



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di Neuroscienze e Scienze Materno Infantili

Sezione di Ginecologia e Ostetricia

Direttore: Prof. Salvatore Dessole

**Dottorato di Ricerca in Scienze Uroginecologiche, di Fisiopatologia del
Pavimento Pelvico ed Infertilità Maschile**

Coordinatore: Prof. Salvatore Dessole

**L'ICSI IN PAZIENTI POOR RESPONDERS: LA
METODICA MIGLIORE?**

Coordinatore e Tutor Dottorato di Ricerca:
Chiar.mo Prof. *Salvatore Dessole*

**Tesi di Dottorato del
Dott. *Emiliano Omar Gallo***

XXI Ciclo

A.A. 2007 - 2008

INDICE

INTRODUZIONE	3
Approccio alla coppia sterile	9
Tecniche di riproduzione assistita (T.R.A.)	11
Le tecniche "minori" (di I° livello)	11
Le tecniche "maggiori" (di II° e III° livello)	14
La crioconservazione degli embrioni e degli ovociti	16
L'ovodonazione	17
GIFT – ZIFT – TET	20
Tecniche di microiniezione degli spermatozoi	21
MESA – TESE/A – PESA	23
AH (assisted hatching)	24
Biopsia dell'embrione	26
SCOPO DELLO STUDIO	27
MATERIALI E METODI	28
RISULTATI	31
CONCLUSIONI	35
BIBLIOGRAFIA	37

INTRODUZIONE

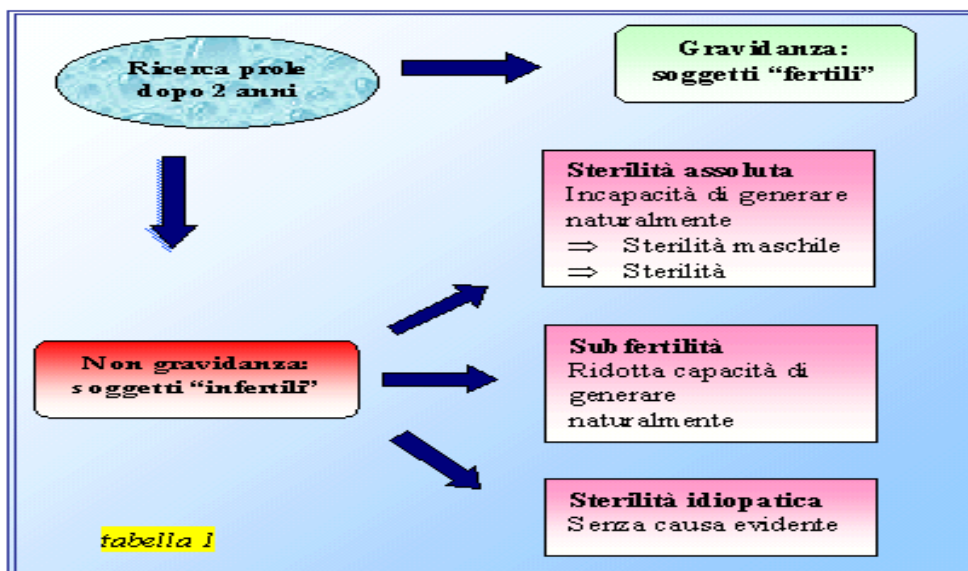
Le Tecniche di Riproduzione Assistita (TRA) consistono in una serie di metodiche che consentono di superare eventuali condizioni patologiche della coppia che ostacolano totalmente o parzialmente la capacità di concepire naturalmente. Viene comunemente utilizzato anche l'acronimo P.M.A.(Procreazione Medicalmente Assistita).

Si calcola che circa il 12 – 15 % delle coppie si trovano in una condizione di infertilità, definita come l'incapacità di concepire dopo 18-24 mesi di rapporti intenzionalmente fecondi. La possibilità di ottenere una gravidanza spontanea è circa del 20-25 % per ciclo, e per i primi 12 mesi di tentativi sale al 90%. Dopo un anno e dopo due anni di tentativi la fecondabilità, la probabilità cioè di ottenere una gravidanza spontanea, si riduce, rispettivamente, al 10% ed al 3% circa. Si stima che oltre 40.000 - 50.000 nuove coppie ogni anno in Italia andranno incontro a difficoltà riproduttive nel corso della loro futura vita coniugale, contribuendo così ad incrementare la cosiddetta "popolazione infertile".

Si tratta quindi di una problematica che travalica l'ambito sanitario, per assumere valenze di ordine familiare, personale, relazionale e psicologico, tanto da essere ormai considerato un fenomeno di dimensioni sociali.

A causare l'infertilità (*tabella 1*) possono contribuire condizioni di sterilità assoluta o di subfertilità, oppure talvolta può non essere individuata alcuna causa evidente (sterilità

idiopatica)



La sterilità assoluta può essere maschile o femminile, mentre la subfertilità è in generale una condizione di coppia. Nella *tabella 2* sono riportate le condizioni cliniche in base alle quali viene posta la diagnosi del tipo di infertilità.






	DIAGNOSI					TOT
						
Sterilità assoluta	Aspermia Azoospermia	Utero assente. Ostruzione bilaterale della tube. Amenorrea con FSH elevato. Ipogonadismo ipogonadotropo.	10%	3%	7%	20%
Sub fertilità	Tutte le altre condizioni (vedi tab. 3)	Tutte le altre condizioni (vedi tab. 3)	20%	20%	25%	65%
Sterilità idiopatica	Seme e funzione sessuale normale	Ovulazione regolare. Tube ed utero regolari			15%	15%

Tabella 3			
	Grado di subfertilità		
	Lieve	Moderato	Severo
Subfertilità liquido seminale	Spermatozoi mobili totali 1,5 –5 milioni	Spermatozoi mobili totali da ½ a 1,5 milioni.	Spermatozoi mobili totali minori di ½ milione.
Endometriosi	Lesioni recenti nel Douglas, peritoneo pelvico e plica vescico-uterina. No aderenze.	Aderenze minime. Ovaie e tube con lesioni superficiali.	Ovaie e tube con lesioni profonde. Aderenze e/o retrazioni cicatriziali
Funzionalità tubarica inadeguata	Stenosi monolaterale. Fimosi. Aderenze peritubariche.	Stenosi bilaterale. Occlusione monolaterale. Aderenze tube- ovaie - utero.	Stenosi monolaterale + occlusione controlaterale. Sactosalpinge. Sindrome aderenziale

Le coppie che una volta eseguiti gli esami, presentano una condizione assoluta di infertilità sono solamente il 20%; nel 15% non viene messa in luce alcuna apparente anomalia, mentre ben il 65% accusa una condizione di subfertilità, il più delle volte

motivata dalla coesistenza di fattori sia maschili che femminili. Dalla tabella 3 risulta ben evidente la distinzione della subfertilità nei suoi 3 gradi (lieve, moderato, severo) in dipendenza dalla compromissione anatomica dei vari organi coinvolti nella riproduzione. È anche riportata la suddivisione in forma lieve, moderata o severa per le cause più frequenti di infertilità: il fattore maschile ed il fattore tubo-peritoneale (alterata funzionalità tubarica, aderenze, endometriosi).

Mentre per le coppie affette da sterilità non esiste alcuna possibilità di concepire spontaneamente, questa è ancora invece possibile in caso di subfertilità e di infertilità idiopatica. Questa probabilità di "fertilità residua" si riduce però gradualmente con l'aumentare degli anni di infertilità e con l'aumento dell'età del partner femminile (tabella 4), scendendo al di sotto del 2% per donne di età superiore a 35 anni che cercano una gravidanza da oltre 5 anni.

Tabella 4

Periodo infertilità	Probabilità di fertilità residua in coppie con sterilità idiopatica			
	Età donna			
	< 25 aa	26-30 aa	31-35 aa	> 35 aa
1 - 2 anni	50%	40%	30%	30%
2 - 3 anni	34%	28%	16%	13%
3 - 5 anni	25%	20%	5%	< 3%
> 5 anni	-	20%	4%	< 2%

L'attesa può essere quindi una valida alternativa prima di indirizzare la coppia verso i trattamenti per l'infertilità, purché vengano valutati tutti i dati esposti in precedenza per ben calcolare se e quanto la coppia possa "aspettare".

Ecco che allora le Tecniche di Riproduzione Assistita possono rappresentare, in alcuni casi, l'unica possibilità terapeutica (es. in caso di occlusione tubarica bilaterale), in altri

casi l'ultima possibilità terapeutica qualora altri trattamenti non abbiano avuto successo nel ripristinare una fertilità spontanea (es. una subfertilità del liquido seminale), ed in altri casi ancora sono una valida alternativa a trattamenti più semplici, ma non sempre ugualmente efficaci (es. infertilità idiopatica).

Nell'impostare il programma terapeutico il ginecologo deve tenere in debita considerazione tutti i principali fattori oggettivi (età della donna, durata della infertilità, efficacia, costi e rischi del trattamento) senza però trascurare gli eventuali fattori soggettivi. Alla coppia deve essere fornita una chiara e corretta informazione mediante la quale deve essere messa in condizione di potere scegliere il trattamento che più risponde alle proprie esigenze individuali, esigenze che spesso sono molto differenti da coppia a coppia.

Approccio alla coppia sterile

Il primo colloquio con la coppia sterile deve essere approfondito, per raccogliere con attenzione l'anamnesi completa di ambedue i coniugi, valutare tutti i precedenti esami effettuati ed eseguire poi un esame obiettivo di entrambi, un pap-test, un tampone cervicovaginale ed una ecografia pelvica del partner femminile. Fondamentale risulta pure l'esecuzione di almeno due esami del liquido seminale, a distanza quanto meno di una settimana, con eventuale prova di preparazione del seme. Nella valutazione complessiva della funzionalità riproduttiva del partner femminile è irrinunciabile una verifica della pervietà tubarica e della presenza di ovulazione periodica. Non è sempre necessario, al primo approccio, prescrivere gli esami diagnostici, che sono svariati e non sempre utili, ma è corretto graduare in diverse fasi la loro esecuzione, in relazione all'età della donna ed alla durata della sterilità. Oltretutto, gli esami oggi disponibili, in merito alla loro correlazione più o meno diretta con la fecondabilità, possono essere suddivisi in tre categorie (vedi tabella 5).

Tabella 5

1. Esami anomali *strettamente correlati* con l'infertilità

- esame del liquido seminale
- isterosalpingografia o laparoscopia (valutazione della pervietà tubarica)
- anovulazione

2. Esami anomali *non sempre correlati* con l'infertilità

- post-coital test
- endometriosi lieve (diagnosticata con laparoscopia)
- test di penetrazione del muco cervicale
- ricerca di anticorpi anti-spermatozoo
- isteroscopia

3. Esami anomali *non correlati* con l'infertilità

- biopsia dell'endometrio
- diagnosi di varicocele
- falloppioscopia

TECNICHE DI RIPRODUZIONE ASSISTITA (T.R.A.)

LE TECNICHE "MINORI" (DI 1° LIVELLO)

L'inseminazione intrauterina (I.U.I.)

Si tratta di una tecnica di esecuzione semplice, ad invasività minima, con rischi per la salute della paziente pressoché nulli. Le indicazioni e le condizioni permissibili sono riportate nelle tabelle 6 e 7.

Indicazioni Inseminazione Intrauterina (I.U.I.)

- Oligoastenozoospermia lieve – media
 - Ipospermia
 - Eiaculazione retrograda
 - Infertilità da fattore cervicale (ormonale, meccanico, immunologico, infiammatorio)
 - Endometriosi minima
 - Vaginismo e/o impotenza coeundi
 - Infertilità inspiegata
-

Tabella 6

Inseminazione intrauterina (I.U.I.)

Condizioni permissibili

- Possibilità di ovulazione spontanea o stimolata
 - Almeno una tuba pervia e funzionante
 - Utero integro
 - Almeno 500 mila-1 milione di spermatozoi con motilità > 70% dopo capacitazione.
-

Tabella 7

Consiste nel depositare il liquido seminale all'interno della cavità uterina, consentendo così ad un elevato numero di spermatozoi di giungere in prossimità delle tube. Vengono quindi anche superati eventuali ostacoli al livello della cervice uterina. Di norma, dopo

un rapporto, solo lo 0,1% degli spermatozoi riesce a superare subito il canale cervicale, ed una quantità ancora minore raggiunge poi le tube. Il liquido seminale deve essere preventivamente trattato secondo un procedimento detto di "capacitazione", che consente di concentrare e selezionare gli spermatozoi morfologica-mente migliori e dotati di maggiore vitalità e di eliminare detriti, batteri ed elementi estranei.

Dopo la preparazione il seme viene caricato in un apposito catetere ed introdotto, attraverso il canale cervicale, all'interno della cavità uterina. La procedura è semplice ed indolore, e viene eseguita ambulatorialmente.

L'inseminazione deve essere eseguita in un momento opportuno per la fecondazione, cioè durante il periodo dell'ovulazione. Può essere quindi monitorato ecografia-mente un ciclo spontaneo, in cui generalmente perviene a maturazione un solo ovocita, oppure eseguire una stimolazione dell'ovaio per ottenere una ovulazione multipla. In questo caso, quando lo sviluppo follicolare, monitorato mediante ripetute ecografie transvaginali ed eventuali dosaggi plasmatici del 17- β estradiolo, risulta soddisfacente, viene indotta la ovulazione mediante la somministrazione di HCG .

L'I.U.I può essere eseguita una volta solamente, a 36 ore circa dalla somministrazione dell'HCG, oppure più volte , a cavallo del periodo ovulatorio. Ogni volta viene iniettata in utero una quantità di seme pari a circa 0,3 ml: nei 15-20 minuti successivi la paziente mantiene la posizione distesa prima di riprendere qualunque altra attività. La percentuale di gravidanze è del 15% circa per ciclo e del 20-40 % circa dopo 5-6 tentativi. Possiamo effettuare l'inseminazione intrauterina anche con seme di donatore anonimo precongelato, in caso di azoospermia totale del partner od in caso di malattie genetiche potenzialmente trasmissibili al prodotto del concepimento ed alla partner. Per tale tecnica è anche utilizzabile seme del partner maschile congelato preventivamente,

in previsione di interventi chirurgici o chemioterapici o radianti potenzialmente lesivi per la fertilità successiva.

LE TECNICHE "MAGGIORI" (DI II° E III° LIVELLO)

LA FIVET La nascita della prima bambina al mondo concepita "in vitro" (si trattava di una donna affetta da sterilità tubarica), si deve proprio, nel 1978, a tale metodica, che per lungo tempo ha rappresentato l'unica tecnica di concepimento assistito disponibile.

La FIVET (fertilizzazione "in vitro" e trasferimento in utero di embrioni), poteva essere eseguita con seme omologo del partner o con seme di donatore, qualora il liquido seminale del partner non disponesse dei parametri minimi necessari per la fertilizzazione.

La FIVET si articola sempre in tre tappe fondamentali, rappresentate dal prelievo degli ovociti (pick-up), dalla loro fecondazione extracorporea e dal successivo trasferimento (transfer) degli embrioni sviluppatasi "in vitro" (cioè in laboratorio) all'interno dell'utero materno. Diverse varianti di questa metodica sono state messe a punto nel corso degli anni, sia in fase clinica che di laboratorio, varianti che hanno consentito di aumentare l'efficacia delle T.R.A. e di ampliarne sempre di più le indicazioni.

La prima gravidanza FIVET, nel 1978, fu ottenuta in un ciclo spontaneo, dopo avere cioè prelevato l'unico ovocita presente in un normale ciclo ovulatorio della donna e trasferendo poi un unico embrione. Fu in seguito chiaramente dimostrato, sin dall'inizio degli anni ottanta, che per incrementare l'efficacia della FIVET la donna doveva essere stimolata con farmaci induttori della ovulazione, che consentivano di portare a maturazione non solo il follicolo dominante ma anche tutti quelli della coorte altrimenti destinati all'atresia, così da prelevare più ovociti e trasferire nello stesso ciclo 3-4 embrioni all'interno dell'utero. Nel 1980, infatti, fu ottenuta la prima gravidanza in un ciclo "superstimolato", ed è da allora che l'induzione della crescita follicolare multipla è diventata una tappa fondamentale dei cicli di riproduzione medicalmente assistita.

La crioconservazione degli embrioni e degli ovociti

Talvolta come conseguenza di una "superovulazione" e della fertilizzazione "in vitro", gli embrioni ottenuti possono essere superiori al numero ritenuto ideale per un singolo transfer. Ecco che allora la possibilità di conservare gli embrioni in eccesso mediante un congelamento in azoto liquido (a temperature inferiori a -196°) permette di poterli trasferire in utero in un tempo successivo, evitando così di ripetere tutte le fasi di un nuovo ciclo. Dall'inizio degli anni ottanta sono state via via perfezionate le metodiche ed i tempi di congelamento, ed è oggi divenuto di estrema importanza, tecnica e morale, che i Centri di Medicina della Riproduzione possano eseguire la crioconservazione degli embrioni "in eccesso". Infatti, quando l'alternativa è unicamente la distruzione di patrimoni genetici umani, la crioconservazione diviene una insostituibile necessità etica. Le nuove tecniche di congelamento degli ovociti (che sono cellule e non organismi), attualmente in fase di studio, consentirebbero di porre fine ai dilemmi di ordine etico-morale legati alla crioconservazione degli embrioni.

L'ovodonazione

Con tale tecnica si consente la possibilità di una gravidanza anche a tutte quelle donne che, pur possedendo un utero integro, non sono più in grado di produrre ovociti (il gamete femminile) per il concepimento. Si tratta di donne (circa il 10% delle donne sterili) che sono precocemente entrate in menopausa, donne le cui ovaie non sono più funzionanti a cause di terapie antiblastiche (es. terapie per neoplasie) o perché le ovaie sono state asportate chirurgicamente, etc (tabella 8)

INDICAZIONI PER L'OVORICEZIONE

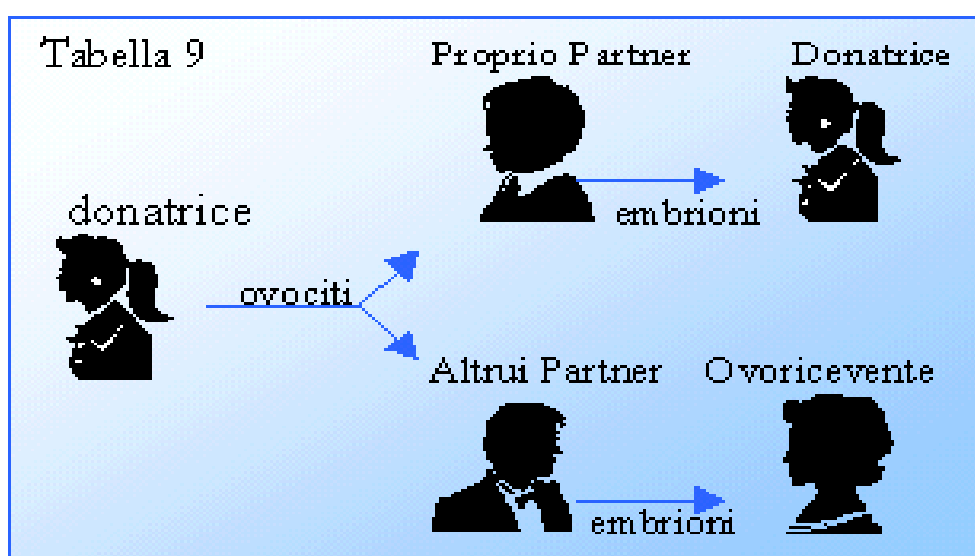
- A. Donne con disgenesia ovarica (S. di Turner, S. di Swyer, disgenesie pure)
 - B. Donne che hanno subito una ovariectomia o terapie antiblastiche
 - C. Donne in menopausa precoce
 - D. Donne portatrici di ereditarie passibili di trasmissione alla prole
 - E. Donne che hanno risposto più volte in modo inidoneo alle stimolazioni ovariche per cicli di concepimento assistito
 - F. Donne in perimenopausa, di età non troppo lontana da quella fisiologica riproduttiva
 - G. Donne con ovaie inaccessibili
-

Tabella 8

La fecondazione in vitro di ovociti umani ha reso possibile la donazione di queste cellule da una donna all'altra. La nascita del primo bambino mediante ovodonazione risale al 1983 e da allora questa metodica si è largamente diffusa, nonostante le implicazioni etico- giuridiche che ne possono scaturire. L'utero della "ricevente" viene preparato all'impianto di un eventuale embrione mediante la somministrazione di una ben precisa terapia ormonale sequenziale, che viene attuata, previa soppressione preliminare con analoghi del GnRH, anche per le pazienti con una normale funzione ovarica. Questo protocollo viene attuato per migliorare la sincronizzazione tra donatrice e ricevente, ed ampliare il periodo in cui la ricevente può "aspettare" eventuali ovociti

disponibili, in quanto l'embrione deve essere trasferito in un "periodo finestra" ben preciso del cosiddetto ciclo uterino. Gli ovociti della donatrice destinati alla donazione, una volta prelevati, sono inseminati "in vitro" con gli spermatozoi del marito della ricevente e posti in coltura (tabella 9).

Gli embrioni che eventualmente si svilupperanno sono poi trasferiti in utero dopo 2-3 giorni dalla inseminazione. La ricevente non è la madre biologica del nascituro, ma essendo colei che lo partorisce, ne diviene la madre legittima.



Le donatrici sono rappresentate esclusivamente da pazienti sterili, che si sottopongono a cicli di concepimento assistito, che donano volontariamente, in forma anonima e gratuita e che sottoscrivono un apposito consenso informato. Le donatrici devono avere un'età inferiore a 36 anni, mappa cromosomica normale e assenza di malattie infettive

ed ereditarie: deve essere comunque loro assicurato un numero di ovociti più che sufficiente per il proprio trattamento di riproduzione assistita. È anche per questa ragione che la disponibilità di ovociti è limitata ed imprevedibile, e spesso la ricevente "sincronizzata" non può disporre di cellule uovo donate in quel ciclo previsto. Della ricevente, che non deve essere di età superiore a quella riproduttiva naturale, viene studiata e valutata la presenza di eventuali controindicazioni alla terapia ormonale da eseguire, oltreché la capacità di portare a termine una gravidanza senza eccessivi rischi per se e per il feto. Anche il marito deve sottoporsi ad esami che escludano malattie genetiche ed infettive trasmissibili alla prole.

GIFT – ZIFT – TET

Si tratta di metodiche che consentono un approccio terapeutico più fisiologico, poiché consistono nell'effettuare il transfer dei gameti o del prodotto del concepimento, all'interno delle tube, laddove fisiologicamente avviene la fecondazione, e le prime fasi di crescita e segmentazione dell'embrione. Nella GIFT vengono trasferiti nelle tube i gameti maschili e femminile (ovociti e spermatozoi): la fecondazione avviene all'interno del corpo umano, cioè "in vivo".

Se invece nelle tube sono trasferiti gli zigoti (ovociti appena fecondati) la tecnica si chiama ZIFT, oppure TET se vengono collocati nelle tube embrioni già in fase di divisione (2-4 cellule). È ovvio che il trasferimento intratubarico può essere eseguito solo qualora la funzionalità delle tube sia conservata, o solo lievemente alterata. Come per la FIVET, anche per la GIFT, ZIFT e la TET può essere utilizzato il seme del partner, o, se necessario, quello di un donatore.

Queste metodiche trovano applicazione sempre più di rado, perché il più delle volte è necessario sottoporre la donna ad una manovra chirurgica in anestesia generale, la laparoscopia o celioscopia, ottenendo poi percentuali di successo simili alla FIVET, tecnica sicuramente meno invasiva. Da qualche anno viene anche eseguito il trasferimento di gameti od embrioni nelle tube, attraverso la cervice uterina, mediante catetere, sotto guida ecografica od isteroscopica per semplificare la tecnica e renderla più accettabile, ma i risultati a tutt'oggi non sembrano incoraggianti.

Tecniche di microiniezione degli spermatozoi

Queste tecniche, utilizzate sin dalla fine degli anni ottanta, hanno notevolmente migliorato i successi della PMA ed ampliato le indicazioni. Sin da allora, infatti, l'inseminazione "in vitro" veniva sempre eseguita mettendo a contatto l'ovocita con un certo numero di spermatozoi, mobili e morfologicamente normali, in una piccola quantità di terreno di coltura: tutte le successive tappe della fecondazione (superamento della barriera dell'ovocita, fusione della membrana plasmatica dell'ovocita, penetrazione all'interno del citoplasma) dovevano avvenire, se pur "in vitro", spontaneamente. Tutto ciò diveniva poco probabile od addirittura impossibile in caso di parametri seminali estremamente scarsi, cioè con un bassissimo numero di spermatozoi e/o con una motilità estremamente ridotta: l'eiaculato doveva garantire un numero sufficiente di spermatozoi mobili.

Le tecniche di microiniezione (che sono metodiche di inseminazione meccanica degli ovociti), hanno consentito di superare queste limitazioni.

La SUZI (microiniezione di spermatozoi sotto la zona pellucida dell'ovocita), prima tecnica utilizzata nel 1990, e la PDZ (dissezione parziale della zona pellucida dell'ovocita maturo) sono state completamente abbandonate nel 1993 a favore della ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection), i cui risultati sono nettamente superiori e più facilmente riproducibili. Con la ICSI viene iniettato, mediante un sofisticato micromanipolatore, un unico spermatozoo direttamente all'interno del citoplasma dell'ovocita. La ICSI può essere utilizzata, se necessario, in un ciclo FIVET, o ZIFT o TET od in un ciclo di ovodonazione, ma non, ovviamente in un ciclo GIFT, dove la fecondazione spontanea deve avvenire all'interno delle tube.

Nella *tabella 10* sono schematizzate le principali indicazioni alle varie metodiche.

MESA – TESE/A – PESA

Si tratta di tecniche che prevedono un prelievo chirurgico di spermatozoi dalle vie seminali. Con la MESA (Microsurgical Epididimal Sperm Aspiration), si esegue un prelievo dall'epididimo con tecniche microchirurgiche (durata 30 – 60 minuti) in anestesia generale, mentre la PESA (Percutaneous Epididimal Sperm Aspiration) ne rappresenta una semplificazione, in quanto il prelievo si effettua con un ago attraverso la cute e non è necessaria l'anestesia generale.

La TESE/A (TEsticular Sperm Extraction e TEsticular Sperm Aspiration) è un prelievo direttamente dal testicolo di frammenti di tessuto mediante, rispettivamente, procedura chirurgica oppure agoaspirazione. L'indicazione a queste tecniche è l'azoospermia (cioè l'assenza totale di spermatozoi nell'eiaculato), ma con una valida produzione di tali cellule che non possono però raggiungere le vie seminali (e quindi essere presenti nell'eiaculato) per un'ostruzione delle stesse (azoospermia escretoria). Con la TESE/A si può ovviare anche ad un parziale arresto maturativo degli spermatozoi (azoospermia secretiva). Gli spermatozoi ottenuti con queste tecniche chirurgiche vengono poi utilizzati, per lo più mediante ICSI, per l'inseminazione in vitro degli ovociti. È anche prevista la crioconservazione di eventuali spermatozoi soprannumerari, per consentire l'esecuzione di altri cicli FIVET, risparmiando al paziente ulteriori prelievi chirurgici.

Tabella 10

P.M.A.: Indicazioni alle varie metodiche

ZIFT - TET	Sterilità idiopatica – Azoospermia- Sterilità maschile (MESA- TESA) – Subfertilità maschile - Endometriosi
GIFT	Sterilità inspiegata – Endometriosi lieve – Subfertilità tubarica lieve – Subfertilità media del liquido seminale – Fattore cervicale
FIVET	Occlusione tubarica completa –Stenosi e/o aderenze tubariche moderate-severe – Endometriosi moderata e severa – Sterilità e Subfertilità dell'uomo
ICSI	Alterazioni severe dei parametri seminali – Mancata o bassa fecondazione degli ovociti in vitro (< 30%) .

AH (Assisted Hatching)

L'ovocita, e l'embrione sino al momento del suo impianto, sono normalmente rivestiti da una membrana di protezione, che prende il nome di zona pellucida. L'AH è una procedura di laboratorio che consiste nel creare, per via chimica o fisica, una piccola apertura nella zona pellucida subito prima del transfer in utero, così da favorire la fuoriuscita della blastocisti, migliorandone il contatto con la mucosa dell'utero. Le possibili indicazioni proposte per tale metodica sono riassunte nella tabella 11. Ulteriori dati si attendono per la conferma di una reale efficacia di tale accorgimento.

Indicazioni all'Assisted Hatching

- Età della donna > 39 anni
- Elevati livelli basali di FSH
- Ripetuti fallimenti FIVET
- Ispessimento della zona pellucida

Tabella 11

BIOPSIA DELL'EMBRIONE

Alcuni Centri nel mondo eseguono questa metodica, che consiste nell'asportare un blastomero (cellula embrionale) da un embrione di 6-8 cellule, senza danneggiarlo, per eseguire poi, in tempi molto brevi (5-6 ore) alcune indagini di citogenetica. Attualmente si possono studiare solo alcuni cromosomi, (13 – 14 – 16 – 18 – 21 – 22) oltre a quelli sessuali. In futuro saranno certamente possibili sempre più approfondite analisi, che potrebbero rappresentare, ad esempio, una eccellente alternativa alla diagnosi prenatale invasiva (villocentesi, amniocentesi).

SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo del nostro studio è stato valutare se è possibile migliorare il risultato dei cicli FIVET nelle pazienti “*poor responders*” mediante l’iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI).

MATERIALI E METODI

Dal gennaio 2006 al giugno abbiamo seguito 80 donne *poor responders* con partner con seme normale (sec WHO 1999: n°spermatozoi >20 milioni/ml; mobilità >50%; forme normali > 30%) o con oligospermia di grado lieve che costituiscono il gruppo di studio.

Per “*poor responder*” si intende per definizione quella paziente che abbiano eseguito almeno un ciclo di stimolazione ovarica per FIVET e/o ICSI con dose >300 UI/die di r-FSH con protocollo di soppressione lungo e che abbia risposto in tale ciclo con meno di 2 follicoli del diametro maggiore di 16mm.

I nostri criteri di inclusione delle pazienti *poor responders* nello studio sono stati: una durata della stimolazione > 13 giorni, una quantità di FSH totale somministrato > 3000 UI, un numero di follicoli reclutati < 6 e un tasso di E2 <600 pg/ml il giorno della somministrazione di hCG.

Le 80 donne sono state quindi randomizzate mediante computer in due gruppi: il gruppo 1, costituito da 40 donne che sono state sottoposte ad ICSI per un totale di 40 cicli; il gruppo 2 comprendeva 40 donne che sono state sottoposte a FIVET per in totale di 40 cicli.

Non erano presenti differenze statisticamente significative tra i due gruppi sia nell'età media (gruppo 1: 34.86 ± 4.01 anni ; gruppo 2 : 37.53 ± 3.74 anni) come pure nella durata media dell'infertilità (gruppo 1: 2.84 ± 1.32 anni; gruppo 2 : 3.25 ± 1.41 anni).

La stimolazione ovarica è stata del tipo “short protocol” utilizzando GnRH-antagonisti per la down-regulation (0.25 mg di Cetrotide, MerckSerono Europe) in fase di stimolazione ovarica quando almeno un follicolo aveva raggiunto la

taglia di 14mm di diametro; a partire dal secondo giorno della mestruazione, previo dosaggio dell'E2 (<30 pg/ml) ed ecografia transvaginale (ovaie a riposo), è stata iniziata la stimolazione ovarica con FSH ricombinante (follitropina beta, Puregon, Organon, Olanda; follitropina alfa, Gonal F, MerckSerono Europe) a dosaggi di 375 fino a max di 450 UI/die. Il trattamento veniva adattato in accordo con la condizione di “poor responder” della paziente documentata da un precedente ciclo FIVET. La gonadotropina corionica ricombinante (Ovitrelle 250µg , Serono Europe) veniva somministrata quando il livello di E2 era \geq 150-200 pg/ml per follicolo di diametro > 15 mm con presenza di almeno 3 follicoli del diametro di 16-20 mm. Il prelievo ovocitario per via transvaginale è stato effettuato sotto guida ecografica in anestesia totale o sedoanalgesia. Gli embrioni, fino ad un massimo di 3 sono stati trasferiti in utero a distanza di 2 o 3 giorni dal prelievo ovocitario. Il supporto della fase luteale veniva fatto somministrando progesterone micronizzato intravaginale sotto forma di ovuli (Prometrium 200 mg, Rottapharm, Olanda) per 2 volte/die per la durata di 14 giorni. L'avvenuta gravidanza veniva dimostrata mediante prelievo sierico di beta-HCG al giorno 14° e al giorno 21° dalla data del transfer embrionario. La gravidanza in evoluzione veniva dimostrata al 28° giorno mediante visualizzazione del sacco gestazionale intrauterino, dell'embrione e della positività dell'attività cardiaca fetale.

ANALISI STATISTICA

Un'analisi descrittiva è stata fatta attraverso utilizzo di medie e deviazioni standard e per l'analisi statistica il test utilizzato è stato il test χ^2

RISULTATI

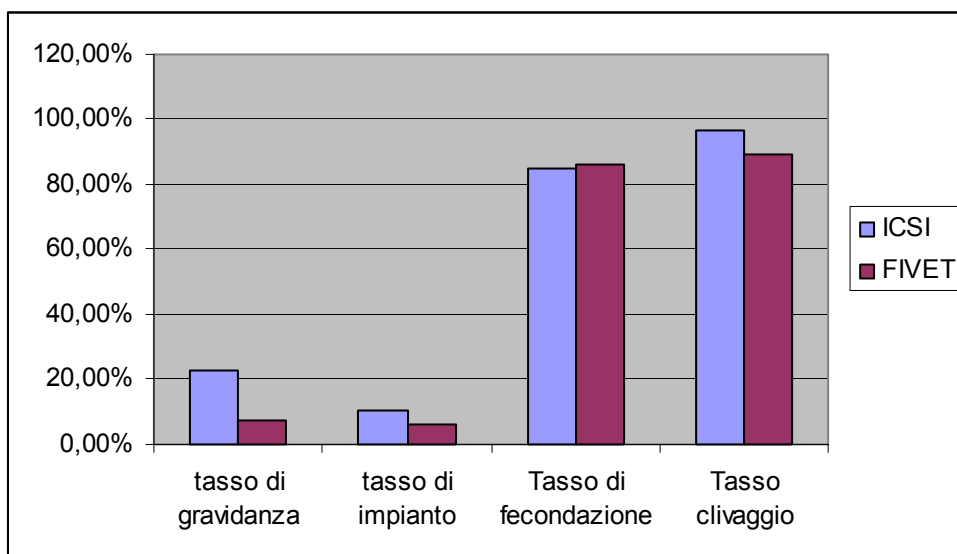
Le pazienti appartenenti ai due gruppi sono stati comparati in termini di età, anni di sterilità, giorni totali di stimolazione follicolare, quantità totale di FSH somministrato, spessore ecografico endometriale, livello sierico di E_2 al momento della somministrazione dell' hCG, numero totale di follicoli > mm 15 al momento della somministrazione dell' hCG, numero totale di cumuli ovocitari recuperati il giorno del prelievo ovocitario, numero totale di ovociti in M2, numero totale di ovociti fecondati allo stadio di 2PN, numero totale di embrioni clivati e numero totale di embrioni trasferiti per ciclo. L'analisi statistica ha dato risultati sovrapponibili tra ICSI e FIVET in termini di età (34.86 \pm 4.01 vs 37.53 \pm 3.74), anni di sterilità (2.84 \pm 1.32 vs 3.25 \pm 1.41), giorni totali di stimolazione (12.92 \pm 2.6 vs 12.28 \pm 1.57), quantità totale di FSH somministrato (3148.68 \pm 1047.23 vs 3336.32 \pm 1055.57), spessore ecografico endometriale (10.3 \pm 1.54 vs 11.2 \pm 2.12), livello sierico di E_2 al momento della somministrazione dell' hCG (680.84 \pm 205.85 vs 544.5 \pm 189.49), n° di follicoli >mm 15 al momento della somministrazione dell' hCG (3.52 \pm 3.39 vs 3.15 \pm 2.23), n° di cumuli recuperati per pickup ovocitario(3.31 \pm 2.33 vs 2.56 \pm 1.16), n° di ovociti in M2 (3 \pm 1.82 vs

2.19±0.84), n° di ovociti fecondati allo stadio di 2 PN(2.55±0.68 vs 1.83±1.00),n° di embrioni totali clivati (2.42±0.75 vs 1.82±0.87), numero di embrioni totali trasferiti per ciclo (2.26± 0.81 vs 1.88± 0.83)(tabella 1).

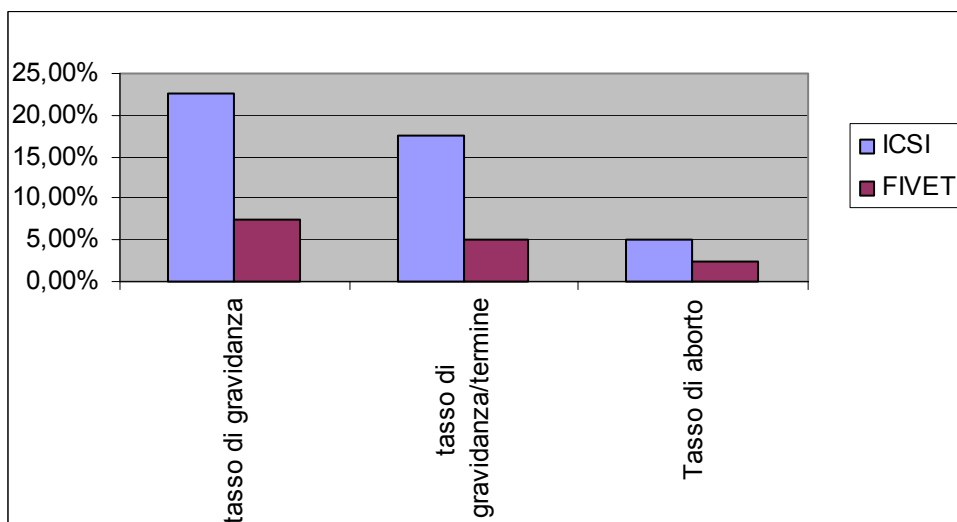
TABELLA 1.

	ICSI	FIVET	P
N° pazienti	40	40	NS
N° cicli	40	40	NS
Età	34.86±4.01	37.53±3.74	NS
N° anni di sterilità	2.84±1.32	3.25±1.41	NS
N° giorni totali stimolazione/ciclo	12.92±2.61	12.28±1.57	NS
Tot FSH UI/ml /ciclo	3148.68±1047.23	3336.32±1055.57	NS
Totale E2/ciclo (pg/mL)	680.84±205.85	544.5±189.49	NS
Spessore EE (mm)	10.3±1.54	11.2±2.1	NS
Numero di follicoli >15mm/ciclo	3.52±3.39	3.15±2.23	NS
Numero cumuli ovocitari recuperati/ciclo	3.31±2.33	2.56±1.16	NS
Numero ovociti M2/ciclo	3±1.82	2.19±0.84	NS
Numero zigoti fecondati/ciclo	2.55±0.68	1.83±1.00	NS
Numero embrioni clivati/ciclo	2.42±0.75	1.82±0.87	NS
Numero embrioni trasferiti/ciclo	2.26±0.81	1.88±0.83	NS

Non vi sono evidenziate tra ICSI e FIVET differenze neppure per quel che riguarda il tasso di fecondazione(84.80% vs 86.36%) e il tasso di clivaggio(96.84% vs 89.47%).



Le differenze evidenziate per quel che riguarda il tasso di impianto (10.4% vs 5.88%), le gravidanze totali (9/40 vs 3/40), le gravidanze per transfer (22.5% vs 7.5%), le gravidanze a termine(17.5%vs 5%) sono altamente significative in termini statistici pur non essendo elevato il numero di pazienti reclutate (tabella 2).



Non si sono evidenziate differenze per quel che riguarda il numero di gravidanze plurime e aborti (tabella 2).

TABELLA 2

	ICSI	FIVET	P
Tasso di fecondazione	84.8%	86.3%	NS°
Tasso di clivaggio	96%	89%	NS°
Impianto	10.4%	5.88%	P<.005
Gravidanze totali	9/40	3/40	P<.05
Gravidanze/transfer	22.5%	7.5%	P<.05
Gravidanze/termine	17.5%	5%	P<.05
Aborti	5%	2.5%	NS°
Gravidanze /Gemellari	2.5%	0%	NS°

CONCLUSIONI

Il nostro studio ha dimostrato che l'ICSI determina migliori risultati in termini di gravidanza rispetto alla FIVET classica in donne *poor responders* con partner con seme normale e/o oligospermia di grado lieve.

I dati da noi ottenuti hanno mostrato che l'impiego delle due metodiche (ICSI e FIVET) non ha determinato differenze in termini di fertilizzazione e clivaggio nonché del numero degli embrioni trasferiti.

Sono invece risultati decisamente superiore sia il tasso di impianto che di gravidanze per transfer nel gruppo di pazienti sottoposte ad ICSI rispetto a quelle trattate con FIVET. Tale dato si accorda con la letteratura internazionale relativa all'utilizzo di queste due tecniche ICSI e FIVET sugli stessi ovociti proveniente dalla paziente sottoposta a trattamento. In Italia, visto l'obbligo datoci dalla legge 40 di inseminare fino ad un massimo di 3 ovociti raccolti al prelievo ovocitario, non possiamo utilizzare gli ovociti della stessa paziente per confrontare le due tecniche. Quindi nella nostra nazione sempre di più si preferisce la ICSI rispetto alla FIVET, per i migliori risultati in termini di fertilizzazione della prima tecnica ed avendo a disposizione solo 3 ovociti da inseminare. In apparenza, avendo noi trattato coppie solo con seme normale o borderline, non si è evidenziata la discrepanza dei risultati in termini di qualità ovocitaria, fertilizzazione e qualità embrionaria come si verifica confrontando coppie con sterilità da fattore maschile grave. Tutto a dimostrazione che se i gameti sono apparentemente normali e di buona qualità i risultati sono sovrapponibili in termini di qualità embrionaria. Pertanto nella differenza importante che si è ottenuta tra i nostri due gruppi di

controllo è pensabile che, non solo la metodica di fecondazione è implicata nel raggiungimento del successo in un ciclo di fecondazione in vitro, ma altri fattori come la qualità ovocitaria e dell'embrione, il suo assetto cromosomico e la recettività endometriale e tante altre variabili possono essere in grado di alterare il confronto tra i due gruppi. Ci sembra quindi di poter concludere che sia opportuno ampliare la nostra casistica e che l'ICSI, sebbene nel nostro studio sembri migliorare notevolmente i risultati in termini di bambini "in braccio", al momento, così come dimostrato in altri studi, non può essere considerata una metodica di routine nel trattamento delle pazienti *poor responders*.

BIBLIOGRAFIA

1. Ola B et al. Should ICSI be the treatment of choice for all case of in vitro conception? Considerations of fertilizations and embryo development, cost effectiveness and safety. *Hum Reprod* 2001;16:2485-2490.
2. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update*. 2006 Nov-Dec;12(6):685-718. Epub 2006 Aug 4.
3. Weghofer A, Margreiter M, Fauster Y, Schaetz T, Brandstetter A, Boehm D, Feichtinger W. Age-specific FSH levels as a tool for appropriate patient counselling in assisted reproduction. *Hum Reprod*. 2005 Sep;20(9):2448-52. Epub 2005 May 19.
4. Hendriks DJ, Broekmans FJ, Bancsi LF, Looman CW, de Jong FH, te Velde ER. Single and repeated GnRH agonist stimulation tests compared with basal markers of ovarian reserve in the prediction of outcome in IVF. *J Assist Reprod Genet*. 2005 Feb;22(2):65-73.
5. Ubaldi FM, Rienzi L, Ferrero S, Baroni E, Sapienza F, Cobellis L, Greco E. Management of *poor responders* in IVF. *Reprod Biomed Online*. 2005 Feb;10(2):235-46. Review.
6. Ziebe S, Andersen AN, Andersen AG, Mikkelsen AL, Lindenberg S. Results of intracytoplasmic sperm injection in relation to indication. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1997; 76:335-9.
7. Ruiz A et al ,The role of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in couples with unexplained infertility after failed intrauterine insemination. *Fertil Steril*. 1997 Jul; 68(1):171-3.

8. Aboulghar MA, Intracytoplasmic sperm injection and conventional in vitro fertilization for sibling oocytes in cases of unexplained infertility and borderline semen. *J Assist Reprod Genet.* 1996 Jan;13(1):38-42.
9. Saito et al. Relatively poor oocyte quality is an indication for ICSI. *Fert Ster* Mar 2000; 73(3)465-469,
10. Loutradis et al. Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after ICSI. *Fert Ster* 1999 Aug; 72(2)240-244
11. Khamsi et al. ICSI increased fertilization and good-quality embryo formation in patients with non male factor indications for FIV: a prospective randomized study. *Fertil Ster* 2001; Febr 75(2) 342-347
12. Pisarska MD et al, Fertilization after standard in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in subfertile males using sibling oocytes. *Fertil Steril.* 1999 Apr;71(4):627-32.
13. Fishel S, Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in-vitro conception? *Hum Reprod.* 2000 Jun; 15(6):1278-83.
14. Moreno C, Ruiz A et al, Intracytoplasmic sperm injection as a routine indication in *low responders* patients. *Hum Reprod.* 1998 Aug; 13(8): 2126-9.
15. A La Marca., S Giulini, S Xella et al. Comparison of a gonadotropin-releasing hormone(GnRH) antagonist and GnRH agonist flare-up regimen in *poor responders* undergoing ovarian stimulation, *Hum Reprod.* 1998 Aug; 13(8): 2126-9.

16. Tarlatzis BC, Zepiridis L, Grimbizis G, Bontis J. Clinical management of low ovarian response to stimulation for IVF: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2003;9:61–76.
17. Fasouliotis SJ, Laufer N, Sabbagh-Ehrlich S, Lewin A, Hurwitz A, Simon A. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-antagonist versus GnRH-agonist in ovarian stimulation of *poor responders* undergoing IVF. *J Assist Reprod Genet* 2003;20:455–60.
18. Olivennes F, Cuhna-Filho JS, Fanchin R, Bouchard P, Frydman R. The use of GnRH antagonists in ovarian stimulation. *Hum Reprod Update* 2002;8:279–90.
19. Firouz Khamsi Intracytoplasmic sperm injection increased fertilization and good-quality embryo formation in patients with non–malefactor indications for in vitro fertilization a prospective randomized study. *Fertility and Sterility*. February 2001;5.