

# VALORACIÓ DE LA QUALITAT EN ELS PRIMERS ESTADIS DE DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI HUMÀ



Tesi Doctoral

**Gemma Arroyo Cardona**

Barcelona, Juliol 2015



VALORACIÓ DE LA QUALITAT EN  
ELS PRIMERS ESTADIS DE  
DESENVOLUPAMENT  
EMBRIONARI HUMÀ

**Memòria presentada Gemma Arroyo Cardona per optar al grau de doctor  
per la Universitat Autònoma de Barcelona**

Gemma Arroyo Cardona

Barcelona, Setembre 2015



El Dr. Josep Santaló Padró, Catedràtic de Biologia Cel·lular de Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, i la Dra. Anna Veiga Lluch, Directora Científica del Servei de Medicina de la Reproducció del Departament d'Obstetrícia, Ginecologia i Reproducció de l'Hospital Universitari Quirón Dexeus,

CERTIFIQUEN: que Gemma Arroyo Cardona ha realitzat sota la seva direcció el treball de tesi doctoral "Valoració de la qualitat en els primers estadis de desenvolupament embrionari humà".

Aquest treball s'ha dut a terme a la Unitat de Biologia Cel·lular de la Universitat Autònoma de Barcelona i al Servei de Medicina de la Reproducció de l'Hospital Universitari Quirón Dexeus.

Dr. Josep Santaló Padró

Dra. Anna Veiga Lluch

Barcelona, Setembre 2015

Al Joan, al Guillem, a la Júlia i al Pau,  
motors d'aquesta tesi.

A la meva mare,  
a qui ho dec tot.

## Agraïments:

A l'Anna, codirectora d'aquesta tesi, per engrescar-me a fer recerca, per ser un exemple de constància i esforç. Gràcies per trobar sempre temps per corregir a última hora i per una trobada entre Boston i Califòrnia.

Al Josep, codirector d'aquesta tesi, per estar sempre disponible, per animar-me i pel seu perfeccionisme i rigor. Gràcies per ensenyar-me a traduir del catinglish a quelcom intel·ligible.

A tots dos, gràcies per la vostra amistat i confiança, per ensenyar-me tantes coses i per encoratjar-me a seguir endavant.

Al Dr. Pere N. Barri per deixar-me formar part del seu equip i fer-me'n sentir molt orgullosa.

A la Monste Boada, pel seu suport i per les seves minucioses revisions.

A tots els biòlegs del Laboratori de FIV. Les sèniors que em van ensenyar la FIV: Bego, M<sup>a</sup>José, Itziar; i les llavors júnior: Fina, Yolanda, Ana, Carolina, Laura M., Irene, Imma i Olga. Fa molt de temps...

Als meus compis de dimarts tarda: Miquel i Bea, sense el vostre suport i amistat això no hauria sortit endavant.

A la Clara i la Cris, per fer-me mil canvis de matrix.

A la Eli pel seu exemple de mare-superpower.

A la Mònica per ensenyar-me els entrellats del digipí.

A la Silvia, la Marta B., la Marta T. i en Lluç, pels aires compartits.

A les meves clínics de referència: el Ventura per confiar en mi, la Paca per liar-me amb estudis surrealistes i a la Rosa per fer-me treure el nas dels pronuclis.

Als màsters Felipe, Elisenda i Sandra, gràcies per les matxacades de dades..

Al Nacho, per ser l'herramienta epidemiològica sense el qual res d'això no m'ho creuria. Gràcies per trobar sempre un forat i tenir una p disponible.

Al Willy, al Ricardo i a la Elena, per preguntar-me sempre com portava la tesi. L'heu mantinguda viva.

Al Joan i al Guillem, per canviar-me el sentit de la vida.

A la Júlia, que m'ha apretat en la recta final.

Al Pau, per aguantar-me la canya. Mil gràcies pel teu suport, amor i paciència. Sense tu no ho hauria aconseguit.

Als meus germans, la Cristina, l'Enric i la Mireia, gràcies per animar-me a seguir endavant amb la tesi i recordar-me que l'esforç val la pena.

A la meva mare, a qui dec tot el que sóc. Gràcies per la teva generositat, per ser un exemple de sacrifici i amor incondicional.





# Índex

1. Introducció.....	9
1.1. La maduració oocitària.....	9
1.1.1. Acció de les gonadotropines en la maduració de l'oòcit.....	10
1.1.2. Represa de la meiosi.....	12
1.1.3. Qualitat oocitària en TRA.....	14
1.2. Desenvolupament embrionari en l'estadi de zigot.....	16
1.2.1. Activació del zigot.....	16
1.2.2. Reacció cortical.....	18
1.2.3. Finalització de la meiosi i extrusió del segon corpuscle polar.....	18
1.2.4. Formació dels pronuclis.....	19
1.2.5. Valoració de la fecundació.....	24
1.2.6. Sistemes de classificació segons els pronuclis.....	26
1.3. Embrió.....	29
1.3.1. Primera divisió embrionària / <i>Early cleavage</i> .....	29
1.3.2. Desenvolupament embrionari fins a blastocist.....	30
1.3.3. Valoració de la morfologia de l'embrió.....	31
1.4. Diagnòstic genètic preimplantacional.....	34
1.4.1. Biòpsia embrionària.....	34
1.4.2. Tècniques diagnòstiques.....	35
1.4.3. Screening d'aneuploidies: PGS.....	37

1.4.4. Translocacions.....	38
2.0. Objectius.....	39
3.0. Publicacions.....	41
3.1. Developmental prognosis for zygotes based on pronuclear pattern: Usefulness of pronuclear scoring.....	41
3.2. Pronuclear morphology, embryo development and chromosome constitution.....	51
3.3. Does early cleavage correlate with chromosome constitution in human preimplantation embryos?.....	61
4.0. Discussió.....	71
4.1. Característiques morfològiques del zigot i qualitat embrionària.....	71
4.2. Patró de pronuclis.....	73
4.2.1. Correspondència entre les dues classificacions.....	74
4.3. Patró de pronuclis i qualitat embrionària.....	75
4.4. Patró de pronuclis i dotació cromosòmica.....	78
4.5. Qualitat embrionària i dotació cromosòmica.....	79
4.6. Divisió primerenca i qualitat embrionària.....	81
4.7. Divisió primerenca i dotació cromosòmica.....	83
5.0. Conclusions.....	85
6.0. Glosari.....	87
7.0. Bibliografia.....	91

# 1. Introducció

La selecció embrionària i la capacitat de predir el potencial d'implantació dels embrions és un factor determinant per l'èxit de les tècniques de fecundació in vitro (FIV). Les elevades taxes d'embaràs múltiple i els riscos obstètrics i neonatals que se'n deriven fan que es vulgui reduir el nombre d'embrions que es transfereixen sense una disminució excessiva de la taxa d'embaràs (Pandian et al., 2013) i per aconseguir-ho cal seleccionar molt bé els embrions a transferir.

Actualment hi ha una àmplia varietat de mètodes per dur a terme aquesta selecció. Més enllà de les tècniques de detecció d'anomalies genètiques (PGD), hi ha les tècniques d'anàlisi metabòlica (Hardarson et al., 2012), que tot i tenir una sòlida base científica, tenen una relació cost-efectivitat limitada que fa que el seu ús sigui ara per ara restringit. La pràctica més habitual per valorar la qualitat embrionària i dur a terme la selecció però, s'ha basat sempre en criteris morfològics. En aquest sentit, en els darrers anys el seguiment morfocinètic de l'embrió mitjançant la tecnologia de *time-lapse* (TML) ha aportat la possibilitat d'avaluar dinàmicament el desenvolupament de l'embrió la qual cosa ha permès modificar alguns conceptes i paràmetres de qualitat embrionària clàssica (Meseguer et al., 2011).

Cal tenir en compte que factors intrínsecs dels gàmetes com l'edat materna (Rubio et al., 2007) o els defectes genètics (O'Shea et al., 2012) i factors extrínsecs com els protocols d'estimulació (Farquhar et al., 2013) i les condicions de cultiu dels embrions (Kleijkers et al., 2014) poden marcar diferències en el desenvolupament embrionari i en la capacitat d'implantació de l'embrió.

Per tal d'interpretar i comprendre els resultats obtinguts en quan al desenvolupament embrionari primerenc explicarem conceptes com la maduració de l'oòcit i la sèrie d'esdeveniments que tenen lloc durant la fecundació, activació del zigot i el posterior desenvolupament embrionari.

## 1.1. La maduració oocitària

---

És important que l'oòcit adquireixi en la seva formació i maduració tots els elements necessaris per una correcta fecundació i desenvolupament embrionari. Les primeres fases del desenvolupament

embrionari fins a l'activació del genoma de l'embrió depenen estrictament de les reserves de l'oòcit, i per tant el correcte desenvolupament de l'embrió estarà lligat a la qualitat i la competència de l'oòcit. Al llarg de la formació i maduració de l'oòcit s'aconsegueix un reservori de mRNA matern i proteïnes determinants perquè l'oòcit sigui capaç de completar la meiosis, d'assegurar una penetració monoespermàtica, de descondensar el cap de l'espermatozoide, i de fer progressar el desenvolupament embrionari i d'assolir estadis posteriors (Swain and Smith, 2007).

### **1.1.1. Acció de les gonadotropines en la maduració de l'oòcit**

El cicle menstrual consta de dues fases: la preovulatòria o fol·licular i la postovulatòria o lútea (Figura 1). Sota l'efecte de les hormones pituitàries, la hipòfisi segrega l'hormona fol·licle estimulant (FSH) i la luteïnitzant (LH), que seran les encarregades de la progressió del desenvolupament fol·licular.

L'ovari té els fol·licles preantrals en repòs fins que l'FSH provoca el creixement fol·licular antral d'alguns fol·licles que passaran a trobar-se en estadi "precursor" i en disposició d'entrar en la fase final de maduració.

El reclutament del fol·licle d'on prové l'oòcit madur es dona des del cicle anterior. En cada cicle menstrual es dona un pic d'LH que provoca l'ovulació, i un cop s'inicia la involució del cos luti i una disminució de la producció d'estrògens, progesterona i inhibina, hi ha una elevació inter-cicle de l'FSH (12 dies després del pic d'LH) que recluta fol·licles per a la seva maduració. Aquesta cohort de fol·licles reclutats són els que 2 mesos enrere van abandonar el conjunt de fol·licles en repòs per passar a estadi precursor. Dels fol·licles reclutats per l'FSH, només un serà seleccionat com a "dominant" durant la fase fol·licular avançada. El fol·licle dominant és aquell en el què les cèl·lules de la granulosa responen millor a l'FSH, la qual cosa li permet adquirir primer la capacitat de secretar estrògens. Els estrògens i la inhibina secretats per aquest fol·licle exerceixen una retroalimentació negativa sobre la secreció d'FSH, i com a conseqüència s'atura el creixement dels fol·licles amb menor capacitat de resposta a l'FSH, involucionant cap a l'atrèsia. Pel que fa a l'LH, si bé en la primera meitat del creixement fol·licular no juga un paper important, és clau en la maduració fol·licular i oocitària. Els fol·licles en fase de desenvolupament necessiten un nivell d'LH suficient perquè les cèl·lules de la teca i de la granulosa proliferin i secretin factors endocrins (estrògens) i paracrins de creixement i diferenciació. Si pel contrari, i de forma anormal, se supera un llindar màxim d'LH, es pot desencadenar la luteïnització i atrèsia prematura del fol·licle preovulatori.

Una vegada el fol·licle arriba a la fase de maduresa preovulatòria, la secreció d'estrògens augmenta molt i ràpidament. Aquest pic d'estradiol té una retroalimentació positiva sobre la secreció d'LH per part de la hipòfisi, desencadenant un pic preovulatori d'LH (i també en menor grau d'FSH). L'LH activa via MAPK la ruptura de les unions intercel·lulars de les cèl·lules de la granulosa i la ruptura de la paret del fol·licle, l'alliberació de l'òocit i la formació del cos luti. El pic d'LH atura també el desenvolupament dels fol·licles menys madurs que havien estat reclutats, desencadenant la seva luteïtzació prematura i/o atrèsia.

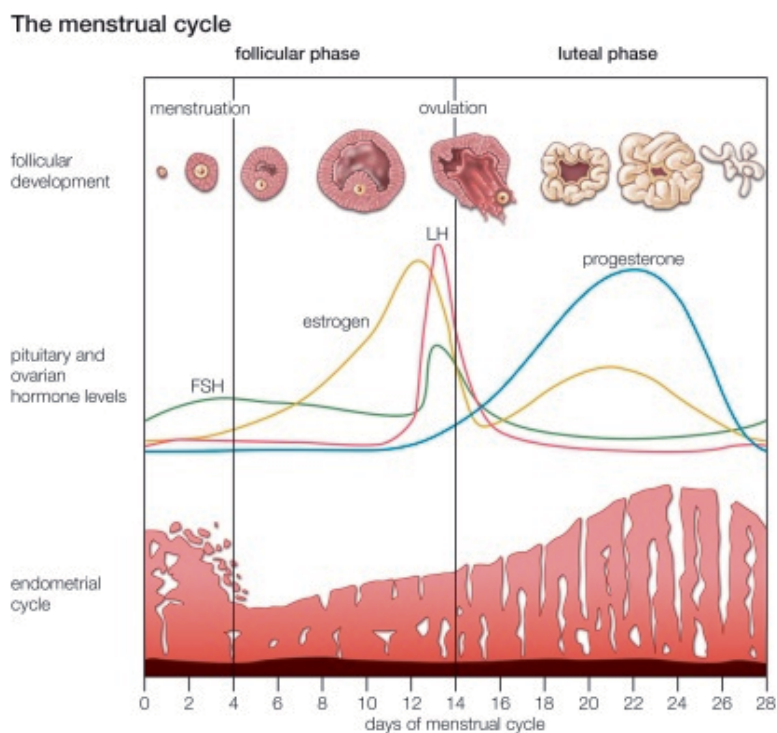


Fig 1. Cicle menstrual humà. Variacions en la concentració de les hormones hipofisiàries FSH i LH i les ovàriques esteroidees Estrògens i Progesterona al llarg del cicle (<http://www.reproduccion.com/reproduccion/ciclo-menstrual/>).

En un cicle de FIV es realitza una estimulació ovàrica per reclutar el major nombre d'òocits de bona qualitat per tal de maximitzar les possibilitats d'embaràs. El procés s'inicia a través d'una inhibició hipofisiària amb anàlegs o antagonistes de la GnRH seguit d'un aport exogen de gonadotrofines.

### 1.1.2. Represa de la meiosis

L'òocit no adquireix la capacitat de reprendre la meiosi des de dictiotè i progressar en la meiosi fins a MII fins assolir el màxim del desenvolupament fol·licular. En la represa de la meiosi el desencadenant principal és l'efecte de l'LH sobre els nivells d'AMPc. Durant l'aturada en profase I, l'AMPc actua sobre la PKA, que al seu torn via Cdc25 (Oh et al., 2010) manté inactiva la CDK1, subunitat reguladora de l'MPF. L'augment d'LH provoca la distensió de les unions intercel·lulars de les cèl·lules de la corona que envolten l'òocit i això fa que es tanquin les unions en esclatxa que els comuniquen. Com a conseqüència, l'AMPc procedent de les cèl·lules fol·liculars no pot entrar a l'òocit i la fosfodiesterasa oocitària degrada l'AMPc intracel·lular provocant-ne una disminució en la concentració. La baixada d'AMPc inactiva la PKA, i per tant la Cdc25 no és fosforilada i com a conseqüència, s'activa. La Cdc25 activa defosforila la CDK1 que és la subunitat reguladora de l'MPF la qual cosa fa que s'activi l'MPF i progressi la meiosi fins a Metafase I (Figura 2).

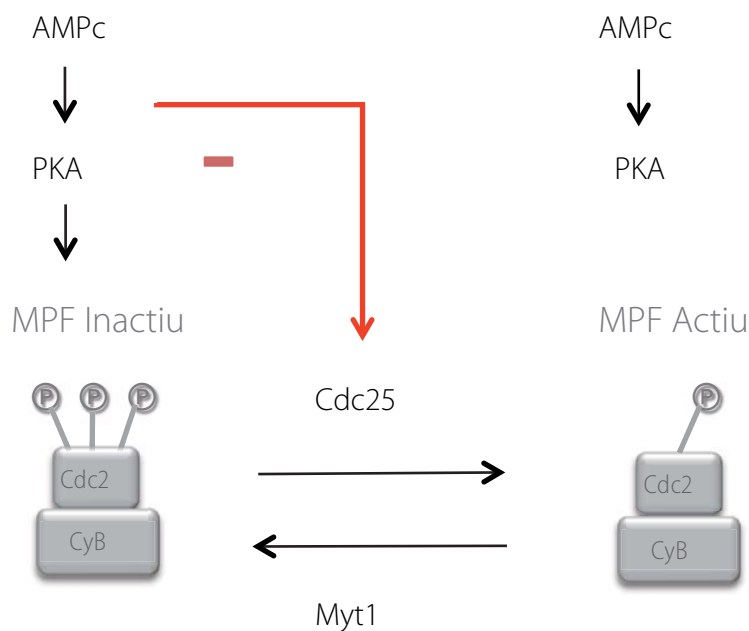


Fig 2. Diagrama de la cascada de senyalització de l'AMPc i el seu efecte en l'activitat d'MPF de l'òocit.

Posteriorment l'activitat de l'MPF caurà per acció del complex promotor de l'anafase (APC) i s'avançarà fins anafase i telofase per entrar en MII, fase en la qual experimenta una segona aturada. La responsable d'aquesta segona aturada és la MAPK, ja que està implicada en la inhibició de

l'APC. L'APC ubiquïtinitza la ciclina B (CyB) que és el component actiu de l'MPF. La MAPK exerceix una doble acció per tal de que el MPF es mantingui actiu i la meiosi s'aturi a MII: per una banda inhibeix l'APC impedit que es degradi l'MPF, i per altra banda inhibeix Myt1 mantenint MPF actiu (Figura 3).

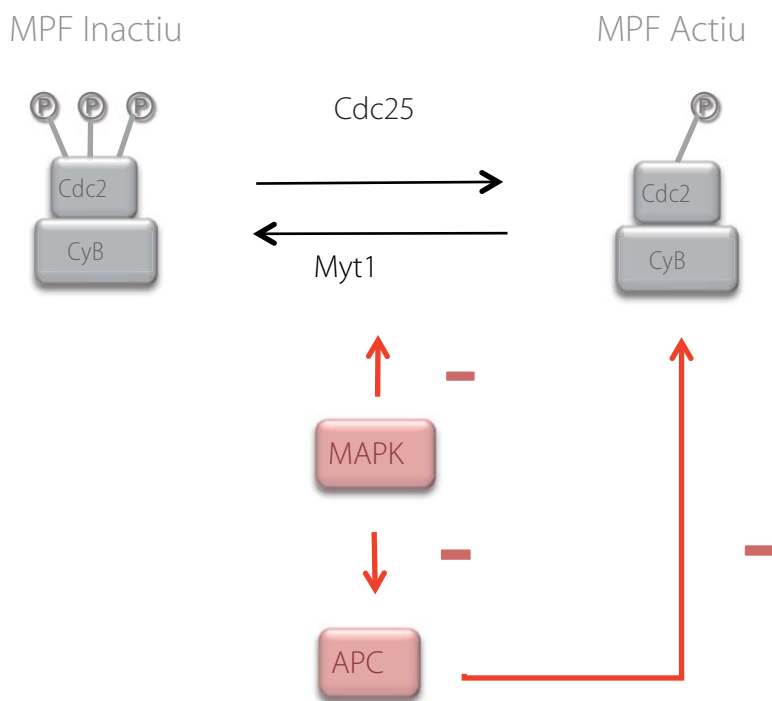


Fig 3. Diagrama de cascada d'actuació de la MAPK i l'APC i el seu efecte en l'activitat d'MPF de l'oòcit.

L'aturada a profase I de l'oòcit i la represa de la meiosis actuen com un element de control de la qualitat oocitària, ja que es recupera el mecanisme de bloqueig de la G2 per a la reparació de danys del DNA i dels punts de control respectivament (Bassermann et al., 2008; Solc et al., 2010). En el cicle cel·lular en general, hi ha un control de la cèl·lula sobre danys en el DNA; tant en la doble com en la cadena simple de DNA. La cèl·lula atura el cicle cel·lular i repara els danys i, en cas que no sigui capaç de fer-ho, desencadena una resposta d'apoptosis per eliminar la cèl·lula malmesa (Ciccia and Elledge, 2010). En la transició entre les fases G1/S i G2/M, els mecanismes de reparació de la doble i simple cadena DNA es donen activant les quinases ATM i ATR (Reinhardt and Yaffe, 2009; Smith et al., 2010).

L'aturada a profase I de l'oòcit i la represa de la meiosis actuen com un element de control de la qualitat oocitària ja que es recupera el mecanisme de bloqueig de la G2 per a la reparació de danys del DNA i dels punts de control respectivament (Bassermann et al., 2008; Solc et al., 2010).

A nivell del cycle cel·lular de l'oòcit es desencadena l'apoptosis si no hi ha hagut fecundació. A G1 del cycle cel·lular es dóna la transcripció del factor p53 (Bartek and Lukas, 2007) que atura el cycle cel·lular bloquejant la transició G1/S (Mirzayans et al., 2012) per reparar el DNA. Si no és possible reparar-lo amb èxit, p53 porta a la cèl·lula cap a l'apoptosis, a través de la transcripció de gens pro-apoptòtics (Meulmeester and Jochemsen, 2008). Pel que fa a la fase G2, la reparació del DNA i l'aturada de l'entrada a la fase M, requereix la inactivació per fosforilació la CiclinaB-CDK1 implicades en la progressió cap a la fase M (Boutros et al., 2007).

### **1.1.3. Qualitat oocitària en TRA**

En les tècniques de reproducció assistida (TRA), concretament en la FIV, els tractaments d'estimulació de l'ovulació pretenen aconseguir el màxim nombre d'oòcits madurs. Una correcta maduració de l'oòcit implica la sincronia entre la maduració nuclear i la citoplasmàtica (Krisner et al., 2004) i permet que l'oòcit esdevingui competent. Una maduració citoplasmàtica insuficient no permetrà l'adequada activació del genoma embrionari i impedirà la transició del control del desenvolupament de matern a embrionari, provocant errors en el desenvolupament embrionari posterior (Vassena et al., 2003). Així doncs existeix una clara relació entre la correcta maduració de l'oòcit i la qualitat del desenvolupament de l'embrió que se'n deriva.

Pel que fa a l'associació entre la qualitat de l'oòcit i la qualitat embrionària, són molts els estudis que l'han abordat. Per tal de saber quins oòcits donaran lloc a embrions de millor qualitat, cal tenir en compte la taxa d'implantació i de nen nascut, i per tant cal preservar la viabilitat de l'oòcit. Per tant, només podrem utilitzar una sèrie d'indicadors de la qualitat oocitària que no comprometin la seva viabilitat. Aquests indicadors són l'aspecte del cúmulo oòfor, la morfologia del corpuscle polar (CP), i aspectes morfològics de l'oòcit tals com l'espai perivitel·lí, la zona pel·lúcida o, més internament, la uniformitat del citoplasma i la localització del fus meiòtic.

El cúmulo oòfor presenta bona morfologia quan les seves cèl·lules presenten un ooplasma translúcid i no granulós i la disposició d'aquestes és radial respecte l'oòcit.

Un oòcit de bona morfologia és aquell que té una forma esfèrica, una zona pel·lúcida regular, un corpuscle polar intacte, i un citoplasma translúcid i homogeni sense inclusions. El citoplasma fosc i



granulós en presència de cossos refràctils s'ha relacionat amb major taxes d'aneuploidia i baixes taxes d'embaràs (Van Blerkom and Henry, 1992; Serhal et al., 1997; Xia et al., 1997), mentre que altres estudis ho contradiuen (Balaban et al., 1998; Kahraman et al., 2000). La influència de la morfologia del corpuscle polar pel que fa a la qualitat oocitària en quant a la mida (gran o no), forma (rodó/ovoide) i integritat (fragmentat o no) també està en entredit. Mentre hi ha estudis que ho relacionen amb la qualitat embrionària, el desenvolupament fins a blastocist i la taxa d'embaràs (Xia et al., 1997; Ebner et al., 1999; 2002), no és així en altres publicacions (Balaban et al., 1998; Ciotti et al., 2004). També s'han descrit dimorfismes en l'espai perivitel·lí en quant a la mida (augmentat o no) i contingut (presència de partícules o debris) (De Sutter et al., 1998) amb una relació contradictòria amb el desenvolupament embrionari. La morfologia de la zona pel·lúcida pel que respecte a l'estructura i gruix s'ha observat (Gabrielsen et al., 2001) i quantificat amb l'ajuda de la microscòpia de llum polaritzada relacionant-se també amb qualitat embrionària, embaràs i implantació (De Santis et al., 2005; Montag et al., 2008).

L'estructura interna de l'oòcit està formada per membranes, microtúbuls, microfilaments i altres components del citoesquelet (Oldenbourg, 1999). Aquestes estructures les conformen macromolècules que són molt refringents a la llum polaritzada i aquesta característica permet que, mitjançant aquesta tecnologia, puguem estudiar el seu dinamisme sense comprometre la viabilitat de l'oòcit (Wang et al., 2001).

Així, estudis de videocinematografia associada a microscòpia de llum polaritzada revelen que el fus és una estructura dinàmica i que en telofase I desapareix durant 40-60 min per tornar a formar-se durant la Metafase II. Els oòcits madurats in vivo presenten el fus visible en un 80% dels casos (Shen et al., 2005). Els resultats de la inseminació dels oòcits on s'observa la presència de fus respecte l'oòcit que no el presenta, ho han relacionat amb majors taxes de fecundació (Rienzi et al., 2005; Madaschi et al., 2008; Kilani and Chapman, 2014), mentre que altres autors no observen aquesta relació (Moon et al., 2003; Fang et al., 2007). En la majoria d'oòcits en els que no s'observa la presència del fus, aquest es reestructurarà passades 2 hores, però si transcorregut aquest temps el fus no s'ha reestructurat, la taxa de fecundació serà menor (Montag et al., 2006).

La localització del fus és també un factor a tenir en compte havent de ser adjacent al CP. Un desplaçament del fus respecte la zona adjacent al CP, s'ha relacionat amb diferències en la taxa de fecundació quan l'angle CP-fus és superior a 90° (Rienzi et al., 2003). De tota manera, es postula que les variacions en l'angle poden ser degudes també a un simple desplaçament de l'oòcit dins la zona pel·lúcida durant la denudació mecànica de les cèl·lules del cúmulo en la preparació per la

microinjecció espermàtica (ICSI). Per altra banda, és possible que l'oòcit en anafase tardana o telofase I, tot i presentar corpuscle polar, mantingui encara un pont entre el citoplasma i el corpuscle. Si en aquesta situació es microinjecta l'espermatozoide, es desestructurarà el fus i, com a conseqüència, és molt probable que es formin 3 pronuclis (PN) i s'alteri la fecundació (Picinato et al., 2014).

Quant a la relació entre la presència de fus i el desenvolupament embrionari, aquesta no està tan clara. Mentre que alguns estudis ho relacionen amb una major competència en dia 3 (D+3) (Madaschi et al., 2008) i capacitat de formació de blastocists (Rama Raju et al., 2007), no és així en altres treballs (Picinato et al., 2014). En quant a la relació entre la presència del fus i las taxes d'embaràs i d'implantació també s'han publicat estudis contradictoris (Chamayou et al., 2006; Coticchio et al., 2010; Picinato et al., 2014; Kilani et al., 2014).

## 1.2. Desenvolupament embrionari en l'estadi de zigot

---

Per analitzar els resultats obtinguts en el nostre treball és important conèixer la sèrie d'esdeveniments que han tingut lloc al llarg del desenvolupament embrionari en l'estadi de zigot. L'oòcit s'activa després de la fecundació i es dona la reacció cortical, encarregada d'impedir la polispèrmia. A partir d'aquest moment, es posen en marxa els mecanismes de finalització de la meiosi i d'extrusió del segon corpuscle polar. Seguidament es formen els pronuclis, i és a partir d'aquest moment que ja és valorable si hi ha hagut una correcta fecundació de l'oòcit. Existeix tota una sèrie de classificacions del zigot en base a la morfologia dels pronuclis que han estat l'objecte de la nostra tesi. Després de la formació de PN, el zigot continua desenvolupant-se i té lloc la primera divisió mitòtica de l'embrió, també objecte del nostre estudi i pas important del desenvolupament embrionari.

### 1.2.1. Activació del zigot

L'activació del zigot es dona a partir de la fusió de les membranes de l'oòcit i l'espermatozoide i inclou un gran nombre de canvis morfològics i bioquímics (Yanagimachi, 1994; Schultz and Kopf, 1995). Aquests canvis van associats a oscil·lacions en la concentració de  $Ca^{2+}$  intracel·lular (Miao and Williams, 2012) i inclouen l'exocitosi dels grànuls corticals per bloquejar la polispèrmia en primer lloc, així com la represa de la meiosi i la formació dels pronuclis, i també el reclutament de mRNA matern i l'inici de les divisions mitòtiques (Malcuit et al., 2006).

La primera pujada de  $\text{Ca}^{2+}$  es dona gràcies al PLC $\zeta$ , una isoforma de la PLC que es troba lliure en el citosol de l'espermatozoide i que s'allibera per l'efecte de la fusió de les membranes en la fecundació (Swann et al., 2012). Seguidament s'activa en l'oòcit madur la via de senyalització cel·lular dels fosfolípids inositol alhora que es despolaritza transitòriament la membrana oocitària provocant un bloqueig primari de la polispèrmia (Carroll et al., 1994).

La PLC $\zeta$  hidrolitza el PIP2 de la membrana en IP3 i DAG (Ducibella 1996; Sun 2003). Per altra banda, l'IP3 provoca l'alliberació de més  $\text{Ca}^{2+}$  obrint-ne els canals dels reservoris interns subcorticals. En augmentar la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular s'indueix l'obertura dels canals de  $\text{K}^+$ , que surt cap a l'exterior de l'oòcit a favor del gradient, produint la pèrdua de càrregues positives i la primera hiperpolarització (primera baixada del potencial de membrana).

Per altra banda, i també com a conseqüència de l'augment en la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular, es produeix un alliberament de calci induït pel propi calci (CICR). L'increment de la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular dispara un seguit de mecanismes per retornar a la concentració inicial. El  $\text{Ca}^{2+}$  alliberat s'uneix a la calmodulina provocant un canvi conformacional en la CaMK II que fosforila els receptors d'IP3 (IP3R) inhibint-los (Miyazaki et al., 1993). D'altra banda, a certa concentració crítica de calci en el citoplasma, les ATPases calci-dependents del reticle endoplasmàtic (Lechleiter et al., 1998; Schuster et al., 2002) expulsen el  $\text{Ca}^{2+}$  de la cèl·lula o el deriven als reservoris (Van Blerkom et al., 2002; Dumollard et al., 2006). En disminuir la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$ , novament es tanquen els canals de  $\text{K}^+$ , recuperant-se el potencial de membrana per acció de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa, despolaritzant-se així la membrana. Aquest fet causa l'obertura dels canals de  $\text{Ca}^{2+}$  extracel·lulars voltatge-dependents (VOTCCs), reiniciant-se el cicle. Aquesta hiperpolarització-repolarització de la membrana manté les oscil·lacions de  $\text{Ca}^{2+}$  durant les hores que segueixen la fusió oòcit-espermatozoide.

Paral·lelament als canvis iònics, el DAG fruit de la hidròlisi del PIP2, activa la PKC, la qual promou l'exocitosi dels grànuls corticals (Miao and Williams, 2012), l'extrusió dels segon corpuscle polar (Gallicano et al., 1997) i remodela el citoesquelet intern de l'oòcit (Gallicano et al. 1995).

Aquesta activació de l'oòcit és imprescindible pel desenvolupament embrionari per tant, l'activació de l'oòcit també s'ha de donar en la tècnica de la microinjecció espermàtica (ICSI). En aquest cas, les primeres oscil·lacions es donen com a conseqüència de l'aspiració mecànica del citoplasma en el moment de l'ICSI (Tesarik and Sousa, 1994).

### 1.2.2. Reacció cortical

Una de les conseqüències més immediates de l'activació de l'oòcit és la inducció de la reacció cortical que té com a finalitat evitar la polispèrmia o entrada de més d'un espermatozoide a l'oòcit.

Novament les oscil·lacions del  $Ca^{2+}$  són el desencadenant, a través de l'activació de la CaMKII que exerceix una doble acció. Per una banda, fosforila les proteïnes de lligam o tethering de la superfície dels grànuls corticals que els uneixen al citoesquelet, fent que aquestes s'alliberin. Altrament, activa la quinasa que fosforila la cadena lleugera de la miosina (MLCK), induint així el transport dels grànuls corticals a una ubicació propera a la membrana plasmàtica on alliberaran el seu contingut (Wu et al., 2006).

Els oòcits madurs contenen gran quantitat de grànuls corticals al còrtex del citoplasma. N'hi ha de 2 tipus, uns que buiden el seu contingut a l'ooplasma per bloquejar la polispèrmia i uns altres de menor diàmetre que es creu que podrien estar implicats amb la rotació de l'ooplasma en l'extrusió del segon CP (Sathananthan et al., 1985). Els grànuls corticals contenen enzims que s'alliberaran a l'espai perivitel·lí modificant l'estructura i composició de la membrana plasmàtica i la zona pel·lúcida (ZP) de l'oòcit. Primerament, es dona la hidròlisi de la glicoproteïna ZP2 (Morales et al., 1989) perquè ja no sigui reconeguda per l'acrosina d'altres espermatozoides, la qual cosa impedeix la penetració de la ZP per part dels espermatozoides supernumeraris. Paral·lelament, es dona la modificació de la glicoproteïna ZP3 la qual cosa impedeix el reconeixement i la inducció de la reacció acrosòmica de nous espermatozoides (Ducibella et al., 1990).

### 1.2.3. Finalització de la meiosi i extrusió del segon corpuscle polar

La finalització de la meiosi II comprèn la represa la meiosi des de MII, la separació de les cromàtides germanes i l'extrusió del segon CP. La finalització de la meiosi també depèn de les oscil·lacions de  $Ca^{2+}$ . Sembla que la CaMKII exerceix una doble acció: per una banda regula la inhibició del factor citostàtic (CSF), encarregat de mantenir l'oòcit aturat en MII (Lorca et al., 1993). En aquest sentit, la proteïna Mos forma part del CSF regulant l'activitat de la MAPK i estabilitzant l'MPF (Tunquist and Maller, 2003). D'altra banda la CaMKII activa l'APC provocant l'extrusió del segon CP en fer disminuir l'activitat d'MPF.

La cèl·lula progressa de MII a anafase i telofase, produint-se l'extrusió del segon corpuscle polar normalment adjacent al primer (Levi et al., 2011). Amb la incorporació de la tecnologia de videocinematografia s'ha pogut observar que l'extrusió es produeix 4h post-ICSI (Boada et al.,

2012). Amb l'extrusió del segon CP es finalitza la meiosis femenina i s'inicia la formació del PN femení.

Anomalies en aquests processos poden resultar en la presència de 3PN degut a una retenció extra del segon CP (Flaherty et al., 1995), la formació de petits PN femenins degut a una segregació dels cromosomes incorrecta (Asch et al., 1995), o una absència completa del PN femení (Asch et al., 1995).

El 80% de les aneuploïdies de l'embrió són d'origen matern (Hassold and Hunt, 2001). Gran part dels errors en la segregació dels cromosomes en la oogènesis es donen en la meiosis I, però estudis en ratolí i humans demostren que, amb l'edat, s'incrementa el risc d'errors meiòtics en l'anafase II (Vogt et al., 2008). Així, hi ha evidències de què l'estat del fus meiòtic i el seu funcionament es veuen afectats per l'edat materna, induint una separació precoç de las cromàtides (Mailhes and Young, 1998), reduint l'expressió dels gens que controlen el fus (Steuerwald et al., 2005) i la seva degeneració (Eichenlaub-Ritter et al., 1988).

#### **1.2.4. Formació dels pronuclis**

Paral·lelament a la reactivació de la meiosis femenina s'inicia la formació del PN masculí. El cap de l'espermatozoide es descondensa abans de l'extrusió del segon corpuscle polar i desapareix la membrana nuclear.

Un cop el contingut espermàtic queda lliure en l'ooplasma, es descondensarà la cromatina d'origen masculí (Poccia and Collas, 1997). La cromatina de l'espermatozoide es troba altament condensada, empaquetada en protamines i això la fa transcripcionalment inactiva. El DNA es descondensa per la ruptura dels ponts disulfur entre protamines, s'envolta de membrana pronuclear i entra en fase S. Durant aquesta fase, les protamines són substituïdes per histones d'origen femení en el seu pas per la forquilla de replicació (McLay and Clarke, 1997). Les noves histones incorporades al genoma patern seran hiperacetilades per acció de les HATs, la qual cosa permetrà l'expressió del genoma patern en el què es coneix com la fase menor d'expressió gènica del zigot. La cromatina, ara ja descondensada, és accessible a les RNA polimerases i als factors de transcripció. La nova envolta nuclear és necessària per la síntesis de DNA (Spann et al. 1997), així com per a la importació de proteïnes i l'exportació d'RNA. El PN masculí resultant, ràpidament serà capaç d'efectuar transport nuclear, síntesis de DNA i síntesis d'RNA (Andeol, 1994). El PN masculí es formarà sempre al centre de l'oòcit, mentre que el femení ho farà adjacent al primer CP, a prop del fus mitòtic (Payne et al., 1997).

Al cap de 6 hores post-fecundació disminueix l'activitat MAPK, la qual la qual cosa permet la formació dels PN. Les oscil·lacions de  $Ca^{2+}$  s'allarguen fins aquest moment (Figura 4) ja que la PLC $\zeta$  té un Nuclear Localizing Signal (NLS) que l'introdueix al nucli provocant l'aturada definitiva de les oscil·lacions de  $Ca^{2+}$  (Lee et al., 2006).

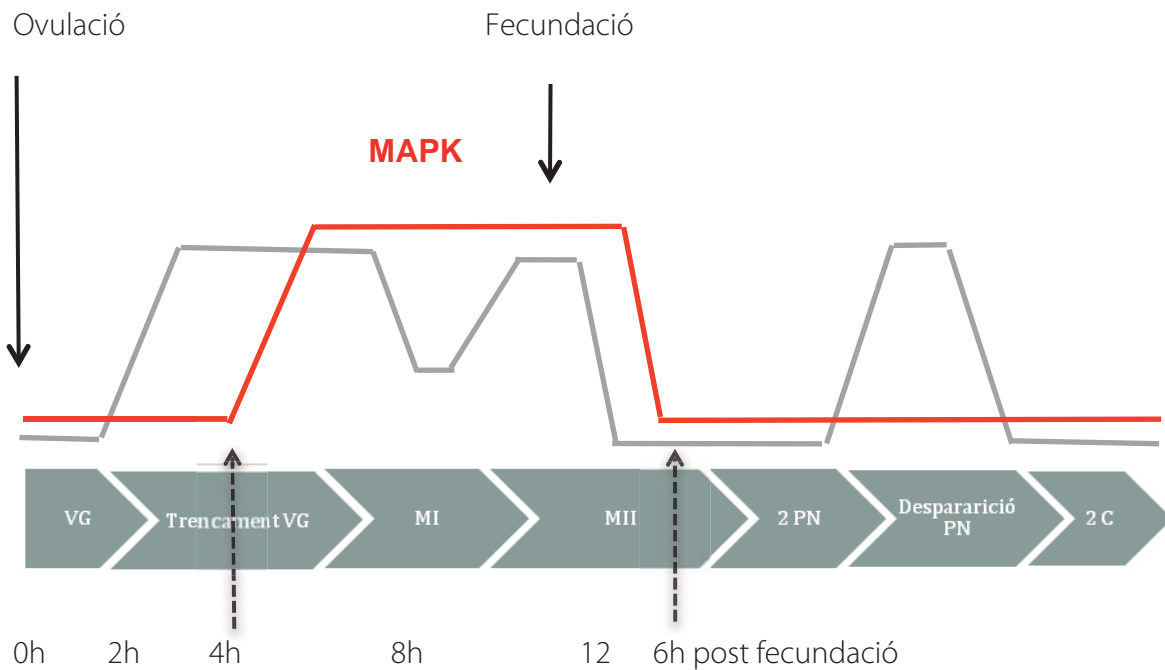


Fig. 4. Increment i davallada dels nivells de MPF (blau) i MAPK (vermell) al llarg de l'activació de l'òocit i del zigot.

A diferència del PN masculí, les histones del PN femení es troben metilades, i per tant la cromatina silenciada. A partir de la fecundació, els 2 pronuclis epigenèticament diferents coexisteixen en el mateix ambient cel·lular dominat per factors oocitaris. El DNA patern és desmetilat ràpidament i s'activa en el zigot abans de la primera divisió cel·lular per acció de les TET (Zhang et al., 2010). Es pensa que els primers gens que es transcriuran en el PN masculí són gens supressors de l'apoptosis. Després d'aquesta primera fase d'expressió del PN masculí, coneguda com a fase menor, les histones són desacetilades i metilades i el PN masculí esdevé silenciada (Oswald et al., 2000).

Per contra, el DNA matern és desmetilat de forma passiva durant les subseqüents divisions embrionàries, presumiblement pel manteniment d'una baixa concentració de la metilasa DNMT1

que metil·laria exclusivament els gens imprintats, provocant una hemimetil·lació progressiva dels gens materns al llarg de les successives divisions embrionàries. Així doncs, la metil·lació del DNA es dóna de manera diferencial en els 2 PN. Aquesta situació es manté fins l'estadi de mòrula, on es produeix un canvi radical en el patró de metil·lació embrionari (Santos et al., 2002).

Veiem doncs que les primeres divisions embrionàries presenten canvis en la distribució de les histones i modificacions d'aquestes (Ooi and Henikoff, 2007). Gran part del genoma és desmetilat en l'estadi de mòrula (Mayer et al., 2000; Santos et al., 2002), i subseqüentment remetilat quan s'acosta el moment de la implantació (Monk et al., 1987; Santos et al., 2002). Aquesta metil·lació "de novo" és activa i diferencial entre les cèl·lules que es diferenciaran en la massa cel·lular interna i el trofoectoderm. Aquesta remetil·lació tampoc afecta als gens imprintats, que es mantenen metilats fins a la seva expressió en el desenvolupament embrionari posterior (Stöger et al., 1993; Tremblay et al., 1995). En aquest sentit, durant les TRA la metil·lació "de novo" es podria veure afectada per les condicions artificials del cultiu in vitro. Cal afegir que hi ha estudis epidemiològics que descriuen un increment moderat de síndromes causat per anomalies epigenètiques en la població de nens concebuts amb TRA (Eroglu et al., 2012).

El moment aproximat en els què es donen la successió d'esdeveniments que tenen lloc en el zigot després de la inseminació es recull en la Figura 5:

- La fase G1 comença amb la represa de la segona divisió meiótica i l'extrusió del segon CP. Molts zigots inicien la fase G1 3 hores post-inseminació (hpi) (especialment els inseminats per ICSI) i s'acaba normalment sobre les 14 hpi.
- Els pronuclis apareixen en la transició de la fase M de la meiosi II a la fase G1 de la primera divisió mitòtica (Balakier et al., 1993a).
- Síntesis de DNA s'inicia entre 8-14 hpi i s'acaba 14-24 hpi.
- Els primers zigots que entren en fase G2 ho fan 12 hpi i s'allarguen fins 30-31 hpi.
- La durada de la fase M és relativament constant (3-4h).
- La condensació dels cromosomes comença 17-18 hpi .
- La desaparició dels PN 22-30 hpi.

Variacions en duració de la fase S i G2 entre els zigots reflecteixen l'assincronia en la durada del primer cicle cel·lular, una aturada o endarreriment o canvis en el moment de l'entrada de l'espermatozoide (Capmany et al., 1996).

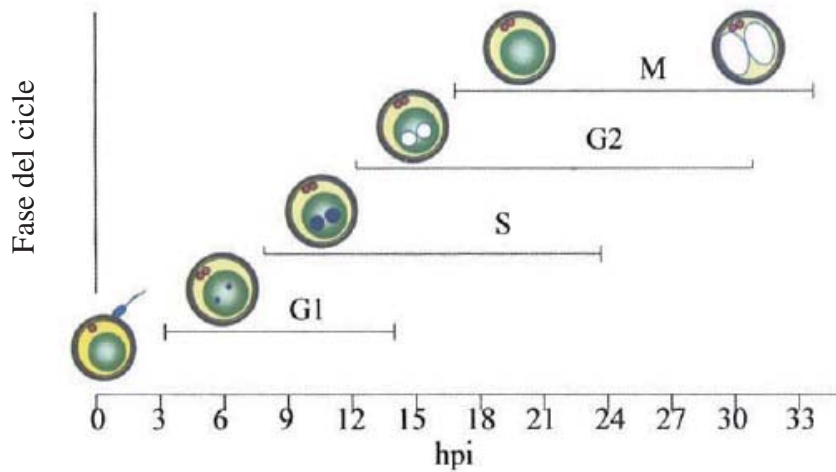


Fig 5. Cicle cel·lular en les hores que segueixen la fecundació/inseminació (hpi). Modificació de Plachot et al., 2000.

La correcta fecundació de l'oòcit es determina amb la presència de 2PN i 2CP, així com mitjançant l'observació de la mida i posició relativa dels PN i la distribució dels precursors nucleolars (NPB) de dins de cada PN.

Quant a la morfologia dels PN, en l'interior dels PN s'observa la cromatina i els NPBs. Aquests són unes estructures intranuclears electrodenses, homogènies i lleugerament filamentosos, el número, mida i localització dels quals varia al llarg del desenvolupament dels PN. Primerament es troben dispersos dins de cada PN i posteriorment es polaritzen o disposen a la zona adjacent a l'altre PN per tal que els cromosomes quedin correctament posicionats. Mentre els PN són visibles ens trobem en fase de síntesi o fase S, on es dona la replicació del DNA.

Amb els PN encara visibles el centríol proximal masculí es duplica i cadascun d'ells es desplaça a pols oposats del fus. A continuació els cromosomes masculins i femenins es condensen i s'alineen en la placa metafàsica de la primera divisió mitòtica. Aquest fet que coincideix amb la desaparició sincrònica de les membranes pronuclears i amb la transició de la fase G2 a la fase M de la primera mitosis, es coneix amb el nom de sincronització metafàsica o singàmia (Sathananthan et al., 1998). Les cromàtides germanes es separen a l'anafase i la primera divisió continua, donant lloc a 2 cèl·lules germanes que contenen els primers nuclis embrionaris (Tesarik and Kopecny, 1989a).



La naturalesa dels NPB es diferencia dels nuclèols en quant a morfologia, composició química i funció. Hi ha components fibril·lars i granulars típics nucleolars que no es troben en els NPB. A més, en els NPB no hi ha síntesi ni processament de RNA ribosomal (Tesarik and Kopecny, 1990).

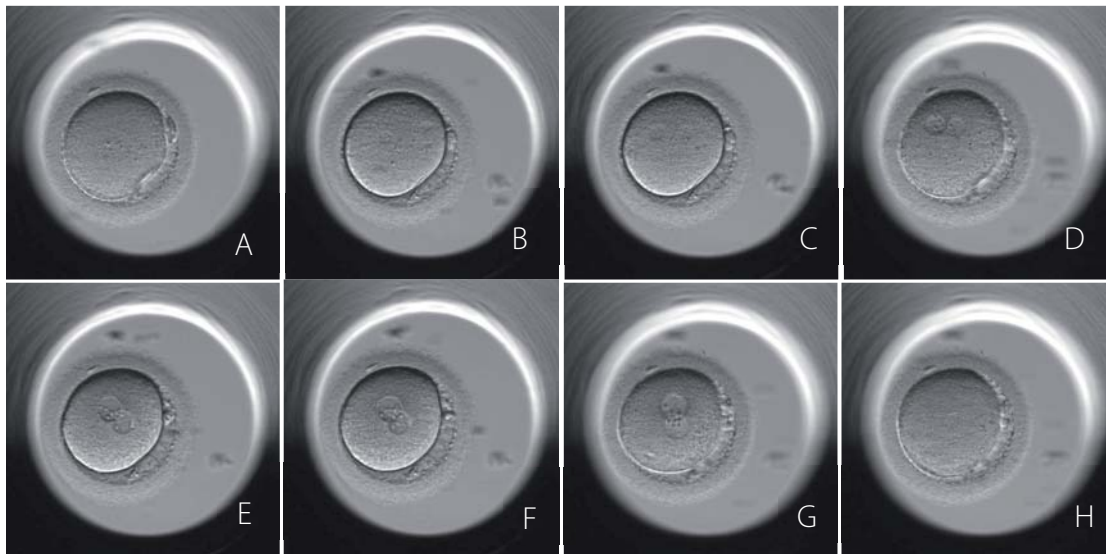


Fig 6. Formació dels PN per videocinematografia. A: 2.9 hpi, extrusió del 2on CP. B: 5.9 hpi, aparició dels PN. C: 6.9 hpi, migració dels PN. D: 9.6 hpi: juxtaposició de les membranes dels PN; E: 15.1 hpi: augment de mida dels PN; F: 17.9 hpi: moviment dels NPB i rotació dels PN; G: 23.4 hpi: rotació dels PN; H: 25.9 hpi desaparició PN.

S'ha vist que és necessària la presència temporal de la cromatina en l'acoblament dels NPB per donar la nucleologènesis. Aquesta consta de 2 passos: en un primer pas la cromatina transcripcionalment activa està present en l'acoblament dels NPB i en un segon pas, la cromatina es retira de les estructures resultants i roman quiescent durant 2 cicles cel·lulars, fins que s'activa per convertir els NPB en nuclèols capaços ara de sintetitzar RNA ribosomal (Tesarik and Kopecny, 1990).

S'han observat diferents estadis de formació dels NPB que s'han associat a diferents estadis de transcripció de DNA i síntesi de RNA. En un primer i segon estadi ultraestructural dels NPB en el PN masculí, no hi ha cromatina associada al NPB pròpiament dit. En aquestes fases on els NPB són petits de mida i es troben en major nombre que en estadis posteriors, no hi ha ni replicació de DNA ni síntesi de RNA ni DNA. No serà fins estadis posteriors del NPB, estadis 3 i 4 que hi ha cromatina lliure associada al NPB. És en l'estadi 3 del NPB que es dona una síntesi de RNA, necessària perquè el NPB completi el seu desenvolupament (Tesarik and Kopecny, 1989a). Si la síntesi de RNA continua o no en estadi 4 no està clar, però la cromatina associada als NPB no només exerceix una funció d'acoblament i lligam entre els NPB, sinó que és clau en el

desenvolupament, estructuració i maduresa dels PN. En estadi 4 és quan es considera que el NPB, ara ja més gran de mida i amb cromatina lliure associada al NPB, ja ha finalitzat el seu desenvolupament ultraestructural. És en aquest estadi quan es considera que el PN ja està totalment desenvolupat, i és en aquest moment, unes 12h després de la fusió dels gàmetes, que s'inicia la fase de síntesi o fase S (Tesarik and Kopecny, 1989b).

Quant a la cromatina que està associada als NPB, aquesta es disposa de forma diferencial depenent del moment de desenvolupament i de la seva funcionalitat. Per una banda els cromosomes de cada pronucli adopten una disposició radial en forma de roda de carro amb la majoria de centròmers orientats cap als NPB, disposició que desapareix abruptament en 2 cèl·lules (C) quan hi ha una sèrie de moviments de la cromatina per donar pas a la transcripció de molts gens (Martin et al., 2006). Per altra banda, i amb una finalitat oposada, existeix l'heterocromatina associada als NPB que tendeix a formar agregats anomenats cromocentres. Aquests agregats actuen com a dominis silenciadors (Cerda et al., 1999) i sembla que tenen un paper en l'expressió gènica diferencial dels gens segons com es disposen aquests respecte aquestes estructures (Schubeler et al., 2000).

### **1.2.5. Valoració de la Fecundació**

A partir del coneixement profund dels esdeveniments que tenen lloc durant els primers estadis del desenvolupament embrionari, s'han proposat una sèrie d'indicadors per tal d'avaluar el procés de la fecundació d'una forma no invasiva.

La valoració de la fecundació dels oòcits en un programa de FIV es realitza mitjançant l'observació 16-20 hpi dels pronuclis femení i masculí en el zigot. La asincronia d'aquesta aparició recomana l'observació tardana o una segona observació si la presència de dos corpuscles polars descarten la no-fecundació (Nagy et al., 1994). No és fins després de l'extrusió del segon corpuscle polar com a final de la meiosi de l'oòcit, i fins que s'han donat canvis en l'aspecte del citoplasma signe de moviment d'òrgànuls productors d'energia que deixen la perifèria, que no apareixen els pronuclis (Payne et al., 1997). La correcta fecundació es caracteritza per l'activitat dels òrgànuls, que són principalment mitocondris productors d'energia, vesícules de reticle endoplasmàtic llis i aparells de Golgi (Boada and Ponsà, 2008). L'homogeneïtat del citoplasma del zigot en pronuclis es mesura per l'absència de vacúols i grànuls (Plachot and Crozet, 1992) i per un halo fosc de mitocondris productors d'energia al voltant dels pronuclis (Scott and Smith, 1998). Aquest últim es considera un senyal de maduresa citoplasmàtica.

Pel que fa a la localització dels PN en el zigot, la aposició dels 2 PN té lloc a prop del fus meiótic si l'espermatozoide ha entrat a la vora d'aquest, o al centre de l'oòcit si l'entrada de l'espermatozoide s'ha produït en la zona oposada al fus (Van Blerkom et al., 1995).

La valoració de la fecundació es realitza clàssicament a les 16-20 hpi. Malgrat a les 9-10 hpi ja s'observa l'aparició dels PN i aquests s'observen fins les 24-26 hpi, es manté les 16-18hpi com a hora de valoració de la fecundació i catalogació dels PN.

Una fecundació correcta és aquella en la que s'observen 2PN i 2CP. Una fecundació anòmala serà aquella en la que s'observi un sol PN o bé  $>2$  PN.

La presència d'un sol pronucli té possibles orígens. La presència de zigots 1PN 2CP és molt més freqüent en FIV convencional que en ICSI, i pot tenir diferents orígens. En el cas de FIV convencional normalment s'interpreta com una asincronia en la formació dels pronuclis, en la major part dels casos corresponent a un retard en la formació del PN femení. Payne et al., (1997) descriu gràcies a una metodologia de *time-lapse*, una xifra de sincronització en l'aparició de PN del 63%; en el mateix sentit, Staessen et al., (1993) després d'una segona observació troben que el 25% dels embrions 1PN formen un segon PN passades 4-6 hores. Una altra possibilitat per explicar l'observació d'un sol PN, és que s'hagi donat una fusió del PN femení i del PN masculí, donant lloc a un sol PN diploide de mida major (Levron et al., 1995), encara que la fusió de PN és un fenomen força debatut en els mamífers.

En el cas dels zigots 1PN que provenen de ICSI s'ha proposat que el seu origen seria la formació d'una sola membrana nuclear que englobaria els 2 genomes patern i matern (Mateo et al., 2013). A més, els autors, observen que malgrat els zigots 1PN provenen en la seva majoria d'oòcits fecundats, aquests són cromosòmicament anormals. Per altra banda, un altre possible origen dels zigots 1PN 2CP provinents d'ICSI seria l'activació partenogenètica de l'oòcit (Balakier et al., 1993b), tot i que es tracta d'un fenomen menys freqüent i podria ser degut a la pròpia tècnica de microinjecció. Els embrions que se'n deriven acostumen a ser haploides (Balaban et al., 2004), ja que només tenen la dotació cromosòmica femenina; encara que també se'n troben d'aneuploides, mosaics i caòtics (Campos et al., 2007).

Per altra banda, l'aparició de  $> 2$  PN és també signe d'una fecundació anòmala. En el cas de zigots provinents d'inseminació convencional el seu origen és degut molt probablement a una polipenetració espermàtica (Plachot et al., 1989), mentre que si es tracta d'un zigot  $>2$ PN després d'ICSI, l'origen recau en una no-extrusió del segon corpuscle polar (Palermo et al., 1993;

Grossmann et al.,1997). Independentment del seu origen, els zigots en 3PN són triploides i són sempre descartats (Staessen and Van Steirteghem, 1997).

En alguns casos, en una segona observació dels zigots en 2 PN, bé per la tecnologia de *time-lapse* o en la valoració de la divisió primerenca del zigot, s'ha observat una asincronia en l'aparició dels PN i en la seva desaparició o bé l'aparició d'un PN extra no detectat en la primera observació. En aquests casos ens trobaríem davant de conversions de 2 PN a 1 PN o 3 PN, fenòmens sempre associats a pitjors taxes de desenvolupament embrionari (Reichman et al., 2010).

Malgrat la tecnologia de *time-lapse* ens permet valorar i efectuar un seguiment continu del desenvolupament dels PN, es manté la validesa clínica de les observacions no seriades, puntuals i efectuades a determinats moments. La metodologia *time-lapse* reforça i complementa els temps d'observació de la fecundació descrits prèviament.

### **1.2.6. Sistemes de classificació segons els pronuclis**

Amb els sistemes de classificació dels zigots s'intenta valorar si hi ha una relació entre la morfologia dels pronuclis i el posterior desenvolupament embrionari. Per la valoració del zigot s'ha considerat principalment l'aspecte dels PN i dels NPB (Scott and Smith, 1998; Tesarik and Greco, 1999; Scott et al., 2000). En relació als PN es valora la seva simetria (iguals o desiguals), posició (adjacents o separats), i localització en el citoplasma (centrals o no). Els NPB es classifiquen en quant a número, simetria (igual mida), i localització (polaritzats: alineats en la membrana o situats en la meitat adjacent a l'altre PN).

Scott i col·laboradors (1998) va proposar una primera classificació dels zigots on es tenia en compte paràmetres com l'aspecte i posició dels CP respecte als PN, la morfologia del citoplasma (presència d'halo), i la morfologia embrionària a les 25-27 hpi (persistència de PN, absència de PN o primera divisió cel·lular).

Tesarik and Greco (1999) van presentar un sistema alternatiu basat només en l'aspecte dels PN pel que fa a la mida i posició relatives dins el zigot, i el nombre i posició dels NPB dins dels PN. Distribueix els zigots en 6 patrons possibles en funció del número i distribució dels NPB (Figura 7). Posteriorment, la possibilitat de classificar un mateix zigot en varis patrons alhora va fer que l'autor es corregís i presentés una classificació alternativa amb només 2 grups diferenciats: grup de bon pronòstic (p0) i el de mal pronòstic (no-p0) (Tesarik et al., 2000).

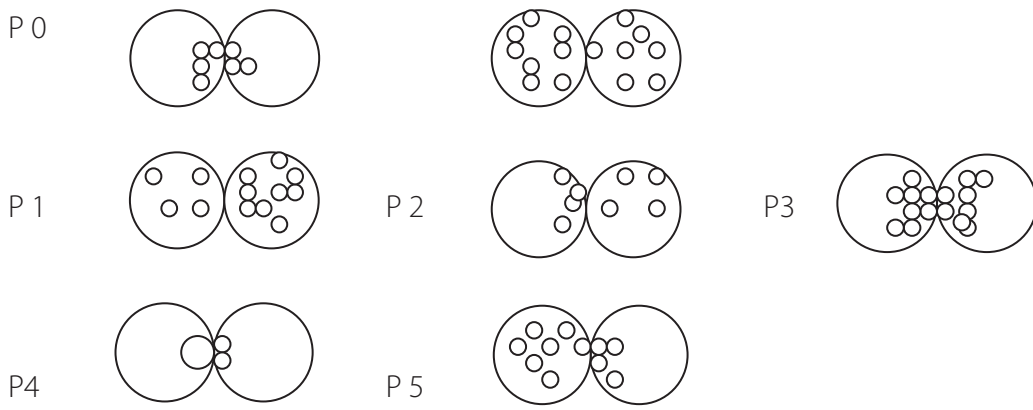


Fig. 7. Classificació de PN segons Tesarik and Greco, 1999.

Simultàniament, Scott et al., (2000) van proposar una classificació més objectivable basada exclusivament en l'aspecte dels PN i que superava la que havia proposat anteriorment i que, a més, tenia en consideració l'aspecte del citoplasma (Scott and Smith, 1998). En aquesta nova classificació, els zigots són distribuïts en 4 patrons Z (Fig. 8). Els grups de bon pronòstic són Z1 i Z2 i es relacionen amb majors taxes de desenvolupament fins a blastocist i d'implantació.

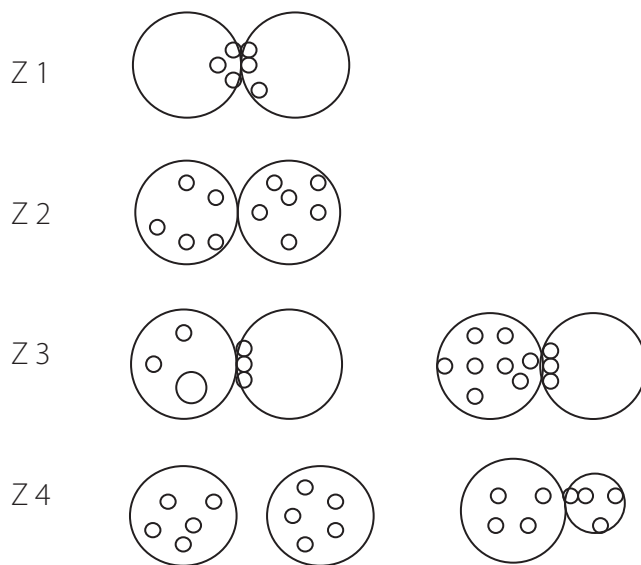


Fig. 8. Classificació de PN segons Scott et al., 2000.

Posteriorment, Gianaroli et al., 2003 presenten una classificació alternativa que inclou l'avaluació dels PN, NPB i l'orientació dels CP (Fig. 9). Aquesta classificació no apareix en cap altra publicació fins el 2007 i amb modificacions respecte la original (Nicoli et al., 2007).

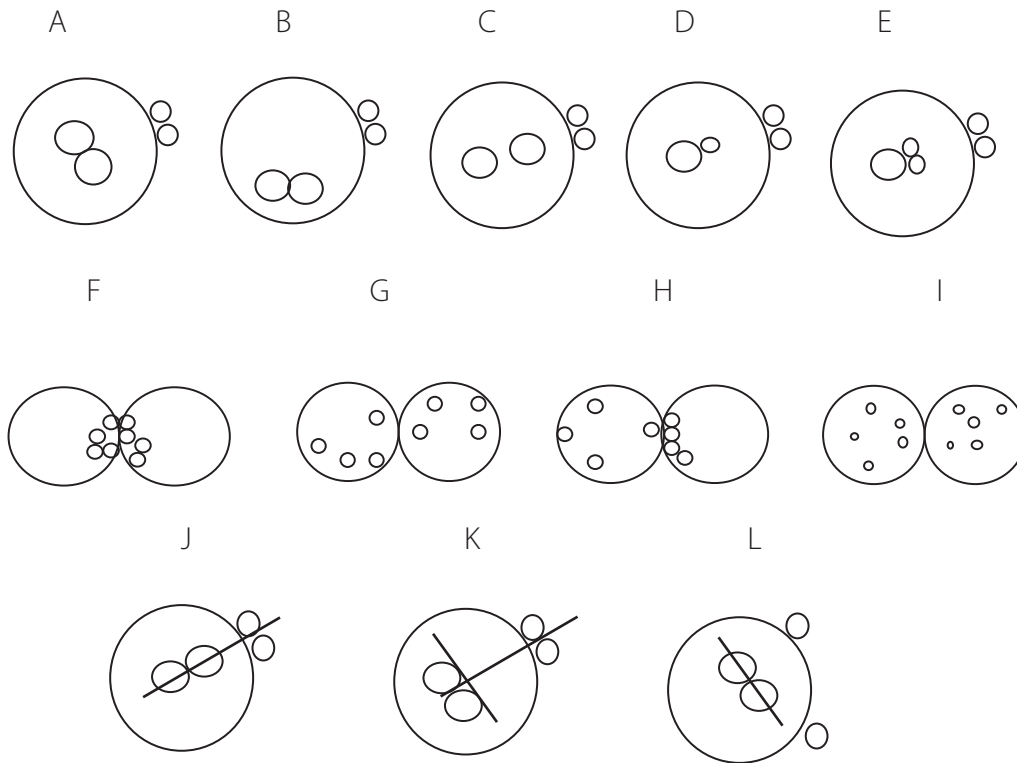


Fig. 9. Classificació dels PN Nicoli et al., (2010) a partir de Gianaroli et al., (2003). Els autors identifiquen 5 patrons diferents segons la morfologia dels PN: juxtaposats i centrats (Fig. 9A); juxtaposats i perifèrics (Fig. 9B); centralitzats i separats (Fig. 9C); asimètrics (Fig. 9D); fragmentats (Fig. 9E). En funció del número NPB: grossos i polaritzats (Fig. 9F); grossos i no polaritzats (Fig. 9G); grossos i polaritzats en un PN però no polaritzats en l'altre PN (Fig. 9H); petits i almenys en un PN no polaritzats (Fig. 9I). En funció de la seva posició respecte el CP: longitudinal a l'eix de PN (Fig. 9J); perpendicular (Fig. 9K); desviat (Fig. 9L).

Finalment, per tal de consensuar la valoració dels PN, les societats científiques ESHRE i Alpha (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011) van simplificar la classificació en 3 categories: fecundació normal-sincrònica, normal-àsincrònica i anormal. En aquesta classificació la sincronia es defineix com el fet de que tots 2 PN es trobin amb

els NPB polaritzats o no, i l'asincronia quan un PN sí se n'hi troba i l'altre no. La fecundació anormal comprèn PNs amb 0 o 1 NPB.

## 1.3. Embrió

### 1.3.1. Primera divisió embrionària / *Early cleavage*

Un cop formats, els PN roten fins que s'alineen perpendicularment a l'eix polar, i les membranes pronuclears desapareixen permetent la reunió dels cromosomes en la placa metafàsica. Amb l'extrusió del segon CP es defineix un nou eix: l'eix polar; en el qual el pol adjacent al 2n CP és el pol anterior i l'oposat el pol posterior. El posicionament dels PN i la seva orientació en el citoplasma determinarà el pla de divisió de la primera divisió cel·lular. Les 2 cèl·lules (C) resultants són el·líptiques mentre que el 2n CP ancorat en l'embrió determinarà l'eix polar des del zigot fins blastocist. Perpendicular a aquest eix s'estableix l'eix dorso-ventral embrionari, de manera que la següent divisió cel·lular (de 2 a 4C) es donarà en el pla d'aquest segon eix dorso-ventral. Al llarg del posterior desenvolupament embrionari i les successives divisions embrionàries aquesta polaritat es mantindrà. El 2n CP conservarà la posició de referència més enllà de la formació del trofoectoderm, i correspondrà al pol on trobarem la MCI del blastocist (Gardner et al., 2007).

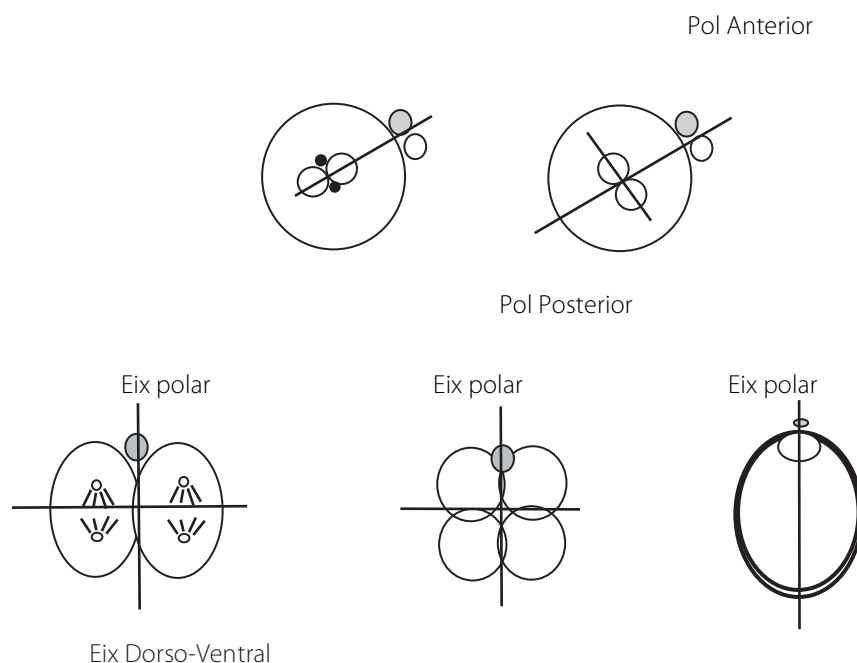


Fig. 10. Polaritat de l'embrió al llarg del seu desenvolupament de zigot a blastocist.

Centrosoma ● 2n CP ● Fus mitòtic ⚡

Són els mRNA d'origen matern acumulats en el citoplasma de l'oòcit, els encarregats de sustentar el desenvolupament de l'embrió fins que el genoma embrionari s'activi (Schultz, 2002). Hi ha una transició del control matern a control per part de l'embrió que consisteix en substituir les proteïnes maternes que dirigeixen els esdeveniments que han tingut lloc durant la fecundació i formació dels PN per l'expressió de nous gens o activació del genoma embrionari en estadi de 2C, 4C i 8C (Braude et al., 1988; Telford et al., 1990; Vassena et al., 2011). La transició materno-zigòtica té tres funcions bàsiques: destruir transcrits específics de l'oòcit per restringir la funcionalitat dels gens, substituir els transcrits materns pels embrionaris i per últim reprogramar el patró d'expressió gènica amb la generació de nous transcrits no expressats en l'oòcit (Latham et al., 1991). Ja des de l'estadi primerenc de 2C s'ha observat l'activació de l'activitat transcripcional del genoma de l'embrió humà (Vassena et al., 2011). És gràcies a aquest inici en l'activació del genoma embrionari que gens implicats en la pluripotencialitat cel·lular (Boué et al., 2010) amb diferents patrons d'activació i sota modificacions epigenètiques, determinaran el destí de la cèl·lula.

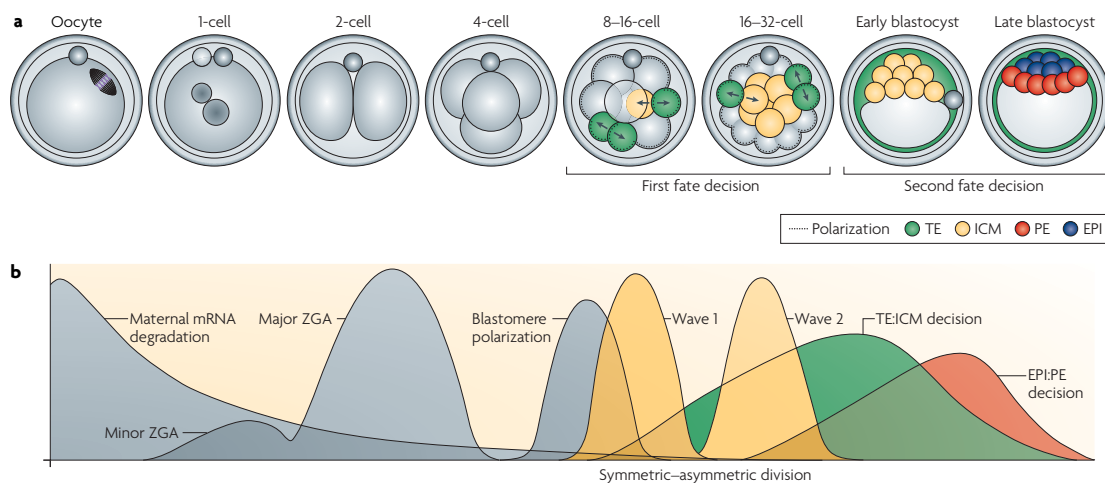


Fig. 11. Evolució del mRNA matern i embrionari al llarg del desenvolupament embrionari (Zernika-Goetz et al., 2009).

### 1.3.2. Desenvolupament embrionari fins a blastocist

Com hem vist fins ara, en una primera etapa del desenvolupament embrionari es dona la transició del control genètic matern a l'embrionari. Aquesta transició va acompanyada d'una pèrdua



progressiva de la totipotencialitat i s'inicia la fase de diferenciació cel·lular que es dona a mida que avancem en el desenvolupament de 4C fins a blastocist.

En la divisió de 4C a 8C, les cèl·lules són reprogramables per modificacions epigenètiques (Latham et al., 1991) i el seu destí encara s'ha de decidir. En l'estadi de 4C, l'asimetria en el contacte intercel·lular determina la polaritat del blastòmer i com a conseqüència l'asimetria de les divisions entre les diferents cèl·lules. Malgrat tot, l'embrió progressarà de 4C a 8C sense perdre l'eix de polaritat.

Hi ha un primer moment de decisió del destí cel·lular cap a massa cel·lular interna o cap a trofoectoderm del blastocist (8-32C) que depèn de la posició que ocupa la cèl·lula en l'embrió, ja que l'entorn particular de cada cèl·lula en determina la polaritat. Més endavant, les cèl·lules compactades formaran l'estructura de mòrula. En aquesta etapa del desenvolupament, les cèl·lules es localitzen en l'interior o exterior de l'embrió i amb la blastulació el seu posicionament determinarà un diferent ritme de divisió: mentre les cèl·lules de la cara interna que esdevindran la massa cel·lular interna (MCI) es dividiran a un ritme, les del trofoectoderm seguiran un patró i ritme diferent. Les divisions cel·lulars i l'augment de mida del blastocel fan que el blastocist s'expandeixi. Les divisions seran asimètriques i això, en una segona ronda de determinació cel·lular, decidirà el destí de les cèl·lules de la MCI cap a epiblast o endoderm primitiu.

### **1.3.3. Valoració de la morfologia de l'embrió**

Per dur a terme una valoració de la morfologia de l'embrió es realitzen observacions en diferents moments del desenvolupament embrionari. La primera observació es realitza al voltant de les 26 hpi i es valora si s'ha produït la primera divisió embrionària, això es coneix com a divisió primerenca o *early cleavage* (EC) de l'embrió. En aquest moment es valora si encara s'observen els 2 PN en el zigot, si aquests ja han desaparegut, o si ja s'ha dividit el zigot en 2 cèl·lules. En el cas de que s'hagi dividit el zigot, es té en compte el número de blastòmers resultants, la mida relativa o simetria dels blastòmers, l'observació d'un sol nucli o de multinucleació en els blastòmers i la presència de fragments citoplasmàtics. La divisió primerenca s'ha correlacionat amb un major potencial de desenvolupament i posterior implantació (Emiliani et al., 2006), i és un paràmetre discriminador, especialment en la selecció d'embrions de morfologia subòptima (De los Santos et al., 2014).

La morfologia dels embrions en D+2 i D+3 ha estat relacionada amb el seu posterior potencial de desenvolupament fins a blastocist (Racowsky et al., 2009) i amb la capacitat d'implantació, i és el

critèri de selecció per la seva transferència i criopreservació (Pandian et al., 2013). En el decurs del desenvolupament embrionari l'anàlisi de la morfologia es realitza mitjançant la valoració de la simetria dels blastòmers de l'embrió i el seu ritme de divisió, el percentatge de fragments citoplasmàtics i la presència de multinucleació en els blastòmers. Clàssicament es considera un embrió de bona morfologia aquell que en D+2 de desenvolupament presenta 4 blastòmers no multinucleats, de mida similar i un percentatge de fragments cel·lulars <10% del volum total de l'embrió (Plachot and Crozet, 1992) . Un augment en el percentatge de fragments, un nombre menor de blastòmers als esperats i/o asimetria entre els blastòmers es relaciona amb menor potencial de desenvolupament de l'embrió i menor probabilitat de nen nascut.

Un embrió que en D+2 no es troba en 4 cèl·lules, o en 8 cèl·lules en D+3, porta retard en el ritme de divisió. Si la situació de retard es manté fins al dia següent podem dir que l'embrió s'ha bloquejat i el considerem no viable (Giorgetti et al., 1995). En l'actualitat i degut a la importància de la valoració d'aquest paràmetre, han sorgit noves classificacions dinàmiques que tenen en compte la morfologia de l'embrió en D+2 i la seva evolució fins a D+3 (ASEBIR, 2008; Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

Pel que fa a l'observació de blastòmers multinucleats s'ha relacionat la multinucleació amb baixes taxes d'implantació i aneuploïdies cromosòmiques (Staessen and Van Steirteghem, 1997), tot i que aquest paràmetre està essent actualment qüestionat (Parriego et al., 2013; De los Santos et al., 2014).

Un altre paràmetre de la morfologia embrionària a tenir en compte, és el percentatge de fragments respecte el volum total de l'embrió i el seu patró de localització (Alikani et al., 1999). La completa o parcial fragmentació d'un blastòmer durant les divisions cel·lulars dona lloc a una població de fragments citoplasmàtics molt comú en les primeres etapes del desenvolupament embrionari in vitro: Es considera que presentar > 25% de fragments va en detriment del desenvolupament embrionari (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

Allargar el cultiu in vitro dels embrions fins a l'estadi de blastocist és un mètode de selecció embrionària, ja que la taxa d'implantació dels blastocists és major que la d'embrions en estadis previs (Racowsky et al., 2011). Es creu que el motiu d'aquest increment és la pressió selectiva exercida in vitro en favor dels embrions prou bons com per ser capaços de desenvolupar-se fins a blastocist. Per la valoració de la morfologia del blastocist es tenen en compte paràmetres com el grau d'expansió del blastocist (mida del blastocel), el grau de compactació i nombre de cèl·lules

que conformen la MCI, així com el nombre de cèl·lules i grau de cohesió de les cèl·lules del trofotoderm. Les diferents classificacions publicades són concordants entre elles (ASEBIR, 2008; Cutting et al., 2008, Racowsky et al., 2011; Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011) i la recent publicació d'atles de morfologia embrionària com el de la ESHRE (Magli et al., 2012) n'ha facilitat la categorització.

Actualment la valoració de la morfologia de l'embrió es pot realitzar per *time-lapse* (TML) (Payne et al, 1997). Aquesta tecnologia consisteix en un incubador de cultiu que porta acoblat un sistema de captura seriada d'imatges (Lemmen et al., 2008) la qual cosa permet fer el seguiment del desenvolupament embrionari sense alterar les condicions de cultiu. Amb la TML doncs, tenim la gravació de la seqüència d'esdeveniments que tenen lloc durant tot el desenvolupament embrionari, a partir de la inseminació (ICSI) o D+1 (FIV convencional) fins a D+7. Les imatges es prenen cada 15-20 min i en 5-7 plans d'enfoc diferents per cada embrió permetent una valoració més acurada del desenvolupament embrionari.

Amb la introducció de la TML en l'estudi del desenvolupament i morfologia del zigot, apareixen nous indicadors com el moment de desaparició dels PN, la durada del primer cicle cel·lular o la sincronia d'aparició dels nuclis després de la primera divisió cel·lular (Lemmen et al., 2008). Ara bé, el valor d'aquests indicadors pot variar d'un grup a l'altre i es recomana que cada grup, sota les seves les particulars condicions de treball i cultiu, defineixi l'algoritme que determini els embrions amb major potencial de desenvolupament.

Pel que fa a la valoració de la qualitat embrionària amb TML, Meseguer et al., 2011 proposa anomenar els temps en què s'assoleixen els diferents estadis cel·lulars amb una "t" seguida del nombre de cèl·lules de l'estadi (t<sub>2</sub>, t<sub>3</sub>...), l'interval entre els diferents estadis embrionaris que correspon als diferents cicles cel·lulars amb una "cc", i la sincronia de les divisions cel·lulars amb una "s" la qual cosa correspon al temps en què l'embrió triga en assolir l'estadi de 2<sup>n</sup>. Per exemple: defineix t<sub>2</sub> com el moment en què l'embrió assolix 2C. Pel que fa a la duració dels cicles cel·lulars, el segon cicle cel·lular o cc<sub>2</sub> correspon a t<sub>3</sub>-t<sub>2</sub>; i en quant al concepte de sincronia de les divisions, s<sub>3</sub> per exemple, equival a t<sub>4</sub>-t<sub>3</sub>.

Amb TML s'ha vist que indicadors clàssics de valoració de la morfologia embrionària, com el nombre de blastòmers i la seva simetria, segueixen tenint vigència. Malgrat tot, la vigència d'altres indicadors com la presència de fragments ha quedat en entredit ja que s'ha pogut observar com en cas de percentatges baixos de fragments o en determinats patrons de localització, aquests poden ser reabsorbits (Hardarson et al., 2002).

Pel que fa al desenvolupament fins a blastocist, s'ha vist que les classificacions clàssiques conserven la seva validesa, tot i que les recents publicacions de TML es fixen ara en les contraccions del blastocist al llarg de la seva expansió (Pérez et al., 2013) o en el grau de compactació de la mòrula en D+4 (Ivec et al., 2011).

## 1.4. Diagnòstic genètic preimplantacional

---

El diagnòstic genètic preimplantacional (PGD) permet identificar els embrions portadors de variacions en la dotació cromosòmica (PGS), així com els embrions portadors d'anomalies genètiques (PGD) que impliquen gens relacionats amb malalties hereditàries o síndromes compatibles o no amb la vida. La tècnica de PGD/PGS es va desenvolupar fa més de 20 anys per tal de poder determinar el sexe dels embrions en parelles amb elevat risc de transmetre malalties lligades al cromosoma X (Handyside et al., 1990). L'ús d'aquesta tècnica s'ha estès a parelles que presenten una FIV de mal pronòstic amb el propòsit de seleccionar els embrions cromosòmicament normals per la seva transferència, augmentant les possibilitats d'un embaràs i naixement d'un nadó sa; aquesta tècnica es coneix com a cribatge o *screening* d'aneuploidies (PGS). En l'actualitat són moltes les indicacions per les que una parella recorre a aquesta tècnica: fallada repetida d'implantació en FIV, avortaments de repetició, elevada edat materna o factor masculí sever.

Les diferents indicacions han estat àmpliament discutides ja que la tècnica en si mateixa té una sèrie de limitacions que posen en dubte el seu cost/eficiència (Mastenbroek et al., 2009).

### 1.4.1. Biòpsia embrionària

El procés implica la biòpsia de l'embrió i el posterior anàlisi del material biopsiat. Per tal de dur a terme la perforació de zona pel·lúcida, en els inicis de la tècnica es feia servir la solució àcida de Tyrode però al poc temps es va incorporar la utilització del làser diode per la seva rapidesa i inoqüïtat (Boada et al., 1998).

La biòpsia es pot realitzar en diferents moments del desenvolupament embrionari: en l'oòcit per l'extracció només el primer CP per descartar anomalies d'origen matern, o bé en el zigot amb la biòpsia del primer i segon CP per augmentar la fiabilitat del diagnòstic només femení; en 6-8 cèl·lules mitjançant la biòpsia d'un o 2 blastòmers; o bé en blastocist per biòpsia de varies cèl·lules del trofoectoderm del blastocist (Dokras et al., 1994; Veiga et al., 1997; De Boer et al., 2004). Per decidir-ne el moment cal valorar l'impacte de la biòpsia en la viabilitat embrionària. En quant a la

representativitat de la mostra, l'anàlisi de varies cèl·lules permet l'eventual detecció de mosaïcisme present en un 44% dels embrions amb aneuploidies d'origen post-meiótic (Gutiérrez-Mateo et al., 2011). D'altra banda s'ha posat en qüestió que el trofèctoderm sigui realment representatiu de les característiques genètiques de l'embrió (Evsikov and Verlinsky, 1998; Magli et al., 2000; Derhaag et al., 2003).

La biòpsia embrionària es realitza en un medi lliure de  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  per facilitar la desunió entre blastòmers. En el cas de les biòpsies en D+3, s'extreu un/dos blastòmers amb un nucli visible i a continuació de manera immediata es procedeix a la seva fixació amb fixador de Carnoy si l'anàlisi es realitza per anàlisi citogenètica de Hibridació In situ Fluorescent (FISH), o al seu processament si és duu a terme per citogenètica molecular (metafase CGH, aCGH, SNP).

#### **1.4.2. Tècniques diagnòstiques**

La tècnica diagnòstica utilitzada depèn de l'anomalia que es vol detectar. Per malalties d'origen monogènic s'utilitza una amplificació del DNA per PCR i es dissenya una estratègia per detectar una anomalia genètica concreta (Goossens et al., 2009). Es pot optar per una detecció directa de la mutació, o bé a través d'una estratègia de detecció de polimorfismes lligats a l'al·lel mutat, com per exemple la tècnica de single nucleotide polimorfisme (SNP microarrays) (Handyside et al., 2010).

En el cas de cribatge d'anomalies cromosòmiques incloent els casos de reorganitzacions estructurals (translocacions recíproques i Robertsonianes, inversions i delecions) inicialment s'utilitzava la FISH. Aquesta tècnica utilitza fragments de DNA marcats amb fluorescència, homòlegs a determinades regions cromosòmiques on s'aparellen sobre el nucli interfàsic fixat de la biòpsia embrionària i emeten fluorescència que es detecta sota microscopi.

La fixació del blastòmer requereixen experiència i destresa, ja que la viabilitat embrionària i el diagnòstic es poden veure compromesos (Simpson, 2008). En aquesta tècnica cal obtenir nuclis d'alta qualitat que facilitin la lectura del diagnòstic (Munné et al., 1996; Velilla et al., 2002) ja que els senyals poden ser confusos: es poden superposar 2 senyals, partir-se (split), quedar senyals febles o destenyits, tenir una hibridació creuada o detectar polimorfismes en la seqüència diana (Magli et al., 2001; Rodrigo et al., 2004; Colls et al., 2007). Per això han estat descrites estratègies on es busquen 2 loci per un mateix cromosoma, o es re-hibrida per rescatar embrions sense diagnòstic (Colls et al., 2007; Uher et al., 2009) o descartar falses monosomies, i que han arribat a formar part de la rutina del diagnòstic (Rodrigo et al., 2004; Mir et al., 2010).

La FISH va ser dissenyada per l'anàlisi de mostres on es disposés de moltes cèl·lules. En la seva aplicació en PGS, el nombre de cromosomes a analitzar ve limitat per la pròpia tècnica de forma que, fins fa poc, els laboratoris realitzaven el diagnòstic d'un número limitat (entre 5 i 12 cromosomes) en cada embrió. Això és degut al restringit número de colors (fluorocroms) dels que es disposa en un mateix espectre de lectura i que limita el nombre de cromosomes que s'observen simultàniament a 5 com a màxim. Per aquesta raó s'ha seleccionat els cromosomes analitzats entre aquells que estan implicats en el 72% dels avortaments de primer trimestre (Simpson et al., 1987) i síndromes compatibles amb la supervivència del fetus: 13, 16, 18, 21, 22, X, Y. I més endavant s'incorporen el 15, 17 i 19 en hibridacions seqüencials sobre el mateix nucli. Generalment s'utilitzen tant sondes centromèriques com locus específiques mentre que un blastòmer pot suportar un màxim de tres rondes de hibridació (les 2 habituals, més la de rescat si s'escau).

Per a les reorganitzacions cromosòmiques les sondes utilitzades són homòlogues a regions específiques dels cromosomes implicats en la reorganització i requereixen d'un disseny determinat en cada cas. Són sondes telomèriques, locus específiques i/o centromèriques que permeten discriminar entre productes equilibrats i desequilibrats de la translocació.

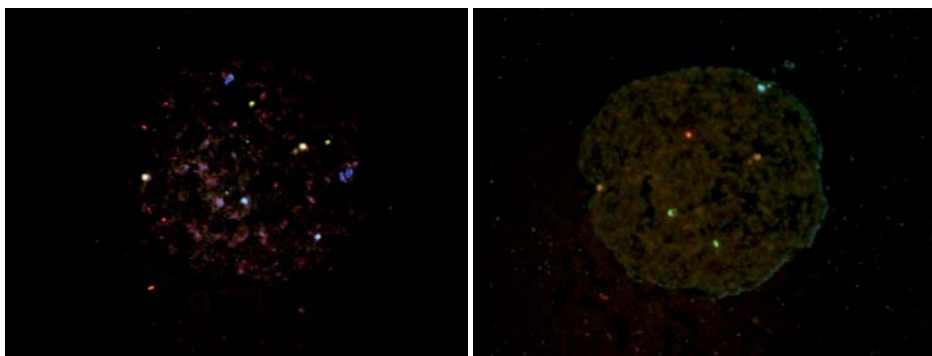


Fig 12. Imatges de FISH en nucli interfàsic d'un blastòmer biopsiat en D+3 en un cicle de PGS. (Imatges cedides per Mònica Parriego)

La validesa dels resultats observats per mitjà de la FISH estan actualment sota revisió amb la incorporació d'altres tècniques de diagnòstic citogenètic molecular per Hibridació Citogenètica Comparada (*comparative genomic hybridization* CGH), *array* de CGH (aCGH) o *array* de SNP, pel diagnòstic de CP, blastòmers i trofoderm.

Per dur a terme la CGH cal una amplificació prèvia de tot el genoma de la cèl·lula biopsiada per PCR o *multiple displacement amplification* (MDA). La CGH compara el DNA de la mostra a analitzar amb un patró de normalitat posant de manifest guanys o pèrdues de material genètic al llarg de cadascun dels 24 cromosomes.

En els darrers anys, la detecció d'anomalies cromosòmiques per *arrays* de CGH s'ha incorporat ràpidament al PGD desplaçant l'ús de la FISH per les seves limitacions tècniques (Mir et al., 2010) essent l'aCGH superior en capacitat diagnòstica (Northop et al., 2010; Fragouli et al., 2011).

### **1.4.3. Screening d'aneuploïdies: PGS**

S'ha demostrat àmpliament en la literatura la relació que existeix entre les aneuploïdies en oòcits i embrions humans i les anomalies en el desenvolupament embrionari, la fallada d'implantació i l'avortament espontani (Pellestor et al., 1995; Hardarson et al., 2001; Sandalinas et al., 2001; Munné et al., 2004 i 2007; Rubio et al., 2009). El PGS ofereix la possibilitat de detectar les anomalies cromosòmiques abans de la implantació, permetent la transferència d'embrions cromosòmicament normals a fi d'incrementar la probabilitat d'embaràs. Ha estat molt discutit en quins casos cal derivar la parella a aquesta tècnica i se n'ha de valorar el cost/eficiència. Els pacients candidats a realitzar un PGS són aquells en els quals es suposa que la incidència d'embrions aneuploides és major, en concret en els casos de fallada repetida d'implantació, avortaments de repetició i dones d'edat avançada (Donoso et al., 2007).

Les limitacions de la tècnica de la FISH i les indicacions per les que s'orienta una parella al PGS han estat molt discutits. En aquest sentit, s'han publicat nombrosos estudis que han abordat cadascuna de les indicacions. En alguns estudis en dones d'edat avançada, fallada repetida de FIV i avortaments de repetició, la taxa de nen viu nascut és menor en el grup de PGS comparat amb el grup control (Mastenbroek et al., 2007; Hardarson et al., 2008; Jansen et al., 2008). En altres estudis, pel contrari, no hi ha millora ni diferències (Staessen et al., 2004; Blockeel et al., 2008; Debrock et al., 2009); i en 2 treballs més observen potencialment una inferior taxa d'avortament (Schoolcraft et al., 2009) i millor taxa d'embaràs (Werlin et al., 2003) malgrat les diferències no són estadísticament significatives. En un grup de pacients que seria de bon pronòstic i que inclou les indicacions d'esterilitat d'origen desconegut i de factor masculí, s'han descrit que no hi ha diferències entre en el grup de PGS davant del control (Staessen et al., 2008; Checa et al., 2009); millor taxa de nen viu nascut (Mersereau et al., 2008). Per contra, hi ha autors que descriuen desavantatges en presentar una menor taxa d'implantació i de nen viu nascut en el grup de PGS (Meyer et al., 2009).

#### 1.4.4. Translocacions

La translocació és una reorganització cromosòmica que té el seu origen en el trencament de 2 cromosomes seguit d'una reparació en una distribució diferent. Si la reorganització és balancejada, no hi ha guany ni pèrdua de material genètic i per tant, no hi ha conseqüències fenotípiques a menys que el punt de trencament afecti la funcionalitat d'algun gen. Ara bé, en aquests pacients, la formació de gàmetes amb complements no-balancejats pot donar lloc a avortaments espontanis i/o a esterilitat. La incidència de translocacions balancejades en la població general és del 0.2% mentre que aquest percentatge augmenta fins al 0.6% entre les parelles infèrtils i fins al 9.2% en parelles amb avortaments recurrents (Stern et al., 1999; Munné et al., 2000). En parelles que per factor masculí necessiten ICSI les anomalies cromosòmiques es donen entre un 2-3.2% (Martin R, et al. 1996; Testart et al., 1996; Egozcue et al., 1997). En aquest sentit, s'ha vist que les translocacions són 10 vegades més freqüents en homes infèrtils (Guanti et al., 1980), i que el recompte espermàtic va de la normozoospermia fins a l'azoospermia, segons el grau de bloqueig meiótic induït per la reorganització (Egozcue et al., 2000).

Per la detecció de productes desequilibrats de les translocacions mitjançant FISH s'utilitzen sondes locus específiques homòlogues a regions concretes dels cromosomes implicats en la reorganització que permetin seguir la segregació dels cromosomes implicats i transferir els embrions normals o balancejats (Pierce et al., 1998).

Existeix la possibilitat de que la reorganització cromosòmica afecti la segregació d'altres cromosomes no implicats en la reorganització. En aquest cas es parla de l'efecte intercromosòmic que poden patir els portadors de translocacions recíproques (Rec t) i Robertsonianes (Rob t) i que pot ser degut a petits trencaments en la formació de la sinapsis homòloga o bé degut a defectes en l'alineació o en la condensació dels cromosomes. Per tal de detectar-lo es van dissenyar múltiples rondes d'hibridació en el decurs d'un cicle de PGD mitjançant FISH on es combinava la utilització de sondes específiques pels cromosomes reorganitzats amb sondes destinades al cribatge d'aneuploidies. Sembla que els portadors de les Rec t serien susceptibles de donar lloc a més embrions aneuploides, mentre que els portadors de Rob t presenten un efecte intercromosòmic que afecta a un nombre més elevat de cromosomes malgrat la seva incidència és menor (Gianaroli et al., 2002).

En l'actualitat, l'aplicació de les tècniques de citogenètica molecular (aCGH, *arrays* de SNP o qPCR) permeten la detecció simultània d'aneuploidies i de translocacions de manera fiable, tot i que algunes no permeten distingir entre embrions normals i balancejats. Per aquesta raó, actualment els cicles de PGD en pacients portadors de translocacions es duen a terme mitjançant aquestes tècniques.



## 2. Objectius

Per tal de determinar la utilitat de la valoració de PN i la divisió primerenca del zigot ens hem plantejat els següents objectius:

1. Establir si existeix una relació entre la morfologia de PN i el desenvolupament embrionari i la dotació cromosòmica de l'embrió.
2. Establir si existeix una relació entre la divisió primerenca del zigot i el desenvolupament embrionari i la dotació cromosòmica de l'embrió.



# 3. Publicacions

## 3.1. Article I: Objectiu 1

---

Títol: Developmental prognosis for zygotes based on pronuclear pattern: usefulness of pronuclear scoring.

Autors: Gemma Arroyo, Anna Veiga, Josep Santaló, Pere Nolasca Barri.

Revista: Journal of Assisted Reproduction and Genetics (2007), 24:173-181.

Índex d'impacte: 1.77 (2007).



## Developmental prognosis for zygotes based on pronuclear pattern: Usefulness of pronuclear scoring

Gemma Arroyo · Anna Veiga · Josep Santaló ·  
Pere Nolas Barri

Received: 2 August 2006 / Accepted: 6 December 2006 / Published online: 22 February 2007  
© Springer Science+Business Media, LLC 2007

**Abstract** *Purpose:* To relate pronuclear patterns (PN) and zygote cytoplasmic appearance and embryo morphology.

*Methods:* The usefulness of PN classification described by Tesarik et al. 1999 (patterns p0-5) and Scott et al. 2000 (Z1-4), for embryo selection is assessed.

*Results:* Synchrony on polarization and number of nucleolar precursor bodies (NPB) were associated with good quality embryos (p0 60.9% and p3 67.3%, and Z1 62.5% and Z2 64.7%;  $p < 0.01$ ). Pattern 4 zygotes were associated with small number of NPB developed into multinucleated embryos (14.3%) and poor quality embryos (61.9%). No significant differences were found in the pregnancy rate between transfer of at least one good prognosis PN pattern and transfer of poor prognosis PN patterns, although 75% of the transfers included at least one embryo derived from a pattern 0 zygote, and 55% included embryos from categories Z1 or Z2.

*Conclusions:* Sequential assessment involving the evaluation of oocyte quality, the classification of PN patterns and embryo morphology allows a more accurate evaluation of embryos to be selected for transfer.

**Keywords** Pronuclear score · Nucleolar precursor bodies · Zygote morphology · Embryo development

G. Arroyo (✉) · A. Veiga · P. N. Barri  
Servei Medicina de la Reproducció, Dpt Obstetrícia i  
Ginecologia, Institut Universitari Dexeus,  
Passeig Bonanova, 89-91,  
08017 Barcelona, Spain  
e-mail: gemarr@dexeus.com

J. Santaló  
Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Ciències,  
Universitat Autònoma de Barcelona,  
08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

### Introduction

Several strategies have been proposed for the selection of embryos for uterine transfer in human assisted reproduction. The possibility of choosing adequate embryos with high implantation potential will allow the reduction in the number of embryos transferred. This will lead to a decrease in the percentage of multiple pregnancies, one of the major complications of IVF treatments. The scoring criteria of embryo selection are based on serial morphological observations conducted on day 1 (during the assessment of fertilization), on days 2 and 3 (based on cleavage and blastomere fragmentation), on day 5, or on combinations of these criteria. Extending the culture of embryos to the blastocyst stage may also be a good option to select high quality embryos [1]. Unfortunately, not all cases are good candidates and benefit from extended culture.

Pronuclear morphology assessment has been extensively described as a method to score zygotes. Also, some countries are only allowed to freeze zygotes and the selection of embryos at this stage is thus necessary [2, 3]. More recently, increasing interest in pronuclear morphology has resulted in reports that describe different PN patterns and associate them with embryo morphological parameters [4, 5].

Zygote morphology has been associated with subsequent embryo development as far as fragmentation, arrested cleavage, chromosome dotation and multinucleation is concerned [6]. Survival after cryopreservation has been related to morphological characteristics of cytoplasm maturity, nucleolar aspect and relative location of PN inside the zygote [7]. The aim of this study is to evaluate the usefulness of pronuclear patterns as described by Tesarik's and Scott's classifications as predictors of embryo morphology and implantation potential.

## Material and methods

### Patients

A total of 64 couples participated in this prospective study. A total of 569 fertilized oocytes from 8 conventional IVF, 48 ICSI cycles and 8 cycles where the oocytes were shared between the two methods (ICSI/IVF) were evaluated.

The mean age of the female patients was 33.1 years ( $\pm 2.93$ ). All women older than 39 years were excluded from the study. Patients had to fulfill the following selection criteria: no previous history of poor ovarian response or basal serum FSH levels  $\leq 10$  U/l, regular menstrual cycles, absence of polycystic ovarian syndrome or severe (grade II–IV) endometriosis as cause of infertility, no more than 3 previous failed IVF cycles. The patients included in the study must have between 8 and 20 mature oocytes collected at oocyte retrieval.

### Ovarian stimulation

Ovarian stimulation was performed following a protocol that used gonadotrophin-releasing hormone agonist (GnRHa) in association with gonadotrophins. Ovarian response was monitored after day 6 by daily evaluation of serum oestradiol concentrations and transvaginal follicle measurements. Human chorionic gonadotrophin (HCG) 10000 IU was administered 36 h before oocyte retrieval, which was carried out by ultrasound-guided puncture.

### Zygote scoring

Between 14 to 23 h after insemination ( $\pm 1.65$ ) the zygotes were placed in individual 50- $\mu$ l drops of medium (Vitro-life Ref. G1-10091) under oil and scored using an inverted microscope with Nomarski differential contrast optics at a magnification of  $\times 400$ . Time of examination was minimized in order to preserve temperature and pH medium, which may affect subsequent embryo development.

Two different classification systems were used to describe the polarization and number of nucleolar precursor bodies (NPBs) into the pronucleus (PN).

According to Tesarik and Greco [4] a pronucleus is considered to be polarized when all NPBs were present in the pronuclear hemisphere whose pole is the point of contact with the other PN. The zygotes are divided into six different categories depending on the number and distribution of NPBs (Fig. 1). In pattern 0 (p 0) zygotes, the NPBs in both PN are polarized if the number of NPBs is between 3 and 7, and they are non-polarized if the number of NPBs is equal or greater than 7. Pattern 1 zygotes have a large difference ( $> 3$ ) between the number of NPBs in each pronuclei. Pat-

tern 2 zygotes are characterized by a small number ( $< 7$ ) of NPBs without polarization in at least one PN. Pattern 3 zygotes present polarization and a large number ( $> 7$ ) of NPBs in at least one PN. Pattern 4 zygotes have a very small number of NPBs in at least one PN. Pattern 5 zygotes present one polarized PN and one non-polarized PN. When the zygote can be assigned to more than one pattern, p 4 has the highest priority, followed by p1, p2, p3 and p5. Pronuclei are considered asymmetrical when the size difference between them is larger than 4  $\mu$ m. This parameter was analyzed independently.

When looking at the relative position of the pronuclei, zygotes can be classified in adjacent (only one contact point between pronuclear membranes), adherent (when pronuclear membranes are in close contact), and separate (no contact of pronuclear membranes).

The second classification was the Z-scoring system described by Scott et al. in 2000 [5], which divided the zygotes into 4 patterns (Z1, Z2, Z3, Z4) (Fig. 2). Patterns Z1, Z2 and Z3 zygotes show symmetry of the PN and PN membranes in contact, which is not the case in Z4 zygotes. In Z1 zygotes both PNs have between 3 and 7 NPBs, the difference between PNs in the number of NPBs is not greater than one, and both PNs are polarized. Z2 zygotes have the same characteristics as Z1 zygotes, but both PNs are non-polarized. Z3 zygotes have alterations in the number of NPB and/or one polarized PN together with one non-polarized PN.

Apart from PN morphology, zygotes were evaluated for cytoplasmic appearance through the presence of vacuoles, cytoplasmic halos, darkness and presence of cytoplasmic granules.

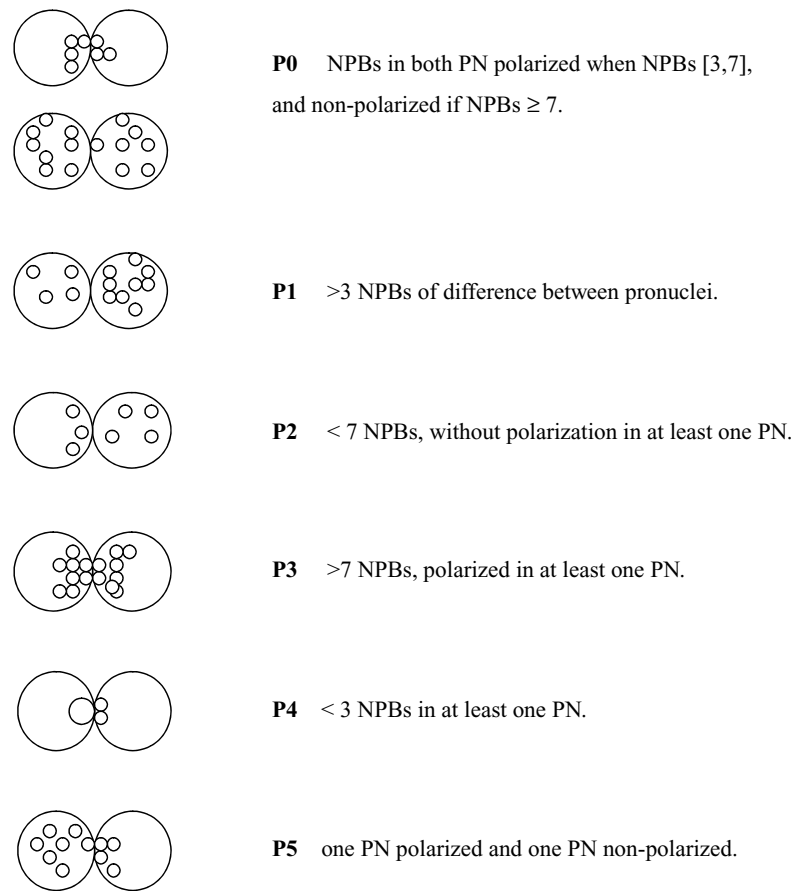
### Embryo scoring

Embryos were evaluated 40–44 h (day 2) after insemination, and embryo selection was exclusively based on embryo morphology. Embryos at day 2 were scored following morphological parameters such as the number of cells, their symmetry, the percentage of cytoplasmic fragmentation and the multinucleation. Grade 1 embryos have at least 4 equal-sized, non-multinucleated blastomeres with no fragments. Grade 2 embryos have between 2–4 non-multinucleated blastomeres, blastomeres with different sizes, or 15–25% of fragments, and grade 3 embryos have fewer than 2 blastomeres, multinucleated blastomeres,  $\geq 30\%$  fragments, or arrested embryos. Grade 1 and 2 embryos were combined in a single good prognosis group, whereas grade 3 zygotes were considered the poor prognosis group.

### Statistical analysis

Qualitative characters were compared using the  $\chi^2$ -test or Fisher's test, whereas quantitative variables were analyzed

**Fig. 1** Classification of PNs by Tesarik et al., 1999



using Student’s T-test [2] or ANOVA [3]; with a significance level of  $p < 0.05$ .

This study establishes the relationship between PN patterns with zygote cytoplasmic appearance, embryo morphology and implantation potential. The usefulness of both PN classifications for embryo selection is assessed.

**Results**

Patients were previously selected for the study in order to evaluate the correlation between position of NPBs in the PNs and both embryo quality and the rate of pregnancy and implantation without the interference of other factors. Neither age nor baseline levels of serum oestradiol showed any significant correlation with the patterns allocated to the zygotes according to the two PN classification systems.

Pronuclei were scored at an average of 19.1 h ( $\pm 1.65$ ) after insemination or ICSI. No differences were found with respect to distribution of the pronuclear patterns in relation with the timing of observation ( $\leq 18$  h,  $> 18$  h).

Distribution of zygotes according to Tesarik’s 1999 classification is showed on Table 1. Due to the small number of

pattern 5 zygotes found, these were excluded from the statistical analysis. Distribution of zygotes according to Scott’s 2000 classification is showed on Table 2.

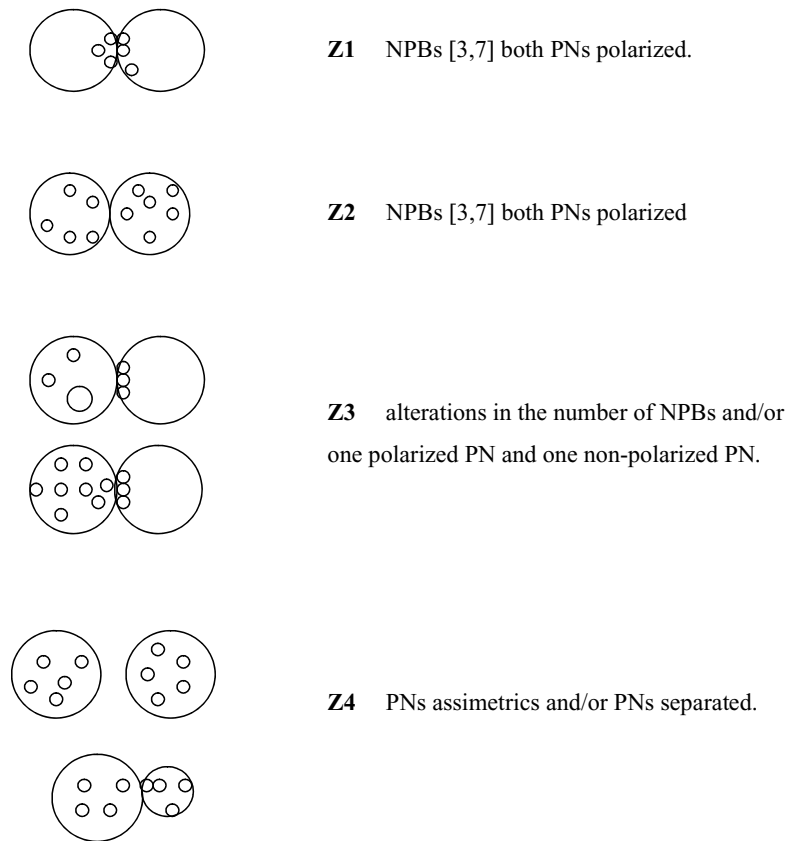
Symmetry and relative position of the pronuclei are considered in Tesarik’s classification only. Symmetry was found in 92.5% of pattern 0 zygotes, 86.1% of pattern 1 zygotes, 87.6% of pattern 2 zygotes, 89.3% of pattern 3 zygotes, and 90.9% of pattern 4 zygotes. No statistically significant differences were found.

More adherent pronuclei were found in the 0 pattern (23.5%), with statistical differences between patterns ( $p < 0.01$ ) (Table 3). The relevance of separate position was not analyzed due to the small number of cases.

There is no relationship between the morphological aspect of the zygotes and the PN patterns in the two PN classification systems. No significant differences between the patterns were found (Table 4). Embryo quality showed a significant correlation with the presence of intracytoplasmic granules, but not with halo or vacuoles (Table 5).

The percentages of zygotes that developed into different morphological categories of embryos on day 2 are shown in Figs. 3 and 4, according to the two classification systems. Patterns 0 and 3 were associated with good quality embryos at a higher frequency (p0: 60.9% and p3: 67.3%;

**Fig. 2** Classification of PNs by Scott et al., 2000



$p < 0.01$ ). A more accurate examination of each category of embryo quality included the assessment of the cleavage, the symmetry of blastomeres and multinucleation. Interestingly, pattern 4 zygotes were associated with a high percentage of zygotes developing into multinucleated embryos (14.3%) and poor quality embryos with various poor prognosis parameters (61.9%) (Table 6).

Patterns Z1 and Z2 were associated with good quality embryos at a higher frequency (Z1: 62.5% and Z2: 64.7%). Since the number of zygotes assigned to Z3 is high and correspond to different morphological patterns, we divided Z3 in two subgroups: Z3a which corresponds to the classical Z3, and Z3b where only was determinant the number of NPBs [3,7]. We divided Z3 group in order to evaluate the impor-

tance of the number of NPBs in front of the polarization of NPBs; no statistically significant differences in embryo quality were found when comparing these subgroups. A high percentage of Z4 zygotes developed into poor quality embryos (51.7%). Z3 zygotes were also associated with poor quality embryos (47.1%), but an independent analysis of this association showed that the incidence of poor quality embryos was similar to that found in groups Z1(37.3%) and Z2 (35.3%). (Table 6).

No significant differences were found in the pregnancy rate between transfer of at least one good prognosis PN pattern (Tesarik's p0 or Scott's Z1 and Z2) and transfer of poor prognosis PN patterns (62.2% at least 1 p0 vs. 46.6% none p0; and 66.7% at least 1 Z1/Z2 vs. 48.2% none Z1/Z2). It must be taken into account that 75% of the transfers included

**Table 1** Distribution of zygotes according to Tesarik's classification

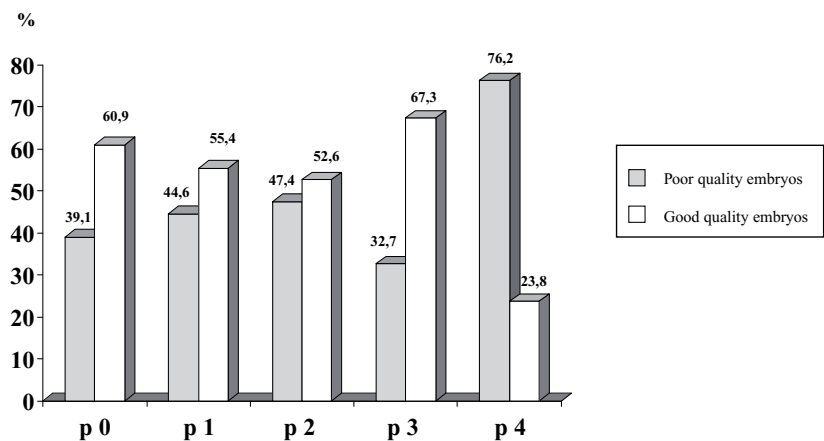
Patterns	<i>n</i>	Percentage
p0	226	39%
p1	101	18%
p2	137	24%
p3	56	10%
p4	44	8%
p5	5	1%

**Table 2** Distribution of zygotes according to Scott's classification

Patterns	<i>n</i>	Percentage
Z1	128	23%
Z2	34	6%
Z3a	143	25%
Z3b	231	41%
Z4	29	5%



**Fig. 3** Zygotes classified according to Tesarik’s system and the quality embryo developed;  $p < 0.01$  Chi-Square Test



polarization where found in early observations when compared to late ones (data not shown).

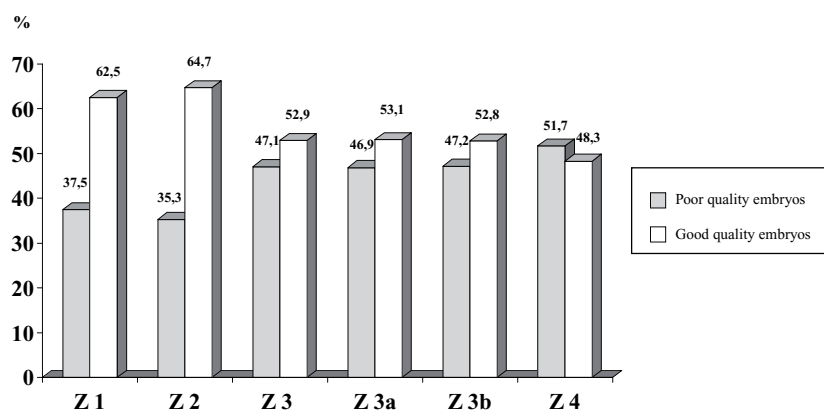
The evaluation of zygote considering PN morphology and cytoplasmic morphology at the same time has been related to embryo quality in previous reports [8]; but lasts classifications based only on PN morphology presented relationships with further embryo development [4, 5]. The simple application of these classifications optimize the time of zygote observation. The relevance of the PN position and NPB distribution has been previously described. The presence of NPB in the PN is related to the synthesis of DNA. The association between the chromatin and NPB depends on the cellular cycle phase of the zygote [13] which takes place at the late stages of the zygote when the G1 phase is ending. The appearance of pronuclei coincides with the beginning of the S phase [14]. Different length of S and G2 phase reflects the asynchrony in first cell cycle between embryos [15]. The asynchrony of phase S is not related with PN size but with the grade of DNA synthesis [16]. Despite that in NPB there is no DNA replication, RNA synthesis exists before the beginning of phase S. Tesarik et al. [17] suggests that the presence of chromatin in NPB is temporal and occurs in two steps: at the end of the first step where the chromatin is

synthetically active the chromatin is present in the assembly of NPB. Chromatin appears to be retracted from the resulting structures which subsequently remain quiescent during 2 cell cycles. The re-entry of chromatin into the NPBs marks the end of NPB quiescence and the beginning of the second step of the nucleogenesis when nucleoli assume the characteristic ultrastructural organization and start the synthesis and processing of ribosomal RNA.

Eighty-three percent of PNs were in an adjacent relative position. It has been reported that contact of their membranes is followed by chromatin polarization, which is a previous important step in the formation of the axis for embryo cleavage [18]. It seems that the most relevant factor to predict embryo morphology is the synchrony in PN appearance [10, 19] as well as in NPB distribution [4, 5, 7].

Pronuclei appear following extrusion of the second polar body at the end of oocyte meiosis. At the time of pronuclear formation, cytoplasmic movements of energy-producing organelles from the cell periphery towards the centre take place [10]. The appearance of a dark halo of energy-producing mitochondria around the PN [20] has been considered of good prognostic value as a part of a complex scoring system [8, 21] and associated with the implantation ability of embryos.

**Fig. 4** Zygotes classified according to Scott’s system and the quality embryo developed; n.s.d. Chi-Square Test



**Table 6** Percentage of zygotes coming from different patterns that developed into different embryo quality group

	<i>n</i>	Good quality embryos			Poor quality embryos			
		Grade 1 (%)	Grade 2 (%)		Grade 3 (%)			
			< 4 blastomeres	Unequal blastomeres	15–25% fragments	≥30% fragments	Multinucleated blastomeres	Various poor prognosis parameters
p 0	225	21.8	16	14.2	8.9	0.4	9.8	28.9
p 1	101	13.9	21.8	8.9	10.9	–	5.9	38.6
p 2	137	16.1	21.2	11.7	3.6	0.7	8.8	38
p 3	55	23.6	18.2	20	5.5	–	5.5	27.3
p 4	42	4.8	14.3	2.4	2.4	–	14.3 <sup>a</sup>	61.9 <sup>a</sup>
Z1	128	20.3	13.3	19.5	9.4	–	7	30.5
Z2	34	29.4	11.8	17.6	5.9	–	5.9	29.4
Z3	374	15.8	20.9	9.9	6.4	0.005	10.2	36.4
Z3a	143	14.7	24.5	9.1	4.9	1.4	10.5	35
Z3b	231	16.5	18.6	10.4	7.4	–	10	37.2
Z4	29	20.7	13.8	6.9	6.9	–	3.4	48.3

<sup>a,b</sup>*p* < 0.01 Chi-Square Test.

In the literature, the incidence of halo appearance in zygotes ranges from 67.5% to 88.7% [21, 22]. Any halo presence has been related to blastocyst quality [23].

In our study we find no correlation between the presence of halo and embryo quality on day 2. Oocyte maturity and quality is reflected by a homogenous cytoplasm without vacuoles and granules [24]. Our findings suggest that a large number of dark granules in zygotes are associated with poor quality embryos. The negative correlation between granules and embryo quality is not confirmed in other reports [25]. Our data show a statistically significant correlation between the presence of granules and the occurrence of poor embryo quality. Van Blerkom et al. 1992 [26] defined these dark granules as regions of intracellular necrosis that arise during the latter stages of maturation, particularly during the time of the first polar body extrusion. In this work the author describes a similar frequency of aneuploidies in oocytes with granules in comparison with oocytes with normal appearance. For Alikani et al. [27] the most commonly encountered cytoplasmic anomaly was partial intracellular necrosis, evidenced by the presence of several small scattered dense bodies (presumably chromatin) or pyknotic nuclei and the majority of such oocytes were normally fertilized.

More than half (55.8 %) of the good quality embryos corresponded to zygotes with patterns 0 and 3 (60.9% of p0 develop into good quality embryos and 67.3% of p3) although no differences are observed in the probability of pattern 0, 1, 2 and 3 zygotes to develop into good quality embryos. Pattern 4 zygotes have a significantly decreased probability to become a good quality embryo (*p* < 0.001). Tesarik and Greco [4] reported that 45% of pattern 1 and 2 zygotes show arrested development. It has to be taken into account that the data on embryo development obtained on day 3 were difficult to correlate with our data obtained on day 2. In our data, embryos

coming from p0 (60.8% vs. 37.3%, *p* < 0.001), p1 (55.4% vs. 14.3%, *p* < 0.001), p2 (52.5% vs 27.8%, *p* < 0.001) and p3 (67.3% vs. 26.7%, *p* < 0.001) developed into good quality embryos in a higher percentage than Tesarik et al. [28]. However, there are no statistical differences from embryos coming from p4. Multinucleation is present in the same proportion in embryos for each PN pattern both in our data and in Tesarik’s. We find poor prognosis embryos from pattern 4 zygotes, with a higher percentage of blastomere multinucleation compared to the data from Tesarik and Greco [4] and Sadowy et al. [6]. It would seem that the presence of a very low number of NPBs (corresponding to p4) in any PN is a poor prognosis factor for embryo development. Balaban et al. [29] reported that a higher percentage of pattern 0 zygotes in Tesarik’s system reached the blastocyst stage when compared to zygotes with double PN abnormality. The relationship between the pronuclear morphology and embryo development and chromosome constitution have also been noted [30] confirming the good prognosis of pattern 0 from Tesarik’s classification.

Our data suggest that zygotes from groups Z1 and Z2 develop into good quality embryos as previously reported. Group Z3 is a neutral predictor, although this is probably related to the heterogeneity of the group. In our results from group Z4, the association between asymmetric and/or separate PNs and poor prognosis embryos was confirmed [5]. Pronuclear morphology studies have found that differences of more than 4 μm in the diameter of PNs are associated with aneuploidy [6]. The analysis of chromosomal status of embryos from different patterns suggests a lower incidence of chromosomal abnormalities in patients aged < 37 years with zygotes with similar PN size [31]. A high risk of chromosomally abnormal embryos and low rate of blastocyst formation was observed in zygotes with asymmetry or

asynchrony [30, 32]. The poor quality of embryos from Z4 zygotes in our data is confirmed by Scott et al. [5] through a high rate of development arrest and low rate of blastocyst formation.

Both Tesarik and Scott claim that a successful implantation is mostly associated with embryos from pattern 0 zygotes, or embryos developing from group Z1/Z2 zygotes. No data on implantation rate related to PN pattern are available in our study as the number of homologous transfers is too low to allow the analysis. Interestingly, choosing embryos for transfer based solely on embryo quality in our patients results in the selection of 75% embryos from pattern 0 zygotes and 55% of embryos from groups Z1/Z2. The analysis of implantation of embryos developed from the same zygote pattern and its correlation with embryo quality has been reported on day 3 [4] and on blastocyst stage [5]. These data are useful in the assessment of good quality embryos with high implantation potential.

The usefulness of the two classifications is limited although the application of classifications based solely on the PN morphology simplifies and minimizes the time of observation. First of all, Tesarik's classification is not unique; some PN can be included into various patterns of irregularities at the same time. This fact presents a reasonable doubt about the prognosis of the future zygote development. On the other hand, Scott's classification is not discriminatory enough; the wideness of Z3 group supposes irregularities of normality without an accurate evaluation of the subsequent embryo development.

The challenge for ART clinics is to transfer fewer embryos in order to minimize the risk of multiple pregnancies and births, while still maintaining the greatest chance of pregnancy for their patients [33]. An optimized method for embryo selection is required to achieve this goal while not decreasing the pregnancy and implantation rates.

A sequential embryo assessment method [34] can be used as a valid indicator of good subsequent embryo development and implantation prognosis, especially if the patient has several morphologically similar embryos available on the day of the transfer.

The assessment of morphological parameters that can be predictive of embryo quality can be performed at very early stages and proceed through oocytes, zygotes, early cleavage embryos and blastocysts. It has also been described that follicular vascularization and oxygen concentration can be related to oocyte quality and chromosomal/spindle normality [35]. Sequential assessment would involve the evaluation of oocyte quality, the classification in PN patterns, embryo morphology and cleavage rate analysis and the ability to reach the blastocyst stage. All these criteria, although always subjective, have been correlated to embryo quality, chromosomal normality and implantation potential, and will allow a

more accurate evaluation of embryo quality, resulting in an optimized method to select embryos for transfer.

**Acknowledgements** This work was carried out under the auspices of the Catedra de Investigación de Obstetricia y Ginecología del Institut Universitari Dexeus

## References

- Gardner DK, Lane M. Towards a single embryo transfer. *Reprod BioMed Online* 2003;6:470–81.
- Ludwig M, Schopper B, Al-Hasani S, Dietrich K. Clinical use of a pronuclear stage score following intracytoplasmic sperm injection: impact on pregnancy rates under the conditions of the German embryo law. *Hum Reprod* 2000;15:325–29.
- Zollner U, Zollner K-P, Hartl G, Dietl J, Steck T. The use of a detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience. *Hum Reprod* 2002;17:1327–33.
- Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 1999;14:1318–23.
- Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod* 2000;15:2394–403.
- Sadowy S, Tomkin G, Munné S, Ferrara-Congedo T, Cohen J. Impaired development of zygotes with uneven pronuclear size. *Zygote* 1998;6:137–41.
- Wright G, Wiker S, Elsner C, Kort H, Massey J, Mitchell D, Toledo A, Cohen J. Observations on the morphology in human zygotes and implications for cryopreservation. *Hum Reprod* 1990;5:109–15.
- Scott L, Smith S. The successful of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod* 1998;13:1003–13.
- Wittmer C, Bettahar-Lebugle K, Ohl J, Rongières C, Nisand I, Gerlinger P. Zygote evaluation: and efficient tool for embryo selection. *Hum Reprod* 2000;15:2591–7.
- Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse cinematography. *Hum Reprod* 1997;12:532–41.
- Scott L. Pronuclear scoring as a predictor of embryo development. *Reprod BioMed Online* 2003;6:470–81.
- Nagy ZP, Liu J, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem A. Time-course of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in human oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1994;9:1743–8.
- Tesarik J, Kocpcny V. Developmental control of the human male pronucleus by ooplasmic factors. *Hum Reprod* 1989;4:962–8.
- Tesarik J, Kocpcny V. Development of human male pronucleus: ultrastructure and timing. *Gamete Res* 1989;24:135–49.
- Capmany G, Taylor A, Braude PR, Bolton VN. The timing of pronuclear formation, DNA synthesis and cleavage in the human 1-cell embryo. *Molec Hum Reprod* 1996;2:299–306.
- Balakier H, MacLusky NJ, Casper RF. Characterization of the first cell cycle in human zygotes. implications for cryopreservation. *Fertil Steril* 1993;59:359–65.
- Tesarik J, Kocpcny V. Assembly of the nucleolar precursor bodies in human male pronuclei is correlated with an early RNA synthetic activity. *Experimental Cell Research* 1990;191:153–56.
- Edwards RG, Beard K. Oocyte polarity and cell determination in early mammalian embryos. *Molec Hum Reprod* 1997;3:863–905.
- Staessen C, Janssenswillen C, Devroey P, Van Steirteghem AC. Cytogenetic and morphological observations of single

- pronucleated human oocytes after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1993;8:221–3.
20. Van Blerkom J, Davis P, Alexander S. Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP contents and competence. *Hum Reprod* 2000;15:2621–33.
  21. Salumets, A, Hydén-Granskog, C, Suikkari, A-M, Tiitinen, A, Tuuri, T. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Hum Reprod* 2001;16:2177–81.
  22. Demirel LC, Evirgen O, Aydos K, Ünlü C. The impact of the source of spermatozoa used for ICSI on pronuclear morphology. *Hum Reprod* 2001;16:2327–32.
  23. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Wiesinger R, Puchner M, Tews G. Presence, but not type or degree of extension, of a cytoplasmic halo has a significant influence on preimplantation development and implantation behavior. *Hum Reprod* 2003;18:2406–12.
  24. Plachot M, Crozet N. Fertilization abnormalities in human in vitro fertilization. *Hum Reprod* 1992;7(Suppl 1):89–94.
  25. Ebner T, Yaman C, Moser M. Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 2000;15:427–30.
  26. Van Blerkom J, Henry G. Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. *Hum Reprod* 1992;3:379–90.
  27. Alikani M, Palermo G, Adler A, Bertoli M, Blake M, Cohen J. Intracytoplasmic sperm injection in dysmorphic human oocytes. *Zygote* 1995;3:283–88.
  28. Tesarik J, Junca AM, Hazout A, Aubriot FX, Nathan C, Cohen-Bacrie P, Dumont-Hassan. Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple, non-invasive examination of pronuclear morphology. *Hum Reprod* 2000;15:1396–99.
  29. Balaban B, Urman B, Isiklar A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R, Mumcu A, Nuhoglu A. The effect of pronuclear morphology on embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome. *Hum Reprod* 2001;16:2357–61.
  30. Balaban B. Pronuclear morphology predicts embryo development and chromosome constitution. *Reprod BioMed Online* 2004;8(6):695–700.
  31. Gmiz P, Rubio C, de los Santos MJ, Mercader A, Simón C, Remohí J, Pellicer A. The effect of pronuclear morphology on early development and chromosomal abnormalities in cleavage-stage embryos. *Hum Reprod* 2003;18:2413–9.
  32. Kahraman S, Kumtepe Y, Sertyel S, Dönmez E, Benkhalifa M, Findikli N, Vanderzwalmen P. Pronuclear morphology scoring and chromosomal status of embryos in severe male infertility. *Hum Reprod* 2002;17:3193–3200.
  33. Tur R, Barri PN, Coroleu B, Buxaderas R, Parera N, Balasch J. Use of a prediction model for a high-order multiple implantation after ovarian stimulation with gonadotrophins. *Fertil Steril* 2005;83(1):116–21.
  34. Neuber E, Rinaudo P, Trimarchi JR, Sakkas D. Sequential assessment of individually cultured human embryos as an indicator of subsequent good quality blastocyst development. *Hum Reprod* 2003;18:1307–12.
  35. Van Blerkom J, Antczak M, Schrader R. The developmental potential of the human oocyte to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Hum Reprod* 1997;12:1047–55.

## 3.2. Article II: Objectiu 1

---

Títol: Pronuclear morphology, embryo development and chromosome constitution.

Autors: Gemma Arroyo, Josep Santaló, Mònica Parriego, Montserrat Boada, Pere Nolasca Barri, Anna Veiga.

Revista: Reproductive Biomedicine Online (2010), 20:649-655.

Índex d'impacte: 2.98 (2010).





www.sciencedirect.com  
www.rbmonline.com



## ARTICLE

# Pronuclear morphology, embryo development and chromosome constitution


Gemma Arroyo <sup>a,\*</sup>, Josep Santaló <sup>b</sup>, Mònica Parriego <sup>a</sup>, Montse Boada <sup>a</sup>,  
Pedro N Barri <sup>a</sup>, Anna Veiga <sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Reproductive Medicine Service, Department of Obstetrics, Gynecology and Reproduction, Institut Universitari Dexeus, Barcelona, Spain; <sup>b</sup> Unit of Cellular Biology, Faculty of Sciences, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain; <sup>c</sup> Stem Cell Bank, Centre for Regenerative Medicine, Barcelona, Spain

\* Corresponding author. E-mail address: gemarr@dexeus.com (G Arroyo).



Gemma Arroyo obtained her degree in Biology from the Universidad de Barcelona, and her Master's degree in Reproductive Biology and Assisted Reproduction Techniques in 1999 from the Institut Universitari Dexeus – Universitat Autònoma de Barcelona. She also has a BSc in Cellular Biology (2003) from the Universitat Autònoma de Barcelona. She has been working at the IVF laboratory at Institut Universitari Dexeus since 1999. She is an active member of the Association for the Study of Reproductive Biology and the Spanish Society of Fertility. Her main interest is focused on oocyte maturation *in vitro*, and oocyte and early embryo morphology.

**Abstract** The aim of the present study was to evaluate the usefulness of pronuclear patterns, according to the classifications of Tesarik and Scott, as predictors of embryo chromosome constitution. Up to 73 preimplantation genetic diagnosis/preimplantation genetic screening (PGD/PGS) cycles were analysed in this retrospective study including 17 cycles of translocation carriers and 56 PGS cycles. A total of 331 biopsied embryos were studied assessing pronuclear (PN) pattern, embryo quality and chromosome constitution. As regards to the relationship between PN pattern and embryo quality, the data obtained in this study show no correlation between both parameters. Although there were no significant differences when comparing the distribution of chromosomally normal and abnormal embryos with respect to embryo quality, such differences were observed when distinguishing between normal, aneuploid and polyploid embryos. The results show that the PN pattern using Tesarik's and Scott's classification systems is not related to the embryo developmental potential or its chromosome constitution. Therefore, in the context of a PGD/PGS programme, the PN pattern cannot be used as a tool to predict embryo quality or chromosome status. 

© 2010, Reproductive Healthcare Ltd. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**KEYWORDS:** chromosome abnormalities, embryo quality, pronuclear pattern

## Introduction

When performing IVF, it is important to transfer the embryo with the best prognosis and the highest potential for implantation. An adequate embryo assessment allows reduction of the number of embryos to be

transferred and thus the risk of multiple pregnancy. A number of guidelines are available for the assessment of embryo quality and transfer policies in order to decrease multiple pregnancies (ASRM Guidelines on number of embryos transferred; ESHRE Guidelines for Reproductive Medicine).

1472-6483/\$ - see front matter © 2010, Reproductive Healthcare Ltd. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.rbmo.2009.12.028

The most widely used criterion for selecting the embryo to be transferred is based on embryo morphology on day 2 and 3 of development. This approach takes into account the cleavage rate, cytoplasmic fragmentation, blastomere multinucleation and development up to the blastocyst stage (Alikani et al., 1999; Balakier and Cadesky, 1997; Boiso et al., 2002; Gardner and Lane, 2003). Others authors consider cytoplasmic morphology as a parameter for the assessment of embryo quality. The presence and distribution of cytoplasmic organelles, especially mitochondria might influence embryo development (Van Blerkom and Davis, 2006). Pronuclear morphology is a method for assessing zygote quality that provides complementary information for embryo selection in early stages of cleavage. This information may even prove to have a determining influence as some countries only allow freezing of embryos at the zygote stage (Ludwig et al., 2000; Zollner et al., 2002).

There are two pronuclear scores based on the number and distribution of nucleolar precursor bodies (NPB) and these have been related to different parameters of embryo quality such as embryo morphology and implantation potential (Scott and Smith, 1998; Scott et al., 2000; Tesarik and Greco, 1999). Thus, the pronuclear pattern has been associated with embryo development in terms of cytoplasmic fragmentation, cleavage arrest (Balaban et al., 2001), blastomere multinucleation (Sadowy et al., 1998) and chromosome constitution (Balaban, 2004; Gámiz et al., 2003; Gianaroli et al., 2003; Kahraman et al., 2002). However, the use of different pronuclear scores and their variations makes it difficult to compare the results and clinical relevance among different studies.

The aim of the present study is to evaluate the usefulness of pronuclear patterns according to the classifications of Tesarik and Scott as predictors of embryo chromosome constitution.

## Materials and methods

### Patients

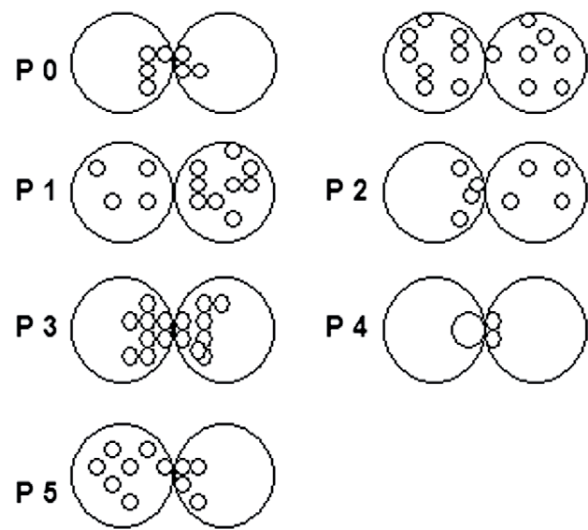
A total of 73 preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS) cycles were included in this retrospective study. Indications for PGD were presence of a balanced translocation (17 cycles) and for PGS (56 cycles) were repeated implantation failure (22), recurrent miscarriage (23) and male factor (11). A total of 526 intracytoplasmic sperm injection (ICSI) fertilized oocytes were evaluated.

### Ovarian stimulation

Ovarian stimulation was performed following a protocol using gonadotrophin-releasing hormone agonist (GnRHa) in association with gonadotrophins (Barri et al., 2002). Laboratory procedures for gamete and embryo handling followed standard methodology (Arroyo et al., 2007).

### Zygote scoring

Examination time was minimized in order to maintain the temperature and pH of the culture medium, as this may affect subsequent embryo development.

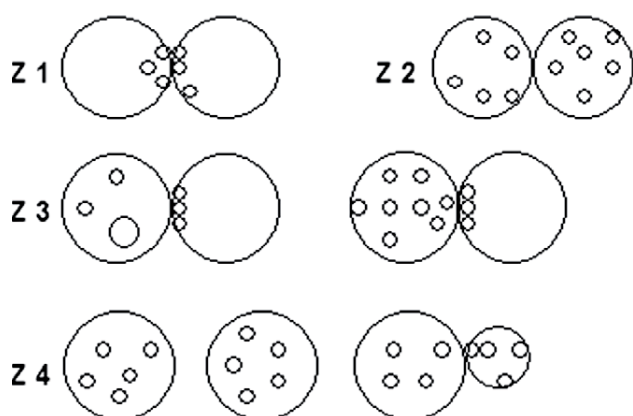


**Figure 1** Schematic diagram of pronuclei showing different patterns of nucleolar precursor bodies as classified by Tesarik and Greco (1999).

Two different classification systems were used to describe the polarization and number of NPB in the pronuclei (PN). The first PN score (patterns p0–p5) was based on the classification system described by Tesarik and Greco (1999). This approach considers a pronucleus to be polarized when all NPB are present in the pronuclear hemisphere whose pole is the point of contact with the other PN. Zygotes are divided into six different categories depending on the number and distribution of NPB (Figure 1). In p0 zygotes, the NPB in both PN are polarized if the number of NPB is between three and seven, and they are non-polarized if the number of NPB is equal or greater than seven. p1 zygotes have a large difference (more than three) between the number of NPB in each pronuclei. p2 zygotes are characterized by a small number (less than seven) of NPB without polarization in at least one PN. p3 zygotes present polarization and a large number (more than seven) of NPB in at least one PN. p4 zygotes have a very small number of NPB in at least one PN. p5 zygotes present one polarized PN and one non-polarized PN. p0 is considered to be the best prognosis pattern by the author (Tesarik and Greco, 1999). When the zygote could be assigned to more than one pattern, the criteria to assign to one or another pattern were the same as previously described (Arroyo et al., 2007). In brief, p4 has the highest priority, followed by p1, p2, p3 and p5.

The second classification system was the Z-score approach described by Scott et al. (2000), which classifies zygotes into four patterns (Z1, Z2, Z3 and Z4) (Figure 2). Z1, Z2 and Z3 zygotes show symmetry of the PN and PN membranes in contact, which is not the case in Z4 zygotes. In Z1 zygotes, both PN have between three and seven NPB, the difference between PN in the number of NPB is not greater than one, and both PN are polarized. Z2 zygotes have the same characteristics as Z1 zygotes, but both PN are non-polarized. Z3 zygotes have alterations in the number of NPB and/or one polarized PN together with one non-polarized PN. Z1 and Z2 are considered to be the best prognosis pattern by the author (Scott et al., 2000).





**Figure 2** Schematic diagram of pronuclei showing different patterns of nucleolar precursor bodies as classified by Scott et al. (2000).

### Embryo scoring

Embryo morphology was evaluated 40–44 h (day 2) after insemination. Embryos at day 2 of development were scored according to morphological parameters such as the cell number, their symmetry, the percentage of cytoplasmic fragmentation and blastomere multinucleation.

Two groups of embryo quality on day 2 were considered (Arroyo et al., 2007). The good-morphology group was constituted by embryos with at least 4 non-multinucleated blastomeres and <25% fragmentation. The poor-morphology group comprised embryos with either less than four blastomeres or multinucleated blastomeres or ≥30% fragmentation.

### Embryo biopsy

Blastomere biopsy for fluorescence in-situ hybridization (FISH) analysis was performed on day-3 embryos presenting at least four blastomeres and <35% cytoplasmic fragmentation. Arrested embryos and those presenting >35% cytoplasmic fragmentation were not biopsied.

Embryos were individually manipulated in Ca- and Mg-free medium and the zona pellucida was drilled with a diode laser, as previously described (Boada et al., 1998). For the multicolour FISH analysis, specific DNA probes for chromosomes X, Y, 13, 15, 16, 18, 21 and 22 were used in a two-step protocol (Vidal et al., 1998). An embryo was considered to be aneuploid when the number of copies of any of these chromosomes was abnormal. An embryo was considered to be polyploid when having more than two copies of all the chromosomes analysed.

For PGD cycles involving translocation carriers, embryos were analysed by FISH using specific probes for the chromosomes involved in these translocations.

Biopsied embryos were kept in culture until day 5, when those embryos diagnosed as normal/balanced and showing adequate development were transferred.

### Statistical analysis

Qualitative variables were compared using the chi-squared test or Fisher’s exact test, with a significance level of  $P < 0.05$ .

### Results

The mean age of the female patients was 35.4 years (range 27–44; SD = 3.7). Zygotes were evaluated at 20 h after insemination (range 14–23; SD = 1.65), as previously described (Arroyo et al., 2007).

### Biopsied embryos

A total of 331 embryos were analysed. The distribution of zygotes according to Tesarik’s classification (Tesarik and Greco, 1999) was 39.0% for p0, 19.0% for p1, 23.6% for p2, 9.1% for p3 and 9.4% for p4. The distribution of zygotes according to Scott’s classification (Scott et al., 2000) was 15.7% for Z1, 12.1% for Z2, 64% for Z3 and 8.2% for Z4 (Table 1).

When evaluating on day 2 of development, 65.3% of embryos biopsied showed good morphology. As shown in Table 1, embryo morphology of biopsied embryos was not related with the zygote pattern in either of the classification

**Table 1** Distribution of zygotes using the two classification systems in the biopsied embryos.

Study	Zygote distribution	Good morphology	Chromosomally abnormal
Total	331	216 (65.3)	222 (37.1)
Tesarik			
p0	129 (39.0)	77 (59.7)	87 (67.4)
p1	63 (19.0)	41 (65.1)	48 (76.2)
p2	78 (23.6)	58 (74.4)	50 (64.1)
p3	30 (9.1)	21 (70.0)	21 (70.0)
p4	31 (9.4)	19 (61.3)	16 (51.6)
Scott			
Z1	52 (15.7)	27 (51.9)	39 (75.0)
Z2	40 (12.1)	30 (75.0)	23 (57.5)
Z3	212 (64)	140 (66.0)	138 (65.1)
Z4	27 (8.2)	19 (70.4)	22 (81.5)

Values are number (%).

**Table 2** Distribution of zygotes using the two classification systems in the PGS embryos.

<i>Study</i>	<i>Zygote distribution</i>	<i>Good morphology</i>	<i>Chromosomally abnormal</i>
Total	250	160 (64.0)	160 (64.0)
Tesarik			
p0	91 (36.4)	52 (57.1)	58 (63.7) <sup>a</sup>
p1	52 (20.8)	34 (65.4)	39 (75.0) <sup>a</sup>
p2	60 (24.0)	43 (71.7)	39 (65.0) <sup>a</sup>
p3	25 (10.0)	17 (68.0)	16 (64.0) <sup>a</sup>
p4	22 (8.8)	14 (63.6)	8 (36.4) <sup>a</sup>
Scott			
Z1	33 (13.2)	16 (48.5)	23 (69.7)
Z2	28 (11.2)	21 (75.0)	14 (50.0)
Z3	169 (67.6)	109 (64.5)	108 (63.9)
Z4	20 (8.0)	14 (70.0)	15 (75.0)

Values are number (%).

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , normal versus abnormal.

systems. A total of 222 (67.1%) embryos were chromosomally abnormal. There was no relationship between PN pattern and chromosomal status in the two PN classification systems used (Table 1).

### PGS group

For the 250 PGS embryos, the distribution of zygotes in the two classification systems was similar to that of the whole sample (Table 2). No correlation was established between PN pattern and embryo morphology in this study group (Table 2).

A total of 64% of PGS embryos were chromosomally abnormal. In this group, significant differences were found in the chromosomal status when comparing different pronuclear patterns according to Tesarik's classification, ranging from 36.4% abnormal embryos in p4 to 75.0% in p1 ( $P < 0.05$ ); however, no differences were observed when using Scott's classification (Table 2). No significant differences were found when analysing the type of chromosomal abnormality (aneuploidy and polyploidy) according to the

different pronuclear patterns in either of the two classification systems (data not shown).

As regards the relationship between chromosomal status and embryo quality, significant differences were found between good- and poor-morphology embryos when considering whether they were normal, aneuploid or polyploidy. Thus, 40.3% of good-morphology (GM) embryos were chromosomally normal, 57.9% aneuploid and 1.9% were polyploid while 28.9% of poor-morphology embryos (PM) were chromosomally normal, 62.2% aneuploid and 8.9% polyploid ( $P < 0.05$ ).

### Chromosome translocation group

The distribution of zygotes using the two classification systems in the group of 81 embryos from patients with translocations was similar to that of the whole sample (Table 3). The percentage of embryos with good morphology was similar in the two PN classifications used (Table 3). The percentage of chromosomally abnormal embryos was 76.5% in this group. No correlation was found between PN pattern and chromo-

**Table 3** Distribution of zygotes using the two classification systems in the translocation embryos.

<i>Study</i>	<i>Zygote distribution</i>	<i>Good morphology</i>	<i>Chromosomally abnormal</i>
Total	81	56 (69.1)	62 (76.5)
Tesarik			
p0	38 (46.9)	25 (65.8)	29 (76.3)
p1	11 (13.6)	7 (63.6)	9 (81.8)
p2	18 (22.2)	15 (83.3)	11 (61.1)
p3	5 (6.2)	4 (80.0)	5 (100)
p4	9 (11.1)	5 (55.6)	8 (88.9)
Scott			
Z1	19 (23.5)	11 (57.9)	16 (84.2)
Z2	12 (14.8)	9 (75.0)	9 (75.0)
Z3	43 (53.1)	31 (72.1)	30 (69.8)
Z4	7 (8.6)	5 (71.4)	7 (100)

Values are number (%).

somal status (Table 3). When analysing the correlation between chromosome abnormalities and embryo quality, no differences were found between the group of poor- and good-quality embryos (80% versus 75%, respectively).

## Discussion

Several studies have analysed the possible relationship between zygote morphology and embryo chromosome constitution. Zygotes have been classified according to pronuclear scores mainly based on the relative position of PN in the zygote and on the location and number of NPB within the PN.

The present study has been performed with the two most widely used scoring systems due to their clarity and objectivity (Scott et al., 2000; Tesarik and Greco, 1999). The pronuclear pattern distribution, its relationship with embryo morphology and with chromosome constitution have been analysed considering data from all biopsied embryos, from PGS embryos and those corresponding to patients with chromosome translocations. The relationship between embryo morphology and chromosome constitution has also been analysed.

## PN distribution

The zygotes analysed were only biopsied and good-morphology embryos from a PGD programme and the distribution of their PN patterns was consistent with the distribution reported in previous studies (Arroyo et al., 2007). This distribution is different from those described by Tesarik and Greco (1999) and Scott (2003) in their respective studies with IVF patients. Moreover, these differences are maintained when considering only good-quality embryos from the above-mentioned studies. This could be due to the fact that a given zygote may be included in more than one category in Tesarik's classification (Balaban et al., 2001). It should also be noted that Scott's classification may have a poor discriminatory capacity in some of the groups (Arroyo et al., 2007) especially because the Z3 group is considered to be too large.

## PN pattern and embryo quality

With regard to the relationship between PN pattern and embryo quality, the data obtained in this study show no correlation between both parameters while Tesarik and co-workers (1999) reported a good relationship between them. In this study, zygotes from the p0 group were associated with good-morphology embryos (37.3%) while 45% of p1 and p2 showed arrested development. In addition, it seems that the presence of a very low number of NPB (corresponding to p4) was considered a poor prognostic factor for embryo development. In the present study's data, although 57.1% of p0 zygotes developed into good-morphology embryos, similar percentages were observed in the rest of the PN patterns.

With respect to the classification proposed by Scott et al. (2000), embryos from Z1 and Z2 pronuclear patterns achieved better rates of blastocyst development than those from Z3. The authors confirmed these results in a more recent publication (Scott et al., 2007).

Despite the attempts of these two classification systems to relate PN morphology and the potential for embryo development, no definitive conclusions have been established.

Indeed, many studies have sought to identify such correlation with only relative success (Arroyo et al., 2007; Balaban et al., 2001; Jaroudi et al., 2004; Salumets et al., 2001; Wittermer et al., 2000), thus illustrating the limitations of the PN scoring systems (James et al., 2006; Nicoli et al., 2007; Payne et al., 2005).

It should be noted that the object of the present study was all those embryos that had already been selected for embryo biopsy, discarding those that showed poor morphology; the aim was then to analyse their morphology on day 2 of development.

## PN distribution and chromosome status

The main objective of the present study was to establish the relationship between PN pattern and the chromosome status of the embryos but not such relationship could be established. In PGS embryos, all PN patterns from the two classifications presented a similar rate of chromosome abnormalities (mean 67%) except p4 from Tesarik's classification (35.6%). This is an unexpected result without a rational explanation as this poor-prognosis PN pattern would usually lead to poor-morphology embryos frequently associated to chromosome abnormalities. By contrast, some authors (Balaban, 2004) have reported Tesarik's p0 pattern to be indicative of adequate chromosome constitution.

Chen et al. (2003), in a short series of embryos, reported higher rates of diploidy in Z1/Z2 than in Z3/Z4 when applying Scott's classification. The authors analysed surplus IVF embryos, and although the PN distribution did not vary with respect to the distribution of the whole sample, the rate of mosaicism among the embryos analysed was higher for Z3 and Z4 patterns than for Z1 and Z2 ones. Gianaroli et al. (2003, 2007) also found a relationship between different PN patterns and chromosome abnormalities. However, these authors established a new classification system also based on the characteristics of the NPB and the relative position of the PN with respect to polar bodies. They reported higher rates of euploidy in embryos derived from zygotes with large nucleoli, while many of those which showed complex aneuploidies came from zygotes with small scattered nucleoli. The present study did not assess the morphology of the NPB. Although Z1 and Z2 patterns have lower numbers of NPB which also tend to be larger, no relationship was found between the chromosome status of the embryos and these PN patterns.

Sadowy et al. (1998) reported a high percentage of mosaicism (44%) compared with aneuploidies and euploidies (20% and 36%, respectively) in embryos derived from zygotes showing PN asymmetry. Other authors suggested a higher risk of aneuploidy associated to PN asymmetry in women aged older than 37 years (Gámiz et al., 2003) and a high risk of chromosomally abnormal embryos and a low rate of blastocyst formation in zygotes showing asymmetry or asynchrony (Kahraman et al., 2002). The present study's results provide no evidence of higher rates of chromosome abnormalities in the Z4 pattern that includes asymmetrical and/or separated PN.

Scott and Smith (1998) consider the observation of a dark halo surrounding pronuclei in the zygote cytoplasm as a signal of the presence of mitochondria providing ATP demands. Mitochondrial distribution in the oocyte and the early embryo

has been related to metabolic abnormalities, cell death and chromosomal segregation effects (Van Blerkom, 2008).

### Embryo quality and chromosome status

These results show a trend towards a relationship between the rate of chromosome abnormalities and embryo quality in the PGS group: although there were no significant differences when comparing the distribution of chromosomally normal and abnormal embryos with respect to embryo quality, such differences were observed when distinguishing between normal, aneuploid and polyploid embryos. These results are similar to those recently reported by Magli et al. (2007) showing an abnormality rate of around 50% in embryos with good morphology. As also shown in this study's results, abnormalities such as polyploidy increase in embryos with low developmental potential (Magli et al., 2001, 2007; Munné, 2006) while others such as cytoplasmic fragmentation have been related with mosaicism and originate in spindle errors (Magli et al., 1998; Munné and Cohen, 1998). However, it has to be pointed out that results from previous studies (Márquez et al., 2000) failed to find a higher rate of aneuploidy in embryos with low developmental potential. This study's results show a high rate of polyploidy particularly in poor-quality embryos. The possible origin of this fact could be an asynchrony in the pronuclear development in multipronuclear zygotes ( $\geq 3PN$ ) misleadingly resulting in the observation of 2PN, especially when this observation is performed later than 20 h after insemination.

According to this study's results it should be concluded that the PN pattern (Tesarik and Scott classification systems) is not related to the embryos developmental potential or its chromosome constitution. Therefore, in the context of a PGD/PGS programme, it cannot be used as a tool to predict embryo quality or chromosome status.

### Acknowledgements

The authors would like to thank Fanny Vidal from the Department of Cellular Biology of the Universitat Autònoma de Barcelona and Marta Carrera from the Centro de Patología Celular from Barcelona their contribution to the PGD Programme of Institut Universitari Dexeus. Furthermore, the authors are grateful to Ignacio Rodríguez from the Biostatistics Department for statistical advice.

### References

- Alikani, M., Cohen, J., Tomkin, G., et al., 1999. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil. Steril.* 71, 836–847.
- American Society for Reproductive Medicine: the Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology and the Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine 2008 Guidelines on number of embryos transferred. *Fertil. Steril.* 90 (Suppl. 3), 163–164.
- Arroyo, G., Veiga, A., Santaló, J., et al., 2007. Developmental prognosis for zygotes based on pronuclear pattern: usefulness of pronuclear scoring. *J. Assist. Reprod. Genet.* 24, 173–181.
- Balaban, B., 2004. Pronuclear morphology predicts embryo development and chromosome constitution. *Reprod. Biomed. Online* 8, 695–700.
- Balaban, B., Urman, B., Isiklar, A., et al., 2001. The effect of pronuclear morphology on embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome. *Hum. Reprod.* 16, 2357–2361.
- Balakier, H., Cadesky, K., 1997. The frequency and developmental capability of human embryos containing multinucleated blastomeres. *Hum. Reprod.* 12, 800–804.
- Barri, P.N., Martinez, F., Coroleu, B., et al., 2002. The role of GnRH antagonists in assisted reproduction. *Reprod. Biomed. Online* 5 (Suppl. 1), 14–19.
- Boada, M., Carrera, M., De la Iglesia, C., et al., 1998. Successful use of a laser for human embryo biopsy in preimplantation genetic diagnosis: report of two cases. *J. Assist. Reprod. Genet.* 15, 302–307.
- Boiso, I., Veiga, A., Edwards, R.G., 2002. Fundamentals of human embryonic growth in vitro and the selection of high-quality embryos for transfer. *Reprod. Biomed. Online* 5, 328–350.
- Chen, C., Shen, G., Horng, S., et al., 2003. The relationship of pronuclear stage morphology and chromosome status at cleavage stage. *J. Assist. Reprod. Genet.* 20, 413–420.
- European Society of Human Reproduction and Embryology: ESHRE Guidelines for Reproductive Medicine Magli, M.C., Etienne Van den Abbeel, E., Lundin, K., Royere, D., Van der Elst, J., Gianaroli, L. for Committee of the Special Interest Group on Embryology, 2008. *Hum. Reprod.* 6, 1253–1262.
- Gámiz, P., Rubio, C., de los Santos, M.J., et al., 2003. The effect of pronuclear morphology on early development and chromosome abnormalities in cleavage-stage embryos. *Hum. Reprod.* 18, 2413–2419.
- Gardner, D.K., Lane, M., 2003. Towards a single embryo transfer. *Reprod. Biomed. Online* 6, 470–481.
- Gianaroli, L., Magli, C., Ferraretti, A.P., et al., 2003. Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. *Fertil. Steril.* 80, 341–349.
- Gianaroli, L., Magli, C., Ferraretti, A.P., et al., 2007. Oocyte euploidy, pronuclear zygote morphology and chromosomal complement. *Hum. Reprod.* 22, 241–249.
- James, A., Hennessy, S., Reggio, B., et al., 2006. The limited importance of pronuclear scoring of human zygotes. *Hum. Reprod.* 21, 1599–1604.
- Jaroudi, K., Al-Hassan, S., Sieck, U., et al., 2004. Zygote transfer on day 1 versus cleavage stage embryo transfer on day 3: a prospective randomized trial. *Hum. Reprod.* 19, 645–648.
- Kahraman, S., Kumtepe, Y., Sertyel, S., et al., 2002. Pronuclear morphology scoring and chromosomal status of embryos in severe male infertility. *Hum. Reprod.* 17, 3193–3200.
- Ludwig, M., Schopper, B., Al-Hasani, S., et al., 2000. Clinical use of a pronuclear stage score following intracytoplasmic sperm injection: impact on pregnancy rates under the conditions of the German embryo law. *Hum. Reprod.* 15, 325–329.
- Magli, M.C., Gianaroli, L., Munné, S., et al., 1998. Incidence of chromosomal abnormalities from a morphologically normal cohort of embryos in poor-prognosis patients. *J. Assist. Reprod. Genet.* 15, 297–301.
- Magli, M.C., Gianaroli, L., Ferraretti, A.P., et al., 2007. Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. *Fertil. Steril.* 87, 534–541.
- Magli, M.C., Sandalinas, M., Escudero, T., et al., 2001. Double locus analysis of chromosome 21 for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Prenat. Diagn.* 21, 1080–1085.
- Márquez, C., Sandalinas, M., Bahçe, M., et al., 2000. Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reprod. Biomed. Online* 1, 17–27.
- Munné, S., Cohen, J., 1998. Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum. Reprod. Update* 4, 842–855.
- Munné, S., 2006. Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. *Reprod. Biomed. Online* 12, 234–253.

- Nicoli, A., Valli, B., Di Girolamo, R., et al., 2007. Limited importance of pre-embryo pronuclear morphology (zygote score) in assisted reproduction outcome in the absence of embryo cryopreservation. *Fertil. Steril.* 88, 1167–1173.
- Payne, J.F., Raburn, D.J., Couchman, G.M., et al., 2005. Relationship between pre-embryo pronuclear morphology (zygote score) and standard day 2 or 3 embryo morphology with regard to assisted reproductive technique outcomes. *Fertil. Steril.* 84, 900–909.
- Sadowy, S., Tomkin, G., Munné, S., et al., 1998. Impaired development of zygotes with uneven pronuclear size. *Zygote* 6, 137–141.
- Salumets, A., Hydén-Granskog, C., Suikkari, A.-M., et al., 2001. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Hum. Reprod.* 16, 2177–2181.
- Scott, L., 2003. Pronuclear scoring as a predictor of embryo development. *Reprod. Biomed. Online* 6, 470–481.
- Scott, L., Smith, S., 1998. The successful of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum. Reprod.* 13, 1003–1013.
- Scott, L., Alvero, R., Leondires, M., et al., 2000. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum. Reprod.* 15, 2394–2403.
- Scott, L., Finn, A., O’Leary, T., et al., 2007. Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates. *Hum. Reprod.* 22, 230–240.
- Tesarik, J., Greco, E., 1999. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum. Reprod.* 14, 1318–1323.
- Van Blerkom, J., 2008. Mitochondria as regulatory forces in oocytes, preimplantation embryos and stem cells. *Reprod. Biomed. Online* 16, 553–569.
- Van Blerkom, J., Davis, P., 2006. High-polarized ( $\Delta\Psi$ mHIGH) mitochondria are spatially polarized in human oocytes and early embryos in stable subplasmalemmal domains: developmental significance and the concept of vanguard mitochondria. *Reprod. Biomed. Online* 13, 246–254.
- Vidal, F., Giménez, C., Rubio, C., et al., 1998. FISH preimplantation diagnosis of chromosome aneuploidy in recurrent pregnancy wastage. *J. Assist. Reprod. Genet.* 15, 310–313.
- Wittemer, C., Bettahar-Lebugle, K., Ohl, J., et al., 2000. Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection. *Hum. Reprod.* 15, 2591–2597.
- Zollner, U., Zollner, K.-P., Hartl, G., et al., 2002. The use of a detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience. *Hum. Reprod.* 17, 1327–1333.

*Declaration: The authors report no financial or commercial conflicts of interest.*

Received 28 July 2009; refereed 21 September 2009; accepted 16 December 2009.



### 3.3. Article III: Objectiu 2

---

Títol: Does early cleavage correlate with chromosome constitution in human preimplantation embryos?

Autors: Gemma Arroyo, Josep Santaló, Montserrat Boada, Mònica Parriego, Ignacio Rodríguez, Buenaventura Coroleu, Pere Nolasca Barri, Anna Veiga.

Revista: Medicina Reproductiva y Embriología Clínica (2015).







## ORIGINAL ARTICLE

# Does early cleavage correlate with chromosome constitution in human preimplantation embryos?



Gemma Arroyo<sup>a,\*</sup>, Josep Santaló<sup>b</sup>, Montserrat Boada<sup>a</sup>, Mònica Parriego<sup>a</sup>, Ignacio Rodríguez<sup>a</sup>, Buenaventura Coroleu<sup>a</sup>, Pedro N. Barri<sup>a</sup>, Anna Veiga<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Reproductive Medicine Service, Department of Obstetrics, Gynecology and Reproduction, Hospital Universitari Quirón Dexeus, Gran Via Carles III, 71–75, 08028 Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Stem Cell Bank, Centre for Regenerative Medicine (CMR[B]), C. Doctor Aiguader, 88, 08003 Barcelona, Spain

Received 8 August 2014; accepted 17 March 2015

Available online 18 June 2015

### KEYWORDS

Early cleavage (EC);  
Embryo quality;  
Preimplantation  
aneuploidy screening;  
Preimplantation  
genetic diagnosis  
(PGD)

### Abstract

**Introduction:** The purpose of this study is to analyze the correlation between the occurrence of early cleavage and chromosome constitution of embryos from preimplantation genetic screening (PGS) and preimplantation genetic diagnosis (PGD).

**Material and methods:** A total of 595 embryos from 96 cycles were included in this retrospective study.

**Results:** When clinical pregnancy rates per transfer were compared, statistically significant differences were observed between patients that had at least one early cleavage (ECpos) embryo and patients no EC (ECneg) (35.7% vs. 6.7%;  $p < .001$ ). Statistically significant differences were found between EC, No PN and 2PN embryos at 26 h, good embryo quality at day 2 (71.4%, 55.6% and 40.7%, respectively;  $p < .05$ ) and in blastocyst rate (43.3% EC vs. no early cleavage embryos (NEC) 27.1%;  $p < .001$ ) in PGS cycles. These differences were not found in the PGD group. Early-cleaved embryos exhibited less chromosome abnormalities than No PN and 2PN group in PGS (61%, 69.4% and 77.2%;  $p < .05$ ) and differences in PGD group (69.8%, 76.2% and 66.7%;  $p < .05$ ).

**Discussion:** Early cleavage has shown to correlate with embryo quality, with the capacity to develop up to blastocyst stage, as well as with euploid chromosome constitution.

© 2014 Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción y Sociedad Española de Fertilidad. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

\* Corresponding author.

E-mail address: [gemarr@dexeus.com](mailto:gemarr@dexeus.com) (G. Arroyo).

**PALABRAS CLAVE**

División temprana (EC);  
Calidad embrionaria;  
Cribado de aneuploidías (PGS);  
Diagnóstico genético preimplantacional (PGD)

### Existe una correlación entre la división temprana de los embriones y la dotación cromosómica de los embriones preimplantacionales humanos?

**Resumen**

**Introducción:** El objetivo de este estudio es analizar la relación que existe entre la división temprana (EC) y la dotación cromosómica de los embriones del Programa de Diagnóstico Genético Preimplantacional (PGD) y Cribado o Screening de Aneuploidías (PGS).

**Material Y Métodos:** Se han incluido un total de 595 embriones provenientes de 96 ciclos. Estudio retrospectivo.

**Resultados:** Se han observado diferencias estadísticamente significativas en la tasa de embarazo entre las pacientes con algún embrión EC (ECpos) y ningún embrión EC (ECneg) (35.7% vs. 6.7%;  $p < 0.001$ ). Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre el estadio del embrión a las 26 h: EC, No PN y 2PN, y la buena calidad embrionaria en día 2 (71.4%, 55.6% y 40.7%;  $p < 0.05$ ); así como también en la tasa de formación de blastocisto (43.3% EC vs. No early cleavage (NEC) 27.1%;  $p < 0.001$ ) en los ciclos PGS. Estas diferencias no se ha encontrado en el grupo de PGD. Los embriones EC presentan menos anomalías cromosómicas que los No PN y los 2PN en el grupo de PGS (61%, 69.4% y 77.2%;  $p < 0.05$ ) y también existen diferencias en el grupo de PGD (69.8%, 76.2% y 66.7%;  $p < 0.05$ ).

**Discusión:** La división temprana del embrión está relacionada con la calidad embrionaria, la capacidad de desarrollo hasta blastocisto y con dotación cromosómica euploide.

© 2014 Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción y Sociedad Española de Fertilidad. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

**Introduction**

When performing in vitro fertilization (IVF), the selection of the embryo with the best prognosis and highest implantation potential is essential in order to reduce the number of embryos to be transferred, and therefore the risk of multiple pregnancy, which can lead to maternal and perinatal complications without reducing the pregnancy rate (Bergh et al., 1999; Devroey et al., 2009). The most widely used criteria for the evaluation of embryo quality is the assessment of pronuclear morphology at 18–20 h after insemination (day 1), embryo morphology and cleavage stage at 44–47 h and 67–71 h after insemination (day 2 and day 3) and/or blastocyst morphology (day 5 to day 6).

Another embryo quality indicator is the assessment of early cleavage (EC) at 25–27 h after insemination (Edwards et al., 1984). It has been suggested that the assessment of early cleavage is less subjective and more reliable, fast and simple to routinely apply in any laboratory, as opposed to the assessment of pronuclear morphology (Tesarik and Greco, 1999; Scott et al., 2000; Arroyo et al., 2007; Nicoli et al., 2013). Furthermore, with time-lapse methodologies, early cleavage is easier to assess (Rubio et al., 2012; Chamayou et al., 2013). Early cleavage has been related to embryo quality at day 2 (Racowsky et al., 2009), day 3 (Neuber et al., 2003) and embryo development up to the blastocyst stage (Rehman et al., 2007).

Early cleavage assessment has proved to have a predictive value in pregnancy rates after conventional IVF (Edwards et al., 1984; Shoukir et al., 1997) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI) (Sakkas et al., 1998; Bos-Mikich et al., 2001; Lundin et al., 2001; Fenwick et al., 2002). Studies on single embryo transfer (SET) suggest that both early cleavage and the embryo quality score should be

taken into account in order to select an embryo with a high implantation potential (Salumets et al., 2003; Van Montfoort et al., 2004; De las Heras et al., 2009). Giorgetti et al. (2007) proposed to use the predictive value of early cleavage to improve the selection of suboptimal quality embryos based on embryo morphology thus allowing SET cycles without reducing pregnancy rates. Moreover, with the introduction of time-lapse video cinematography in laboratory routines for embryo evaluation, morphokinetic parameters are becoming more relevant. The more relevant criteria described for the selection of good quality embryos are directly related to early cleavage corresponding to the time of first division and the duration of the different cell cycles (Meseguer et al., 2011).

The relationship between embryo quality and chromosomal abnormalities has been described at different stages of development. At day 1, different patterns of pronuclear scoring have been related to higher incidence of chromosomal abnormalities (Coskun et al., 2003; Arroyo et al., 2010). At day 2 and day 3 of embryo development, different morphological parameters and/or slow/arrested development present higher occurrence of abnormalities (Munné, 2006; Fragouli et al., 2013).

Data of this study are based on the static observation of early cleavage at 26–27 h post-insemination and FISH analysis of the embryos. The results presented will be useful for those laboratories that still do not have the time-lapse technology and comparative genomic hybridization arrays (aCGH) incorporated on their routine equipment. The purpose of this study is to analyze the possible association between the occurrence of early cleavage and chromosome constitution of embryos from a preimplantation genetic screening/Diagnosis (PGS/PGD) program, embryo quality at day 2 and implantation potential.

**Table 1** Patient characteristics according to early cleavage presentation (ECpos) or no early cleavage presentation (ECneg) of embryos.

	Patients	Age	E2 (pg/ml)	Follicles	MII
ECpos	79	37.5 ± 3.9	3000.8 ± 968.4	13.9 ± 4.4	14.7 ± 6.3
ECneg	17	40 ± 3.3	3161.7 ± 1079.3	14.2 ± 4.5	14.7 ± 6.9

*PGS group.* Of 516 analyzed embryos, 40.7% exhibited EC compared to 27.9% that no longer showed PN and 31.4% that still presented 2PN. Among the EC group, 66.2% embryos presented symmetric blastomeres (Table 3) and only 24.8% had fragmentation. The incidence of multinucleation at the time of early cleavage assessment was 3.3% but due to this low percentage no statistical analysis could be performed.

Regarding embryo quality on day 2, 41.9% of all embryos had good morphology. There were statistically significant differences between EC group and no early cleavage (NEC) group (71.4% vs. 47.7%;  $p < 0.0001$ ). In the EC group, when the two blastomeres from the first cleavage division were symmetrical, significant differences were observed among good morphology embryos when compared to non-symmetrical cleavage (76.3% vs. 62%;  $p < 0.05$ ). Differences were also observed in embryo quality on day 2 when EC embryos were compared, both with the No PN group (55.6%) and with 2 PN group (40.7%) ( $p < 0.05$ ) (Table 3).

Overall blastocyst rate in PGS cycles was 33.7%, showing differences when comparing embryos presenting EC, with a higher blastocyst rate than that of NEC embryos (43.3% vs. 27.1%;  $p < 0.001$ ).

No statistically significant differences were found in the blastocyst rate with regard to symmetry of division at the time of early cleavage assessment (Table 3).

*PGD group.* A total of 79 embryos were analyzed in this group. A total of 54.4% point four percent of the embryos exhibited EC, 26.6% did not have visible PN and 19% still showed 2PN. These differences were not statistically significant (Table 4).

Good morphology was found in 75.9% of the embryos. No statistically significant differences were observed concerning embryo quality according to early cleavage status or development until the blastocyst stage (Table 4).

When early cleavage characteristics were analyzed (symmetry of blastomeres or fragmentation) no differences were observed in embryo quality either (Table 4).

#### Chromosome constitution

*PGS group.* A total of 68.4% of the studied embryos were chromosomally abnormal. Early-cleaved embryos exhibited a lower rate of chromosome abnormalities than NEC embryos ( $p = 0.0035$ ), and a lower rate when compared to the No PN and the 2PN group (61%, 69.4% and 77.2%, respectively;  $p < 0.05$ ) (Table 5).

The most frequent chromosome abnormalities were aneuploidies, representing 92.9%. A total of 36.9% of aneuploid embryos presented EC, whereas the remaining 63.1% corresponded to NEC embryos ( $p = 0.026$ ); among this group, 27.1% corresponded to the No PN group and 36% to 2PN group, these differences being statistically significant when compared to EC group ( $p < 0.05$ ).

As for polyploid embryos, 23.1% were EC, 53.8% did not present PN and 23.1% presented 2PN. Although these differences were not statistically significant, the low number of cases in each group needs to be considered.

When the characteristics of early cleavage, such as symmetry of blastomeres or fragmentation in EC embryos were analyzed, no statistically significant differences were observed in chromosome constitution (Table 5).

*PGD group.* A total of 70.9% embryos from this group were chromosomally abnormal. Early-cleaved embryos exhibited the same rate of chromosome abnormalities as NEC embryos, whereas differences were observed when compared to the No PN and the 2PN groups (69.8%, 76.2% and 66.7% respectively;  $p < 0.05$ ) (Table 5).

When the characteristics of early cleavage, such as symmetry of blastomeres or fragmentation in EC embryos, were

**Table 2** Implantation and pregnancy rates by transferred embryos.

	Implanted embryos	Transferred embryos	Implantation rate	N° transfers	Pregnancies	Pregnancy rate/transfer
ECpos	13	46	28.3 <sup>a,b</sup>	28	10	35.7 <sup>d,e</sup>
ECneg	1	47	2.1 <sup>a,c</sup>	30	2	6.7 <sup>d,f</sup>
No PN	0	25	0	15	0	0
2PN	1	22	4.6	15	2	13.3
Mixed	5	47	10.6 <sup>b,c</sup>	23	6	26.1 <sup>e,f</sup>
Total	19	140	13.6	71	17	23.9

<sup>a</sup> Implantation rate (IR): ECpos vs. ECneg  $p < 0.001$ .

<sup>b</sup> IR: ECpos vs. Mixed  $p < 0.05$ .

<sup>c</sup> IR: ECneg vs. Mixed n.s.

<sup>d</sup> Pregnancy Rate/Transfer (PR/T): ECpos vs. ECneg  $p < 0.001$

<sup>e</sup> PR/T: ECpos vs. Mixed, n.s.

<sup>f</sup> PR/T: ECpos vs. Mixed, n.s.

**Table 5** Chromosome constitution of PGS and PGD embryos.

EC	PGS			PGD			Total		
	N	Chromosomically abnormal (%)		N	Chromosomically abnormal (%)		N	Chromosomically abnormal (%)	
EC	210	128	61 <sup>a,b,c,d</sup>	43	30	69.8 <sup>g,h</sup>	253	158	62.5 <sup>i,j,k,l</sup>
EC symmetry	139	81	58.3 <sup>f</sup>	34	23	67.6	173	104	60.1 <sup>m</sup>
No EC symmetry	71	47	66.2 <sup>f</sup>	9	7	77.8	80	54	67.5 <sup>m</sup>
NEC	306	225	73.5 <sup>a</sup>	36	26	72.2 <sup>g</sup>	342	251	73.4 <sup>i</sup>
No PN	144	100	69.4 <sup>b,c,e</sup>	21	16	76.2 <sup>h</sup>	165	116	70.3 <sup>j,k,n</sup>
2 PN	162	125	77.2 <sup>b,d,e</sup>	15	10	66.7 <sup>h</sup>	177	135	76.3 <sup>j,l,n</sup>
Total	516	353	68.4	79	56	70.9	595	409	68.7

<sup>a</sup> PGS: Chromosomically abnormal EC vs. NEC  $p=0.0035$ .

<sup>b</sup> PGS: Chromosomically abnormal EC vs. No PN and 2PN  $p<0.05$ .

<sup>c</sup> PGS: Chromosomically abnormal EC vs. No PN n.s.

<sup>d</sup> PGS: Chromosomically abnormal EC vs. 2PN  $p<0.001$

<sup>e</sup> PGS: Chromosomically abnormal No PN vs. 2PN n.s.

<sup>f</sup> PGS: Symmetry on EC vs. No EC Symmetry, n.s.

<sup>g</sup> Translocations: Chromosomically abnormal EC vs. NEC n.s.

<sup>h</sup> Translocations: Chromosomically abnormal EC vs. No PN and 2PN  $p<0.05$ .

<sup>i</sup> Total: Chromosomically abnormal EC vs. NEC  $p=0.0058$ .

<sup>j</sup> Total: Chromosomically abnormal EC vs. No PN and 2PN  $p=0.0086$ .

<sup>k</sup> Total: Chromosomically abnormal EC vs. No PN n.s.

<sup>l</sup> Total: Chromosomically abnormal EC vs. 2PN  $p=0.0035$ .

<sup>m</sup> Total: Symmetry on EC vs. No EC Symmetry, n.s.

<sup>n</sup> Total: Chromosomically abnormal No PN vs. 2PN n.s.

60% of embryos, depending greatly on the time-points of observation (Shoukir et al., 1997). Bos-Mikich et al., 2001, observed embryos at 25, 27 and 29 h and define the best time-point for early cleavage determination between 25 and 27 h. The latest publications using time-lapse methodology reported that the good prognosis time-point for the first division begins about 24 h post-insemination, lasting until 28 h (Meseguer et al., 2011). This variation in the time of the first cell division is believed to depend on culture conditions as well as on intrinsic oocyte and sperm factors (Lundin et al., 2001).

In our results we found a relatively high frequency of early cleavage (40.7% in PGS and 54.4% in PGD) compared to the frequencies described in the literature (Lemmen et al., 2008; Racowsky et al., 2009). An explanation would be the fact that it is a biased population of good-quality embryos suitable for biopsy in which a high percentage of early cleavage could be thus expected. This explanation is supported by the fact that the general data of our IVF program show a lower overall early cleavage rate (35.8%; De las Heras et al., 2009). Moreover, the time of observation in this study (26.9 h) as well as in the routine of our IVF program (26.7 h) (De las Heras et al., 2009) is within the upper range of the time frame normally used.

In this study, no statistically significant differences in patients' characteristics were found between groups according to the presence of EC embryos (ECpos) or not (ECneg), demonstrating the comparability of these groups. Patients from both groups were considered at advanced maternal age (37.5 and 40 years old, respectively), and both displayed good stimulation response, which yielded a sufficient number of embryos for a PGS/PGD cycle. Given this

similarity, we can assume that the differences observed in the implantation rate between ECpos and ECneg cycles were not attributable to the patients' response to the ovarian stimulation.

An association between early cleavage and embryo quality has been found in the PGS group. This result agrees with other reports in conventional IVF programs, in which differences between EC and NEC embryos have been found, specifically in terms of the presence of PN and embryo quality at day 2 (Neuber et al., 2003) and day 3 (Chen et al., 2003; Lee et al., 2012). Additionally, our results confirm that assessing the early disappearance of PN before the first division is also a good prognosis factor, as has been previously described in IVF patients (Fancsovits et al., 2005).

Among the group of EC embryos in PGS, we found a connection between the symmetry of blastomeres at first cleavage and embryo quality at day 2 as previously described in IVF (Ciray et al., 2006). Moreover, studies on time-lapse videocinematography have demonstrated that direct cleavage from 1 to 3 cells on the first cell cycle is associated with a lower implantation potential (Rubio et al., 2012). With respect to fragmentation in early cleavage and embryo quality, no connection was observed possibly because the mean percentage of fragmentation in the group of embryos studied is about 12%, lower than the 20% described in publications analyzing IVF cycles where this correlation was observed (Fisch et al., 2001). As for embryo developmental capacity, we found a higher blastocyst rate among EC embryos in the PGS group only. The results are similar to those described in earlier publications in which no biopsy is performed (Fenwick et al., 2002; Guerif et al., 2006), indicating that this procedure does not significantly affect

embryo developmental capacity. Moreover, the fact that EC embryos presented better blastocyst rate to NEC embryos supported the idea that EC is a good prognosis parameter of embryo development. Morphokinetic parameters analyzed using time-lapse technology demonstrated that early cleavage is related to development to the blastocyst stage that also depends on media and culture conditions (Cruz et al., 2012; Kirkegaard et al., 2013).

Regarding the association between embryo morphology and chromosome constitution, it is well known that they do not always match (Sandalinas et al., 2001). Our results in terms of aneuploidy and polyploidy percentage of the embryos analyzed are comparable to those described in earlier studies (Magli et al., 2007) referring to those embryos that reached 6–8 cell stage. Although these studies showed higher aneuploidy and polyploidy rates among embryos arrested on day 2, it should be noted that all embryos included in our study were biopsied; therefore they all overcame the day-2 blockage.

As for early cleavage assessment (i.e. first division, absence or presence of 2PN), we did not find any previous study analyzing its relationship with the chromosome constitution of the embryo. Our results showed a direct association between embryo stage at 25–27 h post ICSI and chromosome abnormalities on day 3. A decreasing proportion of chromosome abnormalities were observed among 2PN, No PN and EC embryos in PGS. This connection should be compared to an extrapolation derived from the results described in earlier publications between embryo quality and chromosome constitution (Munné, 2006). A relationship between dominance of a single blastomere and polyploidy has been described (Munné et al., 1994), as well as between aneuploidy and dysmorphisms on day 3, such as fragmentation (Magli et al., 2001) and multinucleation (Kligman et al., 1996). Moreover, embryos presenting blastomere asymmetry as the single dysmorphism have more post-meiotic abnormalities, such as mosaicism, polyploidy and haploidy than symmetric ones, although their aneuploidy rate is similar (Hardarson et al., 2001). Recent studies on time-lapse videoincinematography and aCGH screening show a relationship between the time of the first or second division and the origin of the chromosome abnormality (Chavez et al., 2012). In this sense, there is a delay on the time of the first division in embryos with meiotic errors, whereas the delay occurs in the second division in embryos with mitotic errors. Moreover, an asynchrony between blastomeres' division was observed that was related to chromosome abnormalities. Due to the fact that the presence of triploidies is undetectable with CGH, these authors confirm their results with FISH analysis. In the group of embryos with meiotic chromosomal errors a higher incidence of cytoplasmic fragmentation at first division was observed.

As for translocation carriers of PGD group, our results showed an association between the moment of first cleavage and chromosome constitution. Fiorentino et al. (2011) have described normal/balanced embryos for the translocation with higher incidences of aneuploidies for other chromosomes, probably due to the interchromosomal effect. In our study, translocations were mainly of male origin with patients presenting altered semen parameters, which suggested us a possible interchromosomal effect (Anton et al., 2011). However, certain unbalanced products of the

translocation may have such a low degree of partial aneuploidy that they do not affect cell division. This agrees with data where no relationship between embryo quality in early stages of development and chromosomal abnormalities were found in embryos from translocation carriers (Ménézo et al., 2001).

It should be noted that the genetic analysis of the embryos included in our study was performed using the FISH technique, and only the chromosomes involved in the reorganization were analyzed. This situation could change the relationship observed between chromosome constitution and early cleavage. Moreover, other preimplantation genetic diagnosis strategies allowing simultaneous analysis of all chromosomes (m-CGH, a-CGH or aSNP) revealing more abnormalities could emphasize these results.

Finally, indications for a couple to undergo a PGS are still controversial (Mastenbroek et al., 2011) and in many cases the decision depends on the number and status of the embryos available for biopsy on day 3. Early cleavage assessment could help in this decision. According to our results, although EC embryos present a lower chromosome abnormality rate, the percentage of abnormal embryos among them is still too high (61%). Therefore, using early cleavage assessment as a determinant criterion for embryo selection seems to be insufficient and we definitely do not believe that it could replace preimplantation genetic diagnosis. Data of this study are based on the observation of early cleavage at 26 h post-insemination and FISH analysis of the embryos. The results presented will be useful for those laboratories that still do not have access to tools like time-lapse technology and aCGH.

Early cleavage has proved to associate with embryo quality, with the capacity to develop up to blastocyst stage as well as with euploid chromosome constitution. The new embryo morphokinetic and preimplantation genetic diagnosis technologies will certainly broaden the information available, but for the moment a simple procedure such as early cleavage assessment can offer valuable information that could contribute to the difficult process for the selection of embryos for transfer and/or cryopreservation.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Anton, E., Vidal, F., Blanco, J., 2011. Interchromosomal effect analyses by sperm FISH: incidence and distribution among reorganization carriers. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 57, 268–278.
- Arroyo, G., Veiga, A., Santaló, J., Barri, P.N., 2007. Developmental prognosis for zygotes based on pronuclear pattern: usefulness of pronuclear scoring. *J. Assist. Reprod. Genet.* 24, 173–181.
- Arroyo, G., Santaló, J., Parriego, M., Boada, M., Barri, P.N., Veiga, A., 2010. Pronuclear morphology, embryo development and chromosome constitution. *Reprod. Biomed. Online* 20, 649–655.
- Barri, P.N., Martínez, F., Coroleu, B., Tur, R., 2002. The role of GnRH antagonists in assisted reproduction. *Reprod. Biomed. Online* 5, 14–19.
- Bergh, T., Ericson, A., Hillensjo, T., Nygren, K.G., Wennerholm, U.B., 1999. Deliveries and children born after in-vitro

- fertilisation in Sweden 1982–95: a retrospective cohort study. *Lancet* 354, 1579–1585.
- Boada, M., Carrera, M., De La Iglesia, C., Sandalinas, M., Barri, P.N., Veiga, A., 1998. Successful use of a laser for human embryo biopsy in preimplantation genetic diagnosis: report of two cases. *J. Assist. Reprod. Genet.* 15, 302–307.
- Bos-Mikich, A., Mattos, A.L., Ferrari, A.N., 2001. Early cleavage of human embryos: an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome. *Hum. Reprod.* 16, 2658–2661.
- Brezinova, J., Oborna, I., Svobodova, M., Fingerova, H., 2009. Evaluation of day one embryo quality and IVF outcome – a comparison of two scoring systems. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3, 7–9.
- Chamayou, S., Patrizio, P., Storaci, G., Tomaselli, V., Alecci, C., Ragolia, C., Crescenzo, C., Guglielmino, A., 2013. The use of morphokinetic parameters to select all embryos with full capacity to implant. *J. Assist. Reprod. Genet.* 30, 703–710.
- Chavez, S.L., Loewke, K.E., Han, J., Moussavi, F., Colls, P., Munne, S., Behr, B., Reijo Pera, R.A., 2012. Dynamic blastomere behaviour reflects human embryo ploidy by the four-cell stage. *Nat. Commun.* 3, 1251.
- Chen, C.K., Shen, G.Y., Horng, S.G., Wang, C.W., Huang, H.Y., Wang, H.S., Soong, Y.K., 2003. The relationship of pronuclear stage morphology and chromosome status at cleavage stage. *J. Assist. Reprod. Genet.* 20, 413–420.
- Ciray, H.N., Ulug, U., Bahçeci, M., 2004. Transfer of early-cleaved embryos increases implantation rate in patients undergoing ovarian stimulation and ICSI-embryo transfer. *Reprod. Biomed. Online* 8, 219–223.
- Ciray, H.N., Karagenc, L., Ulug, U., Bener, F., Bahçeci, M., 2006. Early cleavage morphology affects the quality and implantation potential of day 3 embryos. *Fertil. Steril.* 85, 358–365.
- Coskun, S., Hellani, A., Jaroudi, K., Al-Mayman, H., Al-Kabra, M., Qeba, M., 2003. Nucleolar precursor body distribution in pronuclei is correlated to chromosomal abnormalities in embryos. *Reprod. Biomed. Online* 7, 86–90.
- Cruz, M., Garrido, N., Herrero, J., Perez-Cano, I., Muñoz, M., Meseguer, M., 2012. Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod. Biomed. Online* 25, 371–381.
- De las Heras, M., Arroyo, G., Boada, M., Coroleu, B., Veiga, A., 2009. División embrionaria (EC) en transferencias únicas (SET). *Rev. Iberoam. Fertil.* 26, 213–223.
- Devroey, P., Fauser, B.C., Diedrich, K., Evian Annual Reproduction (EVAR) Workshop Group 2008, 2009. Approaches to improve the diagnosis and management of infertility. *Hum. Reprod. Update* 15, 391–408.
- Dumont, M., 2008. Embryo quality and selection. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.* 37, S9–S13.
- Edwards, R.G., Fishel, S.B., Cohen, J., Fehilly, C.B., Purdy, J.M., Slater, J.M., Steptoe, P.C., Webster, J.M., 1984. Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J. In Vitro Fert. Embryo Transf.* 1, 3–23.
- Emiliani, S., Fasano, G., Vandamme, B., Vannin, A.S., Verdoodt, M., Biramane, J., Delbaere, A., Englert, Y., Devreker, F., 2006. Impact of the assessment of early cleavage in a single embryo transfer policy. *Reprod. Biomed. Online* 13, 255–260.
- Fancovits, P., Toth, L., Takacs, Z.F., Murber, A., Papp, Z., Urbancsek, J., 2005. Early pronuclear breakdown is a good indicator of embryo quality and viability. *Fertil. Steril.* 84, 881–887.
- Fenwick, J., Platteau, P., Murdoch, A.P., Herbert, M., 2002. Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum. Reprod.* 17, 407–412.
- Fiorentino, F., Spizzichino, L., Bono, S., Biricik, A., Kokkali, G., Rienzi, L., Ubaldi, F.M., Lammarrone, E., Gordon, A., Pantos, K., 2011. PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. *Hum. Reprod.* 26, 1925–1935.
- Fisch, J.D., Rodriguez, H., Ross, R., Overby, G., Sher, G., 2001. The Graduated Embryo Score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos. *Hum. Reprod.* 16, 1970–1975.
- Fragouli, E., Alfarawati, S., Spath, K., Jaroudi, S., Sarasa, J., Enciso, M., Wells, D., 2013. The origin and impact of embryonic aneuploidy. *Hum. Genet.* 132, 1001–1013.
- Giorgetti, C., Chabert-Orsini, V., Barry, B., Chinchole, J.M., Franquebalme, J.P., Hans, E., Glowaczower, E., Terriou, P., Sitri, M.C., Salzmann, J., Thibault, M.C., Roullet, R., 2006. Elective single embryo transfer: a justified policy for selected patients. *Gynecol. Obstet. Fertil.* 34, 317–322.
- Giorgetti, C., Hans, E., Terriou, P., Salzmann, J., Barry, B., Chabert-Orsini, V., Chinchole, J.M., Franquebalme, J.P., Glowaczower, E., Sitri, M.C., Thibault, M.C., Roullet, R., 2007. Early cleavage: an additional predictor of high implantation rate following elective single embryo transfer. *Reprod. Biomed. Online* 14, 85–91.
- Guerif, F., LeGouge, A., Giraudeau, B., Poindron, J., Bidault, R., Gasnier, O., Royere, D., 2006. Limited value of morphological assessment at days 1 and 2 to predict blastocyst development potential: a prospective study based on 4042 embryos. *Hum. Reprod.* 22, 1973–1981.
- Hardarson, T., Hanson, C., Sjögren, A., Lundin, K., 2001. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum. Reprod.* 16, 313–318.
- Kirkegaard, K., Kesmodel, U.S., Hindkjær, J.J., Ingerslev, H.J., 2013. Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: a prospective cohort study. *Hum. Reprod.* 28, 2643–2651.
- Kligman, I., Benadiva, C., Alikani, M., Munne, S., 1996. The presence of multinucleated blastomeres in human embryos is correlated with chromosomal abnormalities. *Hum. Reprod.* 11, 1492–1498.
- Lee, M.J., Lee, R.K., Lin, M.H., Hwu, Y.M., 2012. Cleavage speed and implantation potential of early-cleavage embryos in IVF or ICSI cycles. *J. Assist. Reprod. Genet.* 29, 745–750.
- Lemmen, J.G., Agerholm, I., Ziebe, S., 2008. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod. Biomed. Online* 17, 385–391.
- Lundin, K., Bergh, C., Hardarson, T., 2001. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum. Reprod.* 16, 2652–2657.
- Magli, M.C., Sandalinas, M., Escudero, T., Morrison, L., Ferraretti, A.P., Gianaroli, L., Munné, S., 2001. Double locus analysis of chromosome 21 for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Prenat. Diagn.* 21, 1080–1085.
- Magli, M.C., Gianaroli, L., Ferraretti, A.P., Lappi, M., Ruberti, A., Farfalli, V., 2007. Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. *Fertil. Steril.* 87, 534–541.
- Mastenbroek, S., Twisk, M., Van der Veen, F., Repping, S., 2011. Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs. *Hum. Reprod. Update* 17, 454–466.
- Ménézo, Y., Chouteau, J., Veiga, A., 2001. In vitro fertilization and blastocyst transfer for carriers of chromosomal translocation. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 96, 193–195.
- Meseguer, M., Herrero, J., Tejera, A., Hilligsøe, K.M., Ramsing, N.B., Remohí, J., 2011. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum. Reprod.* 26, 2658–2671.
- Munné, S., 2006. Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. *Reprod. Biomed. Online* 12, 234–253.
- Munné, S., Alikani, M., Cohen, J., 1994. Monospermic polyploidy and atypical embryo morphology. *Hum. Reprod.* 9, 506–510.

- Na, Y.J., Kim, J.P., Joo, B.S., Lee, D.H., Lee, K.S., 2008. Prediction of multiple pregnancies by the number of early cleaving embryos. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 34, 379–383.
- Neuber, E., Rinaudo, P., Trimarchi, J.R., Sakkas, D., 2003. Sequential assessment of individually cultured human embryos as an indicator of subsequent good quality blastocyst development. *Hum. Reprod.* 18, 1307–1312.
- Nicoli, A., Palomba, S., Capodanno, F., Fini, M., Falbo, A., La Sala, G.B., 2013. Pronuclear morphology evaluation for fresh in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycles: a systematic review. *J. Ovarian Res.* 12, 64.
- Racowsky, C., Ohno-Machado, L., Kim, J., Biggers, J.D., 2009. Is there an advantage in scoring early embryos on more than one day? *Hum. Reprod.* 24, 2104–2113.
- Rehman, K.S., Bukulmez, O., Langley, M., Carr, B.R., Nackley, A.C., Doody, K.M., Doody, K.J., 2007. Late stages of embryo progression are a much better predictor of clinical pregnancy than early cleavage in intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization cycles with blastocyst-stage transfer. *Fertil. Steril.* 87, 1041–1052.
- Rubio, I., Kuhlmann, R., Agerholm, I., Kirk, J., Herrero, J., Escribá, M.J., Bellver, J., Meseguer, M., 2012. Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. *Fertil. Steril.* 98, 1458–1463.
- Sakkas, D., Shoukir, Y., Chardonnens, D., Bianchi, P.G., Campana, A., 1998. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum. Reprod.* 13, 182–187.
- Sakkas, D., Percival, G., D'Arcy, Y., Sharif, K., Afnan, M., 2001. Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection. *Fertil. Steril.* 76, 1150–1156.
- Salumets, A., Hydén-Granskog, C., Mäkinen, S., Suikkari, A.M., Tiitinen, A., Tuuri, T., 2003. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum. Reprod.* 18, 821–825.
- Sandalinas, M., Sadowy, S., Alikani, M., Calderón, G., Cohen, J., Munné, S., 2001. Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Hum. Reprod.* 16, 1954–1958.
- Scott, L., Alvero, R., Leondires, M., Miller, B., 2000. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum. Reprod.* 15, 2394–2403.
- Shoukir, Y., Campana, A., Farley, T., Sakkas, D., 1997. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum. Reprod.* 12, 1531–1536.
- Tesarik, J., Greco, E., 1999. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum. Reprod.* 14, 1318–1323.
- Van Montfoort, A.P., Dumoulin, J.C., Kester, A.D., Evers, J.L., 2004. Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. *Hum. Reprod.* 19, 2103–2108.
- Vidal, F., Giménez, C., Rubio, C., Simón, C., Pellicer, A., Santaló, J., Egozcue, J., 1998. FISH preimplantation diagnosis of chromosome aneuploidy in recurrent pregnancy wastage. *J. Assist. Reprod. Genet.* 15, 310–313.





# 4. Discussió

L'interès principal d'aquesta tesi ha estat l'estudi de l'embrió en els primers estadis de desenvolupament de cara a valorar la seva capacitat d'implantació. Ha estat àmpliament demostrat que optimitzar la capacitat de predir el potencial d'implantació dels embrions humans permet avançar en la millora dels resultats en FIV. En la majoria de laboratoris de FIV, la valoració del zigot en estadi de pronuclis i la seva primera divisió, tenen com a finalitat servir de suport en la selecció de l'embrió en dies posteriors del seu desenvolupament. A més, en països on no es permet la criopreservació més enllà de l'estadi de zigot (per exemple Alemanya i Àustria) és important dur a terme una valoració dels pronuclis (PN) ja que la selecció s'ha de realitzar en aquest estadi, i en molts casos a partir d'una única observació morfològica (Ludwig et al., 2000; Zollner et al., 2002). A més de l'anàlisi dels PN, la selecció embrionària es realitza mitjançant la valoració de la morfologia de l'embrió en D+2, D+3 i en D+5 i el seguiment del seu desenvolupament. Per altra banda, la incorporació i millora de les tècniques de PGD/PGS permeten complementar l'avaluació de la qualitat embrionària amb la determinació de les seves característiques genètiques i la dotació cromosòmica.

Hem estructurat la discussió dels articles que conformen aquest treball seguint la línia argumental que han seguit els articles. Hem seguit l'ordre cronològic dels esdeveniments que tenen lloc durant l'activació del zigot, formació dels pronuclis i posterior desenvolupament embrionari.

En el primer article, hem relacionat la morfologia del zigot amb el patró de PN i la qualitat embrionària en D+ 2 i amb la taxa d'implantació.

En el segon article, hem relacionat el patró de PN amb la dotació cromosòmica de l'embrió i el seu potencial d'implantació.

En el tercer article, ens hem interessat per la possible associació entre la divisió primerenca del zigot (*early cleavage*, EC) i el desenvolupament de l'embrió en D+2, així com amb la seva dotació cromosòmica i el seu potencial d'implantació.

## 4.1. Característiques morfològiques del zigot i qualitat embrionària

---

S'ha de tenir en compte que en el primer article, el disseny experimental buscava evitar interferències de factors com l'edat de les pacients (Ludwig et al., 2000) i la resposta al tractament d'estimulació en els resultats obtinguts. No hem trobat cap correlació entre la distribució de PN i

les característiques de les pacients, per la qual cosa podem afirmar que la mostra analitzada és homogènia pel que fa als paràmetres estudiats.

Per tal d'intentar correlacionar el patró de PN amb la morfologia de l'embrió s'ha valorat l'aspecte del citoplasma, la presència de vacúols, d'halo citoplasmàtic, i de grànuls citoplasmàtics.

En quant a l'anàlisi del citoplasma en relació amb la distribució de PN no s'ha trobat cap correlació positiva entre el patró de PN i el fet de que el zigot presenti un citoplasma fosc. Tampoc no hem observat cap associació entre les característiques morfològiques del zigot pel que fa a la presència de vacúols, ni a la presència d'halo citoplasmàtic amb la distribució de PN. No hem pogut comparar aquests resultats amb cap referència, ja que no hi ha publicacions que ho relacionin. La presència d'halo en la classificació de zigots publicada per Scott and Smith (1998) es considera un factor de bon pronòstic, ja que és signe de la presència de mitocondris productors d'energia, però no es relaciona amb cap patró de PN.

Pel que fa a la morfologia citoplasmàtica del zigot, els nostres resultats no mostren cap relació amb la qualitat embrionària excepte pel que fa a una major presència de grànuls citoplasmàtics (necròtics) en zigots que esdevenen embrions de baixa qualitat.

Això s'adiu amb la publicació de Veeck et al., (1990) que relaciona la presència d'aquests grànuls amb una menor taxa de fecundació però contrasta amb els resultats de Ebner et al., (2000) que no evidencien una associació entre la presència d'aquests i la qualitat embrionària. Cal tenir en compte que la majoria d'aquests grànuls corresponen als cossos necròtics, els quals tenen el seu origen en estructures i orgànuls intracel·lulars que han perdut la seva funcionalitat en l'oòcit i/o zigot i el seu destí és l'exocitosi o la desestructuració.

D'altra banda, en un intent de relacionar dimorfismes de l'oòcit amb el desenvolupament embrionari, Ten et al., (2007) no troben relació entre la taxa de fecundació i la morfologia de l'oòcit pel que fa a l'espai perivitel·lí, la zona pel·lúcida alterada, el CP fragmentat, la presència de vacúols i de citoplasma granulós o fosc. Sí troba però, que els oòcits que presenten citoplasma fosc, signe de immaduresa, presenten menor qualitat embrionària, no sent així en els nostres resultats.

Tanmateix, Scott and Smith (1998) relacionen la presència d'halus del zigot, amb la bona qualitat embrionària; nosaltres pel contrari, no hi hem trobat cap relació.

## 4.2. Patró de Pronuclis

---

La classificació de pronuclis en diferents patrons proposada per Tesarik and Greco, (1999) i més endavant per Scott et al., (2000), són fàcilment reproduïbles en la valoració de la fecundació en el laboratori de FIV. La seva utilització és objectiva i permet la classificació dels PN de manera ràpida en el microscopi òptic sense que l'increment del temps necessari per la seva utilització comprometi la viabilitat dels zigots.

En els nostres resultats la distribució dels zigots en els diferents patrons de PN difereix de la publicada pels autors de les classificacions (Tesarik and Greco, 1999; Scott et al., 2000). La distribució general del zigots que s'han analitzat mostra una freqüència més elevada dels patrons p0, p1 i p2 segons la classificació de Tesarik and Greco (1999), i per altra banda, una freqüència similar de Z1 i Z4 però molt diferent en Z2 i Z3a la classificació de Scott et al., (2000). Aquesta variabilitat pot ser deguda a les diferències en les condicions de cultiu i temps d'observació. Per aquest motiu, en el primer article vàrem analitzar l'existència de canvis en la distribució dels patrons de PN en funció de si l'observació s'havia realitzat  $<18$  hpi o  $\geq 18$  hpi, no trobant diferències. Cal recordar que la mitjana del temps d'observació va ser  $19.1 \pm 1.65$  hpi.

En aquest sentit, actualment la tecnologia de *time-lapse* (TML) en la valoració del desenvolupament embrionari, ha permès observar la progressió dels PN des de l'inici de la seva formació fins a la seva desaparició. Azzarello et al., (2012) analitza els canvis que experimenten els PN realitzant valoracions a les 16 hpi, 18 hpi i just abans de la seva desaparició, no trobant diferències entre les 16 i les 18 hpi, però sí entre les 16 hpi i la desaparició de PN i les 18 hpi i la desaparició de PN. Malgrat tot, la utilització d'aquesta tecnologia es veu limitada perquè la presa d'imatges es realitza cada 15-20 min. i només en 5-7 plans focals, cosa que dificulta, entre altres detalls morfològics, el comptatge de NPB. Es considera que el millor moment per valorar els PN és just abans de la seva desaparició, al voltant de les 22.5-25.9 hpi, moment en el qual els NPB acostumen a ser de major mida i estan polaritzats (Aguilar et al., 2014). Cal remarcar que els nostres resultats provenen d'observacions puntuals i que la mitjana del moment d'observació es troba dins del rang considerat com a òptim.

Per altra banda, és difícil aplicar les classificacions descrites per Tesarik and Greco, (1999) i Scott et al., (2000) tal com apunten les nombroses adaptacions o versions que se n'ha fet i que es mostren a la Taula 1. Això pot ser degut a que un mateix zigot pot ser inclòs en més d'un patró en la

classificació de Tesarik and Greco (1999) (Balaban et al., 2001) i que la classificació de Scott et al., (2000) és poc discriminatòria en algun dels seus grups (Scott et al., 2003).

#### **4.2.1. Correspondència entre les dues classificacions**

És important analitzar la correspondència existent entre les dues classificacions, entenent com a correspondència els trets en comú que hi ha entre les dues. Els patrons de PN de millor pronòstic en les dues classificacions corresponen a aquells que presenten sincronia en la polarització/no-polarització dels NPB i un nombre similar de NPB entre ambdós PN.

Per altra banda, pel que fa a la posició relativa dels PN, Tesarik and Greco (1999) ho analitza com una característica a part dels patrons de PN, mentre que Scott et al., (2000) ho inclou dins de la seva classificació (patró Z4). Els primers autors consideren els PN adherents de millor pronòstic que els adjacents o separats, i s'associen al patró p0 (Tesarik and Greco, 1999). Malauradament, en el nostre primer article, l'anàlisi dels PN que es troben separats no s'ha pogut dur a terme donat el baix nombre de casos. Amb la tecnologia de *time-lapse*, Azzarello et al. (2012), no observen canvis en el posicionament relatiu dels PN dins del zigot entre les 16 hpi i PNB. Aquestes observacions es repeteixen en l'article publicat per Aguilar et al. (2014). Pel que fa a l'adhesió de les membranes dels PN, l'observació amb TML tampoc ha revelat diferències entre els diferents moments d'observació. Aquest paràmetre ha estat relacionat amb la taxa de nen nascut (Azzarello et al., 2012); mentre que altres pel contrari, troben que no es relaciona amb la taxa d'implantació (Aguilar et al., 2014).

En quant al nombre i distribució de NPB en els patrons definits com a patrons de bon pronòstic, les dues classificacions consideren de bon pronòstic la coincidència en la polarització dels NPB entre ambdós PN. En la classificació de Tesarik and Greco, (1999) cal que els NPB estiguin no-polaritzats si són >7 NPB i polaritzats quant el nombre és inferior. En la classificació de Scott et al., (2000) els patrons de bon pronòstic Z1 i Z2, presenten tots dos entre 3 i 7 NPB, i la localització dels NPB és polaritzada o no, en ambdós PN. La diferència entre les dues classificacions està en el nombre màxim de NPB, però coincideixen en que el nombre de NPB no pot diferir gaire entre els 2 PN. En quant al nombre de NPB, s'ha confirmat amb TML que va disminuint en el decurs del temps (Azzarello et al., 2012; Chamayou et al., 2013). Així mateix, l'observació amb TML també ha confirmat que els NPB es van posicionant dins d'un PN cap a l'altre, passant de no-polaritzats a polaritzats (Azzarello et al., 2012).

Amb la intenció de consensuar la valoració dels PN, les societats científiques ESHRE i Alpha (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011) van simplificar la classificació en 3 categories: fecundació normal-sincrònica, normal-àsincrònica i anormal (veure introducció). Ara bé, realitzant l'observació amb TML entre les 16 hpi i la desaparició dels PN, s'ha vist que aquesta classificació també varia en el decurs del temps, trobant uns patrons de PN diferents en funció del moment d'observació (Azzarello et al., 2012).

### 4.3. Patró de Pronuclis i qualitat embrionària

---

La relació entre els patrons de PN i la qualitat i el desenvolupament embrionari ha estat l'objecte de molts estudis. Tot i que majoritàriament s'han utilitzat les classificacions de Tesarik and Greco, (1999) i la de Scott et al., (2000) o adaptacions d'aquestes (Taula 1 i Taula 2) i això dificulta l'anàlisi dels resultats, la majoria d'estudis coincideixen en que la sincronia interpronuclear és un factor de bon pronòstic relacionat amb el correcte desenvolupament embrionari i desenllaç clínic favorable.

En els nostres resultats, patrons de PN que presentin pocs NPB en algun PN (p4), o bé PN de mida desigual o que es trobin separats (Z4) s'han relacionat amb una pitjor qualitat embrionària en D+2. A més, tot i que la selecció embrionària per la transferència s'ha realitzat només tenint en compte la morfologia del D+2, en la majoria dels casos se seleccionen per transferència embrions que procedeixen majoritàriament de zigots p0/Z1-Z2, patrons de bon pronòstic caracteritzats per la seva sincronia interpronuclear.

La majoria d'estudis que analitzen la relació existent entre el patró de PN i la qualitat embrionària, confirmen la hipòtesi de la sincronia interpronuclear (Taula 1). Ara bé, amb la incorporació de TML en els darrers estudis, no s'ha trobat relació entre el patró de PN i la taxa d'implantació (Aguilar et al., 2014) ni la taxa de nen nascut (Azzarello et al., 2012). En aquests treballs però, els embrions d'estudi són embrions òptims i potser la selecció prèvia emmascara els resultats.

Una situació similar es donaria en el nostre segon article. En els nostres resultats, tampoc no trobem relació entre els PN i la qualitat embrionària, però cal recordar que partim d'embrions biopsiats i amb diagnòstic del programa de PGD, els quals complien criteris de bona qualitat embrionària en D+3 de desenvolupament, que els feien aptes per la biòpsia.

A la vista d'aquests resultats, la relació entre el patró de PN i la qualitat embrionària queda en entredit. Malgrat sembla que hi ha característiques que són de mal pronòstic, el patró que presenten els PN no és discriminador del subseqüent desenvolupament embrionari.

**Taula 1.** Resum de les publicacions més destacades que analitzen la morfologia de PN i la qualitat embrionària i resultats clínics.

Autors	Estudi	Variables avaluades	Cicles	Zigots	Hora PN	Score PN	PN i morfologia embrionària	Resultats clínics
Payne et al., 1997	P	Evolució PN time-lapse	42	50	17-20	APN, posició i simetria PN	Aparició i posició PN	
Wittemer et al., 2000	P	Q.e. D+3	262	1000	14-18	Tesarik and Greco'99	p0 i p3 = millor q.e.	p0 = millor TE i TI
Montag et al., 2001	P	Q.e. D+2	495	1114	16-20	Tesarik and Greco'99 modificat: p0A (>7 NPB no pol)/ p0B (<7 NPB pol)/ no-p0	p0 = millor q.e.	p0A = millor TE i TI
Salumets et al., 2001	P	Q.e. D+2-D+3	245	1520	16-18	Tesarik and Greco'99 vs Scott'98	Scott'98: NPB pol > no pol; Tesarik i Greco'99: n.s.	n.s.
Balaban et al., 2001	R	Desenvolupament fins a blastocist	86	676	14-17	Tesarik and Greco'99 modificat p0 / 1 anomalia / 2 anomalies	p0 = millor q.e. i taxa blastocist	p0 = millor TE i TI
De Plácido et al., 2002	R	Q.e. D+2-D+3	154	1171	16-20	Patrò propi	n.s.	n.s.; score seqüencial d.s.
Zollner et al., 2002	P	Desenvolupament fins a blastocist	168	424	16-18	Patrò propi	PN asimètrics = baixa taxa de blastocist	n.s.
Lan et al., 2003	R	Desenvolupament fins a blastocist	346	1894	16-18	Scott'00 modificat	d.s. q.e. i taxa blastocist	d.s. TE i TI
Neuber et al., 2003	R	Desenvolupament fins a blastocist	191	1550	16-19	PN simètrics; PN aliniats	PN simètrics = millor q.e.; PN aliniats = millor q.e. D+2	
Nagy et al., 2003	PR	Q.e. D+3	151	912	12-21	PN simètrics; PN aliniats	n.s.	score seqüencial d.s. TI
Jaroudi et al., 2004	PR	Q.e. D+3	254	1293	15-18	Tesarik and Greco'99: p0/no-p0	n.s.	score D+3 > score PN
Payne et al., 2005	P	Q.e. D+2-D+3	100	292	16-18	Scott'00	Z1/Z3 > Z2/Z4	n.s.
Chen et al., 2006	PR	Q.e. D+3	165	1186	18-20	Patrò propi	PN pol = millor q.e. D+3	n.s.
James et al., 2006	R	Q.e. D+3	104	3333	16-18	Scott'00	n.s.	n.s.
Sjöblom et al., 2006	R	Desenvolupament fins a blastocist	357	420	16-18	Patrò propi	Nº NPB i PN posició i simetria = d.s. blastocist	n.s.
Scott et al., 2007	R	Desenvolupament fins a blastocist	120	1193	16-18	Scott'00	PN asimètrics = baixa q.e. i blastocist	d.s.
Guérif et al., 2007	P	Q.e. D+3	758	4042	18-20	Tesarik and Greco'99: p0/no-p0	n.s.	n.s.
Nicoli et al., 2007	R	Q.e. D+3	393	1032	18-20	Gianaroli'03 modificat	n.s.	n.s.
Brezinova et al., 2009	P	TE i TI	364	2708	16-20	Tesarik and Greco'99: p0/ no-p0		n.s.
Nicoli et al., 2010	R	Q.e. D+3	459	1078	18-20	Gianaroli 2003 modificat	n.s.	
Zamora et al., 2010	R	Q.e. D+2	43	43	16-18	NPB pol/no pol	Aturats = NPB no pol	
Aydin et al., 2011	P	Desenvolupament fins a blastocist	139	487	16-18	Tesarik modificat / Scott'00	n.s.	
Azzarello et al., 2012	R	Evolució PN time-lapse	130	159	16,18, PNB	Scott'00 / ESHRE consensus / PN posició / NPB		n.s.
Berger et al., 2014	R	Q.e. D+3	344	1064	16-18	Scott'00 modificat	n.s.	n.s.
Aguilar et al., 2014	R	Evolució PN time-lapse	842	1448	APN-PNB	Scott'00 modificat / PN posició i simetria		n.s.

P: prospectiu; R: retrospectiu; PR: prospectiu randomitzat; Hora PN: hores postinseminació transcorregudes fins a l'observació dels PN; Q.e.: qualitat embrionària; TE: taxa d'embaràs; TI: taxa d'implantació; PN: pronúclis; NPB: precursors nucleolars; APN: aparició PN; PNB: desaparició dels PN; pol: polaritzats; no pol: no polaritzats; n.s.: diferències estadísticament no significatives; d.s.: diferències estadísticament significatives.

**Taula 2.** Resum de les publicacions més destacades que analitzen la morfologia de PN i la dotació cromosòmica dels embrions i els resultats clínics.

Autors	Estudi	PGS/PGD	Cicles	Zigots	Hora PN	Score PN	PN i morfologia embrionària	PN i dotació cromosòmica	Resultats clínics
Sadowy et al., 1998	R	PGS	12420	10260	19	PN asimètrics	PN asimètrics = major % aturada D+3	PN asimètrics = major % mosaicisme	
Kahraman et al., 2002	R	PGS	452	3116	18	Tesarik and Greco'99 modificat: PN similars / no similars	PN similars > PN no similars	PN no similars = menor % euploidia	
Fincikli et al., 2003	P	PGD	34	251	16-18	Patrò propi	n.s.	n.s.	n.s.
Chen et al., 2003	R	PGS	40	98	18-21	Scott'00 modificat	n.s.	euploidia Z1>Z3/Z4	
Gianaroli et al., 2003	P	PGS	107	631	16	Gianaroli'03	PN separats = baixa q.e.	euploidia NPB grans>NPB petits	
Gámiz et al., 2003	R	PGS	81	888	16-18	Scott'00 modificat	≤ 37 anys: Z1> Z2/Z3/Z4; > 37 anys: Z4<Z1/Z2/Z3	PN similars = major euploidia ≤37 anys	
Balaban et al., 2004	R	PGS	68	240	17	Tesarik and Greco'99: p0/1 anomalia /2 anomalies	p0>1 anomalia >2 anomalies	euploidia p0>1 anomalia >2 anomalies	
Gianaroli et al., 2007	R	PGS	218	2535	16	Gianaroli'03		euploidia > PN centrals i NPB grans	d.s.

P.: prospectiu; R.: retrospectiu; PR.: prospectiu randomitzat; PGS: cicle de diagnòstic genètic preimplantacional d'screening d'aneuploidies; PGD: cicle de diagnòstic genètic preimplantacional de portadors de translocacions balancejades; Hora PN: hores postinseminació transcorregudes fins a l'observació dels PN; Q.e.: qualitat embrionària; PN: pronucleis; NPB: precursors nucleolars; n.s.: diferències estadísticament no significatives; d.s.: diferències estadísticament significatives.

## 4.4. Patró de Pronuclis i dotació cromosòmica

---

L'anàlisi de l'associació entre el patró de PN i la dotació cromosòmica dels embrions ha estat l'objectiu principal del segon article. En els nostres resultats únicament trobem relació entre el patró de PN i la dotació cromosòmica dels embrions en D+3 en del grup de PGS en el patró p4 de Tesarik and Greco, (1999), mentre que no trobem relació quan utilitzem la classificació d'Scott et al., (2000). És sorprenent el fet de trobar un alt percentatge de normalitat cromosòmica en p4, i això ens fa pensar de nou que la selecció prèvia en el moment de realitzar la biòpsia podria esbiaixar la mostra estudiada a favor de la proporció d'embrions cromosòmicament normals.

Si analitzem els resultats d'altres publicacions, diversos autors sí troben relació entre el patró pronuclear i la dotació cromosòmica (Taula 2), però publicacions recents de TML i aCGH no troben relació entre la morfologia dels PN i la dotació cromosòmica embrionària (Basile et al., 2014). De tota manera, el fet de què en aquest treball els autors no han analitzat el patró de PN pròpiament, sinó el moment de desaparició d'aquests, i que la població d'estudi és molt diferent a la del nostre segon article, dificulta la comparació de resultats.

Un altre factor a tenir en compte a l'hora d'analitzar els resultats, és que el diagnòstic s'ha realitzat amb la tècnica de la FISH i sobre un nombre limitat de cromosomes. Creiem que amb la incorporació dels aCGH amb l'estudi de tots els cromosomes, augmentaria el percentatge d'embrions anormals, i més tenint en compte que la nostra població és susceptible de presentar l'efecte intercromosòmic, ja que es tracta de parelles on en la majoria dels casos el portador de la translocació és l'home que a més presenta un patró seminal alterat.

En els embrions de pacients amb reorganitzacions cromosòmiques del grup de PGD, no s'observa cap relació entre el diagnòstic de normalitat i el patró de PN. Tampoc altres autors presenten relació entre la distribució del patró de PN i una dotació cromosòmica alterada en portadors de translocacions recíproques i Robertsonianes (Findikli et al., 2003). De nou cal destacar que aquests resultats van ser obtinguts mitjançant un anàlisi amb FISH i podrien canviar si es realitzés l'anàlisi per aCGH, on es detectaria no només la reorganització diana, sinó tota la dotació cromosòmica de l'embrió. És ben conegut que existeix un possible efecte intercromosòmic en portadors de translocacions Robertsonianes i recíproques i que pot ser degut a petits trencaments en la formació de la sinapsis homòloga o bé degut a defectes en l'alineació o en la condensació dels cromosomes (Anton et al., 2011). Això podria derivar en un augment d'aneuploidies en les subseqüents divisions mitòtiques dels embrions i aquest fet es veuria reflectit si tinguéssim informació de la totalitat de la dotació cromosòmica. És possible que amb aquesta nova



metodologia sí que es trobés una associació entre la dotació cromosòmica dels embrions i el patró de PN dels zigots dels quals procedeixen.

## 4.5. Qualitat embrionària i dotació cromosòmica

---

Les anomalies cromosòmiques són la principal causa de bloqueig de desenvolupament embrionari. Mentre que aproximadament el 50% dels embrions presenten bona morfologia, només un 25-30% són cromosòmicament normals (Munné et al., 1993; Kilani et al., 2014). Hi ha treballs que demostren una possible correlació entre el desenvolupament i la qualitat embrionària i la seva constitució cromosòmica. En els nostres resultats hi ha relació entre la qualitat embrionària i la dotació cromosòmica dels embrions del grup de PGS (aneuploides, poliploides i normals), trobant que els embrions de millor morfologia són normals en major proporció (40.3% bona morfologia vs. 28.9% mala morfologia,  $p < 0.05$ ).

En la literatura, els estudis són contradictoris. Per una banda, s'ha descrit que el percentatge d'aneuploidies no té relació amb la qualitat embrionària. En un estudi realitzat al respecte, Magli et al., (2007) refereixen prop d'un 50% d'anormalitat en els embrions de bona morfologia. Per altra banda, sembla que pel contrari, anomalies com la poliploidia sí augmenten en embrions amb un baix potencial de desenvolupament (Magli et al., 2001, 2007; Munné, 2006).

Si tenim en compte les característiques morfològiques específiques, els resultats mostren una gran variabilitat. Així, la presència de fragmentació citoplasmàtica, s'ha relacionat amb el mosaicisme i es creu que el seu origen es degut a errors en el fus mitòtic (Munné and Cohen, 1998; Magli et al., 2000). En quant a la simetria de blastòmers, es troba en els embrions cromosòmicament normals en major proporció que en els anormals (Hardarson et al., 2001). Els embrions que presenten un bloqueig en el ritme de divisió tenen més anomalies cromosòmiques que els que no el tenen (Munné et al., 1995), igual que els embrions que tenen un ritme de divisió massa ràpid (Magli et al., 1998), els quals presenten també una menor taxa de blastocist (Alikani et al., 2000). Pel que fa a la presència de multinucleació que clàssicament s'ha relacionat amb majors taxes d'aneuploidia (Meriano et al., 2004), el nostre grup ha trobat una alta freqüència d'embrions euploides que presentaven multinucleació en D+1, D+2 o D+3 tot i que es tracta d'una sèrie curta d'embrions de PGD. El fet que a més aquests embrions presentin taxes d'implantació equiparables a la resta d'embrions i que no haguem trobat cap relació ni amb el patró ni amb el percentatge de multinucleació, fa que l'estratègia a seguir davant d'aquests embrions hagi canviat completament,

passant de ser considerats embrions no aptes, a ser aptes per la transferència o bé perllongar el seu cultiu fins blastocist (Parriego et al., 2013).

Malgrat tot, cal recordar que en el segon article els embrions d'estudi són tots els embrions biopsiats dels que tenim diagnòstic i per tant, han estat seleccionats en D+3 abans de la biòpsia.

Estudis recents amb metodologia TML relacionen indicadors morfocinètics amb taxes d'aneuploidia detectades per aCGH (Chávez et al., 2012; Basile et al., 2014). Chávez et al., (2012) observen diferències en el ritme divisió, la fragmentació i l'asimetria dels blastòmers en els embrions aneuploides com ja s'havia descrit en estudis previs (Hardarson et al., 2001; Luna et al., 2008). Semblaria que els embrions portadors d'errors cromosòmics amb origen meiótic presentarien un retard en la primera divisió, mentre que si l'error és d'origen mitòtic, el retard tindria lloc en la segona divisió (Chávez et al., 2014). A més, Davies et al., (2012) descriuen un retard en el ritme de divisió en la transició a 2 i a 4 cèl·lules en els embrions aneuploides. També Basile et al., (2014) troben relació entre la durada de l'interval de temps transcorregut entre les 2C i les 5C i entre 3C i 5C (cc3) i la taxa d'aneuploidia.

En quant al desenvolupament fins a blastocist, Campbell et al., (2013) troben un retard en la formació del blastocel i en l'arribada a l'estadi de blastocist en els embrions aneuploides, però en canvi no troben diferències amb els primers estadis de divisió embrionària. Les diferències observades entre els diferents autors podrien ser degudes al fet de dur a terme la biòpsia embrionària en diferents estadis: mentre que en l'estudi de Basile et al., (2014) es realitza la biòpsia en D+3, Campbell et al., (2013) la realitzen en D+5. És possible que el fet de realitzar la biòpsia en D+3 interrompent el desenvolupament embrionari alteri els resultats morfocinètics del posterior desenvolupament fins a blastocist i per això no hi hagi concordança entre els 2 treballs. Una altra explicació plausible seria el fet que en els estudis en què la biòpsia es duia a terme en D+3 el percentatge d'aneuploidia podria estar esbiaixat a la baixa degut a la no detecció de mosaïcisme.

Pel contrari, també s'han publicat altres estudis de PGS amb aCGH i *time-lapse* que no troben cap correlació entre el ritme de divisió massa ràpid (es coneix com a divisió directa quan el segon cicle cel·lular té lloc en menys de 4h) i l'euploidia dels embrions (Rienzi et al., 2015) ni tampoc entre el desenvolupament fins a blastocist i l'euploidia d'aquests (Rienzi et al., 2015).

Per altra banda, els nostres resultats no mostren una correlació entre la morfologia dels embrions procedents de parelles portadores de reorganitzacions cromosòmiques i el seu contingut cromosòmic. En aquest mateix grup de pacients, Fiorentino et al. (2011) descriu un efecte

intercromosòmic en els embrions normals/balancejats per la translocació que augmenta la taxa d'aneuploidia dels altres cromosomes no implicats en la translocació. Com ja vàrem comentar en el nostre estudi, la majoria de les translocacions són d'origen patern, cosa que es relacionaria amb patrons de semen alterat i ratificaria l'efecte intercromosòmic (Anton et al., 2011). És possible que com que el fragment cromosòmic implicat en la reorganització és normalment és molt petit, la divisió cel·lular no es veuria afectada, i per aquest motiu no s'observa una disminució de la qualitat embrionària. Caldria veure, però, si en aplicar l'aCGH en aquest tipus de pacients es mantindria el percentatge d'anomalies cromosòmiques o si pel contrari, aquest augmentaria.

## 4.6. Divisió primerenca i qualitat embrionària

---

En el tercer article hem analitzat la relació entre la divisió primerenca i la qualitat embrionària incloent el desenvolupament fins a blastocist, i la dotació cromosòmica de l'embrió i la taxa d'implantació.

Un indicador de qualitat embrionària és la valoració de la divisió primerenca o la culminació de la primera divisió mitòtica abans de les 26 h després de la inseminació (hpi) (Edwards et al., 1984). S'ha considerat que els embrions que presenten EC podrien tenir una millor qualitat embrionària que els embrions de divisió tardana (Sakkas et al., 1998; Racowsky et al., 2009).

En els nostres resultats, la taxa d'embaràs i d'implantació dels embrions EC és molt superior als No EC (NEC) (35.7 vs. 6.7 i 28.3 vs. 2.1,  $p < 0.001$ , respectivament). En el grup de PGS, hi ha relació entre el desenvolupament de l'embrió a les 26 hpi (PN visibles, PN no visibles i EC) i la qualitat embrionària en D+2 i la capacitat per desenvolupar-se fins a blastocist. Malgrat se segueix la mateixa tendència en el grup d'embrions de PGD, les diferències no són estadísticament significatives. Creiem, novament, que el fet que només s'hagin analitzat els embrions biopsiats i amb diagnòstic, ha exercit un biaix cap els bons embrions.

S'ha relacionat la divisió primerenca de l'embrió amb millors taxes d'embaràs tant en FIV convencional (Edwards et al., 1984; Shoukir et al., 1997) com en ICSI (Sakkas et al., 1998; Ciray et al., 2006); malgrat tot, aquesta relació no s'ha descrit en altres publicacions (Emiliani et al., 2006; De las Heras et al., 2009; De los Santos et al., 2014).

Diverses publicacions han descrit que la divisió primerenca només té valor predictiu en els embrions de qualitat embrionària mitja o pobra (De las Heras et al., 2009; De los Santos et al., 2014) i que aquest efecte es veu diluït en els embrions òptims, la majoria dels quals presenten EC. En

aquesta línia, De las Heras et al., (2009) analitzen la relació entre l'EC i la qualitat embrionària i la taxa d'implantació de transferències úniques. En les transferències úniques no selectives i per tant de pitjor pronòstic, s'observa una relació entre l'EC i la qualitat embrionària, mentre que aquesta relació no es reproduïx en les transferències úniques selectives. Contràriament, en altres estudis on només s'ha transferit un embrió de manera selectiva, s'observen millors taxes d'implantació en embrions EC davant d'embrions No EC; 50% vs. 26.4% (Salumets et al., 2003) 46% vs. 18% (Van Montfoort et al., 2004), 49.4% vs. 33.3% (Giorgetti et al., 2007).

En l'estudi multicèntric realitzat per ASEBIR, De los Santos et al., (2014) descriu que la freqüència d'embrions EC és menor en pacients de FIV (22%) que en donants d'oòcits (33.2%). En aquest grup d'embrions no s'observen diferències ni en la taxa d'implantació ni en la qualitat embrionària entre els EC i els No EC, potser degut a que són embrions de bon pronòstic procedents de donants d'oòcits i no de pacients infèrtils. D'altra banda, cal destacar que, en aquest mateix estudi, no es troben diferències significatives en la taxa d'implantació entre els embrions EC i NEC de millor categoria (A o B) mentre que sí hi ha diferències en els embrions de tipus C (25,7% EC vs. 14.9% No EC). Semblaria, per tant, que l'EC tindria una major capacitat predictiva en els embrions de qualitat mitja o baixa que no pas en els embrions de bona qualitat.

En les publicacions de TML, també s'ha relacionat la divisió primerenca amb el posterior desenvolupament embrionari. Primerament, s'ha trobat associació entre el temps que transcorre entre el moment de desaparició dels PN i la primera divisió amb la qualitat embrionària en D+2 (Lemmen et al., 2008), el desenvolupament fins a blastocist (Wong et al., 2010), la taxa d'implantació i d'embaràs (Kirkegaard et al., 2013; Aguilar et al., 2014; Basile et al., 2015). Semblaria que el temps idoni que ha transcorrer entre aquests 2 esdeveniments és de 4.04h (Meseguer et al., 2011). Per altra banda, si la primera divisió es dona massa d'hora (20.45 hpi, Azzarello et al., 2012), es considera que la fase S és massa curta i això afecta negativament la implantació (Rubio et al., 2012). Caldrà disposar de més dades per tal de definir els temps i rangs adients per la durada d'aquest primer cicle cel·lular. Pel que fa a la durada de la primera divisió, hi ha autors que relacionen una durada del voltant de 14 min amb el posterior desenvolupament embrionari fins a blastocist Wong et al., (2010) . Malgrat tot, aquest és un temps massa breu per ser observat en alguns aparells de TML que realitzen les observacions cada 20 min (Meseguer et al., 2011).

## 4.7. Divisió primerenca i dotació cromosòmica

---

Com ja hem comentat anteriorment, es postula que els embrions portadors d'anomalies cromosòmiques degudes a errors meiòtics patirien un retard en la primera divisió, mentre que si l'error és mitòtic el retard tindria lloc en la segona divisió (Chávez et al., 2012). Aquest fet, suggeriria una relació entre l'EC i la dotació cromosòmica de l'embrió quan l'origen de l'anomalia és meiòtic.

L'anàlisi dels resultats tant en el grup de PGS com en el grup de PGD mostren diferències en la dotació cromosòmica dels embrions segons els embrions estiguessin a les 26 hpi en 2PN, sense 2PN o ja dividits. En PGS la proporció de normalitat creix quan més avançat es trobava l'embrió a les 26 hpi, mentre que en grup de PGD, les diferències no segueixen aquest ordre lògic. Contràriament, dins del grup d'embrions EC, no hi ha una correlació entre les característiques de l'embrió i la dotació cromosòmica de l'embrió.

Com ja hem esmentat anteriorment hi ha controvèrsia respecte de la capacitat predictiva del TML envers la dotació cromosòmica de l'embrió. Pel que fa a l'EC, hi ha estudis de TML i aCGH que troben relació entre la dotació cromosòmica i el moment i la durada de la primera divisió (Chávez et al., 2012), mentre d'altres no ho observen (Campbell et al., 2013; Basile et al., 2014; Rienzi et al., 2015). Les metodologies d'aquestes publicacions difereixen en diversos aspectes com la població d'estudi o el dia en que es realitza la biòpsia embrionària, i per tant no se'n pot extreure conclusions definitives.



# 5. Conclusions

El nostre interès principal ha estat l'estudi de l'embrió en els primers estadis de desenvolupament. De forma general, la valoració del patró de pronuclis en relació amb el posterior desenvolupament i la constitució cromosòmica, ha posat en evidència que aquest criteri té un valor predictiu relatiu, podent prendre com a indicador de bon pronòstic la sincronia interpronuclear. Pel que fa a la divisió primerenca del zigot s'ha establert una correlació amb la qualitat embrionària, amb la capacitat de l'embrió de desenvolupar-se fins a blastocist i amb la seva dotació cromosòmica.

D'altra banda, els resultats obtinguts amb la tecnologia de TML, que ofereix una informació més àmplia sobre les característiques de l'embrió, s'adiu amb les nostres observacions, obtingudes amb procediments senzills com la determinació del patró de PN i del moment de la primera divisió embrionària que poden oferir una informació complementària per la selecció de l'embrió a transferir.

1. La morfologia de PN té relació amb el posterior desenvolupament de l'embrió.
2. Malgrat no s'ha pogut definir un patró únic de bon pronòstic, la sincronia i simetria de PN són factors de bon pronòstic.
3. Existeix una relació entre la morfologia de PN i la dotació cromosòmica de l'embrió quan es realitza un PGS.
4. Existeix una relació entre la divisió primerenca dels embrions i el seu posterior desenvolupament embrionari fins a blastocist.
6. La dotació cromosòmica dels embrions presenta una correlació amb la divisió primerenca del zigot.
7. Els embrions provinents de zigots amb divisió primerenca presenten un increment en la seva taxa d'implantació i d'embaràs.





# 6. Glosari

aCGH: *array-comparative genomic hybridisation*

AMPC: adenosin-monofosfat cíclic

APC: complex promotor de l'anafase

ASEBIR: Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción

ATM: ataxia telangiectasia mutada

ATP: adenosin trifosfat

ATR: ataxia telangiectasia i Rad-3 associada

Ca<sup>2+</sup>: calci

CaMK II: proteïna quinasa II dependent de la calmodulina

Cdc2: *cell division cycle 2*

Cdc25: *cell division cycle 25*

CDK1: quinasa dependent de la ciclina 1

CGH: *comparative genomic hybridisation*

CICR: *calcium induced calcium release*

CP: corpuscle polar

CSF: factor citostàtic

CyB: ciclina B

DAG: Diacil-glicerol

DNA: àcid desoxiribonucleic

DNMT1: *DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1*

ESHRE: *European Society of Human Reproduction and Embryology*

FISH: *fluorescent in situ hybridization*

FIV: fecundació in vitro

FSH: hormona fol.licle estimulant

G1: fase G1 de la interfase o Growth phase o fase de creixement

G2: fase G2 de la interfase o fase pre-mitòtica de la interfase

GnRH: hormona lliberadora de gonadotrofina

HAT: histona acetil transferasa

ICSI: microinjecció espermàtica

IP3: Trifosfat de Inositol

K<sup>+</sup>: potasi

LH: hormona luteïnitzant

M: mitosis: fase del cicle celular M

MAPK: proteïna quinasa activadora de la mitosis

Mg<sup>2+</sup>: magnesi

MII: oòcit en metafase II

MPF: factor promotor de la maduració

mRNA : àcid ribonucleic missatger

Myt1: *Myelin transcription factor 1*

Na<sup>+</sup>: sodi

p53: factor de transcripció o proteïna tumoral p53

PCR: *polymerase chain reaction*

PGS: diagnòstic genètic preimplantacional per cribatge o screening d'aneuploidies

PGD: diagnòstic genètic preimplantacional

PIP2: Fosfatidil Inositol Bifosfat

PKA: proteïna quinasa AMPc dependent

PKC: proteïna quinasa C

PLC $\xi$ : isoenzima  $\xi$  de la fosfolipasa C

PN: pronucli

qPCR: *quantitative polymerase chain reaction*

RNA: àcid iribonucleic

S: fase S de la interfase o fase de Síntesis

SNP: *single nucleotide polymorphism microarrays*

TET: *ten-eleven translocation proteins*

TML: tecnologia morfocinètica de *time-lapse*

TRA: tècniques de reproducció assistida

ZP: Zona pel·lúcida

ZP2: glicoproteïna de la zona pel·lúcida 2

ZP3: glicoproteïna de la zona pel·lúcida 3



# 7. Bibliografía

## A

---

Aguilar J, Motato Y, Escribá MJ, Ojeda M, Muñoz E, Meseguer M. The human first cell cycle: impact on implantation. *Reprod Biomed Online* 2014;28:475-484.

Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi GJ, Mack C, Scott RT. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril*. 1999;71:836-842.

Alikani M, Calderon G, Tomkin G, Garrisi J, Kokot M, Cohen J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Hum Reprod*. 2000;15:2634-2643.

Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology: The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod* 2011;26:1270–1283.

Andeol, Y. Early transition in different animal species: implication for transition from maternal to zygotic control in development. *Roux's Arch Dev Biol* 1994;204:3-10.

Anton E, Vidal F, Blanco J. Interchromosomal effect analyses by sperm FISH: incidence and distribution among reorganization carriers. *Syst Biol Reprod Med*. 2011;57:268-278.

Asch R, Simerly C, Ord T, Ord VA, Schatten G. The stages at which human fertilization arrests: microtubule and chromosome configurations in inseminated oocytes which failed to complete fertilization and development in humans. *Hum Reprod* 1995;10:1897–1906.

ASEBIR. Cuadernos de embriología clínica II. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. 2a ed. Madrid: Gobalo; 2008.

Aydin S, Cinar O, Demir B, Korkmaz C, Ozdegirmenci O, Dilbaz S, Goktolga U. Is pronuclear scoring a really good predictor for ICSI cycles? *Gynecol Endocrinol* 2011;27:742–747.

Azzarello A, Hoest T, Mikkelsen AL. The impact of pronuclei morphology and dynamicity on live birth outcome after time-lapse culture. *Hum Reprod* 2012;27:2649-2657.

## B

---

Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1998;13:3431-3433.

Balaban B, Urman B, Isiklar A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R, Mumcu A, Nuhoglu A. The effect of pronuclear morphology on embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome. *Hum Reprod* 2001;16:2357–2361.

Balaban B, Yakin K, Urman B, Isiklar A, Tesarik J: Pronuclear morphology predicts embryo development and chromosome constitution. *Reprod Biomed Online* 2004;8:695–700.

Balakier H, MacLusky NJ, Casper RF. Characterization of the first cell cycle in human zygotes: implications for cryopreservation. *Fertil Steril* 1993a; 59:359-365.

Balakier H, Squire J, Casper RF. Characterization of abnormal pronuclear human oocytes by morphology, cytogenetics and in-situ hybridization. *Hum Reprod* 1993b; 8: 402-408.

Bartek, J and Lukas, J. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19:238–245.

Basile N, Nogales Mdel C, Bronet F, Florensa M, Riqueiros M, Rodrigo L, García-Velasco J, Meseguer M. Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis. *Fertil Steril*. 2014;101:699-704.

Basile N, Vime P, Florensa M, Aparicio Ruiz B, García Velasco JA, Remohí J, Meseguer M. The use of morphokinetics as a predictor of implantation: a multicentric study to define and validate an algorithm for embryo selection. *Hum Reprod*. 2015;30:276-283.

Bassermann F, Frescas D, Guardavaccaro D, Busino L, Peschiaroli, A, Pagano M. The Cdc14B-Cdh1-Plk1 axis controls the G2 DNA-damage-response checkpoint. *Cell* 2008;134: 256–267.

Berger DS, Zapantis A, Merhi Z, Younger J, Polotsky AJ, Jindal SK. Embryo quality but not pronuclear score is associated with clinical pregnancy following IVF. *J Assist Reprod Genet*. 2014;31:279-283.

Blockeel C, Schutyser V, De Vos A, Verpoest W, De Vos M, Staessen C, Haentjens P, Van der Elst J, Devroey P. Prospectively randomized controlled trial of PGS in IVF/ICSI patients with poor implantation. *Reprod Biomed Online* 2008;17:848–854.

Boada M, Carrera M, De La Iglesia C, Sandalinas M, Barri PN, Veiga A. Successful use of a laser for human embryo biopsy in preimplantation genetic diagnosis: report of two cases. *J Assist Reprod Genet.* 1998;15:302-307.

Boada M and Ponsà M. Características morfológicas y ultraestructurales de cigotos y embriones anormales tras FIV / ICSI. *Revista ASEBIR* 2008; 13: 26-37.

Boada M, Gil Y, Mateo S, Joda L, Barri PN, Veiga A. Morphokinetic differences on embryo development after normal or abnormal fertilization. *Fertil Steril* 2012;98:S159.

Boué S, Paramonov I, Barrero MJ, Izpisua Belmonte JC. Analysis of human and mouse reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. What is in the plate? *PLoS ONE* 2010;5:e12664.

Boutros R, Lobjois V, Ducommun B. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? good targets? *Nat Rev Cancer* 2007;7:495–507.

Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature.* 1988;31:332:459-461.

Brezinova J, Oborna I, Svobodova M, Fingerova H. Evaluation of day one embryo quality and IVF outcome—a comparison of two scoring systems. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;3:7–9.

## C

---

Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Hickman CF. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reprod Biomed Online.* 2013;26:477-485.

Campos G, Parriego M, Vidal F, Coroleu B, Veiga A. Análisis cromosómico y potencial de desarrollo de cigotos monopronucleares y apronucleares *Revista Iberoamericana de Fertilidad* 2007;24:1:29-34.

- Capmany G, Taylor A, Braude PR, Bolton VN. The timing of pronuclear formation, DNA synthesis and cleavage in the human 1-cell embryo. *Mol Hum Reprod* 1996;2:299-306.
- Carroll J, Swann K, Whittingham D, Whitaker M. Spatiotemporal dynamics of intracellular  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations during the growth and meiotic maturation of mouse oocytes. *Development* 1994;120:3507-3517.
- Cerda MC, Berríos S, Fernández-Donoso R, Garagna S, Redi C. Organisation of complex nuclear domains in somatic mouse cells. *Biol Cell*. 1999;91:55-65.
- Chamayou S, Ragolia A, Alecci C, Storaci G, Maglia E, Russo E, Guglielmino A. Meiotic spindle presence and oocyte morphology do not predict clinical ICSI outcomes: a study of 967 transferred embryos. *Reprod BioMed Online* 2006;13:661–667.
- Chamayou S, Patrizio P, Storaci G, Tomaselli V, Alecci C, Ragolia C, Crescenzo C, Guglielmino A. The use of morphokinetic parameters to select all embryos with full capacity to implant. *J Assist Reprod Genet*. 2013;30:703-710.
- Chávez SL, Loewke KE, Han J, Moussavi F, Colls P, Munné S, Behr B, Reijo Pera RA. Dynamic blastomere behaviour reflects human embryo ploidy by the four-cell stage. *Nat Commun*. 2012;3:1251.
- Chávez SL, McElroy SL, Bossert NL, De Jonge CJ, Rodriguez MV, Leong DE, Behr B, Westphal LM, Reijo Pera RA. Comparison of epigenetic mediator expression and function in mouse and human embryonic blastomeres. *Hum Mol Genet*. 2014;15;23:4970-4984.
- Checa MA, Alonso-Coello P, Solà I, Robles A, Carreras R, Balasch J. IVF/ICSI with or without preimplantation genetic screening for aneuploidy in couples without genetic disorders: a systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet*. 2009;26:273-283.
- Chen CK, Shen GY, Horng SG, Wang CW, Huang HY, Wang HS, Soong YK. The relationship of pronuclear stage morphology and chromosome status at cleavage stage. *J Assist Reprod Genet*. 2003;20:413-420.
- Chen CK, Kattera S: Comparison of pronuclear zygote morphology and early cleavage status of zygotes as additional criteria in the selection of day 3 embryos: a randomized study. *Fertil Steril* 2006;85:347–352.



Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*. 2010;22;40:179-204.

Ciotti PM, Notarangelo L, Morselli-Labate AM, Felletti V, Porcu E, Venturoli S. First polar body morphology before ICSI is not related to embryo quality or pregnancy rate. *Hum Reprod*. 2004;19:2334-2339.

Ciray HN, Karagenc L, Ulug U, Bener F, Bahçeci M. Early cleavage morphology affects the quality and implantation potential of day 3 embryos. *Fertil Steril* 2006;85:358-365.

Colls P, Escudero T, Cekleniak N, Sadowy S, Cohen J, Munné S. Increased efficiency of preimplantation genetic diagnosis for infertility using 'no result rescue'. *Fertil Steril* 2007;88:53-61.

Coticchio G, Sciajno R, Hutt K, Bromfield J, Borini A, Albertini DF. Comparative analysis of the metaphase II spindle of human oocytes through polarized light and high-performance confocal microscopy. *Fertil Steril*. 2010;93:2056-2064.

Cutting R, Morroll D, Roberts SA, Pickering S, Rutherford A; BFS and ACE. Elective single embryo transfer: guidelines for practice British Fertility Society and Association of Clinical Embryologists. *Hum Fertil (Camb)*. 2008;11:131-146

## D

---

Davies S, Christopikou D, Tsorva E, Karagianni A, Handyside AH, Mastrominas M, Delayed cleavage divisions and a prolonged transition between 2- and 4-cell stages in embryos identified as aneuploid at the 8-cell stage by array CGH. *Hum. Reprod*. 2012;27: O-217.

De Boer KA, Catt JW, Jansen RP, Leigh D, McArthur S. Moving to blastocyst biopsy for preimplantation genetic diagnosis and single embryo transfer at Sydney IVF. *Fertil Steril*. 2004;82:295-298.

De las Heras M, Arroyo G, Boada M, Coroleu, B, Veiga, A. División embrionaria (EC) en transferencias únicas (SET). *Rev Iberoam. Fertil*. 2009;26:213-223.

De los Santos MJ, Arroyo G, Busquet A, Calderón G, Cuadros J, Hurtado de Mendoza MV, Moragas M, Herrer R, Ortiz A, Pons C, Ten J, Vilches MA, Figueroa MJ, ASEBIR Interest Group in Embryology. A multicenter prospective study to assess the effect of early cleavage on embryo quality, implantation, and live birth rate. *Fertil Steril* 2014;101:981-987.

De Placido G, Wilding M, Strina I, Alviggi E, Alviggi C, Mollo A, Varicchio MT, Tolino A, Schiattarella C, Dale B: High outcome predictability after IVF using a combined score for zygote and embryo morphology and growth rate. *Hum Reprod* 2002;17:2402–2409.

De Santis L, Cino I, Rabellotti E, Calzi F, Persico P, Borini A, Coticchio G. Polar body morphology and spindle imaging as predictors of oocyte quality. *Reproductive BioMedicine Online* 2005;11:36–42.

De Sutter P, Dozortsev D, Qian C, Dhont M. Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1996;11:595-597.

Debrock S, Melotte C, Spiessens C, Peeraer K, Vanneste E, Meeuwis L, Meuleman C, Frijns JP, Vermeesch JR, D'Hooghe TM. Preimplantation genetic screening for aneuploidy of embryos after in vitro fertilization in women aged at least 35 years: a prospective randomized trial. *Fertil Steril* 2009;93:364–373.

Derhaag JG, Coonen E, Bras M, Bergers Janssen JM, Ignoul-Vanvuchelen R, Geraedts JP, Evers JL, Dumoulin JC. Chromosomally abnormal cells are not selected for the extra-embryonic compartment of the human preimplantation embryo at the blastocyst stage. *Hum Reprod.* 2003;18:2565-2574.

Dokras A, Ross C, Gosden B, Sargent IL, Barlow DH. Micromanipulation of human embryos to assist hatching. *Fertil Steril.* 1994;61:514-520.

Donoso P, Staessen C, Fauser BCJM, Devroey P. Current value of preimplantation genetic aneuploidy screening in IVF. *Hum Reprod Update* 2007;13:15–25.

Ducibella T, Kurasawa S, Rangarajan S, Kopf GS, Schultz RM. Precocious loss of cortical granules during mouse oocyte meiotic maturation and correlation with an egg-induced modification of the zona pellucida. *Dev Biol* 1990;137:46-55.

Ducibella T. The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes. *Hum Reprod Update* 1996;2:29-42.

Dumollard R, Marangos P, Fitzharris G, Swann K, Duchen M, Carroll J. Sperm-triggered  $[Ca^{2+}]$  oscillations and  $Ca^{2+}$  homeostasis in the mouse egg have an absolute requirement for mitochondrial ATP production. *Development* 2004;131:3057-3067.

## E

---

Ebner T, Moser M, Yaman C, Feichtinger O, Hartl J, Tews G. Elective transfer of embryos selected on the basis of first polar body morphology is associated with increased rates of implantation and pregnancy. *Fertil Steril.* 1999;72:599-603.

Ebner T, Yaman C, Moser M. Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection *Human Reproduction* 2000;15:427-430.

Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Yaman C, Pfeleger U, Tews G. First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. *Hum Reprod* 2002;17:2415-2418.

Edwards RG, Fishel SB, Cohen J, Fehilly CB, Purdy JM, Slater JM, Steptoe PC, Webster JM Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1984;1:3-23.

Egozcue J, Blanco J, Vidal F. Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Hum Reprod Update.* 1997;3:441-452.

Egozcue S, Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Egozcue J. Increased incidence of meiotic anomalies in oligoasthenozoospermic males preselected for intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet.* 2000;17:307-309.

Eichenlaub-Ritter U, Stahl A, Luciani JM. The microtubular cytoskeleton and chromosomes of unfertilized human oocytes aged in Vitro. *Hum Genet* 1988;80:259–264.

Emiliani S, Fasano G, Vandamme B, Vannin AS, Vannin AS, Verdoodt M, Biramane J, Delbaere A, Englert Y, Devreker F. Impact of the assessment of early cleavage in a single embryo transfer policy. *Reprod Biomed Online* 2006;13:255-260.

Eroglu A, Layman LC. Role of ART in imprinting disorders. *Semin Reprod Med.* 2012;30:92-104.

Evsikov S and Verlinsky Y. Mosaicism in the inner cell mass of human blastocysts. *Hum Reprod.* 1998;13:3151-3155.

## F

---

Fang C, Tang M, Li T, Peng WL, Zhou CQ, Zhuang GL, Leong M. Visualization of meiotic spindle and subsequent embryo development in in-vitro and in-vivo matured human oocytes. *J Ass Reprod Genet* 2007; 24, 547-551.

Farquhar C, Rishworth JR, Brown J, Nelen WL, Marjoribanks J. Assisted reproductive technology: an overview of Cochrane Reviews. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013; 22;8:CD010537.

Findikli N, Kahraman S, Kumtepe Y, Donmez E, Biricik A, Sertyel S, Berkil H, Melil S. Embryo development characteristics in Robertsonian and reciprocal translocations: a comparison of results with non-translocation cases. *Reprod Biomed Online*. 2003;7:563-571.

Fiorentino F, Spizzichino L, Bono S, Biricik A, Kokkali G, Rienzi L, Ubaldi FM, Iammarrone E, Gordon A, Pantos K. PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. *Hum Reprod*. 2011;26:1925-1935.

Flaherty SP, Payne D, Swann NJ, Mattews CD. Aetiology of failed and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1995;10:2623–2629.

Fragouli E, Alfarawati S, Daphnis DD, Goodall NN, Mania A, Griffiths T, Gordon A, Wells D. Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: scientific data and technical evaluation. *Hum Reprod* 2011;26:480–490.

## G

---

Gabrielsen A, Lindenberg S, Petersen K. The impact of the zona pellucida thickness variation of human embryos on pregnancy outcome in relation to suboptimal embryo development. A prospective randomized controlled study. *Hum Reprod*. 2001;16:2166-2170.

Gallicano GI, McGaughey RW, Capco DG. Protein kinase M, the cytosolic counterpart of protein kinase C, remodels the internal cytoskeleton of the mammalian egg during activation. *Dev Biol* 1995;167:482-501.

Gallicano GI, McGaughey RW, Capco DG. Activation of protein kinase C after fertilization is required for remodeling the mouse egg into the zygote. *Mol Reprod Dev*. 1997;46: 587-601.

Gámiz P, Rubio C, de los Santos MJ, Mercader A, Simón C, Remohí J, Pellicer A. The effect of pronuclear morphology on early development and chromosomal abnormalities in cleavage-stage embryos. *Hum Reprod.* 2003;18:2413-2419.

Gardner RL. The early blastocyst is bilaterally symmetrical and its axis of symmetry is aligned with the animal-vegetal axis of the zygote in the mouse. *Development.* 1997;124:289-301.

Gardner RL. The axis of polarity of the mouse blastocyst is specified before blastulation and independently of the zona pellucida. *Hum Reprod.* 2007;22:798-806.

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munné S, Balicchia B, Escudero T, Crippa A. Possible interchromosomal effect in embryos generated by gametes from translocation carriers. *Hum Reprod.* 2002;17:3201-3207.

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fortini D, Grieco N: Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. *Fertil Steril* 2003;80:341–349.

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Lappi M, Borghi E, Ermini B: Oocyte euploidy, pronuclear zygote morphology and embryo chromosomal complement. *Hum Reprod* 2007;22:241–249.

Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, Hans E, Spach JL, Salzmänn J, Roulier R. Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Hum Reprod.* 1995;10:2427-2431.

Giorgetti C, Hans E, Terriou P, Salzmänn J, Barry B, Chabert-Orsini V, Chinchole JM, Franquebalme JP, Glowaczower E, Sitri MC, Thibault MC, Roulier R. Early cleavage: an additional predictor of high implantation rate following elective single embryo transfer. *Reprod Biomed Online* 2007;14:85-91.

Goossens V, Harton G, Moutou C, Traeger-Synodinos J, Van Rij M, Harper JC. ESHRE PGD Consortium data collection IX: cycles from January to December 2006 with pregnancy follow-up to October 2007. *Hum Reprod* 2009;24:1786–1810,

Grossmann M, Calafell JM, Brandy N, Vanrell JA, Rubio C, Pellicer A, Egozcue J, Vidal F, Santaló J. Origin of triprounucleate zygotes after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1997;12:2762-2765.

Guanti G, Zuffardi O, Tiepolo L. rDNA levels in infertile male carriers of Robertsonian translocations. *Cytogenet Cell Genet.* 1980;27:162-167.

Guérif F, Le Gouge A, Giraudeau B, Poindron J, Bidault R, Gasnier O, Royere D. Limited value of morphological assessment at days 1 and 2 to predict blastocyst development potential: a prospective study based on 4042 embryos. *Hum Reprod* 2007;22:1973–1981.

Gutiérrez-Mateo C, Colls P, Sánchez-García J, Escudero T, Prates R, Ketterson K, Wells D, Munné S. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertil Steril*. 2011;95:953-958.

## H

---

Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990;344(6268):768–770.

Handyside AH, Harton GL, Mariani B, Thornhill AR, Affara N, Shaw MA, Griffin DK. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *J Med Genet* 2010;47:651–658.

Hardarson T, Hanson C, Sjögren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod*. 2001;16:313-318.

Hardarson T, Löfman C, Coull G, Sjögren A, Hamberger L, Edwards RG. Internalization of cellular fragments in a human embryo: time-lapse recordings. *Reprod Biomed Online*. 2002;5:36-38.

Hardarson T, Hanson C, Lundin K, Hillensjö T, Nilsson L, Stevic J, Reismer E, Borg K, Wikland M, Bergh C. Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2008;23:2806–2812.

Hardarson T, Ahlström A, Rogberg L, Botros L, Hillensjö T, Westlander G, Sakkas D, Wikland M. Non-invasive metabolomic profiling of Day 2 and 5 embryo culture medium: a prospective randomized trial. *Hum Reprod*. 2012;27: 89-96.

Hassold T and Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Reviews Genetics* 2001;2:280–291.

## I

---

Ivec M, Kovacic B, Vlaisavljevic V. Prediction of human blastocyst development from morulas with delayed and/or incomplete compaction. *Fertil Steril*. 2011;96:1473-1478.

## J

---

James AN, Hennessy S, Reggio B, Wiemer K, Larsen F, Cohen J: The limited importance of pronuclear scoring of human zygotes. *Hum Reprod* 2006;21:1599–1604.

Jansen RP, Bowman MC, de Boer KA, Leigh DA, Lieberman DB, McArthur SJ. What next for preimplantation genetic screening (PGS)? Experience with blastocyst biopsy and testing for aneuploidy. *Hum Reprod* 2008;23:1476–1478.

Jaroudi K, Al-Hassan S, Sieck U, Al-Sufyan H, Al-Kabra M, Coskun S. Zygote transfer on day 1 versus cleavage stage embryo transfer on day 3: a prospective randomized trial. *Hum Reprod*. 2004;19:645-648.

## K

---

Kahraman S, Yakin K, Dönmez E, Samli H, Bahçe M, Cengiz G, Sertyel S, Samli M, Imirzalıoğlu N. Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 2000;15:2390-2393.

Kahraman S, Kumtepe Y, Sertyel S, Dönmez E, Benkhalifa M, Findikli N, Vanderzwalmen P. Pronuclear morphology scoring and chromosomal status of embryos in severe male infertility. *Hum Reprod* 2002;17:3193-3200.

Kilani S and Chapman MG. Meiotic spindle normality predicts live birth in patients with recurrent in vitro fertilization failure. *Fertil Steril* 2014;101:403-406.

Kilani Z, Magli M, Qaddomi E, Ferraretti A, Shaban M, Crippa A, Haj Hassan L, Shenfield F, Gianaroli L. Chromosome analysis in embryos from young patients with previous parity. *Reprod Biomed Online*. 2014;29:333-339.

Kirkegaard K, Kesmodel US, Hindkjær JJ, Ingerslev HJ. Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: a prospective cohort study *Hum Reprod* 2013;28:2643–2651.

Kleijkers SH, van Montfoort AP, Smits LJ, Viechtbauer W, Roseboom TJ, Nelissen EC, Coonen E, Derhaag JG, Bastings L, Schreurs IE, Evers JL, Dumoulin JC. IVF culture medium affects post-natal weight in humans during the first 2 years of life. *Hum Reprod*. 2014;29:661-669.

Krisher RL. The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci*. 2004;82 E-Suppl:E14-23.

## L

---

Lan KC, Huang FJ, Lin YC, Kung FT, Hsieh CH, Huang HW, Tan PH, Chang SY. The predictive value of using a combined Z-score and day 3 embryo morphology score in the assessment of embryo survival on day 5. *Hum Reprod* 2003;18:1299–1306.

Latham KE, Garrels JI, Chang C, Solter D. Quantitative analysis of protein synthesis in mouse embryos. I. Extensive reprogramming at the one- and two-cell stages. *Development*. 1991;112:921-932.

Lechleiter JD, John LM, Camacho P. Ca<sup>2+</sup> wave dispersion and spiral wave entrainment in *Xenopus laevis* oocytes overexpressing Ca<sup>2+</sup> ATPases. *Biophys Chem*. 1998;5:72:123-129.

Lee SW, Hu YS, Hu LF, Lu Q, Dawe GS, Moore PK, Wong PT, Bian JS. Hydrogen sulphide regulates calcium homeostasis in microglial cells. *Glia*. 2006;54:116-124.

Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2008;17:385-391.

Levi M, Kaplan-Kraicer R, Shalgi R. Regulation of division in mammalian oocytes: implications for polar body formation. *Mol Hum Reprod* 2011;17:328-334.

Levron J, Munné S, Willadsen S, Rosenwaks Z, Cohen J. Male and female genomes associated in a single pronucleus in human zygotes. *Biology of Reproduction* 1995;52:653-657.

Lorca T, Cruzalegui FH, Fesquet D, Cavadore JC, Mery J, Means A, Doree M. Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature* 1993;366:270 – 273.



Ludwig M, Schopper B, Al-Hasani S and Dietrich K: Clinical use of a pronuclear stage score following intracytoplasmic sperm injection: impact on pregnancy rates under the conditions of the German embryo law. *Hum Reprod* 2000;15:325-329.

Luna M, Copperman AB, Duke M, Ezcurra D, Sandler B, Barritt J. Human blastocyst morphological quality is significantly improved in embryos classified as fast on day 3 ( $\geq 10$  cells), bringing into question current embryological dogma. *Fertil Steril*. 2008;89:358-363.

## M

---

Madaschi C, Carvalho de Souza Bonetti T, Paes de Almeida Ferreira Braga D, Pasqualotto FF, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Spindle imaging: a marker for embryo development and implantation. *Fertil Steril* 2008;90:194-198.

Magli MC, Gianaroli L, Munné S, Ferraretti AP. Incidence of chromosomal abnormalities from a morphologically normal cohort of embryos in poor-prognosis patients. *J Assist Reprod Genet*. 1998;15:297-301.

Magli MC, Jones GM, Gras L, Gianaroli L, Korman I, Trounson AO. Chromosome mosaicism in day 3 aneuploid embryos that develop to morphologically normal blastocysts in vitro. *Hum Reprod*. 2000;15:1781-1786.

Magli MC, Sandalinas M, Escudero T, Morrison L, Ferraretti AP, Gianaroli L, Munné S. Double locus analysis of chromosome 21 for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Prenat Diagn* 2001;21:1080-1085.

Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Lappi M, Ruberti A, Farfalli V. Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. *Fertil Steril*. 2007;87:534-541.

Magli MC, Jones GM, Lundin K, van den Abbeel E. Atlas of human embryology: from oocytes to preimplantation embryos. *Hum Reprod*. 2012;27 Suppl 1:i1.

Mailhes JB and Yuan ZP. Differential sensitivity of mouse oocyte to Colchane-induced aneuploidy. *Environ Mol Mutagen* 1987;10:183-189.

Malcuit C, Kurokawa M, Fissore RA. Calcium oscillations and mammalian egg activation. *J Cell Physiol*. 2006;206:565-573.

Martin C, Brochard V, Migné C, Zink D, Debey P, Beaujean N. Architectural reorganization of the nuclei upon transfer into oocytes accompanies genome reprogramming. *Mol Reprod Dev* 2006;73:1102-1111.

Martin, R. The risk of chromosomal abnormalities following ICSI. *Hum Reprod* 1996;11:924-925.

Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, Vogel NE, Arts EG, de Vries JW, Bossuyt PM, Buys CH, Heineman MJ, Repping S, van der Veen F. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med* 2007;357:9-17.

Mateo S, Parriego M, Boada M, Vidal F, Coroleu B, Veiga A. In vitro development and chromosome constitution of embryos derived from monopronucleated zygotes after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2013;1;99:897-902.

Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 2000;403:501-502.

McLay DW and Clarke HJ. The ability to organize sperm DNA into functional chromatin is acquired during meiotic maturation in murine oocytes. *Developmental Biology* 1997;186:73-84.

Meriano J, Clark C, Cadesky K, Laskin CA. Binucleated and micronucleated blastomeres in embryos derived from human assisted reproduction cycles. *Reprod Biomed Online*. 2004;9:511-520.

Mersereau JE, Pergament E, Zhang X, Milad MP. Preimplantation genetic screening to improve in vitro fertilization pregnancy rates: a prospective randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2008; 90:1287-1289.

Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, Ramsing NB, Remohí J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod*. 2011;26:58-71.

Meulmeester, E and Jochemsen, AG. p53: a guide to apoptosis. *Curr Cancer Drug Targets* 2008;8:87-97.

Meyer LR, Klipstein S, Hazlett WD, Nasta T, Mangan P, Karande VC. A prospective randomized controlled trial of preimplantation genetic screening in the 'good prognosis' patient. *Fertil Steril* 2009;91:1731-1738.

Miao YL and Williams CJ. Calcium signaling in mammalian egg activation and embryo development: the influence of subcellular localization. *Mol Reprod Dev*. 2012;79:742-56.

Min JK, Claman P, Hughes E, Cheung AP, Claman P, Fluker M, Goodrow GJ, Graham J, Graves GR, Lapensée L, Min JK, Stewart S, Ward S, Chee-Man Wong B, Armson AB, Delisle MF, Farine D, Gagnon R, Keenan-Lindsay L, Morin V, Mundle W, Pressey T, Schneider C, Van Aerde J. (JOINT SOGC-CFAS) 2008 Guidelines for the number of embryos to transfer following in vitro fertilization No. 182, September 2006. *Int J Gynaecol Obstet.* 2008;102:203-16.

Mir P, Rodrigo L, Mateu E, Peinado V, Milán M, Mercader A, Buendía P, Delgado A, Pellicer A, Remohí J, Rubio C. Improving FISH diagnosis for preimplantation genetic aneuploidy screening. *Hum Reprod.* 2010;25:1812-1817.

Mirzayans R, Andrais B, Scott A, Murray D. New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012:170325.

Miyazaki S, Shirakawa H, Nakada K, Honda Y. Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ $Ca^{2+}$  release channel in  $Ca^{2+}$  waves and  $Ca^{2+}$  oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev Biol* 1993;158:62-78.

Monk M, Boubelik M, Lehnert S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development* 1987;99:371–382.

Montag M, van der Ven H, German Pronuclear Morphology Study Group: Evaluation of pronuclear morphology as the only selection criterion for further embryo culture and transfer: results of a prospective multicentre study. *Hum Reprod* 2001, 16:2384–2389.

Montag M, Schimming T, van der Ven H. Spindle imaging in human oocytes: the impact of the meiotic cell cycle. *Reprod BioMed Online* 2006; 12: 442–446.

Montag M, Schimming T, Köster M, Zhou C, Dorn C, Rösing B, van der Ven H, Ven der Ven K. Oocyte zona birefringence intensity is associated with embryonic implantation potential in ICSI cycles. *Reprod Biomed Online.* 2008;16:239-244.

Moon JH, Hyun CS, Lee SW, Son WY, Yoon SH, Lim JH. Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using the PolScope enables the prediction of embryonic developmental competence after ICSI. *Hum Reprod* 2003;18:817–820.

Morales P, Cross NL, Overstreet JW, Hanson FW Acrosome intact and acrosome-reacted human sperm can initiate binding to the zona pellucida. *Dev Biol* 1989; 133:385-92.

Munné S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod*. 1993;8:2185-2191.

Munné S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril*. 1995;64:382-391.

Munné S, Dailey T, Finkelstein M, Weier HU. Reduction in signal overlap results in increased FISH efficiency: implications for preimplantation genetic diagnosis. *J Assist Reprod Genet* 1996;13:149-156.

Munné S and Cohen J. Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod Update*. 1998;4:842-855.

Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Fung J, Gianaroli L, Cohen J. Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Fertil Steril*. 2000;73:1209-1218.

Munné S. Preimplantation genetic diagnosis of numerical and structural chromosome abnormalities. *Reprod Biomed Online*. 2002;4:183-96.

Munné S, Sandalinas M, Magli C, Gianaroli L, Cohen J, Warburton D. Increased rate of aneuploid embryos in young women with previous aneuploid conceptions. *Prenat Diagn*. 2004;24:638-643.

Munné S. Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. *Reprod Biomed Online* 2006;12:234-253.

Munné S, Chen S, Colls P, Garrisi J, Zheng X, Cekleniak N, Lenzi M, Hughes P, Fischer J, Garrisi M, Tomkin G, Cohen J. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. *Reprod Biomed Online*. 2007;14:628-634.

## N

---

Nagano A, Koga R, Ogawa M, Kurano Y, Kawada J, Okada R, Hayashi YK, Tsukahara T, Arahata K. Emerin deficiency at the nuclear membrane in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet*. 1996;12(3):254-9.

Nagy ZP, Liu J, Joris H, Devroey P and Van Steirteghem A. Time-course of oocyte activation, pronucleous formation and cleavage in human oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 1994;9:1743-1748.

Nagy ZP, Dozortsev D, Diamond M, Rienzi L, Ubaldi F, Abdelmassih R, Greco E. Pronuclear morphology evaluation with subsequent evaluation of embryo morphology significantly increases implantation rates. *Fertil Steril*. 2003;80:67-74.

Neuber E, Rinaudo P, Trimarchi JR, Sakkas D. Sequential assessment of individually cultured human embryos as an indicator of subsequent good quality blastocyst development. *Hum Reprod* 2003; 18:1307-1312.

Nicoli A, Valli B, Di Girolamo R, Di Tommaso B, Gallinelli A, La Sala GB. Limited importance of pre-embryo pronuclear morphology (zygote score) in assisted reproduction outcome in the absence of embryo cryopreservation. *Fertil Steril* 2007;88:1167–1173.

Nicoli A, Capodanno F, Moscato L, Rondini I, Villani MT, Tuzio A, La Sala GB. Analysis of pronuclear zygote configurations in 459 clinical pregnancies obtained with assisted reproductive technique procedures. *Reprod Biol Endocrinol* 2010; 8:77.

Northrop LE, Treff NR, Levy B, Scott RT Jr. SNP microarray based 24 chromosome aneuploidy screening demonstrates that cleavage stage FISH poorly predicts aneuploidy in embryos that develop to morphologically normal blastocysts. *Mol Hum Reprod* 2010;16:590–600.

## O

---

O'Shea LC, Mehta J, Lonergan P, Hensey C, Fair T. Developmental competence in oocytes and cumulus cells: candidate genes and networks. *Syst Biol Reprod Med*. 2012;58:88-101.

Oh JS, Han SJ, Conti M. WeeB, Myt1, and Cdc25 function in distinct compartments of the mouse oocyte to control meiotic resumption. *J. Cell Biol*. 2010;188: 199–207.

Oldenbourg R Polarized light microscopy of spindles. *Methods in Cellular Biology* 1999; 61:175–208.

Ooi SL and Henikoff S. Germline histone dynamics and epigenetics. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19:257–265.

O'Shea LC, Mehta J, Lonergan P, Hensey C, Fair T. Developmental competence in oocytes and cumulus cells: candidate genes and networks. *Syst Biol Reprod Med*. 2012;58:88-101.

Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, Dean W, Reik W, Walter J. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* 2000;20;10:475-478.

## P

---

Palermo G, Joris H, Derde MP, Camus M, Devroey P, Van Steirteghem A. Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 1993;59:826-835.

Palermo GD, Munné S, Colombero LT, Cohen J, Rosenwaks Z. Genetics of abnormal human fertilization. *Hum Reprod* 1995; 10 Suppl 1:120-127.

Pandian Z, Marjoribanks J, Ozturk O, Serour G, Bhattacharya S. Number of embryos for transfer following in vitro fertilisation or intra-cytoplasmic sperm injection. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;29:7:CD003416.

Parriego M, Nadal S, Boada M, Tuñón D, Mateo S, Coroleu B, Veiga, A. Evolución y análisis cromosómico de embriones multinucleados. VII Congreso ASEBIR; 2013 Noviembre 20-22; Sevilla, España.

Parrington J, Swann K, Shevchenko VI, Sesay AK, Lai FA. Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature* 1996; 25; 379(6563):364-368.

Payne JF, Raburn DJ, Couchman GM, Price TM, Jamison MG, Walmer DK. Relationship between pre-embryo pronuclear morphology (zygote score) and standard day 2 or 3 embryo morphology with regard to assisted reproductive technique outcomes. *Fertil Steril*. 2005;84:900-909.

Payne D, Flaherty SP, Barry MF and Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse cinematography. *Hum Reprod* 1997;12:532-541.

Pellestor F. The cytogenetic analysis of human zygotes and preimplantation embryos. *Hum Reprod Update* 1995;1:581-585.

Pérez S, Marcos J, Moya M, Vilorio T, Romero JL, De los Santos MJ, Meseguer M. La contracción de los blastocistos afecta negativamente al éxito reproductivo reduciendo su tasa de implantación; un estudio time-lapse. VII Congreso ASEBIR; 2013 Noviembre 20-22; Sevilla, España.

Picinato MC, Martins WP, Giorgenon RC, Santos CK, Ferriani RA, Navarro PA, de Sá Rosa-E-Silva AC. The impact of examining the meiotic spindle by polarization microscopy on assisted reproduction outcomes. *Fertil Steril*. 2014;101:379-384.

Pierce KE, Fitzgerald LM, Seibel MM, Zilberstein M. Preimplantation genetic diagnosis of chromosome balance in embryos from a patient with a balanced reciprocal translocation. *Mol Hum Reprod*. 1998;4:167-172.

Pirino, G., Wescott, M.P and Donovan, P.J. (2009). Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes. *Cell Cycle* 8, 665–670.

Plachot M, Mandelbaum J, Junca AM, de Grouchy J, Salat-Baroux J, Cohen J. Cytogenetic analysis and developmental capacity of normal and abnormal embryos after IVF. *Hum Reprod*. 1989;4:99-103.

Plachot M and Crozet N Fertilization abnormalities in human in vitro fertilization. *Human Reproduction* 1992;7:1:89-94.

Plachot M. Fertilization. *Hum Reprod*. 2000;15;4:19-30.

Poccia D and Collas P. Nuclear envelope dynamics during male pronuclear development. *Develop. Growth Differ* 1997;39:541-550.

## R

---

Racowsky C, Ohno-Machado L, Kim J, Biggers JD. Is there an advantage in scoring early embryos on more than one day? *Hum Reprod* 2009;24:2104-2113.

Racowsky C, Stern JE, Gibbons WE, Behr B, Pomeroy KO, Biggers JD. National collection of embryo morphology data into Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcomes Reporting System: associations among day 3 cell number, fragmentation and blastomere asymmetry, and live birth rate. *Fertil Steril*. 2011;95:1985-1989.

Rama Raju GA, Prakash GJ, Krishna KM, Madan K. Meiotic spindle and zona pellucida characteristics as predictors of embryonic development: a preliminary study using PolScope imaging. *Reprod BioMed Online* 2007;14:166–174.

Reichman DE, Jackson KV, Racowsky C. Incidence and development of zygotes exhibiting abnormal pronuclear disposition after identification of two pronuclei at the fertilization check. *Fertil Steril*. 2010;94:965-970.

Reinhardt HC and Yaffe MB. Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21:245–255.

Rienzi L, Ubaldi F, Martinez F, Iacobelli M, Minasi MG, Ferrero S, Tesarik J, Greco E. Relationship between meiotic spindle location with regard to polar body position and oocyte developmental potential after ICSI. *Hum Reprod* 2003;18:1289–1293.

Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Minasi MG, Romano S, Greco E. Meiotic spindle visualization in living human oocytes. *Reprod BioMed Online* 2005;10:192–198.

Rienzi L, Capalbo A, Stoppa M, Romano S, Maggiulli R, Albricci L, Scarica C, Farcomeni A, Vajta G, Ubaldi FM. No evidence of association between blastocyst aneuploidy and morphokinetic assessment in a selected population of poor-prognosis patients: a longitudinal cohort study. *Reprod Biomed Online*. 2015;30:57-66.

Rodrigo L, Mateu E, Mercader A, Buendía P, Remohí J, Pellicer A, Rubio C. Rescue of false monosomies in a PGD program using subtelomeric probes. In 12th International Conference on Prenatal Diagnose and Therapy, Budapest (Hungary), 2004. Final program and abstracts book, 32.

Rubio C, Rodrigo L, Mercader A, Mateu E, Buendía P, Pehlivan T, Vilorio T, De los Santos MJ, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Impact of chromosomal abnormalities on preimplantation embryo development. *Prenat Diagn*. 2007;27:748-756.

Rubio C, Buendía P, Rodrigo L, Mercader A, Mateu E, Peinado V, Delgado A, Milán M, Mir P, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Prognostic factors for preimplantation genetic screening in repeated pregnancy loss. *Reprod Biomed Online*. 2009;18:687-693.

Rubio I, Kuhlmann R, Agerholm I, Kirk J, Herrero J, Escribá MJ, Bellver J, Meseguer M. Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. *Fertil Steril*. 2012;98:1458-1463.



## S

---

Sadowy S, Tomkin G, Munné S, Ferrara-Congedo T, Cohen J. Impaired development of zygotes with uneven pronuclear size. *Zygote* 1998;6:137-141.

Sakkas D, Shoukir Y, Chardonens D, Bianchi PG, Campana A. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum Reprod* 1998; 13:182-187.

Salumets A, Hydén-Granskog C, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Hum Reprod* 2001;16:2177-2181.

Salumets A, Hydén-Granskog C, Mäkinen S, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum Reprod* 2003;18:821-825.

Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M, Calderon G, Cohen J, Munné S. Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Hum Reprod*. 2001;16:1954-1958.

Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* 2002; 241:172–182.

Sathananthan AH, Ng SC, Chia CM, Law HY, Edirisinghe WR, Ratnam SS. The origin and distribution of cortical granules in human oocytes with reference to Golgi, nucleolar, and microfilament activity. *Ann N Y Acad Sci*. 1985;442:251-264.

Sathananthan AH. Paternal centrosomal dynamics in early human development and infertility. *J Assist Reprod Genet* 1998;15:129-139.

Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG, Stevens J, Rawlins M, Munné S. Preimplantation aneuploidy testing for infertile patients of advanced maternal age: a randomized prospective trial. *Fertil Steril* 2009; 92:157–162.

Schübeler D, Lorincz MC, Cimborá DM, Telling A, Feng YQ, Bouhassira EE, Groudine M. Genomic targeting of methylated DNA: influence of methylation on transcription, replication, chromatin structure, and histone acetylation. *Mol Cell Biol* 2000;20:9103-9112.

Schultz RM and Kopf GS. Molecular basis of mammalian egg activation. *Curr Top Dev Biol.* 1995;30:21-62.

Schultz, RM. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Hum. Reprod. Update* 2002;8:323-331.

Schuster S, Marhl M, Höfer T. Modelling of simple and complex calcium oscillations. From single-cell responses to intercellular signalling. *Eur J Biochem.* 2002;269:1333-1355.

Scott L and Smith S. The successful of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Human Reproduction* 1998;13:1003-1013.

Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod.* 2000; 15: 2394-403.

Scott L. Pronuclear scoring as a predictor of embryo development. *Reprod Biomed Online* 2003;6:201–214.

Scott L, Finn A, O'Leary T, McLellan S, Hill J. Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates. *Hum Reprod.* 2007;22:230-240.

Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Khadum IM. Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1997;12:1267-1270.

Shen Y, Stalf T, Mehnert C, Eichenlaub-Ritter U, Tinneberg HR. High magnitude of light retardation by the zona pellucida is associated with conception cycles. *Hum Reprod* 2005;20;1596–1606.

Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod* 1997; 12:1531-1536.

Simpson JL and Bombard AT. Chromosomal abnormalities in spontaneous abortion: frequency, pathology and genetic counselling. In: Edmonds K, Bennett MJ, eds. *Spontaneous Abortion.* London, UK: Blackwell; 1987:51

Simpson JL. Randomized clinical trial in assessing PGS: necessary but not sufficient. *Hum Reprod* 2008;23:2179–2181.

Sjöblom P, Menezes J, Cummins L, Mathiyalagan B, Costello MF. Prediction of embryo developmental potential and pregnancy based on early stage morphological characteristics. *Fertil Steril* 2006;86:848–861.

Smith J, Tho LM, Xu N, Gillespie DA. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathway DNA damage signaling and cancer. *Adv.Cancer Res.* 2010;108;:73–112.

Solc P, Schultz RM, Motlik J. Prophase I arrest and progression to metaphase I in mouse oocytes: comparison of resumption of meiosis and recovery from G2 arrest in somatic cells. *Mol Hum Reprod* 2010;16: 654–664.

Spann TP, Moir RD, Goldman AE, Stick R, Goldman RD. Disruption of nuclear lamin organization alters the distribution of replication factors and inhibits DNA synthesis. *J Cell Biol* 1997; 24;136:1201-1212.

Staessen C, Janssenswillen C, Devroey P, Van Steirteghem AC. Cytogenetic and morphological observations of single pronucleated human oocytes after in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1993;8:221-223.

Staessen C and Van Steirteghem A. The chromosomal constitution of embryos developing from abnormally fertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection and conventional in-vitro fertilization. *Human Reproduction* 1997;12:321-327.

Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2004;19:2849–2858.

Staessen C, Verpoest W, Donoso P, Haentjens P, Van der Elst J, Liebaers I, Devroey P. Preimplantation genetic screening does not improve delivery rate in women under the age of 36 following single-embryo transfer. *Hum Reprod* 2008;23:2818–2825.

Stern C, Pertile M, Norris H, Hale L, Baker HW. Chromosome translocations in couples with in-vitro fertilization implantation failure. *Hum Reprod.* 1999;14:2097-2101.

Steuerwald NM, Steuerwald, MD, Mailhes JB. Post-ovulatory aging of mouse oocytes leads to decreased MAD2 transcripts and increased frequencies of premature centromere separation and anaphase. *Molec Hum Reprod* 2005;11:623–630.

Stöger R, Kubicka P, Liu C-G, Kafri T, Razin A Cedar H, Barlow DP. Maternal specific methylation of the imprinted mouse *Igf2r* locus identifies the expressed locus as carrying the imprinting signal. *Cell* 1993;73:61–71.

Sun QY. Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. *Microsc Res Tech*. 2003;61:342-348.

Swain JE and Smith GD. Mechanism of oocyte maturation. In *In-Vitro Maturation of Human Oocytes – Basic Science to Clinical Application*, 2007; pp 83–101. Eds SL Tan, RC Chian & WM Buckett. Oxon, UK: Informa Health.

Swann K, Windsor S, Campbell K, Elgmati K, Nomikos M, Zernicka-Goetz M, Amso N, Lai FA, Thomas A, Graham C. Phospholipase C- $\zeta$ -induced  $Ca^{2+}$  oscillations cause coincident cytoplasmic movements in human oocytes that failed to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2012; 97:742-747.

## T

---

Telford NA, Watson AJ, Schultz GA. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev*. 1990;26:90-100.

Ten J, Mendiola J, Vioque J, de Juan J, Bernabeu R. Donor oocyte dysmorphisms and their influence on fertilization and embryo quality. *Reprod Biomed Online*. 2007;14:40-48.

Tesarík J and Kopečný V. Nucleic acid synthesis and development of human male pronucleus. *J Reprod Fertil* 1989a ;86:549-58.

Tesarík J and Kopečný V. Assembly of the nucleolar precursor bodies in human male pronuclei is correlated with an early RNA synthetic activity. *Exp Cell Res*. 1990;191:153-156.

Tesarík J and Kopečný V. Development of human male pronucleus: ultrastructure and timing. *Gamete Res*. 1989b;24:135-149.

Tesarik J and Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Human Reproduction* 1999;14:1318-1323.

Tesarik J, Junca AM, Hazout A, Aubriot FX, Nathan C, Cohen-Bacrie P, Dumont-Hassan M. Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple, non-invasive examination of pronuclear morphology. *Hum Reprod.* 2000;15:1396-1399.

Tesarik J and Sousa M. Comparison of Ca<sup>2+</sup> responses in human oocytes fertilized by subzonal insemination and by intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1994;62:1197-1204.

Testart J, Gautier E, Brami C, Rolet F, Sedbon E, Thebault A. Intracytoplasmic sperm injection in infertile patients with structural chromosome abnormalities. *Hum Reprod.* 1996;11:2609-2612.

Tremblay KD, Saam JR, Ingram RS, Tilghman SM, Bartolomei MS. A paternal-specific methylation imprint marks the alleles of the mouse H19 gene. *Nat Genet* 1995;9:407-413.

Tunquist BJ and Maller JL. Under arrest: cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes Dev* 2003;17:683-710.

## U

---

Uher P, Baborova P, Kralickova M, Zech MH, Verlinsky Y, Zech NH. Non-informative results and monosomies in PGD: the importance of a third round of re-hybridization. *Reprod Biomed Online* 2009;19:539-546.

## V

---

Van Blerkom J and Henry G. Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. *Hum Reprod* 1992;7:379-390.

Van Blerkom J, Davis P, Merriam J, Sinclair J. Nuclear and cytoplasmic dynamics of sperm penetration, pronuclear formation and microtubule organization during fertilization and early preimplantation development in the human. *Hum Reprod Update* 1995;1:429-461.

Van Blerkom J, Davis P, Mathwig V, Alexander S. Domains of high-polarized and low-polarized mitochondria may occur in mouse and human oocytes and early embryos. *Hum Reprod.* 2002;17:393-406.

Van Montfoort AP, Dumoulin JC, Kester AD, Evers JL. Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. *Hum Reprod* 2004;19:2103-2108.

Vassena R, Mapletoft RJ, Allodi S, Singh J, Adams GP. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology* 2003;15;60:923-932.

Vassena R, Boué S, González-Roca E, Aran B, Auer H, Veiga A, Izpisua Belmonte JC. Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during human preimplantation development. *Development* 2011;138:3699-3709.

Veeck LL. The morphological assessment of human oocytes and early conception. In Keel, B.A. and Webster, R.W. (eds) *Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility*. Boca Raton, CRC Press, 1990; pp 353-369.

Veiga A, Sandalinas M, Benkhalifa M, Boada M, Carrera M, Santaló J, Barri PN, Ménéz Y. Laser blastocyst biopsy for preimplantation diagnosis in the human. *Zygote*. 1997;5:351-354.

Velilla E, Escudero T, Munné S. Blastomere fixation techniques and risk of misdiagnosis for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online* 2002;4:210–217.

Vogt E, Kirsch-Volders M, Parry J, Eichenlaub-Ritter U. Spindle formation, chromosome segregation and the spindle checkpoint in mammalian oocytes and susceptibility to meiotic error. *Mutat Res* 2008;12;65:114-129.

## W

---

Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Odenbourg R, Keefe DL. Limited recovery of meiotic spindles in living human oocytes after cooling–rearming observed using polarized light microscopy. *Hum Reprod* 2001;16: 2374–2378.

Werlin L, Rodi I, DeCherney A, Marelllo E, Hill D, Munné S. Preimplantation genetic diagnosis as both a therapeutic and diagnostic tool in assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2003; 80:467–468.

Wittemer C, Bettahar-Lebugle K, Ohl J, Rongières C, Nisand I, Gerlinger P. Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection. *Hum Reprod* 2000, 15:2591–2597.

Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM, Pera RAR. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to blastocyst stage. *Nat. Biotechnol.* 2010;28,1115–1121.

Wu XQ, Zhang X, Li XH, Cheng HH, Kuai YR, Wang S, Guo YL. Translocation of classical PKC and cortical granule exocytosis of human oocyte in germinal vesicle and metaphase II stage. *Acta Pharmacol Sin* 2006;27:1353-1358.

## X

---

Xia P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum Reprod*. 1997;12:1750-1755.

## Y

---

Yanagimachi R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* 1994;2:371-372.

## Z

---

Zamora RB, Sánchez RV, Pérez JG, Díaz RR, Quintana DB, Bethencourt JC. Human zygote morphological indicators of higher rate of arrest at the first cleavage stage. *Zygote* 2011, 19:339–344.

Zhang, H, Zhang, X, Clark, E, Mulcahey, M, Huang, S, Shi, YG. TET1 is a DNA-binding protein that modulates DNA methylation and gene transcription via hydroxylation of 5-methylcytosine. *Cell Res* 2010; 20:1390-1393.

Zernicka-Goetz M, Morris SA, Bruce AW. Making a firm decision: multifaceted regulation of cell fate in the early mouse embryo. *Nat Rev Genet*. 2009;10:467-477.

Zollner U, Zollner KP, Hartl G, Dietl J, Steck T. The use of a detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience. *Hum Reprod* 2002;17:1327–1333.

