



CRA – Centro Riproduzione Assistita - Catania

www.cragroup.it

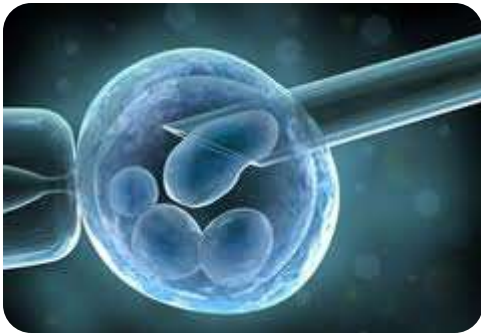
19-20-21 Giugno 2012

La Diagnosi Genetica Preimpianto

Dott.ssa Raffaella Cavallaro

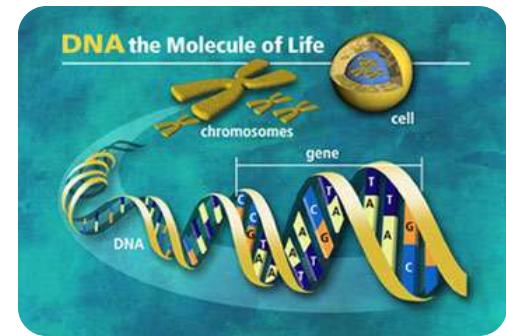
Cos'è la PGD ?

È una procedura ormai collaudata utilizzata nell'ambito delle tecniche di riproduzione assistita di cui è parte integrante e che permette di identificare ,in coppie a rischio , la presenza di malattie genetiche o alterazioni cromosomiche già a uno stadio precoce di sviluppo embrionale. E' una importante alternativa alla diagnosi prenatale poichè consente di evitare il trasferimento di embrioni presentanti il difetto genetico, dando la possibilità a queste coppie di ottenere una prole sana.



Cenni storici

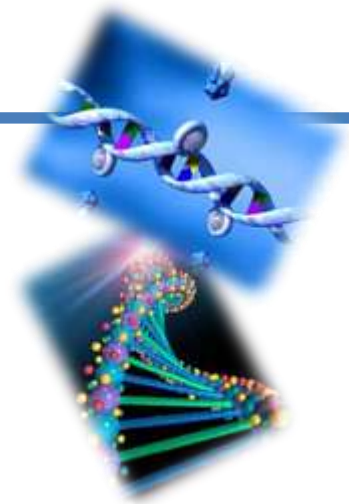
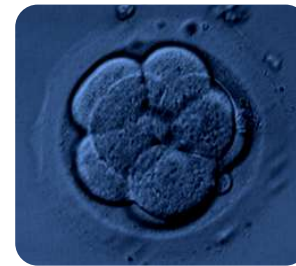
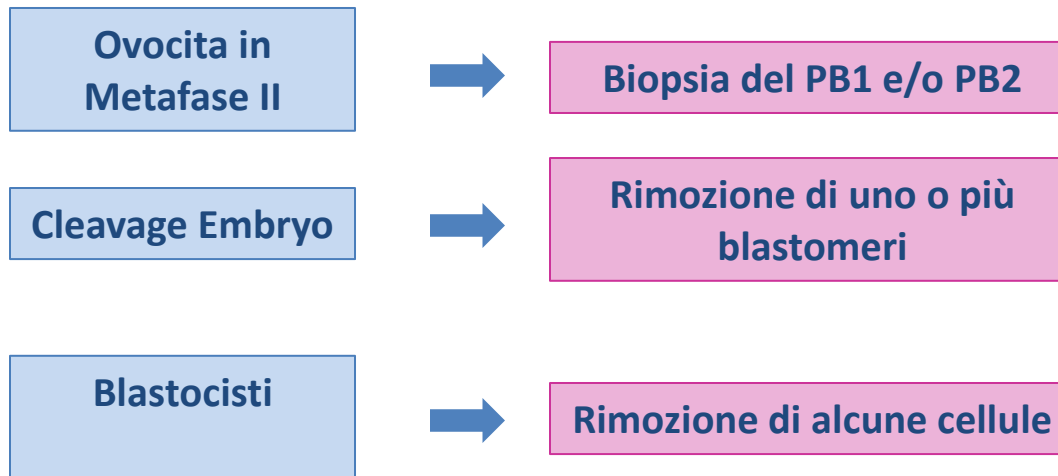
- Negli anni '60 **Gardner e Edwards** ottennero insieme la determinazione del sesso di blastocisti di coniglio mediante l'analisi di cellule derivanti dal trofoectoderma.
- I primi casi di PGD sono riportati indipendentemente da **Handyside** e colleghi e da **Verlinsky** e colleghi nel 1990.
- Da allora fino ad oggi migliaia di procedure sono state eseguite con successo



SET – UP DI UN PROGRAMMA PGD

La diagnosi genetica preimpianto (PGD) può essere eseguita con due approcci differenti:

- L'analisi del I° ed eventualmente del II° globulo polare durante la gametogenesi femminile (diagnosi genetica pre-concezionale)
- La biopsia dell'embrione (PGD propriamente detta)



PGD & PMA

Malattie monogeniche più spesso diagnosticate

Autosomiche recessive	Autosomiche dominanti	Legate al cromosoma X
Talassemia	Distrofia miotonica	Emifilia A e B
Fibrosi cistica	Malattia di Huntington	Distrofia muscolare di Duchenne
Atrofia muscolare spinale	Malattia di Chercot-Marie	Sindrome dell'X fragile
Malattia di Tay-Sachs	Neurofibromatosi	Sindrome di wiskott-Aldrich
Drepanocitosi	Sindrome di mMarfan	Sindrome di Alport
Epidermolisi bollosa	Ostoegenesi imperfetta	Sindrome di Lesch Nyhan
Malattia di Gaucher	Sclerosi tuberosa	
Sindrome adrenogenitale		



PGD & PMA

Anomalie Cromosomiche

Traslocazioni Robertsoniane	Traslocazioni Reciproche	Aneuploidie
--------------------------------	-----------------------------	-------------

Applicazioni alternative della PGD

Ricerca di istocompatibilità HLA	Malattie ad insorgenza tardiva	screening del sesso per indicazioni sociali ?????	screening genetico preimpianto
--	--------------------------------------	---	-----------------------------------



Coppie candidate alla PGD

**Coppie con
ripetuta
poliabortività di
natura idiopatica**

**Coppie infertili ,
con aneuploidie
legate all'età
materna**

- Coppie a rischio per patologie autosomiche recessive (talassemia, fibrosi cistica).
- Coppie a rischio per patologie autosomiche dominanti (distrofia miotonica, corea di Huntington).
- Coppie a rischio per malattie X-linked (X fragile, distrofia muscolare).
- Coppie con abortività ripetuta.
- Coppie fertili senza figli.
- Coppie “poor prognosis”.

Coppie “poor Prognosis”: definizione

- a Età materna avanzata
- b Ripetuti fallimenti di impianto dopo FIV (≥ 3).
- c Cariotipo alterato nel sangue periferico (mosaicismi, traslocazioni Robertsoniane).



SET – UP DI UN PROGRAMMA PGD

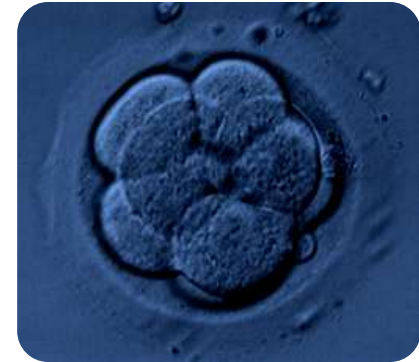


La rimozione di PB1 e PB2 è particolarmente indicata per la ricerca delle aneuploidie legate all'età e dei disordini monogenici di origine materna.

Uno o due cellule in cui è ben visibile il nucleo vengono prelevate con apposita micropipetta e su queste viene eseguita analisi genetica.



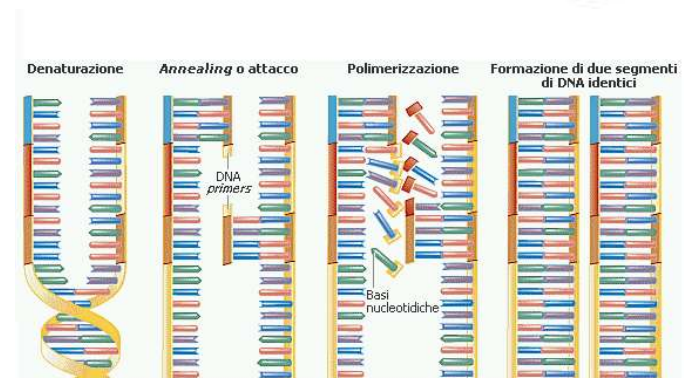
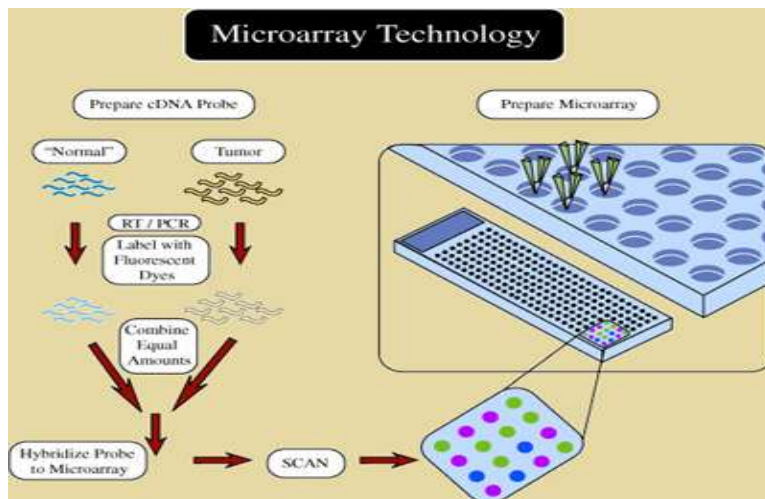
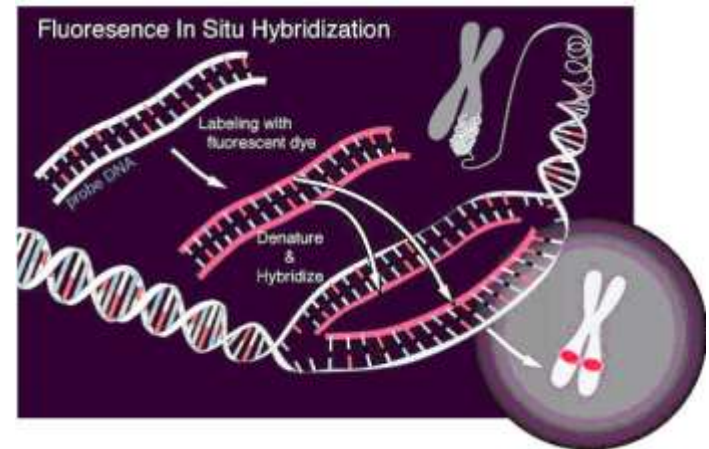
Rimozione di cellule del trofoectoderma senza intaccare l'inner cell mass. Si ha la possibilità di ottenere numerose cellule da analizzare



SET – UP DI UN PROGRAMMA PGD



- FISH**
per aneuploidie e traslocazioni
- PCR**
elettiva per malattie monogeniche
- MICROARRAY**
per indagini molecolari che consentono di rilevare mutazioni a livello di oligonucleotidi

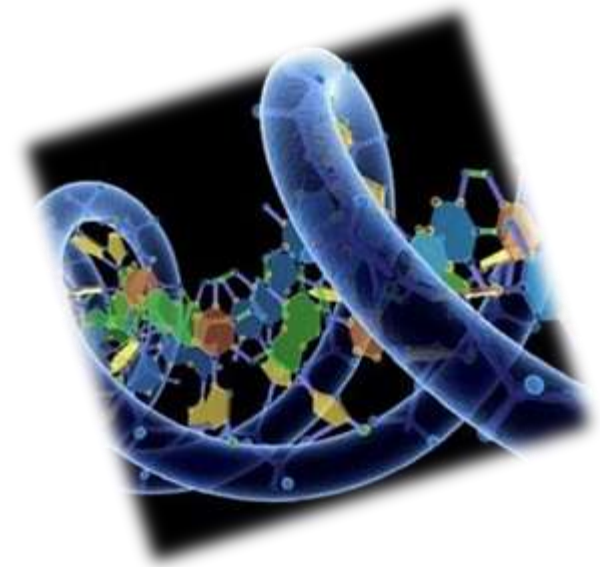


DIAGNOSI GENETICA PRE-IMPIANTO: DIAGNOSI PREZIGOTICA

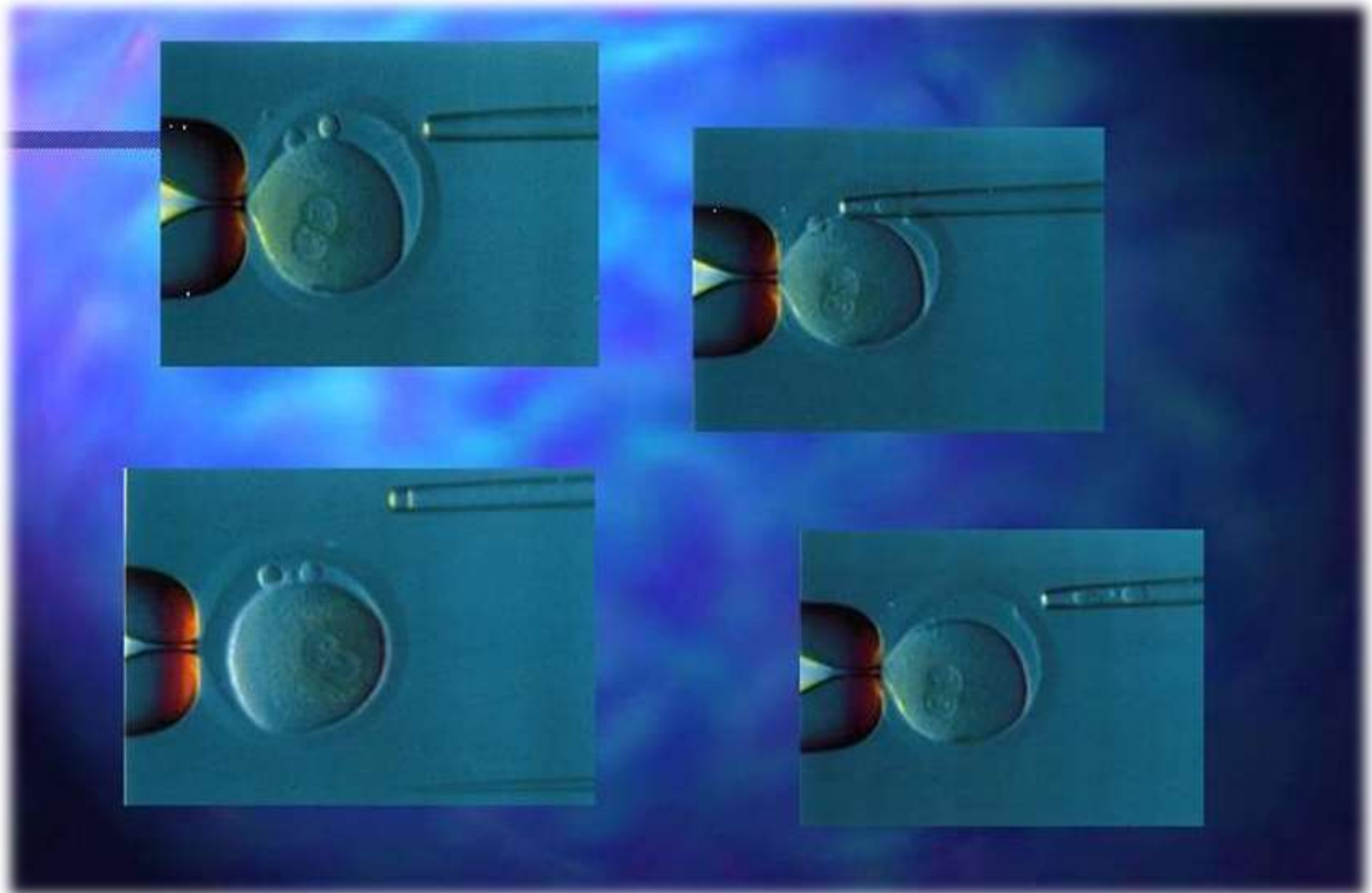
Procedura

Biopsia del 1° ed eventualmente del 2° globulo polare mediante “zona drilling” o dissezione parziale della zona pellucida di ovociti recuperati dopo trattamento di induzione della crescita follicolare multipla in pazienti destinate a tecniche di fecondazione in vitro.

- 1.FISH (ibridazione in situ con fluorescenza)** per la ricerca delle aneuploidie più frequenti (cromosomi X, Y, 13, 18, e 21).
- 2.PCR (reazione polimerasica a catena)** per lo studio di malattie monogeniche (talassemia, fibrosi cistica, emofilia, distrofia miotonica, distrofia muscolare, neurofibromatosi I e II, X fragile etc).



Biopsia dei Globuli Polari

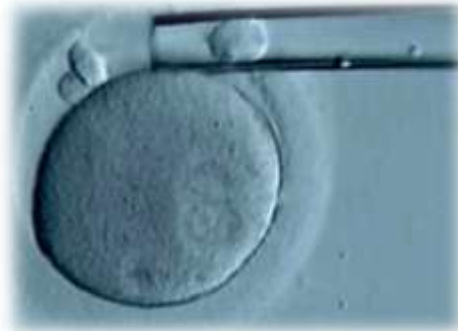


Vantaggi:

L'analisi preconcezionale dei gameti, da un punto di vista etico, è meno problematica in quanto rappresenta una selezione di gameti e non di embrioni.

Svantaggi:

E' attuabile solo su gameti femminili. A parte i problemi inerenti l'analisi di una singola cellula, in questo approccio è da valutare la possibilità di crossing over tra i cromosomi che portano il gene malattia in esame.



DIAGNOSI GENETICA PRE-IMPIANTO: DIAGNOSI POST-ZIGOTICA

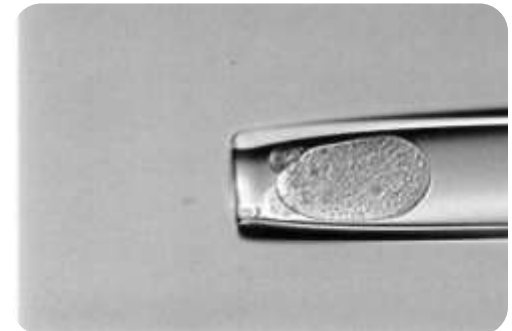
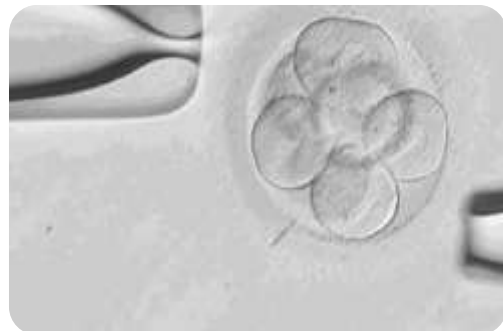
Procedura

Rimozione con un sistema di micromanipolazione di uno o due blastomeri da un embrione morfologicamente normale (day 3), ottenuto mediante fecondazione in vitro.

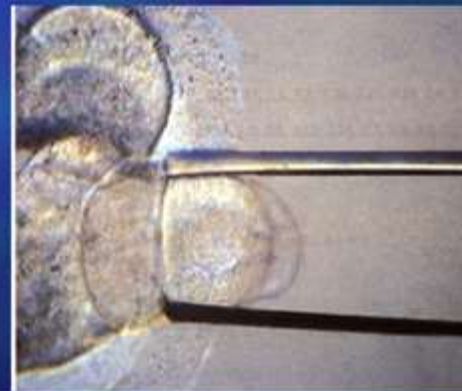
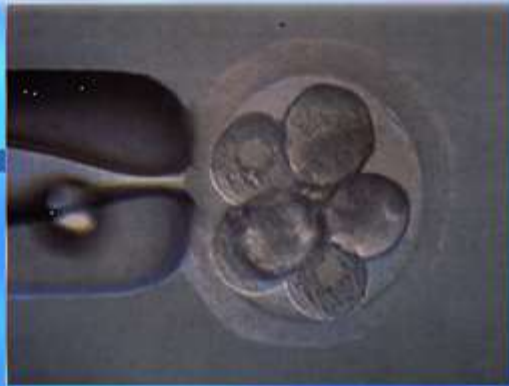
Effettuazione di una ibridazione in situ con fluorescenza multicolore (m-FISH) per lo studio numerico simultaneo dei cromosomi X, Y, 13, 14, 15, 16, 18, 21 e 22 (“screening aneuploidie”) su nuclei in interfase.

OPPURE

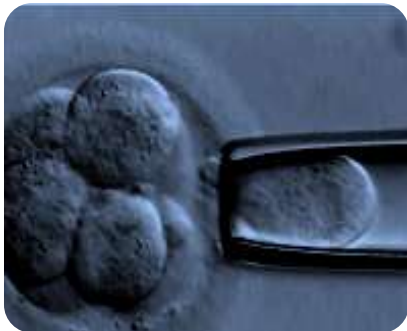
Effettuazione di una amplificazione enzimatica del DNA da singola copia per l’esame molecolare di patologie geniche (talassemia, fibrosi cistica, emofilia, etc.).



DIAGNOSI GENETICA PRE-IMPIANTO: DIAGNOSI POST-ZIGOTICA



BIOPSIA EMBRIONALE



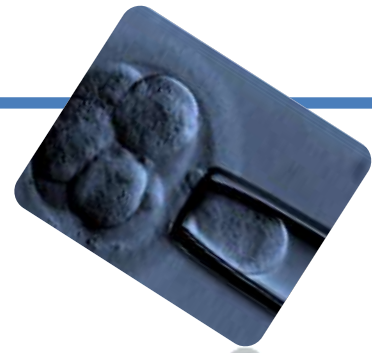
Nel caso di PGD di embrioni al terzo giorno di coltura (almeno allo stadio di 6-8 cellule) la rimozione del blastomero da analizzare viene effettuata previa parziale apertura della zona pellucida mediante laser o utilizzo di soluzione acida (Tyrode's solution - pH 2).

E' di fondamentale importanza che il blastomero prelevato possieda un nucleo ben visibile, quindi si procede all'aspirazione del blastomero con micropipetta.

Il terreno in cui avviene la biopsia è un tipico handling medium Ca e Mg free, per evitare shock osmotici.



La PGD in Italia



**Legge 40/2004
&
Sentenza 151/2009**



Divieto di Soppressione degli Embrioni



PGD???





*Grazie per
l'attenzione!*

Dott.ssa Raffaella Cavallaro