

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA
FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E
NATURALI

Corso di laurea triennale in Scienze Biologiche

ERSILIA TUMINO

Applicazione del “Polar Body Biopsy Pipette”
per l’analisi genetica del globulo polare.

TESI DI LAUREA

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Renata Viscuso

Anno Accademico 2008-2009

Indice

Indice	p.1
Premessa	p. 2
Introduzione	p. 5
Scopo del lavoro	p. 26
Materiali e metodi	p. 28
Risultati	p. 31
Conclusioni	p. 33
Bibliografia	p. 35

Premessa

Le conoscenze inerenti alla riproduzione umana stanno attraversando un rapido sviluppo per far fronte ad un importante problema “dell’uomo del ventunesimo secolo”: la fertilità.

Oggi, infatti, la possibilità di procreare è messa a rischio, oltre che da una serie di fattori patologici riguardanti in egual modo sia la donna che l’uomo, anche dall’organizzazione della società che induce ad un accentuato ritardo rispetto all’età biologica ottimale nell’attuare la prima gravidanza.

Inoltre, la capacità a procreare di entrambi i partner è minacciata dai numerosi fattori ambientali ed occupazionali, associati a nuovi stili di vita rispetto al passato e sicuramente scorretti, sia per abitudini, che per alimentazione, scarsa attività fisica, ecc.

Secondo i dati della SIdR, “Società Italiana della Riproduzione” si può affermare che, biologicamente, una giovane coppia senza problemi di salute che ha rapporti regolari senza precauzioni contraccettive, non ha più del 25% di possibilità di gravidanza per ogni ciclo ovulatorio. Partendo da questo dato di riferimento vengono poi ad aggiungersi le patologie vere e proprie rilevate dall’Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) secondo cui la

percentuale di coppie con problemi di fertilità di varia origine nei paesi industrializzati è circa del 10-20% e, secondo le stime dell'ISTAT, in Italia le coppie con problemi di fertilità sono circa il 20%.

Una coppia, secondo le linee guida emesse in allegato alla legge 40, è considerata infertile se non riesce ad ottenere una gravidanza dopo 12/24 mesi di rapporti mirati non protetti.

Tutte le coppie che non ottengono una gravidanza nei termini sopra definiti costituiscono la popolazione delle coppie infertili.

Questa popolazione è costituita da:

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

Valutare quali siano le cause dell'infertilità è molto difficile.

Una stima affidabile, benché relativa solo ad una parte della popolazione, proviene dai dati riguardanti le coppie che si rivolgono ai centri per la procreazione medicalmente assistita.

I dati raccolti dal Registro Nazionale sulla Procreazione Medicalmente Assistita sono i seguenti:

- infertilità maschile: 35,4%.
- infertilità femminile: 35,5%.
- infertilità maschile e femminile: 15%.
- infertilità idiopatica: 13,2%.
- altro: 1%.

Inoltre, la letteratura medica sottolinea sempre di più il ruolo di fattori psico-sociali di infertilità dovuti a fenomeni complessi come le associazioni tra abitudini di vita, ricerca del primo figlio in età tardiva, uso di droghe, abuso di alcool, fumo, condizioni lavorative stressanti, inquinamento (1). Tutto ciò porta la coppia in tempi più o meno lunghi a rivolgersi ai centri di procreazione medicalmente assistita per una diagnosi del proprio stato di fertilità e per l'appropriata strategia terapeutica.

Introduzione

Per tecniche di procreazione medicalmente assistita si intendono tutti quei procedimenti che comportano il trattamento di ovociti umani, di spermatozoi o embrioni nell'ambito di un progetto finalizzato a realizzare una gravidanza.

Questi procedimenti includono:

- ❖ l'inseminazione omologa;
- ❖ la fecondazione in vitro e il trasferimento embrionale;
- ❖ il trasferimento intra-tubarico dei gameti;
- ❖ il trasferimento intra-tubarico degli zigoti;
- ❖ il trasferimento intra-tubarico degli embrioni;
- ❖ la crioconservazione dei gameti e degli embrioni.

Queste tecniche sono attualmente rappresentate da una gamma di opzioni terapeutiche a diverso grado di invasività sia tecnica che psicologica sulla coppia.

La suddivisione qui riportata in Tecniche di I, II e III livello è stata effettuata tenendo conto della loro complessità e del grado di invasività tecnica.

Tecniche di I Livello:

- inseminazione sopracervicale in ciclo naturale eseguita utilizzando tecniche di preparazione del liquido seminale;
- induzione dell'ovulazione multipla associata ad inseminazione sopracervicale eseguita utilizzando tecniche di preparazione del liquido seminale;
- eventuale crioconservazione dei gameti maschili.

Tecniche di II Livello (procedure eseguibili in anestesia locale e/o sedazione profonda):

- fecondazione in vitro e trasferimento dell'embrione (FIVET);
- iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI);
- prelievo testicolare dei gameti (prelievo percutaneo o biopsia testicolare);
- eventuale crioconservazione di gameti maschili e femminili ed embrioni (nei limiti delle normative vigenti).

Tecniche di III Livello (procedure che necessitano di anestesia generale con intubazione):

- prelievo microchirurgico di gameti dal testicolo;
- prelievo degli ovociti per via laparoscopica (2).

Inoltre, nella popolazione delle coppie infertili e nella popolazione dei fertili vi sono donne che presentano il rischio di trasmettere un disordine genetico alla propria prole.

Lo studio dell'assetto cromosomico e genetico della coppia è compreso nel protocollo diagnostico per infertilità.

Attraverso l'analisi citogenetica è possibile studiare il patrimonio cromosomico degli individui (il cariotipo) allo scopo di evidenziare eventuali anomalie, sia numeriche (trisomie, monosomie), sia strutturali (traslocazioni, delezioni, ed inversioni).

Nell'adulto le indicazioni all'esecuzione del cariogramma sono: l'amenorrea primaria, che nella donna può portare all'identificazione di anomalie numeriche o strutturali del cromosoma X, oppure la poliabortività che può essere legata ad un'alterazione cromosomica strutturale, nell'uomo sono le alterazioni gravi dei parametri seminali.

Le cause cromosomiche più frequenti di sterilità sono le aneuploidie 47-XXY e 47-XYY, 45 XO, i mosaicismi, le alterazioni strutturali del cromosoma X, le traslocazioni robertsoniane o reciproche. I soggetti affetti da patologia autosomica o portatori di riarrangiamenti cromosomici bilanciati possono presentare infertilità a causa di un anomalo svolgimento dei processi meiotici o per la produzione di gameti non vitali (3).

La potenziale trasmissione di malattie genetiche alla progenie è un problema che interessa molte coppie. Grazie alle tecniche di diagnosi prenatale è possibile conoscere con buona approssimazione eventuali patologie genetiche fetali, ma in caso di positività le uniche opzioni rimangono, l'aborto volontario oppure la prosecuzione consapevole della gravidanza.

Un approccio alternativo, disponibile con tecnologie di riproduzione assistita (ART), è la diagnosi genetica preimpianto (PGD), con la quale è possibile verificare l'esistenza di un disordine genetico/cromosomico prima che l'embrione venga trasferito nell'utero della madre.

La PGD, anche grazie allo sviluppo della tecnica FISH, può essere effettuata da coppie a rischio di trasmissione di patologie legate ad alterazione di un singolo gene, come la fibrosi cistica o le talassemie, oppure, può essere effettuata per lo screening delle anomalie cromosomiche, sia numeriche (aneuploidie) che strutturali (inversioni o traslocazioni) (4).

Nel 1990, la PGD è stata introdotta come procedura sperimentale per selezionare geneticamente gli embrioni umani durante un ciclo di fecondazione in vitro (IVF). Dopo più di un decennio, la PGD è diventata una consolidata procedura clinica nelle tecniche di

riproduzione assistita con oltre 6.500 cicli di PGD eseguiti in tutto il mondo, la nascita di oltre 1000 bambini sani, e un tasso di gravidanza, per trasferimento, approssimativamente del 24%. La PGD è stata effettuata inizialmente per preesistenti disturbi monogenici ereditati per via mendeliana compresi i disturbi X-linked, la fibrosi cistica e la malattia di Tay-Sachs.

Malattie monogeniche	Gene
Autosomiche Dominanti	
Charcot Marie Tooth tipo 1A	PMP22
Fibrosi dei muscoli extraoculari congenita	KIF21A
Mano-Piede-Utero Sindrome	HOXD13- HOXA13
Holt-Oram, Sindrome di	TBX5
Huntington, malattia di	HD
Distrofia miotonica	DMPK
Distonia primaria	DYT1
Neurofibromatosi	NF1
Retinoblastoma	RB1
Paraplegia spastica tipo 3	SPG3A
Sclerosi tuberosa tipo 1	TSC1
Autosomiche Recessive	
Talassemia- β	HBB
Lipofuscinosi ceroidi neuronale - sindrome di Batten	PPT1
Fibrosi cistica	CFTR
Sindrome adreno-genitale – deficit 21-idrossilasi	CYP21A2
Fattore VII, deficit	F7
Febbre mediterranea familiare	FMF
Gangliosidosi	GLB1
Omocistinuria	MTHFR
Aciduria Mevalonica	MVK
Mucopolisaccaridosi Tipo IIIA - Sindrome di Sanfilippo tipo A	SGSH
Mucopolisaccaridosi Tipo VI - Sindrome di Maroteaux-Lamy	ARSB
Niemann-Pick malattia di	SMPD1
Anemia falciforme	HBB
Atrofia Muscolare Spinale	SMN1
Tay Sachs, malattia di	HEXA
X-linked	
Adrenoleucodistrofia	ABCD1
Talassemia- α e ritardo mentale, malattia di	ATRX
Charcot Marie Tooth tipo X	CMTX
Granulomatosi cronica – associata al cromosoma X	CYBB
Distrofia muscolare Duchenne-Becker	DMD
X-Fragile sindrome	FRAXA
Glucosio-6-fosfato deidrogenasi deficit	G6PD
Emofilia A	F8
Emofilia B	F9
Lesch-Nyhan malattia di	HPRT
Wiskott-Aldrich, Sindrome di	WAS

Tabella 1 – Malattie genetiche.

La PGD implica l'analisi molecolare del materiale genetico derivato da ovociti o embrioni nel corso di un ciclo di IVF. Gli embrioni identificati come liberi dall'indicato disordine genetico o dall'errore cromosomico, vengono selezionati per il trasferimento in utero.

La PGD può essere eseguita utilizzando tre diverse fonti di materiale genetico: i globuli polari ovocitari, i blastomeri embrionali, le cellule del trofoectoderma dell'embrione allo stadio di blastocisti.

La PGD sui blastomeri embrionali è effettuata sull'embrione allo stadio di 6-8 cellule, al terzo giorno di sviluppo dopo la fecondazione; in questa fase, i blastomeri sono cellule totipotenti, quindi la biopsia di 1 o 2 cellule non dovrebbe compromettere lo sviluppo dell'embrione anche se ne ha causato una riduzione della massa totale.

Lo scopo della biopsia dei blastomeri è di analizzare cellule formatesi dopo la fecondazione e che, quindi, contengono sia il genoma paterno che quello materno. Gli embrioni, dopo biopsia, vengono mantenuti in coltura fino allo stadio di blastocisti, in attesa dell'esito delle indagini genetiche.

Il principale svantaggio della tecnica è rappresentato proprio dalla natura invasiva della procedura, insieme alla riduzione del numero di cellule dell'embrione che può influire sulle sue capacità di sviluppo.

Un altro svantaggio consiste nella possibilità che il materiale prelevato non sia rappresentativo dell'assetto genetico di tutto l'embrione, questa eventualità si verifica in caso di mosaicismi.



Figura 1 – Stadio 8 cellule/Day 3

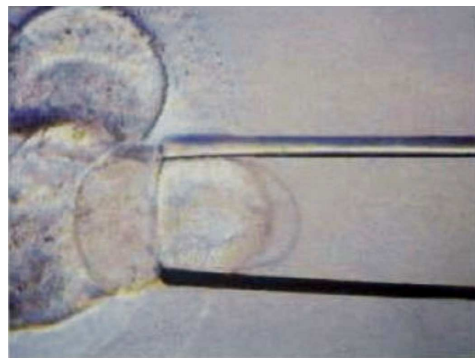


Figura 2 – Prelievo di blastomero

Un'altra possibilità è quella di effettuare la biopsia embrionale allo stadio di blastocisti, in questo caso si possono prelevare circa 6-10 cellule dal trofoectoderma, lo strato esterno della blastocisti.

Il principale vantaggio di questa procedura è il più grande apporto di materiale utilizzabile per i test genetici, ciò permette di aumentare l'attendibilità e l'accuratezza della diagnosi. Inoltre, dato che con la

biopsia si prelevano cellule del trofoectoderma, la massa delle cellule interne, che darà origine al feto nelle fasi successive, non è danneggiata, con indiscussi vantaggi biologici ed etici.

Tra gli svantaggi vi è il limite di tempo per l'analisi che non può essere superiore a 24 ore, salvo effettuare il congelamento degli embrioni in attesa dell'esito delle indagini genetiche; inoltre vi sono delle incertezze riguardo alla composizione genetica del trofoectoderma rispetto a quella della massa cellulare interna, da cui si svilupperà il futuro feto (5).

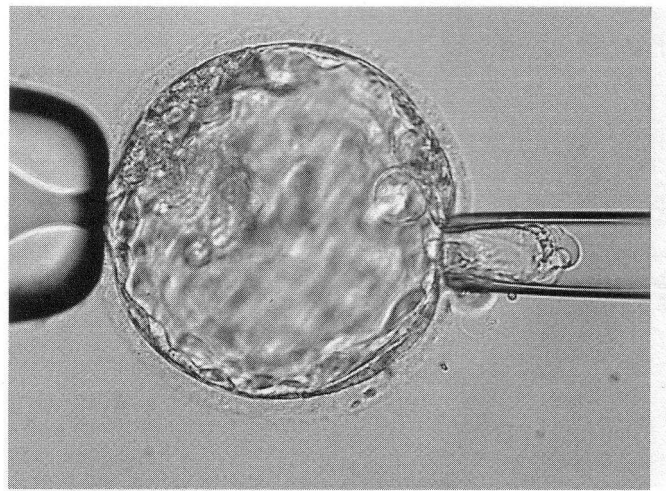


Figura 3 – Prelievo di trofoectoderma

La PGD può essere effettuata anche sul globulo polare, sia prima della fecondazione analizzando il primo globulo polare (PB1), oppure dopo la fecondazione rimuovendo entrambi i globuli simultaneamente.

I globuli polari sono naturalmente estrusi dall'oocita durante la meiosi, senza avere particolare ruolo nello sviluppo del futuro embrione.

È bene ricordare che durante l'oogenesi, ossia il processo di formazione della cellula uovo, gli oogoni, le cellule germinali primitive femminili, si accrescono di numero grazie a ripetuti processi di divisione mitotica. Ad un certo punto, un dato numero di cellule intraprendono la meiosi. Queste cellule entrate nella prima divisione meiotica si arrestano in diplotene per lunghi periodi, con profonde modificazioni a livello nucleare (formazione dei cromosomi a spazzola) e a livello citoplasmatico (imponenti fenomeni di auxocitosi, ossia di accrescimento).

Al termine del diplotene l'oocita si è trasformato in una cellula molto grande, che verso la metafase I, entra nella traiettoria di crescita sotto stimoli endocrini e prosegue la meiosi solo se è stata fecondata.

Nella linea germinale femminile l'enorme quantità di materiale citoplasmatico accumulato nel corso del diplotene viene ereditata da una sola cellula-uovo definitiva. Infatti, alla metafase I si nota che il

fuso meiotico con i bivalenti si porta alla superficie dell'oocita e la prima divisione meiotica procede con la spartizione delle diadi in due cellule: una corrispondente a quasi tutto l'oocita iniziale, l'altra a una sorta di sporgenza citoplasmatica, che una volta resasi indipendente, si trasforma nel primo globulo polare. Mentre l'oocita continua la divisione, entrando nella seconda parte della meiosi (oocita II), il globulo polare I generalmente va incontro a lisi, alternativamente a divisione.

La seconda divisione meiotica si svolge con modalità analoghe alla prima: l'oocita II si divide in una cellula aploide (uovo maturo), che conserva quasi tutto il citoplasma, e in un globulo polare II che, come il I, ha solo la funzione di eliminare la metà del patrimonio cromosomico dell'oocita senza intaccare i materiali di riserva accumulati nel suo citoplasma. Quindi al termine della meiosi nell'oogenesi otterremo quattro cellule, di cui solo una è funzionante e può essere fecondata, mentre le altre sono destinate a degenerare (6).

Ambedue i globuli polari hanno quindi un set di cromosomi che sono complementari a quelli presenti nell'oocita e permettono di dedurre lo stato genetico dell'oocita.

Tra i principali vantaggi della biopsia del globulo polare vi è la natura extra-embrionale dei globuli polari e l'aggiuntivo ammontare di tempo

disponibile per l'analisi genetica prima del trasferimento degli embrioni. Tuttavia, il grave inconveniente di questa tecnica è che il genotipo paterno non è disponibile per l'analisi.

La biopsia del globulo polare impedisce l'analisi delle mutazioni paterne, e l'insorgere di anomalie cromosomiche dalla meiosi paterna. Inoltre, i globuli polari subiscono frammentazioni che rendono spesso difficile la biopsia, ciò può potenzialmente condurre ad una diagnosi errata, se l'embriologo non è capace di recuperare tutti i frammenti cellulari.

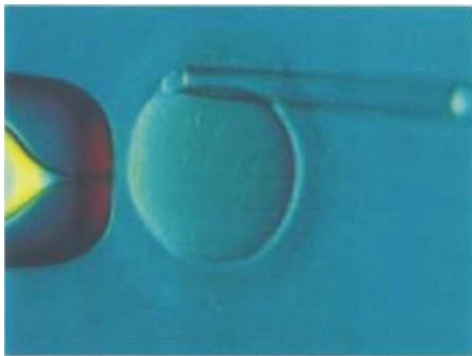


Figura 4 – Prelievo PB1

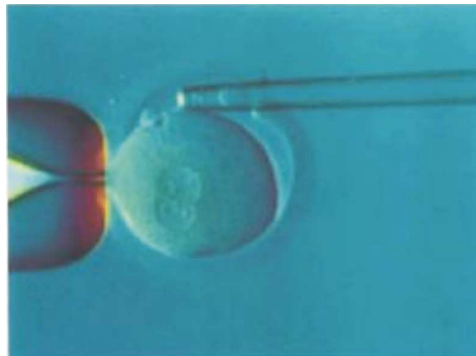


Figura 5 – Prelievo PB1 + PB2

Lo sviluppo delle tecniche di diagnosi preimpianto, e la conseguente selezione embrionale, solleva evidenti problematiche di natura etica, ciò ha determinato la divulgazione di normative specifiche per disciplinarne l'applicazione.

Nei paesi, come l'Italia, con sentenze ultraconservatrici riguardanti la fecondazione in vitro, l'unica forma di PGD che è possibile utilizzare è l'analisi del primo globulo polare (7).

La diagnosi genetica viene, quindi, eseguita sull'ovocita e non sull'embrione, ciò consente di superare i problemi etici che hanno determinato il divieto della diagnosi preimpianto. Quest'ultima, infatti, comporta l'eliminazione degli embrioni che, all'analisi genetica, vengono diagnosticati affetti dalla specifica patologia genetica di cui la coppia è portatrice. Con la diagnosi pre-concepimento, invece, si escludono dalla fecondazione quegli ovociti il cui DNA risulta alterato, e quindi si evita a priori la possibilità di produrre embrioni con anomalie genetiche.

L'ovocita maturo è caratterizzato dalla presenza di un primo globulo polare (PB1), che contiene un complemento di 23 cromosomi bivalenti materni. Questa cellula può essere rimossa dalla cellula uovo e utilizzata per eseguire il test genetico.

Il PB1, espulso dall'ovocita nella fase finale della sua maturazione, contiene un assetto genetico che è speculare a quello presente nell'ovocita stesso. L'analisi di questa piccola cellula, che non ha alcun ruolo biologico (si potrebbe definire come una piccola cellula accessoria) e che degenera dopo alcune ore, fornisce importanti informazioni sullo status genetico dell'ovocita e può essere considerata una valida alternativa alla diagnosi genetica preimpianto effettuata sugli embrioni, ed oggi proibita in Italia.

In pazienti portatrici sane di una malattia monogenica l'analisi del PB1 può essere utilizzata per selezionare quegli ovociti che non presentano la mutazione. Infatti, poiché il primo globulo polare possiede un assetto genetico speculare a quello dell'ovocita, se esso presenta la mutazione materna ne consegue che l'ovocita risulterà privo della mutazione (e quindi normale). Viceversa, se il primo globulo polare non presenta la mutazione materna, sarà l'ovocita a contenere quella mutazione. Solo gli ovociti normali (cioè senza la mutazione materna) saranno poi fecondati con gli spermatozoi paterni mediante ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection). In tal caso, gli embrioni ottenuti potranno essere, al massimo portatori della malattia (in caso di partner affetto o portatore della stessa mutazione), ma non saranno mai affetti dalla malattia.

L'analisi genetica del primo globulo polare può essere complicata da fenomeni di ricombinazione (scambio di porzioni cromosomiche), che avvengono regolarmente tra cromosomi omologhi durante la prima divisione meiotica. Se la ricombinazione coinvolge la regione cromosomica contenente il gene causa della malattia genetica, l'ovocita tratterrà una copia normale del gene ed una contenente la mutazione materna. In tal caso la diagnosi genetica dell'ovocita risulterà non informativa e quest'ultimo non potrà essere considerato utile per la fecondazione. L'analisi del secondo globulo polare ovvierebbe al suddetto problema, fornendo una diagnosi definitiva dell'ovocita. Poiché, il secondo globulo polare viene espulso dall'ovocita circa 16h dopo la fecondazione, tale procedura non è utilizzabile in Italia poiché la legge 40/2004 obbliga il trasferimento simultaneo in utero di tutti gli ovociti fecondati (zigoti), rendendo inutile la diagnosi del secondo globulo polare (8).

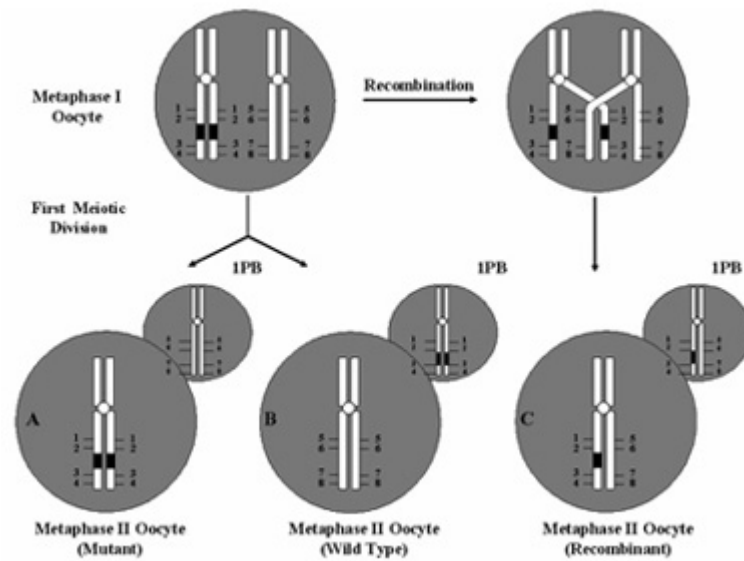


Figura 6: Schema della diagnosi genetica pre-concepimento mediante analisi del primo globulo polare (1PB). Il rettangolo nero rappresenta la mutazione genica di cui il partner femminile della coppia è portatore. L'**ovocita A** risulta contenere la mutazione materna, poiché la diagnosi del 1PB non ha evidenziato la presenza della mutazione in questione. Viceversa, l'**ovocita B** risulta essere normale, poiché la diagnosi genetica del 1PB ha evidenziato la presenza della mutazione materna. Nell'**ovocita C** è avvenuta una ricombinazione tra cromosomi omologhi che ha coinvolto anche la regione cromosomica contenente il gene causa della malattia genetica. Questi ha, quindi, trattenuto una copia normale del gene ed una contenente la mutazione materna.

L'esecuzione di tutte le tecniche di diagnosi preimpianto o pre-concepimento richiede una biopsia embrionale o ovocitaria, le tecniche di biopsia si sono evolute notevolmente nel corso degli anni, tutte vengono eseguite con l'utilizzo di un microscopio invertito.

La prima tecnica di biopsia sperimentata è la “Partial Zona Dissection (PZD)”, tale procedura richiede l'utilizzo di una micropipetta per perforare la zona pellucida mentre un'altra pipetta, denominata holding, tiene fermo l'embrione mediante applicazione di una pressione negativa.

La micropipetta è spinta attraverso la zona pellucida (ZP) ad un polo dell'embrione in modo da attraversare la ZP in due punti, evitando comunque di danneggiare l'embrione (o l'ovocita). L'embrione è spinto verso la parte più spessa della micropipetta, contro la quale può essere sfregata la pipetta holding, al fine di staccare un frammento della ZP, creando in questa maniera un'apertura.

Con una ulteriore apposita micropipetta, si procede all'aspirazione del blastomero (o PB).

Questa tecnica è stata abbandonata a causa dell'eccessiva traumaticità, per l'irregolarità dell'apertura creata e infine per l'eccessivo tempo richiesto per la sua esecuzione.

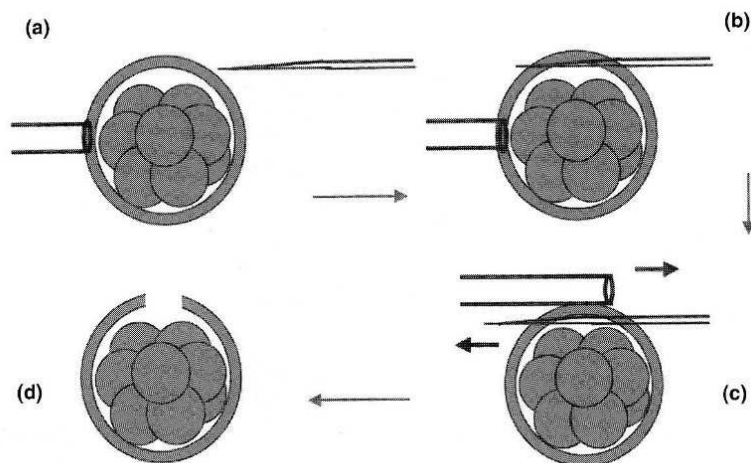


Figura 7 – Partial Zona Dissection

La tecnica più comunemente usata per la biopsia embrionale utilizza una soluzione acida, “Zona Drilling Using Acid Tyrode (ATD)”, per effettuare un foro nella Zona Pellucida.

La soluzione acida viene applicata sulla ZP mediante una micropipetta del diametro interno di 5-10 μm , in modo tale da controllare con precisione il flusso dell’acido. Ciò è necessario al fine di evitare potenziali danni a qualsiasi blastomero che si trovi nelle immediate vicinanze del punto di rottura della ZP.

L'embrione viene tenuto nella posizione desiderata mediante una micropipetta holding tramite applicazione di una pressione negativa, la soluzione acida di Tyrode è rilasciata molto lentamente dalla

pipetta, fino a che non si forma una breccia nella ZP. Una volta che la ZP comincia a diradarsi, segue la rottura in pochi secondi.

Subito dopo l'apertura della breccia nella ZP, si allontana la micropipetta contenente l'acido e si avvicina la micropipetta per l'aspirazione del blastomero (o PB). Uno degli svantaggi riscontrati nell'utilizzo del metodo chimico è il rischio di creare danni alle cellule che devono essere analizzate, e all'embrione (o ovocita) in toto, se questi entrano in contatto con la soluzione acida.

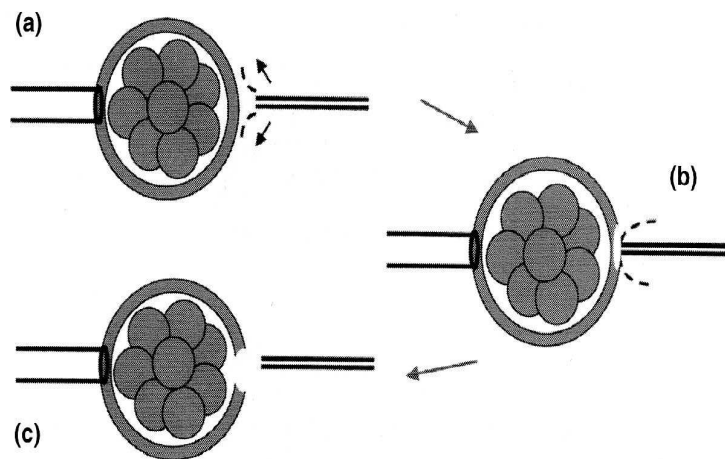


Figura 8 – ATD

Una terza tecnica implica l'utilizzo di un raggio laser per l'effettuazione del foro nella ZP, tale tecnica prende il nome di "Laser Zona Dissection, (LZD)". Esistono diversi tipi di sistemi disponibili, alcuni dei quali lavorano nello spettro dei raggi ultravioletti e altri che operano nello spettro dei raggi infrarossi.

Il laser può essere applicato in un unico punto per creare un buco o in vari punti adiacenti gli uni accanto agli altri lungo la ZP per creare una fessura.

Le dimensioni del buco creato dipendono dalla potenza del laser e dalla durata della sua applicazione.

L'aspetto più importante di questa tecnica è il controllo della macchina, da parte dell'operatore, è essenziale che il laser sia impostato in maniera corretta per evitare la creazione di un buco troppo grande, o un danno diretto all'oocita o ai blastomeri. Per questo motivo, è spesso consigliabile esercitare piccoli fori successivi per creare un percorso attraverso la zona pellucida, piuttosto che tentare di violarla con un solo colpo (9).

Uno dei vantaggi nell'utilizzo del laser è rappresentato dalla possibilità di creare aperture della ZP standardizzate che possono facilmente adattarsi all'effettivo diametro della pipetta richiesta per la biopsia (10). Altri vantaggi sono rappresentati dalla velocità di

esecuzione, dalla sicurezza della tecnica nel complesso, dati bibliografici attestano, infatti, un tasso di degenerazione embrionale, successivo alla biopsia, tra lo 0,5 - 1 % (11).

Tra gli svantaggi della tecnica LZD vi sono gli effetti termici del laser e l'elevato costo dell'apparecchiatura.

Le tecniche di biopsia embrionale sono considerate sicure, i tassi d'impianto e di gravidanza riportati in letteratura, dopo applicazione di tali tecniche, sono comparabili con quelli delle convenzionali tecniche di IVF.

Uno studio comparativo tra le tecniche di biopsia embrionale (12), ha analizzato i risultati della biopsia, in termini di percentuale di blastomeri recuperati, mediante l'applicazione delle due tecniche più diffuse, la ATD e la LZD. Lo studio ha evidenziato che mediante l'utilizzo del laser, si recuperava il 98,3% dei blastomeri intatti, rispetto al 95,2% derivante dall'utilizzo della tecnica ATD. Nella tecnica ATD il danneggiamento dei blastomeri oggetto della biopsia avveniva sia durante la fase di apertura della ZP che durante la micromanipolazione; nella tecnica LZD la lisi si verificava solo durante la micromanipolazione dei blastomeri.

Scopo del lavoro

Questo elaborato si propone di mettere alla prova la funzionalità di un nuovo metodo di prelievo del globulo polare: “Polar Body Biopsy Pipette”.

Le tecniche utilizzate fino ad ora, come il metodo meccanico mediante la parziale dissezione della zona pellucida, chimico mediante la soluzione acida di Tyrode, fisico mediante l'utilizzo del laser, hanno presentato dei limiti nel loro uso, limiti che hanno richiesto la ricerca di una tecnica alternativa al raggiungimento del risultato finale, ossia il prelievo del globulo polare.

Lo studio da noi effettuato si è posto come obiettivo quello di analizzare la potenziale efficacia di questa tecnica, cercando di evidenziarne i vantaggi secondo i seguenti punti: la precisione, i costi, le capacità dell'operatore e la validità del risultato finale.

Si tratta di un nuovo dispositivo specifico per la biopsia del globulo polare. È una pipetta che presenta una punta smussata e un uncino che ne permette la penetrazione attraverso la zona pellucida. Le pareti della pipetta sono parallele per facilitarne l'inserzione nella zona pellucida e la successiva aspirazione del globulo polare.



Figura 9 – Polar Body Biopsy Pipette

Un vantaggio di questo nuovo dispositivo è rappresentato dalla possibilità di utilizzare un'unica pipetta che consente sia la penetrazione nella zona pellucida che l'aspirazione del globulo polare, senza che vi sia bisogno di effettuare il cambio della pipetta per l'apertura della zona pellucida con quella specifica per la biopsia, come accade nei metodi precedentemente descritti.

Uno svantaggio è dato dal rischio di lisare l'ovocita o il globulo polare, nel momento in cui si fa pressione per cercare di penetrare nella zona pellucida. In questa maniera la fonte di materiale genetico verrebbe resa inutilizzabile.

Materiali e metodi

Il nostro studio è stato svolto durante il semestre che va da Dicembre 2008 a Maggio 2009, presso il centro “Diagnosi e Cura della Sterilità” di Ragusa. Per il presente lavoro abbiamo utilizzato, ovociti sovranumerari derivanti da trattamenti di fecondazione assistita eseguiti presso i diversi laboratori (Ragusa, Palermo e Livorno) del Gruppo Genesi.

Effettuato il prelievo ovocitario, gli ovociti sono stati tenuti in coltura, in incubatore a +37°C e 5% CO₂, in terreno di coltura Human Tubal Fluid modificato, per circa 1 ora, in attesa della decoronizzazione. La decoronizzazione è stata effettuata mediante digestione enzimatica dei legami intercellulari delle cellule del cumulo ooforo con Ialuronidasi e successivo spipettamento degli ovociti stessi, allo stereomicroscopio, sotto cappa a flusso laminare e piano riscaldato, mediante micropipette "Stripper" di calibro interno variabile da 170 µm a 140 µm al fine di allontanare le cellule della corona radiata per evidenziare la maturità nucleare e valutare la qualità citoplasmatica dei singoli ovociti.

Selezionati gli ovociti destinati alle tecniche di fecondazione assistita (ICSI), i rimanenti ovociti, non destinati alla crioconservazione e

oggetto del nostro studio, sono stati mantenuti in terreno di coltura Human Tubal Fluid modificato fino al termine delle procedure di fecondazione assistita.

La procedura di biopsia del globulo polare è stata eseguita al termine dell'esecuzione delle tecniche di fecondazione assistita, gli ovociti sono stati posti in microgocce di terreno di coltura HTF modificato, in dischi di coltura, ricoperte da olio minerale per permetterne la sopravvivenza al di fuori dell'incubatore. La procedura è stata eseguita mediante una stazione di micromanipolazione, montata su un microscopio invertito e dotato di piano riscaldato, mediante l'utilizzo di 2 microaghi per micromanipolazione. L'ovocita da trattare è stato posizionato con il globulo polare a ore 6, e mantenuto in posizione mediante una micropipetta Holding che è stata avvicinata all'estremità sinistra dell'ovocita (posizione a ore 9) e a cui è stata applicata una leggera pressione di aspirazione.

La micropipetta da testare è stata avvicinata all'ovocita e, con adeguato movimento, si è proceduto alla rottura della zona pellucida mediante la punta affilata presente sulla sommità del dispositivo stesso, contemporaneamente si è applicata una leggera pressione negativa alla pipetta per permettere l'aspirazione del globulo polare.

Terminata la biopsia si è proceduto al rilascio del globulo polare nel terreno di coltura, in prossimità dell'ovocita stesso e si è proceduto al trattamento dell'ovocita successivo.

Risultati

Lo studio ha interessato 91 ovociti derivanti da tecniche di fecondazione assistita, di questi, 21 sono stati scartati a priori in quanto presentavano caratteristiche morfologiche sfavorevoli alla biopsia: globulo polare molto frammentato, immaturità nucleare, gravi alterazioni citoplasmatiche.

Abbiamo sottoposto 70 ovociti a biopsia, in 17 (24,3%) casi abbiamo recuperato il globulo polare mantenendo intatto l'ovocita, in 33 (47,1%) casi abbiamo recuperato il globulo polare ma si è assistito a lisi dell'ovocita, infine in 20 casi (28,6%) non si è riusciti a recuperare il globulo polare e si è assistito a lisi dell'ovocita.

Nel complesso si è riusciti a recuperare il globulo polare nel 71,4% degli ovociti, ma solo nel 24,3% di questi casi l'ovocita è rimasto intatto e idoneo alla fecondazione dopo la biopsia.

La difficoltà riscontrata, più di frequente, è stata che per un eccessivo spessore e resistenza della zona pellucida si è determinato un elevato stress meccanico per l'ovocita, con conseguente lisi cellulare.

Ragusa				
Numero ovociti iniziale	Ovociti trattati	PB recuperati con ovocita integro	PB recuperati con ovocita lisato	PB non recuperati con ovocita lisato
10	6	1	2	3
14	11	2	5	4
5	3	0	2	1
4	4	1	2	1
Livorno				
Numero ovociti iniziale	Ovociti trattati	PB recuperati con ovocita integro	PB recuperati con ovocita lisato	PB non recuperati con ovocita lisato
7	7	2	3	2
10	8	3	3	2
9	6	1	3	2
Palermo				
Numero ovociti iniziale	Ovociti trattati	PB recuperati con ovocita integro	PB recuperati con ovocita lisato	PB non recuperati con ovocita lisato
15	10	3	5	2
8	8	2	4	2
9	7	2	4	1
Totale	Totale trattati	Tot. PB recuperati con ovocita integro	Tot. PB recuperati con ovocita lisato	Tot PB non recuperato con ovocita lisato
91	70	17	33	20
		24,3	47,1	28,6
			Totale % ovociti lisati	
			75,7	

Tabella 2 – Risultati

Conclusioni

Dallo studio svolto si può evincere che soltanto nel 24,3% dei casi si è riusciti a prelevare il Globulo Polare e mantenere integra la struttura dell'ovocita, quindi l'idoneità alla fecondazione e la possibilità di eseguire diagnosi genetica pre-concepimento.

Questa bassa efficienza della tecnica può essere attribuibile:

- ❖ Al trattamento eseguito dopo circa otto ore di incubazione, cioè dopo aver terminato le procedure inerenti i cicli di IVF.
- ❖ Alla scarsa qualità degli ovociti trattati, i quali rappresentavano il pool di scarto degli ovociti recuperati.
- ❖ Alla ridotta compliance dell'operatore alla procedura, che richiede indiscutibilmente una curva di apprendimento adeguata, che in questo studio non è stata raggiunta dato l'esiguo numero di casi.

Possiamo affermare che la tecnica saggiata è soggetta a notevoli margini di miglioramento utilizzando ovociti di prima scelta, rispettando i tempi di maturazione ovocitaria, e se eseguita da operatori con elevate capacità tecniche specifiche e dedicati a tale metodica.

Sulla base dei riscontri positivi ottenuti dall'utilizzo del "Polar Body Biopsy Pipette", anche se ancora su un numero esiguo di casi, è auspicabile che tale strumento possa avere una più ampia diffusione, anche oltre i confini, in modo da valutare dal punto di vista statistico l'efficacia del suo impiego.

Bibliografia

1. ISS: *Istituto superiore di Sanità*
2. Linee guida emesse in allegato alla Legge 40/2004.
3. Teresa Mattina, *Il kariogramma e le sue anomalie* in **Genetica Medica** di Mollica F., Ed. Grasso, 1989, pp. 33-73.
4. Luca Gianaroli, M. Cristina Magli, Anna P. Ferraretti. *Preimplantation genetic diagnosis in **Current Practices and Controversies in Assisted Reproduction***. Report of a meeting on “Medical, Ethical and Social Aspects of Assisted Reproduction” held at WHO Headquarters in Geneva, Switzerland, 17-21 September 2001, pp.210-219.
5. Mandy G. Katz-Jaffe. *Preimplantation genetic diagnosis in **In Vitro Fertilization, a practical approach***. Edited by David K. Gardner, Informa UKTfd, 2007, pp. 313-330.
6. Pasquale Rosati, Roberto Colombo. **La cellula**, Edi Ermes, 2003, p. 376
7. Santiago Munnè and Luca Gianaroli. *Chromosomal status of human embryos in **Human Preimplantation, embryo***

- selection.** Edited by Kay Elder, Jacques Cohen, Informa UKTfd, 2007, pp. 209-233.
8. Francesco Fiorentino. *La Diagnosi Genetica Preimpianto: problemi pratici e questioni applicative in campo medico* in **Tecnologie riproduttive e tutela della persona** a cura di Gianni Baldini e Monica Soldano, Firenze University Press, pp. 118-120.
 9. *Zona manipulation and embryo biopsy* in **Micromanipulation in Assisted Conception. A Users' Manual and Troubleshooting Guide.** By Steven D. Fleming and Robert S. King. Cambridge University Press, 2003, pp.155-159.
 10. T. Ebner, M. Moser and G. Tews, *Possible applications of a non-contact 1,48 μ m wavelength diode laser in assisted reproduction technologies* in **Human Reproduction Update**, Vol. 11, No. 4, 2005, pp. 425-435.
 11. Katrin van der Ven, Markus Montag, Hans van der Ven, *Polar Body Diagnosis- A Step in the Right Direction?* in **Dtsch Arztebl Int**, 105 (11),2008, pp. 190-196.

12. H. Joris, A. De Vos, R. Janssens, P. Devroey, I. Liebaers and A. Van Steirteghem, *Comparison of the results of human embryo biopsy and outcome of PGD after zona drilling using acid Tyrode medium or a laser* in **Human Reproduction** Vol. 18, No. 9, 2003, pp. 1896-1902.