progesterone.

Con i tests analitici che sono oggi disponibili la CG viene determinata in un tempo molto precoce che pressoché coincide con quello dell'impianto embrionale. Nella donna infatti le determinazioni più precoci di HCG sono state ottenute intorno al sesto giorno dalla fecondazione, che corrisponde appunto al tempo dell'impianto.

Negli anni scorsi un punto controverso era se la CG fosse secreta dalla blastocisti prima di impiantarsi o quando inizia il primo attaccamento del trofoblasto dell'endometrio uterino.

Recentemente per la blastocisti umana è stata determinata secrezione di HCG da parte di embrioni umani coltivati in vitro (Fishel et al, 1984).

L'ovocita era stato ottenuto per laparoscopia nell'ambito di un progetto di fecondazione in vitro (IVF-ET). L'embrione coltivato in vitro in un mezzo di coltura al 15% di siero materno, era stato denudato da tutte le cellule del cumulo ooforo, e della zona pellucida tramite un rapido bagno di venti secondi in una soluzione di Tyrode e pH 2.0.

Il mezzo di coltura dove veniva cresciuto l'embrione cambiato ogni giorno e congelato a -20° C, venne poi analizzato per il suo contenuto di HCG.

I risultati sono stati che non si è trovata nessuna traccia di HCG dopo 110-120 ore dalla fecondazione, che solo dopo 170-197 ore si cominciarono a determinare piccole quantità di HCG, mentre grosse quantità di HCG si riscontrarono solo dopo 288 ore con l'embrione già allo stadio di trofoblasto.

Questo esperimento quindi benché non dice se l'HCG è secreto dal sincitiotrofoblasto o dal citotrofoblasto, dice però che ad uno stadio molto precoce l'embrione è capace di sintetizzare e secernere una molecola complessa come l'HCG, e che è capace di sintetizzarla in vitro senza nessun aiuto o interazione con le cellule dell'endometrio uterino.

A questo punto la domanda è se questa molecola ha o meno la capacità di reprimere la risposta immunitaria materna contro il trofoblasto, se ciò può essere ritenuta la molecola o una delle molecole che l'embrione usa per sfuggire al rigetto.

La metodologia che si è sin qui usata da parte dei vari laboratori è stata di provare in vitro la capacità di questa molecola di inibire la risposta di linfociti umani a stimoli antigenici aspecifici.

I lavori che sono comparsi in letteratura a questo proposito sono abbastanza controversi (Amoroso et al, 1976). Infatti ad un lavoro iniziale di Adcock (Adcock et al. 1973) che dimostrava una possibile funzione immunosoppressiva dell'HCG, ne seguì uno di Muchmore (Muchmore et al., 1977), il quale suggeriva che ad inibire la risposta linfocitaria al PHA non era tanto l'HCG in sé, quanto un contaminante presente nelle preparazioni commerciali di HCG. Si dimostrò infatti successivamente che questo contaminante poteva essere dializzato via. Analizzando però tutti questi lavori una chiara affermazione di una ipotesi o dell'altra non si riesce ad avere. Infatti benché gli autori dimostrano che il contaminante separato dall'HCG è immuno-soppressivo, non altrettanto chiara è la dimostrazione che non lo sia anche l'HCG.

I metodi in vitro che fino ad ora sono stati usati per saggiare l'attività immunosoppressiva del HCG implicano una serie di manipolazioni della popolazione linfocitaria, manipolazioni che variando da laboratorio a laboratorio, potrebbero spiegare i risultati discordanti finora ottenuti.

Recentemente è stato messo a punto (Cocchiara et al, 1983) un modello per determinare la modulazione dell'attività linfocitaria per azione di antigeni, che riduce al massimo le manipolazioni sul linfocita e che permette di determinare l'espressione delle immunoglobuline di superficie di linfociti che da un punto di vista differenziativo stanno ad una tappa precedente a quella delle plasma-cellule attivamente secernenti immunoglobuline.

Con questo modello è stata studiata l'azione di preparazione commerciale di HCG e risultati preliminari sembrano suggerire un suo ruolo soppressivo nei confronti dell'attività linfocitaria (Cocchiara et al., 1983-1984). Resta il problema da risolvere se questa attività è da HCG o da contaminante o da ambedue, ed a questo riguardo la soluzione migliore

resta il purificare queste preparazioni commerciali di HCG su una colonna di affinity chromatography con legato un anticorpo monoclonale anti HCG. In questo modo l'HCG ottenuto è sicuramente privo di contaminanti e sarà possibile stabilirne la sua reale attività immunosoppressiva.

Un ulteriore candidato al ruolo di soppressore della risposta immunitaria materna è un fattore isolato dal gruppo che lavora a Brisbane (Morton et al., 1976, 1977), fattore che compare poche ore dopo la fecondazione, risultando così uno dei fattori più precoci della gravidanza fino ad ora determinati. Gli autori in un loro lavoro suggeriscono che questo EPF (early pregnancy factor) possa essere il contaminante di cui si parlava a proposito dell'HCG (Rolfe et al., 1983), ed attualmente questo gruppo sta lavorando per chiarire un po' più dettagliatamente il meccanismo con cui questo EPF esercita il suo ruolo immunosoppressivo. Altre molecole presenti in buona quantità sia nei secreti uterini durante la fase di impianto sia dopo, sono gli ormoni steroidei.

Sia il progesterone che l'estradiolo, testosterone ed estrogeno sono stati provati per un loro eventuale ruolo immunosoppressivo, ma fino ad oggi i dati pubblicati in letteratura negano un qualsiasi ruolo a questa classe di molecole (Schiff et al., 1975).

Esiste quindi come abbiamo visto anche per l'embrione un ruolo non secondario nella regolazione dell'impianto, un ruolo che è principalmente determinato dalla sua capacità di farsi riconoscere dal sistema immunologico della madre, capacità che è intatta, tanto è vero che si è in grado di produrre antisieri eterologhi sia contro antigeni presenti negli ovociti che poi allo stadio di morula, che allo stadio di blastocisti, includendo in questi anche antigeni della zona pellucida. Questo quindi dimostra ulteriormente che l'embrione antigenicamente è attivo, non è mascherato, che sulla superficie dell'embrione vi sono antigeni capaci di stimolare una risposta immunitaria. che l'embrione è attivo già a questo stadio anche geneticamente in quanto è stato dimostrato sull'embrione presenza di antigeni paterni, e che in generale questi antigeni sono espressi ad uno stadio molto precoce arrivando per alcuni antigeni ad essere determinati fin dallo stadio di due cellule. Tutto questo quindi suggerisce che se rigetto non c'è da parte della madre questo non è certo dovuto ad una mancanza di espressione antigenica da parte dell'embrione.

Nella fecondazione in vitro (IVF/ET) l'embrione quando raggiunge lo stadio di 4-8 cellule viene trasferito in utero. Il numero di embrioni che si possono trasferire contemporaneamente non è limitato, ma recentemente opinioni contrastanti sono emerse a questo proposito. Inizialmente infatti grazie anche alla iperstimolazione ovarica si trasferivano tutti gli embrioni che si riusciva ad ottenere, mentre successivamente aumentando il numero dei casi su cui poter applicare una analisi statistica ci si accorse che oltre tre embrioni trasferiti contemporaneamente il numero delle gravidanze invece

che aumentare diminuiva. Ma ancora recentemente (Cirudzinskas, 1984) è stato riportato che in natura la percentuale di concepimento è più alta di quanto si pensava, solo che in fase molto precoce entro il primo mese vi è un numero molto alto di aborti, di cui prima dello sviluppo delle tecnologie provocate dalla IVF-ET non si aveva sentore.

Da ciò comunque ne deriva che almeno inizialmente il numero di embrioni che si impiantano è notevole per cui ci si sta orientando nuovamente ad aumentare il numero di embrioni da trasferire contemporaneamente, rivedendo in maniera critica i dati sul rapporto numero di embrioni trasferiti e gravidanze.

La fecondazione in vitro come è noto è una metodologia che assicura mediamente un 15-20% di successo ed ha come tappa limitante proprio la fase dell'impianto, in quanto le altre e cioè il prelievo, fecondazione e sviluppo dell'embrione riescono ormai nel 80-90% dei casi. E' quindi su questa fase di impianto embrionale che occorre puntare tutti gli sforzi della ricerca scientifica, unendo le proprie esperienze e capacità lavorative con altri gruppi di ricerca interessati al problema.

## La "qualità" dei bambini nati da concepimenti assistiti

Dalla nascita della prima bambina concepita in vitro nel maggio 1984 abbiamo avviato un programma di follow-up volto alla verifica della normale evoluzione dei bambini nati in seguito alle nuove tecniche di fecondazione.

E' indubbio infatti che molti fattori fanno di queste gravidanze "preziose" delle gravidanze ad alto rischio. Alcuni di questi sono legati alle

Tecnica di fecondazione	Data inizio	N° nati vivi	Sesso		anomalie congenite	N° nati morti
			M	F		
FIV/ET	1984,5	46	21	25	*** 1	
congelamento embrionario	1987,4	1	1			
GIFT	1985,11	43	24	19	2	

**Tabella 1. I dati relativi ai bambini nati da concepimenti assistiti presso la Fondazione per gli studi sulla Riproduzione Umana di Palermo dal maggio 1984 al 20 aprile 1987.**

condizioni biologiche delle coppie sulle quali si opera: l'età materna spesso avanzata e la lunga storia di sterilità già di per se stessa fattore di rischio gravidico e perinatale; altri fattori sono legati alle tecniche stesse: alcuni indiscutibili come le problematiche legate alle gravidanze plurime. conseguenza dell'induzione farmacologica dell'ovulazione e del trasferimento di più embrioni nel corso della fecondazione in vitro o di più ovociti nel corso di GIFT: altri solo ipotetici e comunque non dimostrati, ma certamente più inquietanti come l'eventuale incremento di patologia genetica dovuto alle tecniche di capacitazione e di congelamento dello sperma o alla manipolazione dei gameti femminili nella fecondazione extracorporea o nella GIFT o ancor più nel congelamento degli embrioni.

Dal maggio 1984 all'aprile 1987 sono nati presso il nostro Centro 46 bambini da fecondazione in vitro (FIV/ET), 43 con metodo GIFT, 1 dopo trasferimento di embrione congelato (Tab. 1).

Il follow-up prevede un esame dettagliato dei bambini alla nascita e poi bilanci di salute a 1 mese, 3 mesi, 9 mesi, 12 mesi ed ogni anno fino a 4 anni.

Ma poichè dei 90 bambini nati in seguito all'applicazione delle tecniche di fecondazione, solo 39 sono nati a Palermo, la valutazione degli altri bambini distribuiti nelle varie regioni di Italia avviene mediante i dati che i genitori ci inviano nei tempi previsti dal follow-up su cartelle da noi elaborate, compilate poi dal loro pediatra di fiducia in modo da ottenere informazioni il più possibile complete. E' però previsto per questi bambini un controllo annuale presso la nostra sede nel tentativo di standardizzare il metodo.

I dati raccolti nelle cartelle provengono da 4 periodi cronologici: il periodo preconcezionale e il concepimento; la gravidanza e il periodo prenatale; il parto e il periodo neonatale; i controlli della salute in seguito. I dati del periodo anticoncezionale e prenatale comprendono oltre le notizie anamnestiche usuali,

Tecnica fecondazione	di Data inizio	N. nati vivi	Sesso		Anomalie congenite	N. nati morti
			M	F		
FIV/ET	1984,5	46	21	25	**°1	
Congelam. embrionario	1987,4	1	1			
GIFT	1985,11	43	24	19	2	2

\*\*A.43 - Trisomia 21 (aborto eugenetico)  
°A.33 - Mielomeningocele dopo FIV/ET con ovodonazione (aborto eugenetico)

**Tabella 1. Dati relativi ai bambini nati da concepimenti assistiti presso la Fondazione per gli Studi sulla Riproduzione Umana di Palermo dal maggio 1984 al 20 aprile 1987.**

l'esame dello sperma del padre, così come trattamenti medici o chirurgici subito dalla madre allo scopo di promuoverne la fertilità. I dati sulla gravidanza includono la data del concepimento, il tipo di tecnica adoperata, le eventuali ospedalizzazioni, i farmaci somministrati, i dati della biometria ecografica, la eventuale amniocentesi che viene spesso praticata in relazione all'età avanzata delle pazienti. Alla nascita, oltre ad un esame dettagliato del bambino con l'attribuzione del punteggio di Apgar, viene posto particolare rilievo all'età gestazionale. È noto infatti che non sempre è possibile con i criteri tradizionali ottenere una esatta valutazione dell'età gestazionale che è fondamentale per una valutazione di rischio del neonato. Invece, in questi bambini il momento della fecondazione è conosciuto con esattezza e quindi l'età gestazionale del prodotto del concepimento è calcolata con precisione: questo è un dato estremamente interessante per i neonatologi. I dati di seguito comprendono una valutazione globale della salute, dello sviluppo e del comportamento.

Abbiamo riscontrato anomalie congenite in 3 bambini. Non si tratta comunque di anomalie particolarmente gravi: un maschio di 3,100 kg. presentava una ipospadia di grado lieve, un altro bambino di sesso maschile, secondo nato da un parto trigemino presentava una lieve malformazione scheletrica con presenza di due emispondili e di una costa sovranumeraria, un neonato di sesso maschile secondo nato da una gravidanza trigemina è portatore di un angioma cavernoso in regione frontale.

In due pazienti sottoposte a tecnica FIVET si è dovuto procedere ad un aborto eugenetico: in una donna di 43 anni per il riscontro di un feto affetto da trisomia 21, in un'altra paziente di anni 33 in seguito a diagnosi ecografica di mielomeningocele.

Ci sono stati 2 neonati morti di sesso maschile entrambi provenienti da gravidanze trigemine, rispettivamente del peso di kg. 1,800 e kg. 1,620.

Uno dei rischi sicuramente accertati, perchè riferito da tutta la letteratura mondiale, è l'accresciuta frequenza di gravidanze plurime.

Abbiamo riscontrato una percentuale del 14% di gravidanze plurime. Ci sono state 29 gravidanze multiple (36%) diagnosticate con gli ultrasuoni prima della 12 settimana di gestazione. Nel 48% di esse il numero dei feti alla nascita era inferiore al numero dei sacchi gestazionali all'inizio della gravidanza (tab. 2).

	< 12 settimane	Al parto
Gravidanze gemellari	17	7
Gravidanze trigemine	9	4
Gravidanze quadrigemine	3	-

**Tabella 2. "Regressione fetale" spontanea nelle gravidanze multiple.**

Sicuramente importanti sono i rischi connessi alle gravidanze multiple per il possibile verificarsi di varie condizioni patologiche: tra esse le più frequenti sono la prematurità e il ritardato accrescimento intrauterino con basso peso alla nascita; più elevata inoltre la incidenza di presentazioni anomale, specie per il secondo gemello; così la mortalità perinatale e la frequenza di malformazioni congenite letali.

In alcuni studi eseguiti sui primi nati da fecondazione in vitro veniva suggerita l'ipotesi che il concepimento in vitro favorisse la nascita di bambini di basso peso e predisposti ad un parto pretermine.

In effetti un certo numero delle gravidanze della nostra casistica si sono interrotte prima del tempo, ma questo è senz'altro da mettere in relazione con l'aumentata incidenza di gravidanze multiple.

D'altra parte il basso peso alla nascita è anch'esso da mettere in relazione con le nascite pretermine e con le gravidanze multiple: non appare in alcun modo che i bambini concepiti in vitro siano di per sé ad alto rischio di ritardo di crescita intrauterina e di basso peso alla nascita.

La fig. 22 mostra infatti i pesi dei primi 76 bambini nati in rapporto all'età gestazionale, classificati secondo Lubchenco in pesanti, adeguati e leggeri per la data.

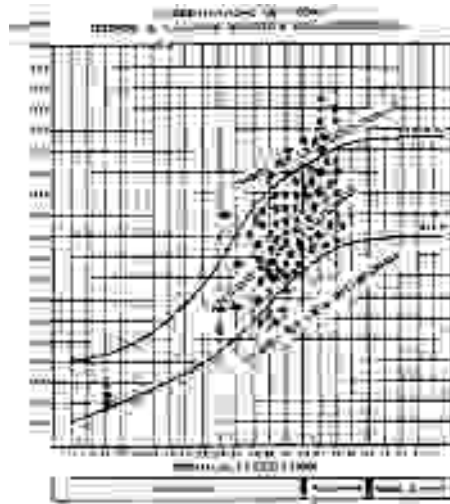
In generale i risultati ostetrici in queste pazienti sono concordi con le aspettative per la loro età e per le altre speciali caratteristiche prima considerate.

D'altra parte la valutazione intensiva multidisciplinare che si sta cominciando a condurre in tutti i centri del mondo ci darà sempre informazioni più dettagliate. Sarebbe importante quando possibile esaminare il materiale abortivo per escludere che ci siano delle anomalie citogenetiche differenti da quelle che possono incidere nelle fecondazione naturale.

Il follow-up che stiamo conducendo mediante l'intervento di un pediatra neonatologo, cui compete la valutazione del bambino nel suo insieme e la elaborazione dei dati inviati dai genitori, non è esente da critiche, per la disomogeneità della popolazione che proviene da varie parti d'Italia con livelli di assistenza ostetrica e neonatale diversa. D'altra parte, trattandosi di bambini teoricamente non a rischio di handicaps, abbiamo volutamente evitato una eccessiva medicalizzazione con richieste di controlli specialistici, ecografici, biologi o ematologi ed abbiamo privilegiato l'aspetto di valutazione globale del bambino e del suo accrescimento, questo perché vogliamo che la nostra opera sia completamento del lavoro fatto dai ginecologi, supporto ai genitori così duramente stressati dall'ansia dell'attesa.

Ma date le particolarissime modalità con cui il bambino è stato concepito e realizzato, come categoria potrebbe esserci un rischio specifico in merito alla possibile alterazione del rapporto genitori-bambino (eccessiva ansia? Iperprotezione? Eccessiva medicalizzazione?).





**Figura 22. Peso alla nascita di 76 bambini in rapporto all'età gestazionale. 60 Bambini adeguati all'età gestazionale; 5 leggeri per l'età gestazionale; 11 grandi per l'età gestazionale.**

In conclusione anche se nel condurre il follow-up sono stati incontrati diversi problemi organizzativi, per altro attesi dovuti alla dispersione delle nascite, i risultati sono stati incoraggianti, e perché è stato possibile controllare il 74% dei bambini ad 1 anno di vita, e perché abbiamo avuto una partecipazione rimarchevole da parte dei genitori superiore alle nostre attese.

Infine, noi pensiamo che, se i periodici bilanci di salute sono altamente auspicabili specie nel primo anno di vita per tutti i bambini, in questi il controllo longitudinale è considerato obbligatorio e ciò per dare maggiori certezze a chi si accosta a queste metodiche, in quanto la finalità del Centro di Fecondazione di Palermo non è quello di dare un figlio ad "ogni costo" alle coppie che lo richiedono, ma un figlio sano sia sotto il profilo fisico che psichico.

## Risultati e conclusioni

I risultati della FIVET sono oggi piuttosto omogenei presso tutti i gruppi di lavoro e si considera che la percentuale dei pick-up positivi sia del 95% delle pazienti giunti all'intervento. Tale percentuale non presenta differenza fra i gruppi che lavorano in laparoscopia e quelli che lavorano sotto controllo ecografico. Le percentuali di fertilizzazione e clivaggio oscillano tra il 65 e l'85% degli ovociti aspirati mentre i tassi di gravidanza oscillano tra il 15 ed il 20% per pazienti e tra il 18 ed il 25% per pazienti trasferite.

Idea più precisa di tali cifre può essere ottenuta dal controllo dei dati di un anno di attività del nostro programma FIVET.

Sono stati eseguiti 175 pick-up, di questi sono stati positivi 164 pari al 93,7%, sono stati recuperati 681 ovociti pari a 3,9 ovociti per pick-up positivi, di essi se ne sono fecondati 460 pari al 71,5% degli ovociti recuperati. Sono stati trasferiti 321 embrioni a 126 pazienti pari a 2,5 embrioni per paziente e 69,7% degli embrioni fertilizzati. Si sono ottenuti 25 gravidanze pari al 15,2% dei pick-up eseguiti ed al 19,8% delle pazienti trasferite.

Sei delle pazienti considerate hanno partorito, 11 hanno una gravidanza in evoluzione, 8 hanno abortito.

A questa cifra bisogna aggiungere la percentuale di gravidanze ottenute dalla reimmissione di embrioni soprannumerati congelati.

Questa percentuale è di circa 10% di gravidanze penalizzate dall'altissima percentuale di aborti, circa 75%.

Per quel che riguarda il GIFT una idea è data da una serie di 184 pazienti sottoposte a GIFT per un totale di 204 cicli, in questa serie si sono ottenute 66 gravidanze pari al 32,83% per ciclo ed al 35,86% per paziente.

Si sono verificati 12 aborti ed 1 gravidanza extrauterina delle 66 gravidanze 1 è stata quadrupla 2 triple e 3 gemellari. Ciò ha fatto rivedere la nostra posizione sul numero massimo di ovociti da trasferire.

Anche con il GIFT si dispone di un gran numero di ovociti soprannumerario da avviare alla FIV ed al congelamento embrionario allo scopo di ottenere un maggiore numero di gravidanze per ciclo di trattamento.

A conclusione appare evidente che i risultati del GIFT sono nettamente superiori a quelli della FIVET, ciò trova una evidente giustificazione nella maggiore fisiologia dell'intervento ma anche nel fatto che si opera in genere su donne con apparati genitali meno provati da eventi patologici.

Anche i risultati della FIVET sono decisamente accettabili al punto che, pur non essendo decisamente una panacea per tutti i tipi di sterilità essa viene universalmente considerata nelle indicazioni concrete un indispensabile presidio terapeutico nella sterilità di origine tubarica.

## BIBLIOGRAFIA

Austin, CR. e Short, R.V.: "Reproduction in mammals I - Germ cells and fertilization. Second edition. Cambridge University Press, Cambridge, London, New York, Melbourne, Sydney, 1982.

Battaglia, A., Cittadini, E., Comparetto, G., Guastella G., Gullo, D., Quartaro, P. e Venezia, R.: "A proposito della fecondazione extracorpora". *Contr. Fertil. Sess.* 9, 407, 1982.

Blandau, R.J.B.: "In vitro fertilization and embryo transfer". In "Modern in Infertility and Conception Control". Vol. 2. Eds. E.E. Wallach, R.S. Kempers, Harper and Row, Pub., Philadelphia, pag. 239, 1982.

Carmina, M., Cittadini, E., Benigno, MA., Fionino, F. e Guastella, G.: "Aspetti medici, etici, ostetrici e pediatrici dei concepimenti indotti. *Contr. Sess.* 12, 361, 1985.

Cittadini, E.: "La fertilizzazione extracorpora". *Feder. Medica* 35, 299, 1982.

Cittadini, E., Carmina, M.: "Dallovulo al bambino". *Atti delle giornate pediatriche di Sabaudia*, Marzo 1985.

Coeciara, R., Lorico, A., Cel'ahj, E., Cittadini, E. e Geraci, D.: "Modulation of lymphocyte response by hormones". *Acta Europea Fertilitatis* 14, 197, 1983.

Edwards, R.G.: "Conception in Human Female". Academic Press London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco. 1980.

Edwards, RU.: "The current clinical success of human in vitro fertilization". In "Recent progress in human in vitro fertilization" Eds., W. Feichtinger e P. Kemeter. COFESE. Ed., Palermo, 17, 1984.

Edwards R.G., Steptoc, P.C., Fowler, RE. e Bailie, J.: "Observations on preovulatory human ovarian follicles and their aspirates". *Brit. J. Obstet. Gynacol.* 87, 769, 1980a.

Gianaroli, L., Mahadevan, M., Trounson, A., Lenton, J. e Wood, C.: "The diagnostic value of in vitro fertilization and embryo transfer". *Eur. J. Fertil. Steril.* 15, 249, 1984.

Gianaroli, L., Trounson, A., Lenton, J. e Wood, C.: "The diagnostic value of in vitro fertilization and embryo transfer". 39th Annual Meeting - The American Fertility Society, San Francisco, Aprile 16-20, 1983.

Guastella, G., Cefalù, E., Ciniminna, R., Comparetto, G., Gullo, D., Palermo, R., Salerno, P., Amodeo, G. e Cittadini E.: "One year's experience with the GIFT method. *Acta Fur. Fertil.* 17, 93, 1986.

Guastella, G., Comparetto, G., Gullo, D., Palermo, R., Venezia, R., Cefalù, E., Ciniminna, R., Salerno, P. e Cittadini, E.: "The Gamete Intrafallopian Transfer in the treatment of infertility: the first series at the University of Palermo". *Fertil. Steril.* 46: 417, 1986.

Johnston, W.I.H., Speirs, A.L., Gronow M.J., Mc Rain, J.C. e Lopata A.: "Clinical aspects of in Vitro fertilization and embryo transfer". In "In vitro fertilization and embryo transfer". Eds.: P.G. Crosignani e B.L. Rubin. Academic Press, Londra, pag. 353, 1983.

Jones, H.W.: "In vitro fertilization". In "Current Therapy of Infertility, 1984-1985". Eds.: C.R., Garcia. L. Mastroianni, RD. Amelar, L. Dubin, B.C. Decker Inc., Philadelphia, pag. 117, 1984.

Jones, H.W., Acosta, A.A. e Garcia, J.: "A technique for the aspiration of oocytes from human ovarian follicles". *Fertil. Steril.* 37, 26, 1982.

Lenton, J., Trounson, A., Wood, C. e Gianaroli, L.: "In Vitro fertilization and embryo transfer: the Monash Group experiences 1981-83". *Eur. J. Fertil. Steril.* 14, 95, 1983.

Lenz, S. e Lauritsen, S.: "ultrasonically guided percutaneous aspiration of human follicles in local anaesthesia: a new method to collect oocytes for in vitro fertilization". *Fertil. Steril.* 38. 673, 1982.

Lopata, A., Brown IB., Lenton, J.F., Talbot, J.F., Talbot, J.M. e Wood, C.: "In vitro fertilization of preovulatory oocytes and embryo transfer in infertile patients treated with clomiphene and human chorionic gonadotropin". *Fertil. Steril.* 30, 27, 1978.

Lopata, A., Johnston, W.I.H., Lenton, J.F., Muchnicki, D., MacTalbot, J. e Wood, C.: "Collection of human oocytes at laparoscopy and laparotomy". *Fertil. Steril.* 25, 1030, 1974.

Lopata, A., Kellow, G., Leung, P., du Plessis, Y., McBain, J.C., Gronow, M.J. e

Johnston, Wilt.: "The ovarion follicular response in relation to fertilization, cleavage and pregnancy success rates". In, "In vitro fertilization and embryo transfer". Eds., PG. Crosignani e B.L. Rubin. Academic Press, London, pag. 341, 1983.

MeMaster, R., Vanagimachi, R. e Lopata, A.: "Penetration of human eggs by human spermatozoa in vitro". Bio. Reprtod. 19, 212, 1978.

Mastroianni, L. Jr. c Bigger iD.: "Fertilization and embryonic development in vitro". Plenum Press, New York, London. 1981.

Renou, P., Trounson, A.O., Wood, C. c Leeton, J.F.: "The collection of human oocytes for in vitro fertilization. An instrument for maximizing oocyte recovery rate". Fertil. Stenil. 35. 409, 1981.

Rolfe, B., Morton, H. e Clarke F.M.: "Early pregnancy factor, is an immunosuppressive contaminant of commercial preparations of human chonionic gonadotropin?" Clin. Exp. Immunol. 51, 45, 1983.

Steptoc P C "In vitro fertilization and embryo transrer". In "Proceedings of the 4th Serono Clinical Colloquium on Reproduction". Carmel, California, October 24-26, 1982.

Steptoc, P.C. e Edwards, R.G.: "Birth after the reimplantation of a human embryo". Lancet 2,366, 1978.

Steptoc, P.C. Webster, J., Fishel, S., Edwards, R.G. e Purdy, J.R: "Clinical aspects of in vitro fertilization". In, "In vitro fertilization and embryo transfer". Eds., PG. Crosignani e B.L. Ruhin. Academic Press, Londra, pag. 305, 1983.

Testart, 3. e Frydman, R.: "Minimum time between luteinizing hormone surge or human chorionic gonadotropin administration and follicular rupture". Fertil. Stenil. 37, 50, 1982.

Trounson, A.O.: "In vitro fertilization at Monash University". In "In vitro fertilization and embryo transfer". Eds. PG. Crosignani e 8.L. Rubin. Academic Press, Londra, pag. 315, 1983.

Wood, C. e Trouson, A.: "Clinical in vitro fertilization". Springer-Vet-lang. Berlin, Hcdelberg, New York, Tokyo, 1984.

## Indice

Istruzioni per l'Autore.....	pag 2
Editoriale.....»	3
Introduzione.....»	
La fecondazione in vitro con transfer dell'embrione.....»	5
Le indicazioni FIV/ET e la selezione delle pazienti.....»	7
Gli accertamenti diagnostici preliminari e la preparazione delle pazienti .....»	9
Il monitoraggio della fase ovulatoria .....»	11
Il pik up laparoscopico .....»	17
Il pik up ecografico .....»	21
la maturazione dell'ovocita .....»	25
Trattamento del liquido seminale .....»	27
Fertilizzazione e coltura in vitro degli embrioni ottenuti .....»	28
Il transfer dell'embrione.....»	30
Il congelamento dell'embrione.....»	33
Il GIFT .....»	37
La preselezione del sesso .....»	41
Possibili varianti della fecondazione artificiale.....»	43
Problematica dell'impianto .....»	45
La qualità dei bambini nati da concepimenti assistiti .....»	52
Risultati e conclusioni.....»	57
Bibliografia .....»	58
Volumi pubblicati nella collana Caleidoscopio.....»	61



# Caleidoscopio

Italiano

1. Rasso S.: *Principi generali di endocrinologia*. Gennaio '83
2. Rasso S.: *L'ipotalamo endocrino*. Giugno '83
3. Rasso S.: *L'ipofisi*. Dicembre '83
4. Alagna., Masala A.: *La prolattina*. Aprile '84
5. Rasso S.: *Il pancreas endocrino*. Giugno '84
6. Fiorini I., Nardini A.: *Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza)*. Luglio '84.
7. Rasso S.: *L'obesità*. Settembre '84
8. Franceschetti F., Ferraretti A.P, Bolelli G.F., Bulletti C.: *Aspetti morfofunzionali dell'ovaio*. Novembre '84.
9. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (1)*. Dicembre '84.
10. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima*. Gennaio '85.
11. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda*. Febbraio '85.
12. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima*. Aprile '85.
13. Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.: *Il TSH*. Giugno '85.
14. Facchinetti F. e Petraglia F.: *La -endorfina plasmatica e liquorale*. Agosto '85.
15. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (1)*. Ottobre '85.
16. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda*. Dicembre '85.
17. Nuti R.: *Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale*. Febbraio '86
18. Cavallaro E.: *Ipnosi: una introduzione psicofisiologica*. Marzo '86.
19. Fanetti G.: *AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti*. Maggio '86.
20. Fiorini I., Nardini A.: *Toxoplasmosi, immunologia e clinica*. Luglio '86.
21. Limone P.: *Il feocromocitoma*. Settembre '86.
22. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.: *Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici*. Novembre '86.
23. Bolcato A.: *Allergia*. Gennaio '87.
24. Kubasik N.P.: *Il dosaggio enzimologico e fluoroenzimologico*. Febbraio '87.
25. Carani C.: *Patologie sessuali endocrino-metaboliche*. Marzo '87.
26. Sanna M., Carcassi R., Rasso S.: *Le banche dati in medicina*. Maggio '87.
27. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.:



- L'amenorrea.* Giugno '87.
28. Zilli A., Pagni E., Piazza M.: *Il paziente terminale.* Luglio '87.
  29. Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.: *Patologie prostatiche.* Settembre '87.
  30. Cingolani M.: *Manuale di ematologia e citologia ematologica.* Novembre '87.
  31. Kubasik N.P.: *Ibridomi ed anticorpi monoclonali.* Gennaio '88.
  32. Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.: *Diagnostica del carcinoma mammario.* Febbraio '88.
  33. Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.: *Neuroendocrinologia dello stress.* Marzo '88.
  34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M.: *La fecondazione in vitro.* Maggio '88.

**Caleidoscopio**  
**Rivista mensile di Medicina**  
anno 6, numero 34

**Direttore Responsabile**

Sergio Rasso  
Via Pietro Nenni, 6  
07100 Sassari  
Tel.-Fax 079 270464  
Tel. mobile 0338 2202502  
E-mail: rasso@ssnet.it

**Responsabile Ufficio Acquisti**

Giusi Cunietti

**EDITORE**

**Consulenti di Redazione**

Giancarlo Mazzocchi ed  
Angelo Maggio

**Segretaria di Direzione**

Letizia Cuccuru

**Servizio Abbonamenti**

Maria Grazia Papalia  
Flavio Damarciasi

Via Rio Torbido, 40  
16165 Genova (Italy)

Tel. (010) 83401 Numero Verde 800 801005 (senza prefisso);  
Telefax (010) 803498- 809070.

Internet URL: <http://medicalsistemas.editoria.com> e <http://www.medicalsistemas.it>  
La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Journal of Clinical Ligand Assay,  
Guida Pratica Immulite<sup>®</sup>, Caleidoscopio, Kaleidoscope, Caleidoscopio letterario, Pandora,  
Journal of Preventive Medicine and Hygiene, Tribuna Biologica e Medica.

**Stampa**

Tipolitografia ATA  
16143 Genova - Via G. Torti, 32 c.r.  
Tel. (010) 513120 - Fax (010) 503320

Registrazione Tribunale di Genova n. 34 del 31/7/1996  
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare: Maggio 1988  
Sped. in Abb. Post. 45%

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e  
scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento  
professionale continuo e riservata ai medici.

Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:  
"L'ECO DELLA STAMPA"  
Via Compagnoni, 28 - Milano