

Attualità in tema di Procreazione Medicalmente Assistita

P.G. ARTINI, V. VALENTINO, M. RUGGIERO, M.R. PARISEN TOLDIN,
V. CELA, A.R. GENAZZANI

RIASSUNTO: Attualità in tema di Procreazione Medicalmente Assistita.

P.G. ARTINI, V. VALENTINO, M. RUGGIERO, M.R. PARISEN TOLDIN,
V. CELA, A.R. GENAZZANI

Nel febbraio 2004, dopo un lungo iter parlamentare, viene approvata in Italia la Legge sulla Procreazione Medicalmente Assistita. Questa norma intende regolamentare, per la prima volta in Italia, l'accesso alle tecniche di fecondazione assistita, ponendo una serie di limiti all'attività dei medici e biologi specialisti in riproduzione ed enfatizzando soprattutto i diritti dell'embrione a discapito dei diritti materni e più in generale delle coppie infertili.

La Legge 40/04 condiziona pesantemente l'accesso alle tecniche riproduttive, subordinandole a determinati requisiti di età, sterilità accertata e stabilità della coppia. Vieta inoltre l'utilizzo di alcune metodiche precedentemente disponibili quali l'utilizzo di gameti da donatori, la produzione ed il trasferimento di più di tre embrioni o la crioconservazione degli stessi ed esclude ogni possibilità di effettuare la diagnosi pre-impianto.

Questa review si propone di analizzare che cosa sta accadendo oggi in Italia a poco più di un anno dall'attuazione della Legge 40, ed in particolare di come si sta evolvendo il modo di operare dei centri che si occupano di procreazione assistita.

SUMMARY: Current issues in Assisted Reproductive technology.

P.G. ARTINI, V. VALENTINO, M. RUGGIERO, M.R. PARISEN TOLDIN,
V. CELA, A.R. GENAZZANI

In February 2004, after along parliamentary iter, it comes approved of in Italy the Law on assisted reproduction technology. This norm means prescribed, for before the time in Italy, the access to the techniques of assisted reproduction, placing one series of limits to the activity of the gynecologist and embryologist and emphasizing above all the embryo rights to the maternal rights' cost and more in a generalized manner of the infertile couples.

Law 40/04 severely limits the access to the reproductive techniques, subordinating it to determines requirement of age, assessed sterility and stability to you of the brace; moreover it prohibits use of some techniques previously available, as use of spermatozoa or eggs from donors, the production and the transfer more than three embryos or the cryopreservation of the same ones and excludes every possibility to carry out the diagnosis pre-system.

This review analyses that what is happening today in Italy little more than a year from the law 40 approval, and in particular how is changing the way to operate of the centers that are taken care of assisted reproduction.

KEY WORDS: Procreazione Medicalmente Assistita - IVF - Legge 40/04.
Assisted Reproduction - IVF - Law 40/04.

Introduzione

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) stima che circa l'8-10% delle coppie ha problemi di infertilità, per cui su una scala mondiale significa che 50-80 milioni di persone soffrono di questo problema.

Le tecniche di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA) rappresentano un trattamento consolidato da moltissimi anni per molte forme di infertilità. Non si può non ricordare che fin dai primi passi la PMA più che essere valutata secondo canoni propri della

scienza medica, fu giudicata in base a presupposti di carattere etico-morale. Tuttavia, anno dopo anno e attraverso un costante progresso medico-scientifico, la PMA ha mostrato la capacità di offrire una risposta terapeutica a decine di milioni di coppie infertili, permettendo la nascita di oltre un milione di bambini. Secondo i dati del Registro Mondiale (ICMART), ogni anno vengono eseguiti nel mondo oltre 500.000 cicli di trattamento che permettono la nascita di circa 100.000 bambini ogni anno. Ad oggi, la "popolazione" di bambini viventi nel nostro mondo grazie a questi trattamenti supera i 2 milioni.

Con il provvedimento legislativo Legge 19 Febbraio 2004, n° 40 è stata regolamentata anche in Italia la PMA. Tale provvedimento rinviava le sue modalità applicative a linee guida da emanarsi dal Ministero

della Salute e la successiva stesura di tali linee guida da parte degli organi competenti ha evidenziato maggiormente lo scontro in atto sui principi fondanti della legge.

Per la presenza di contrastanti orientamenti ideologici, vi è stata un'eccessiva semplificazione del contesto medico-sanitario nel quale la legge si inserisce; appare tuttavia chiaro che il dibattito in atto nasce da un inadeguato approfondimento delle dinamiche biologiche che sono alla base dei meccanismi della riproduzione umana.

I problemi di ordine medico scaturiscono principalmente dai forti limiti imposti all'accesso a tali tecniche e alla libertà dei medici, che hanno portato alla riduzione delle probabilità di successo del 30% ed all'incremento di quasi il 50% dei casi di aborto. Tali allarmanti dati emergono in occasione di un Congresso Nazionale tenutosi recentemente a Roma, dove gli esperti si sono confrontati sui risultati biologici e clinici della PMA in Italia ad un anno e mezzo dall'applicazione dalla legge.

Nuovi orientamenti

A. Numero degli ovociti da fecondare

Uno degli aspetti più problematici è dato dal limite di fecondazione di non più di tre ovociti e all'obbligo di procedere al trasferimento di tutti gli embrioni formati. La fecondazione in vitro dell'ovocita presenta però un tasso di successo non molto elevato (dal 35 al 70%), inoltre solo una piccola percentuale di embrioni raggiungono lo stadio di 6-8 cellule. Nell'epoca "pre-legge", per ovviare a ciò, specie quando si utilizzavano cellule seminali od ovociti di scarsa qualità, numerosi centri inseminavano un numero di ovociti, quando possibile, superiore a tre, con l'obiettivo di poter trasferire poi in utero due o tre embrioni di buona qualità che dessero concrete speranze di gravidanza. Numerosi centri congelavano gli embrioni in soprannumero e li trasferivano in successivi cicli quando non si fosse instaurata la gravidanza al primo tentativo. Ciò non è più permesso dalla nuova normativa che all'art. 14 comma 2 afferma perentoriamente che "le tecniche di produzione di embrioni...non devono creare un numero di embrioni superiore a quello strettamente necessario ad un unico e contemporaneo impianto, comunque non superiore a tre".

L'obbligo di trasferimento di tutti gli embrioni ottenuti comporta un aumento significativo delle gravidanze multiple, soprattutto nelle donne di età inferiore ai 35 anni, mentre si assiste ad una riduzione dei tassi di gravidanza nella donna con un'età

superiore ai 35 anni, vista la ridotta ricettività endometriale. La mancata libertà del medico di modulare il numero di embrioni da trasferire in base ai tassi di impianto, che differiscono fortemente nelle varie età della donna, porta ad un incremento di gravidanze a rischio nelle giovani ed a ridotte possibilità di gravidanza in età più matura.

Il limite di fecondazione di tre ovociti richiede una buona selezione degli stessi e la denudazione del cumulo ooforo, step fondamentale della ICSI, permettendo così oltre alla valutazione del complesso cumulo-corona radiata, anche quella della morfologia ovocitaria, con particolare attenzione alla maturità nucleare e presenza di eventuali anomalie citoplasmatiche e/o extra-citoplasmatiche. Ciò può spiegare il motivo per cui il tasso di ICSI è significativamente aumentato dopo l'approvazione delle legge sulla fecondazione assistita. Tuttavia l'utilizzo sistematico di tale tecnica a discapito della FIVET, aumenta significativamente i costi sanitari e può avere implicazioni cliniche a lungo termine sull'outcome neonatale, poiché la sicurezza di tale tecnica è ancora materia di discussione. Diversi studi hanno infatti evidenziato differenze statisticamente non significative tra i tassi di gravidanza ottenuti con FIVET o ICSI (Retzloff and Hornstein, 2003; Katalinic *et al.*, 2004; Devroey and Van Steirteghem, 2004; Bonduelle *et al.*, 2005; Hansen *et al.*, 2005).

Uno studio recente ha evidenziato un nuovo orientamento per ovviare al rischio che alcune coppie hanno di non avere nessun embrione trasferito. In tale studio, infatti, venivano prelevati tutti gli ovociti, tre venivano inseminati, altri tre venivano incubati, i restanti erano congelati; dopo 18-20 ore gli ovociti inseminati venivano valutati, se non fecondati, si inseminavano gli ovociti "di riserva" tenuti nell'incubatore, in modo da poter comunque trasferire il maggior numero di embrioni (comunque non superiore a tre) alla paziente (Albani E., *abstract book ESHRE 2005*). Tale metodica non è però scevra da critiche, poiché dati della letteratura affermano che dopo 16 ore l'ovocita incubato già andato incontro al suo invecchiamento cellulare, per cui pur essendo ancora fecondabile, darebbe luogo ad embrioni di bassa qualità con un ridotto potenziale di impianto. La situazione ideale sarebbe quella di accelerare i tempi della valutazione, tuttavia questo presenta problemi tecnici ed organizzativi non indifferenti.

Alla luce di tali reperti si è anche pensato di comportarsi come in Germania, effettuando il transfer allo stadio di 2 pronuclei (2PN), con una notevole riduzione dei costi di laboratorio e un minor imprinting esercitato dal terreno di coltura sull'embrione (dati non pubblicati).

B. Crioconservazione dei gameti

La legge n° 40 vieta espressamente la crioconservazione dell'embrione, fatte salve alcune particolari circostanze che rientrano nell'ambito delle condizioni di necessità; ciò ha determinato una importante riduzione del pregnancy rate cumulativo per prelievo ovocitario ed un conseguente aumento del numero di stimolazioni ovariche, non prive di rischi e comunque di costo elevato.

Una soluzione alternativa è rappresentata dalla crioconservazione dei gameti femminili che, oltre all'applicazione nei programmi di FIVET, prospetta una serie di vantaggiose applicazioni cliniche. Infatti questa metodica potrebbe consentire di conservare la fertilità alle donne che rischiano una perdita definitiva della fertilità, per esaurimento ovarico prematuro e per trattamenti chirurgici o chemio-radioterapici.

La crioconservazione dei gameti femminili ha presentato notevoli difficoltà tecniche rispetto allo stoccaggio dei gameti maschili o degli embrioni a causa delle peculiarità citologiche dell'ovocita. Infatti la cellula uovo è una delle cellule più grandi dell'intero organismo, ha un basso rapporto superficie/volume, è molto ricca d'acqua e si trova in una delicata fase del processo meiotico nella quale è teoricamente possibile indurre aneuploidia con l'esposizione ai crioprotettori ed ai processi di raffreddamento/riscaldamento. L'eventuale depolimerizzazione dei microtubuli del fuso operata dai crioprotettori o dai cristalli di ghiaccio formatisi nel processo di congelamento/scongelo potrebbe impedire la normale separazione dei cromatidi al momento della fertilizzazione, inducendo una condizione di aneuploidia dopo l'espulsione del secondo globulo polare. I due periodi potenzialmente pericolosi per la sopravvivenza cellulare sono la fase iniziale di raffreddamento a basse temperature ed il momento di ritorno a condizioni fisiologiche.

Come emerge da un attento esame della letteratura, le indagini svolte sino ad ora sulla crioconservazione degli ovociti forniscono informazioni assai disomogenee e spesso nettamente contrastanti sulla metodologia più idonea e meno dannosa per l'integrità cellulare.

I principali fattori che sembrano coinvolti nel successo del metodo di crioconservazione sono le variabili inerenti l'ovocita (dimensioni, qualità, età, maturità, presenza del cumulo) e quelle inerenti la tecnica (il tipo di crioprotettore e relativa temperatura, concentrazione e tempi di esposizione, la velocità di congelamento e scongelamento). Le dimensioni del gamete sono un parametro molto importante nel processo di congelamento, in grado di influenzare i tassi complessivi di sopravvivenza

poiché anche da esso dipendono le probabilità che si formi ghiaccio intracellulare (Borini *et al.*, 2004; Tucker *et al.*, 2004; Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2004).

Un'altra caratteristica dell'ovocita che sembra condizionare la riuscita del processo di crioconservazione è la presenza del cumulo ooforo. Le documentazioni dei diversi autori depongono alternativamente a favore o contro la rimozione del cumulo: secondo alcuni l'assenza di questo ampio complesso cellulare dovrebbe essere vantaggiosa perché renderebbe più facile la penetrazione dei crioprotettori all'interno del citoplasma, ed effettivamente le prime gravidanze furono ottenute con questo accorgimento (Chen *et al.*, 1986). Esistono però studi che testimoniano l'importanza del mantenimento del cumulo ai fini di una maggiore sopravvivenza cellulare al termine del processo di crioconservazione (Pellicer *et al.*, 1988; Sathanathan *et al.*, 1992). E' dunque possibile che la presenza delle cellule del cumulo sia in grado di offrire una sorta di protezione contro le improvvise modificazioni osmotiche e gli stress causati dalla rapida concentrazione o diluizione intracellulare di crioprotettori durante i processi di equilibrio e rimozione dopo lo scongelamento. Diverse strutture cellulari possono venire lese durante l'intero processo di congelamento/scongelo e dal contatto con sostanze utilizzate come crioprotettori. Queste anomalie possono esitare in anomalie morfologiche e funzionali.

Accanto alle tecniche di congelamento in senso stretto, ricordiamo un'opzione alternativa nelle metodiche di stoccaggio cellulare, rappresentata dalla vitrificazione. La vitrificazione può essere definita come il processo grazie al quale una soluzione di crioprotettori ad alte concentrazioni solidifica durante il raffreddamento senza la formazione di cristalli di ghiaccio. Lo stadio solido raggiunto mantiene la disposizione delle molecole e degli ioni presenti allo stadio liquido, e può venir considerato come un liquido superraffreddato estremamente viscoso. La vitrificazione ha alcuni vantaggi rispetto al congelamento perché essa evita i danni causati dalla formazione del ghiaccio intracellulare. Le soluzioni per la vitrificazione necessitano di notevoli capacità di raffreddamento (circa 1500°C/min) e di concentrazioni elevate di crioprotettori (Friedler *et al.*, 1988). L'applicazione di questa tecnica agli ovociti umani non è confortante e gli studi sono pochi e contraddittori. D'altra parte il buon tasso di sopravvivenza riferito da Trounson costituisce un forte stimolo ad intraprendere ulteriori ricerche: sia la sopravvivenza morfologica che la fertilizzazione di ovociti umani maturi (metafase II) sono

state ottenute in percentuali accettabili, ma è degno di nota il blocco di qualsiasi sviluppo della divisione cellulare nel gruppo degli ovociti vitrificati (Trounson et al., 1986).

Secondo i dati raccolti dalla Società Italiana di Embriologia, questa tecnica è ancora in fase sperimentale, in quanto i dati biologici e clinici oggi disponibili dicono che le probabilità di successo rimangono ancora ridotte rispetto a quelle dei cicli con ovociti freschi; mentre è ancora sotto studio la valutazione del rischio di eventuali anomalie genetiche negli ovociti sottoposti a tale stress fisico (dati non pubblicati).

Infine tale metodica richiede personale altamente specializzato e interamente dedicato e formato su questa metodica è ciò non è alla portata della maggior parte dei Centri Italiani.

C. Diagnosi pre-impianto

La Legge 40/04, oltre a varie polemiche di ordine medico, etico e sociale, ha determinato un pericoloso e discriminante "turismo procreativo", come conseguenza del divieto di donazione di gameti e soprattutto del divieto di effettuare diagnosi pre-impianto (PGD) sia in coppie sterili che non.

La Legge vieta il ricorso a tecniche di procreazione assistita di tipo eterologo; pertanto tutte le donne cui è capitata la triste esperienza di andare in menopausa precoce in giovane età non avranno più la possibilità di ovodonazione. Lo stesso problema si presenta per gli uomini azoospermici che per affezioni congenite o varie malattie pregresse (orchietomie bilaterali, radio- e/o che mio-terapia) non producono spermatozoi.

La nuova legislazione italiana vanifica inoltre l'importante ruolo della diagnosi pre-impianto, quindi i portatori sani di malattie tutt'altro che rare come la talassemia, la fibrosi cistica, la malattia di Duchenne, saranno costretti a trasferire in utero embrioni malati iniziando una gravidanza che sin dall'inizio può presentarsi patologica, per poi ricorrere eventualmente alla legge sull'interruzione volontaria di gravidanza (Legge 194/78) (Robertson et al., 2004). Ciò contrasta fortemente con il dato che a tutt'oggi sono stati effettuati nel mondo oltre 3000 cicli di PGD, per malattie X-Linked, per Anomalie Cromosomiche e per Difetti di un Singolo Gene con la nascita di oltre 500 bambini sani e in particolare in Italia sono nati oltre 100 bambini sani. Inoltre in Italia molti specialisti e centri all'avanguardia per la PGD si trovano nell'impossibilità di lavorare, per cui tale norma, oltre ad avere gravi conseguenze etiche, ha determinato anche ingenti danni scientifici ed economici.

Una soluzione alternativa per ovviare al divieto

della diagnosi preimpianto e alle restrizioni imposte sul numero di ovociti da inseminare è data dalla biopsia del primo globo polare nell'ovocita prima di sottoporlo a crioconservazione, tuttavia questa presenta forti limitazioni poiché utile esclusivamente per valutare patologie a trasmissione materna (Lappi M., *abstract book ESHRE 2005*).

Tutte queste metodiche tendono a sottolineare l'importanza sempre maggiore che riveste lo studio della morfologia e della qualità dell'ovocita rispetto allo studio della qualità dell'embrione che si effettuava prima dell'attivazione della Legge. Per eseguire uno studio accurato della morfologia dell'ovocita i laboratori necessiteranno di biologi preparati ed esclusivamente preposti a questo e di strutture, tipo il poloscopio, necessarie per una miglior valutazione degli ovociti.

D. Nuovi criteri di selezione del gamete maschile

Nei primi anni di introduzione della ICSI l'entusiasmo generato da tale tecnica ha indotto a pensare che i risultati in termini di fertilizzazione, divisione embrionaria ed impianto potessero essere indipendenti dalla qualità spermatica. In realtà a più di 10 anni dall'introduzione della tecnica, in base ad esperienze accumulate nelle ICSI con spermatozoi immaturi o anomali, numerosi studi hanno dimostrato che la qualità del nemesperma microiniettato può essere determinante nei processi di fertilizzazione e divisione embrionaria ed anche nella trasmissione di eventuali anomalie genetiche o cromosomiche.

Nuove prospettive nella scelta del gamete maschile migliore sono state evidenziate da un team di biologi che ha messo a punto un composto a base di acido ialuronico (HA) per la micromanipolazione degli spermatozoi nella ICSI (dati non pubblicati). Tale composto possiede la capacità di selezionare gli spermatozoi maturi in base alla capacità che essi hanno di legarsi con l'acido ialuronico in vitro. Gli spermatozoi maturi infatti posseggono una glicoproteina di membrana (nella porzione posteriore della testa) che ha un dominio di attività ialuronidasi. Il legame spermatozoo-HA rappresenterebbe quindi inequivocabilmente l'evidenza del completamento della spermatogenesi.

E. Microambiente follicolare

Vista la necessità di selezionare al meglio gli ovociti da inseminare, recenti studi hanno posto l'attenzione sul microambiente follicolare ed in particolare sul ruolo della vascolarizzazione, che sembrerebbe costituire un importante elemento che indica il potenziale di sviluppo dell'ovocita (Borini et al., 2005).

Un altro elemento interessante è dato dal fattore

anti-mülleriano (anti-müllerian hormone - AMH), citochina coinvolta nel controllo del recruitment dei follicoli primordiali, infatti l'AMH sembrerebbe esercitare un feedback negativo sulla crescita follicolare (Durlinger et al., 1999). Tale dato è stato successivamente corroborato dal riscontro di ridotti livelli di AMH nei follicoli delle donne affette da sindrome dell'ovaio policistico (Stubbs et al., 2005).

F. Stimolazione ovarica

Un'altra conseguenza del limite di fecondazione di tre ovociti avrebbe dovuto portare alla riduzione delle dosi di FSH utilizzate per la stimolazione ovarica controllata, con conseguente risparmio delle risorse economiche, tuttavia l'atteggiamento dei diversi centri non è univoco, poiché alcuni centri attuano una stimolazione ovarica minima, mentre altri continuano con stimolazione tesa ad ottenere il maggior numero di ovociti. Quando si utilizzano basse dosi di gonadotropine si rischia di non ottenere un numero adeguato di ovociti di buona qualità, motivo per cui può essere giustificata una stimolazione piuttosto intensa, vista la necessità di selezionare al meglio le cellule uovo incrementando i tassi di fertilizzazione. L'utilizzo di dosi maggiori è legittimato dai dati della letteratura che non evidenziano una stretta corrispondenza tra intensità della stimolazione e rischio di sindrome da iperstimolazione. Quest'ultima infatti si manifesta soprattutto in donne a rischio generalmente trattate con basse dosi di FSH. In sintesi, possiamo affermare che un maggior numero di ovociti da selezionare comporta tassi di gravidanza più elevati

(Ragni et al., 2005).

Alcuni centri, come si è già brevemente accennato in precedenza, tendono a non eseguire alcuna stimolazione, basandosi sul follicolo dominante, per definizione di migliore qualità, proseguendone lo sviluppo in vitro, soprattutto nelle pazienti over-35enni. Molto attuale è l'uso dell'LH ricombinante nelle pazienti in età fertile più matura, poiché l'azione simil-HMG favorisce il recruitment follicolare precoce (Gomez-Palomares et al., 2005).

Conclusioni

I centri di fecondazione assistita italiani dopo la promulgazione di questa legge, seppur tra molteplici problemi e perplessità, hanno dovuto adeguarsi sia sul versante biologico che su quello prettamente ginecologico. Sulla base delle restrizioni apportate dalla Legge, l'attenzione del biologo dovrà spostarsi dagli studi finora effettuati sull'embrione ad una più accurata valutazione della qualità ovocitaria. D'altro canto il ginecologo dovrà interessarsi dei fini meccanismi autocrini e paracrini che regolano la follicologenesi e che possono influenzare la qualità ovocitaria e la recettività endometriale.

Concludendo, possiamo dire che è ancora prematuro fare un bilancio degli effetti della nuova legislazione sui risultati clinici della fecondazione assistita, tuttavia sicuramente i limiti posti da questa norma hanno portato a spostare il campo delle ricerche sui gameti ed in particolare sulle tecniche che ci consentono di selezionare e criopreservare al meglio gli ovociti.

Bibliografia

1. BONDUELLE M., WENNERHOLM U.B., LOFT A., TALATZIS B.C., PETERS C., HENRIET S., MAU C., VICTORIN CEDERQUIST A., VAN STEIRTEGHEM A., BALASKA A. et al.: *A multi-centre cohort study of the physical health of 5-year-old children conceived after intracytoplasmic sperm injection, in vitro fertilization and natural conception.* Hum Reprod 20, 722–727, 2005.
2. BORINI A., BONU M.A., COTICCHIO G., BIANCHI V., CATTOLI M., FLAMIGNI C.: *Pregnancies and births after oocyte cryopreservation.* Fertil Steril 82, 601–605, 2004.
3. BORINI A., LAGALLA C., CATTOLI M., SERENI E., SCIAJNO R., FLAMIGNI C., COTICCHIO G.: *Predictive factors for embryo implantation potential.* Reprod Biomed Online. 10(5): 653–68, 2005.
4. CHEN C.: *Pregnancy after human oocyte cryopreservation.* Lancet. Apr 19;1(8486): 884–6, 1986.
5. DEVROEY P., VAN STEIRTEGHEM A.: *A review of ten years experience of ICSI.* Hum Reprod Update 10, 19–28, 2004.
6. DURLINGER A.L., KRAMER P., KARELS B., DE JONG F.H., UILENBROEK J.T., GROOTEGOED J.A., THEMEN A.P.: *Control of primordial follicle recruitment by anti-müllerian hormone in the mouse ovary.* Endocrinology 140: 5789–5796, 1999.
7. FRIEDLER S., GIUDICE L.C., LAMB E.J.: *Cryopreservation of embryos and ova.* Fertil Steril. May; 49(5): 743–64, 1988.
8. GOMEZ-PALOMARES J.L., ACEVEDO-MARTIN B., ANDRES L., RICCIARELLI E., HERNANDEZ E.R.: *LH improves early follicular recruitment in women over 38 years old.* Reprod Biomed Online. Oct; 11(4): 409–14, 2005.
9. HANSEN M., BOWER C., MILNE E., DE KLERK N., KURINCZUK J.: *Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects—a systematic review.* Hum Reprod 20, 328–338, 2005.
10. KATALINIC A., ROSCH C., LUDWIG M.: *German ICSI Follow-up Study Group: Pregnancy course and outcome after intracytoplasmic sperm injection: a controlled, prospective cohort study.* Fertil Steril 81, 1604–1616, 2004.

11. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine: *Ovarian tissue and oocyte cryopreservation*. Fertil Steril 82, 993–998, 2004.
 12. PELLICER A., LIGHTMAN A., PARMER T.G., BEHRMAN H.R., DE CHERNEY A.H.: *Morphologic and functional studies of immature rat oocyte-cumulus complexes after cryopreservation*. Fertil Steril. Nov; 50(5): 805-10, 1988.
 13. RAGNI G., ALLEGRA A., ANSERINI P., CAUSIO F., FERRARETTI A.P., GRECO E., PALERMO R., SOMIGLIANA E.: On behalf of the Società Italiana della Riproduzione (S.I.d.R.) study group on the impact of the law 40/2004. *The 2004 Italian legislation regulating assisted reproduction technology: a multicentre survey on the results of IVF cycles*. Human Reproduction Vol. 20, No. 8 pp. 2224–2228, 2005.
 14. RETZLOFF M.G., HORNSTEIN M.D.: *Is intracytoplasmatic sperm injection safe?* Fertil Steril 80, 851–859, 2003.
 15. ROBERTSON JOHN A.: *Protecting embryos and burdening women: assisted reproduction in Italy*. Human Reproduction Vol. 19, No. 8 pp. 1693–1696, 2004.
 16. SATHANANTHAN AH.: *Understanding the fundamentals of embryology in assisted reproductive technology*. Ann Acad Med Singapore. Jul; 21(4): 576-81, 1992.
 17. STUBBS S.A., HARDY K., DA SILVA-BUTTKUS P., STARK J., WEBBER L.J., FLANAGAN A.M., THEMME A.P., VISSER J.A., GROOME N.P., FRANKS S.: *Anti-mullerian hormone protein expression is reduced during the initial stages of follicle development in human polycystic ovaries*. J Clin Endocrinol Metab. 90 (10): 5536-43. Epub 2005 Jul 19, 2005.
 18. TROUNSON A.: *Preservation of human eggs and embryos*. Fertil Steril. Jul; 46(1): 1-12, 1986.
-