



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**Zigots  
monopronucleats:  
origen,  
desenvolupament  
i constitució  
cromosòmica**

**Sílvia Mateo Cuadros**

**Tesi Doctoral**

**Novembre 2017**



ZIGOTS MONOPRONUCLEATS:  
ORIGEN, DESENVOLUPAMENT  
I CONSTITUCIÓ CROMOSÒMICA

Memòria presentada per Sílvia Mateo Cuadros per optar al  
grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona

Programa de Doctorat de Biologia Cel·lular

Sílvia Mateo Cuadros

Barcelona, Novembre 2017





La Dra. Francesca Vidal Domínguez, Catedràtica de Biologia Cel·lular del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, i la Dra. Montserrat Boada Palà, Directora dels Laboratoris de Reproducció Assistida del Servei de Medicina de la Reproducció del Departament d'Obstetrícia, Ginecologia i Reproducció de l'Hospital Universitari Dexeus.

CERTIFIQUEN que Sílvia Mateo Cuadros ha realitzat sota la seva direcció el treball de Tesi Doctoral titulat "Zigots monopronucleats: origen, desenvolupament i constitució cromosòmica".

Aquest treball s'ha dut a terme al Servei de Medicina de la Reproducció de l'Hospital Universitari Dexeus.

Barcelona, Novembre 2017.

Dra. Francesca Vidal Domínguez

Dra. Montserrat Boada Palà

Aquest treball s'ha realitzat amb l'ajut de la Càtedra d'Investigació en Obstetrícia i Ginecologia de l'Hospital Universitari Dexeus.

*Als meus pares,  
als qui dec el que sóc i tot el que he aconseguit.*

*A la Júlia, la Berta i el Javi,  
pel seu amor, que ho fa tot possible.*





# ÍNDIX

---

RESUM .....	3
ABSTRACT .....	5
ABREVIATURES I ACRÒNIMS.....	7
CAPÍTOL 1: INTRODUCCIÓ .....	11
1.1. FECUNDACIÓ EN L'ESPÈCIE HUMANA .....	12
1.1.1. Procés general .....	12
1.1.2. Alteracions en el procés de fecundació.....	14
1.1.3. Zigots monopronucleats.....	17
1.1.3.1. Origen i mecanismes de formació .....	18
1.1.3.2. Desenvolupament <i>in vitro</i> .....	21
1.1.3.3. Característiques citogenètiques .....	21
1.1.3.4. Implicacions en la pràctica clínica .....	22
1.2. SELECCIÓ EMBRIONÀRIA EN TÈCNiques DE REPRODUCCIÓ ASSISTIDA	23
1.2.1. Avaluació de la morfologia .....	23
1.2.2. Avaluació de la morfocinètica .....	25
1.2.3. Avaluació de la dotació cromosòmica .....	27
1.2.3.1. Biòpsia embrionària.....	28
1.2.3.2. Tècniques diagnòstiques per a cribratge d'aneuploidies.....	29
1.2.3.3. Anomalies cromosòmiques en les primeres etapes del desenvolupament embrionari.....	32
CAPÍTOL 2: HIPÒTESI INICIAL.....	37
CAPÍTOL 3: OBJECTIUS.....	41
CAPÍTOL 4: RESULTATS .....	45
4.1. <i>In vitro</i> development and chromosome constitution of embryos derived from monopronucleated zygotes after intracytoplasmic sperm injection ....	45
4.2. <i>Could monopronucleated ICSI zygotes be considered for transfer?     Analysis through time-lapse monitoring and PGS.....</i>	55

4.3. <i>Chromosomal analysis of blastocyst derived from monopronucleated ICSI zygotes: approach by double trophectoderm biopsy</i> .....	65
4.4. <i>Morphokinetics and developmental potential of monopronucleated ICSI zygotes</i> .....	73
CAPÍTOL 5: DISCUSSIÓ.....	103
5.1. ORIGEN DELS ZIGOTS MONOPRONUCLEATS D'ICSI.....	103
5.2. CONSTITUCIÓ CROMOSÒMICA DELS EMBRIONS DERIVATS DE ZIGOTS MONOPRONUCLEATS D'ICSI .....	104
5.3. DESENVOLUPAMENT <i>IN VITRO</i> DELS EMBRIONS DERIVATS DE ZIGOTS MONOPRONUCLEATS D'ICSI .....	105
5.3.1. Desenvolupament embrionari .....	105
5.3.2. Morfocinètica embrionària .....	106
5.4. UTILITZACIÓ AMB FINALITAT REPRODUCTIVA DELS EMBRIONS DERIVATS DE ZIGOTS MONOPRONUCLEATS D'ICSI .....	108
CAPÍTOL 6: CONCLUSIONS .....	113
CAPÍTOL 7: BIBLIOGRAFIA .....	117
AGRAÏMENTS .....	137

## RESUM

---

L'observació de zigots amb un únic pronucli (PN) i dos corpuscles polars (CP) en el moment de la valoració de la fecundació es dona entre el 3%-6% dels oòcits inseminats mitjançant injecció intracitoplasmàtica d'un espermatozoide (ICSI). La incertesa sobre el destí que se'ls ha de donar fa necessari un estudi del potencial reproductiu que poden tenir els embrions que se'n deriven. Així mateix, cal conèixer els riscos que poden derivar de la seva utilització. Per aquestes raons, el treball realitzat durant aquesta tesi doctoral ha estat centrat en l'estudi de la constitució cromosòmica i el desenvolupament *in vitro* dels zigots monopronucleats (1PN) amb 2CP provinents d'ICSI.

Els resultats obtinguts mostren que els embrions que provenen de zigots 1PN 2CP d'ICSI deriven majoritàriament d'un procés de fecundació amb participació del material genètic de l'espermatozoide. El major diàmetre de pronucli, observat en la majoria de zigots 1PN d'ICSI respecte als 2PN, es podria explicar per la formació d'un únic embolcall nuclear que englobés el material genètic, matern i patern, en una sola estructura pronuclear, i donaria suport a la hipòtesi de l'origen genètic biparental. No obstant, no es pot descartar que alguns embrions derivats de zigots monopronucleats d'ICSI presentin un genoma d'origen uniparental.

Els zigots 1PN 2CP d'ICSI mostren una menor capacitat de desenvolupament *in vitro* respecte als 2PN 2CP d'ICSI, observant-se un alt percentatge d'embrions que aturen el seu desenvolupament en estadis primerencs. Les taxes de zigots monopronucleats que assoleixen l'estadi de blastocist varien entre el 3,4%-28,9% essent inferiors a les observades en embrions derivats de zigots 2PN 2CP d'ICSI.

L'estudi de la morfocinètica dels zigots monopronucleats d'ICSI ha mostrat diferències en la cinètica de formació i desaparició del pronucli i en el retard de les primeres divisions embrionàries amb la dels embrions derivats de zigots 2PN. Malgrat tot, aquells zigots 1PN que formen blastocist tenen una cinètica similar a la dels blastocists provinents de zigots 2PN, excepte en el temps de compactació, que es veu retardat i perllongat.

L'estudi de la constitució cromosòmica dels embrions derivats de zigots 1PN 2CP d'ICSI ha demostrat que un alt percentatge d'aquests embrions són cromosòmicament anormals, amb un elevat grau de mosaïcisme. Els percentatges d'aneuploidia més elevats han estat observats en aquells embrions que bloquegen el desenvolupament *in vitro* en estadis primerencs, mentre que aquells que assoleixen l'estadi de blastocist presenten un major percentatge d'euploidia.

Els resultats obtinguts indiquen que els embrions derivats de zigots monopronucleats d'ICSI no han de ser mai la primera opció per a la transferència. La publicació del naixement d'una nena sana provinent d'un zigot monopronucleat analitzat genèticament obre una alternativa quan no es disposa d'altres embrions viables provinents de zigots 2PN 2CP. En aquests casos, l'anàlisi genètic seria obligat. Per tal de millorar els resultats i maximitzar el cost-benefici de l'anàlisi, l'estudi genètic dels embrions derivats de zigots 1PN d'ICSI hauria de realitzar-se en estadi de blastocists mitjançant tècniques que permetin l'anàlisi de la dotació cromosòmica i l'origen biparental. La transferència d'aquests embrions només podria ser considerada després d'una informació exhaustiva dels riscos i un assessorament reproductiu acurat.

## ABSTRACT

---

The observation of zygotes with a single pronucleus (PN) and two polar bodies (PB) at the moment of the fertilization check is about 3%-6% of the oocytes inseminated by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). The uncertainty about their use made it necessary to perform a study about the reproductive potential that the embryos derived from the monopronucleated (1PN) ICSI zygotes may have. Furthermore, there was a clear need to identify the risks associated with their use. For these reasons, the work performed during this doctoral thesis was focused on the study of the chromosomal constitution and the *in vitro* development of the monopronucleated zygotes with 2PB after ICSI.

The results obtained through the study show that embryos derived from the 1PN 2PB ICSI zygotes come mainly from a fertilization process with the participation of the sperm genetic material. The higher pronucleus diameter observed in the majority of the 1PN ICSI zygotes compared with the 2PN ones, could be explained by the formation of a single membrane that included the maternal and paternal genomes in a single pronucleus, which supports the hypothesis of a biparental origin. Even though, it is not possible to rule out that some embryos derived from the monopronucleated ICSI zygotes showed a uniparental genome.

The monopronucleated ICSI zygotes showed an impaired *in vitro* development with respect to the 2PN 2PB ICSI zygotes, displaying a high percentage of embryos that arrested their development at early stages. The monopronucleated zygotes that reached the blastocysts stage varied between 3.4% and 28.9%, the percentage being lower than of those coming from the 2PN 2PB ICSI zygotes.

The morphokinetic study of the monopronucleated ICSI zygotes showed differences in the pronuclear appearance and the fading kinetics as well as slowed cleavage in the first embryonic stages compared with the 2PN zygotes. However, with the exception of compaction time, which appeared to be delayed and elongated, those 1PN zygotes that achieved the blastocyst stage had similar kinetic behaviour to the blastocysts coming from the 2PN zygotes.

The study of chromosomal constitution of embryos coming from 1PN 2PB ICSI zygotes showed that a high percentage of these embryos were chromosomally abnormal, displaying a high rate of mosaicism. The higher rate of aneuploidy

was observed in the embryos that arrested their development at early stages, while those embryos that achieved the blastocyst stage showed a higher euploidy rate.

The results obtained show that the embryos derived from the monopronucleated ICSI zygotes should never be the first choice for embryo transfer. The publication of the birth of a healthy baby coming from a monopronucleated ICSI zygote after a genetic analysis opens an alternative when no other embryos coming from the 2PN 2PB zygotes are available. In these cases, the genetic analysis has to be mandatory. In order to improve the results and maximise the cost-benefit of the analysis, the genetic study of embryos derived from the 1PN ICSI zygotes should be performed at the blastocyst stage by techniques that allow a comprehensive chromosomal screening and the confirmation of the biparental origin. The transfer of these embryos should only be considered after exhaustive information on the associated risks and accurate reproductive counsel.

## ABREVIATURES I ACRÒNIMS

---

1PN	Zigot monopronucleat
aCGH	<i>Array CGH</i>
aSNP	<i>Array Single-Nucleotide Polymorphism</i>
CCS	<i>Comprehensive Chromosome Screening</i>
CGH	<i>Chromosomic Genome Hybridization</i>
CP	Corpuscle Polar
D+2/D+3/D+5	Segon/tercer/cinquè dia de desenvolupament <i>in vitro</i>
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DUP	Disomia Uniparental
EC	<i>Early Cleavage</i>
FISH	<i>Fluorescent In Situ Hybridization</i>
FIV	Fecundació <i>In Vitro</i>
FIVc	Fecundació <i>in vitro</i> convencional
Hpi	Hores post inseminació
ICSI	<i>Intracytoplasmic Sperm Injection</i>
MCI	Massa Cel·lular Interna
MTOC	<i>MicroTubul-Organizing Center</i>
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGD	<i>Preimplantation Genetic Diagnosis</i>
PGS	<i>Preimplantation Genetic Screening</i>
PN	Pronucli
qPCR	<i>Real-time quantitative PCR</i>
TE	Trofectoriderma
TL	<i>Time-Lapse</i>
TRA	Tècniques de Reproducció Assistida
ZP	Zona Pel·lúcida





# CAPÍTOL 1

---



## INTRODUCCIÓ

---

La fecundació és el procés pel qual els gàmetes femení i masculí s'uneixen per donar lloc a un nou embrió. L'observació de dos pronuclis (PN) i dos corpuscles polars (CP) després de la inseminació evidencia que el procés de fecundació s'ha produït correctament i els dos materials genètics, matern i patern, es troben junts formant el zigot.

Tot i que aquest és el patró de fecundació més àmpliament observat, n' existeixen d'altres, com la presència d'un o més pronuclis, que indiquen que la fecundació no s'ha donat correctament. Malgrat no ser els patrons habitualment observats, alguns d'ells podrien ser considerats amb finalitats reproductives, ja que els embrions que se'n deriven poden ser genèticament normals, com és el cas d'alguns zigots monopronucleats (1PN).

La correcta visualització dels pronuclis és un factor clau en el seguiment dels processos de fecundació *in vitro* (FIV). La valoració de la fecundació es realitza de manera rutinària en els laboratoris de FIV entre les 16 i 18 hores posteriors a la inseminació (hpi), clàssicament amb una observació puntual i més recentment mitjançant observacions seqüencials, gràcies a la incorporació de nous equips de monitorització dinàmica (*time-lapse*; TL).

L'estudi de la constitució cromosòmica dels embrions preimplantacionals, mitjançant l'ús de tècniques de diagnòstic genètic preimplantacional (PGD) i/o de cribratge d'aneuploidies (PGS), permet la selecció genètica d'embrions amb la finalitat de millorar els resultats dels cicles de FIV.

Les tècniques de cribratge d'aneuploidies, també poden ser emprades per a l'estudi dels embrions provinents de patrons pronuclears atípics. Mitjançant l'anàlisi genètic s'ha pogut entendre millor el mecanisme de formació del(s) pronucli(s) i les implicacions d'aquests processos anòmals en el futur desenvolupament de l'embrió, facilitant la presa de decisió final sobre l'ús reproductiu d'aquests embrions.

## 1. INTRODUCCIÓ

### 1.1. FECUNDACIÓ EN L'ESPÈCIE HUMANA

#### 1.1.1. Procés general

En l'espècie humana, la interacció de l'espermatozoide amb l'oòcit desencadena un seguit de senyals que activaran l'oòcit. La fusió de la membrana plasmàtica de l'espermatozoide amb la de l'oòcit produeix canvis que incrementen els nivells de  $Ca^{2+}$  intracel·lular. Aquests, provoquen l'exocitosi dels grànuls corticals situats pròxims a la membrana de l'oòcit alliberant enzims hidrolítics a l'espai perivitellí que modificaran les característiques físico-químiques de la zona pel·lúcida prevenint la polispèrmia. Per altra banda, les fluctuacions en els nivells de  $Ca^{2+}$  intracel·lular provoquen la represa de la meiosi completant la segona divisió meiótica en l'oòcit que finalitza amb l'extrusió del segon CP. El material genètic femení progressa a interfase i al seu voltant es comença a organitzar l'embolcall nuclear (Plachot *et al.*, 2000; Elder i Dale, 2011).

Paral·lelament, un cop dins l'ooplasma, el nucli de l'espermatozoide entra en contacte amb factors citoplasmàtics oocitaris que promouen el trencament dels ponts disulfur entre les protamines i la descondensació de la cromatina (Collas i Poccia, 1998; Wright, 1999; McLay i Clarke, 2003). Al voltant del material genètic masculí es comença a organitzar l'embolcall nuclear. L'aparició del PN masculí i femení és generalment sincrònica i la situació, en el cas del pronucli masculí, és normalment centrada, mentre que el pronucli femení apareix inicialment al costat del segon CP (Payne *et al.*, 1997; Elder i Dale, 2011). Un cop formats els PN, el centrosoma patern, proper al pronucli masculí, forma el centre organitzador de microtúbuls (MTOC). Des d'aquí, irradia l'àster de microtúbuls cap al PN femení, fent-lo migrar cap al centre de l'oòcit, situant els dos pronucis l'un oposat de l'altre (Asch *et al.*, 1995; Simerly *et al.*, 1995; Plachot *et al.*, 2000; Feenan i Herbert, 2006).

L'aparició dels PN suposa la transició cap a la fase G1 de la primera divisió mitòtica, seguida de la fase S o fase de replicació del DNA, que té lloc durant l'engrandiment i migració dels pronucis al centre de l'oòcit (Fig. 1). Els centríols paterns es dupliquen i se situen oposats en els pols del fus mitòtic previ al trencament i desaparició de les membranes dels PN. El desmantellament de les membranes pronuclears té lloc generalment de manera sincrònica al finalitzar la fase G2. Tot seguit, amb l'inici de la fase M, els cromosomes es condensen i s'alineen a la placa metafàsica. En aquest moment, es considera que s'ha produït la singàmia (Sathananthan, 1998). Durant l'anafase, les cromàtides germanes se separen i seguidament es produeix la citocinesi de la primera

divisió embrionària, donant com a resultat les dues primeres cèl·lules del nou embrió (Balakier *et al.*, 1993a; Sathananthan, 1998; Tesarik i Greco, 1999; Feenan i Herbert, 2006).

S'ha vist que en estadi de zigot, el pronucli masculí i femení presenten diferències en la metilació d'histones nucleosomals. En concret, Van Der Heijden i col·laboradors (2009) van confirmar que la asimetria en les marques de metilació de les lisines, entre les histones pronuclears H3 i H4, observada en ratolins (Van Der Heijden *et al.*, 2005), també es donava en l'espècie humana. Aquests patrons diferencials de metilació es mantenen fins després de la singàmia.

La cronologia dels diferents fenòmens que tenen lloc durant la fecundació i la primera divisió cel·lular s'ha reportat en diversos estudis. Així doncs, en l'espècie humana, la descondensació del cap de l'espermatozoide es dona prèviament a l'extrusió del segon corpuscle polar i que, en el moment de l'extrusió del segon CP i l'inici de formació dels pronuclis comença la fase G1 (Fig. 1). Generalment, la fase G1 s'inicia 3h posteriors a la inseminació i s'haurà completat en la majoria dels casos a les 14 hpi, amb una durada mitjana de 5-6 h. Sis hores posteriors a l'entrada de l'espermatozoide es forma l'àster de microtúbuls que fa migrar el pronucli femení, situant-lo oposat al masculí. Existeix una gran variabilitat pel que fa al moment en que els pronuclis es fan visibles (entre les 3 i 20 hpi), apareixent sincrònicament en la majoria dels casos, però també asincrònicament, majoritàriament en els zigots que provenen de inseminació convencional (FIVc). Entre les 8-14 hpi s'inicia la síntesi de DNA que finalitzarà entre les 14 i 24 hpi, amb una durada d'entre 3 i 5h. S'ha observat que els zigots poden entrar a la fase G2 en un rang molt variable, entre les 12 hpi els més ràpids i les 30-31 hpi els més endarrerits, tenint una durada de 4-6 h. En canvi, la fase M sembla ser més estable en el temps, amb una durada d'entre 3 i 4 h, i donant-se l'inici de la condensació dels cromosomes a les 17-18 hpi. El trencament de la membrana del pronucli s'observa de manera general entre les 24-30 hpi, i la primera divisió embrionària no s'observarà fins les 27-33 hpi en la majoria dels casos (Balakier *et al.*, 1993a; Nagy *et al.*, 1994; Simerly *et al.*, 1995; Capmany *et al.*, 1996; Payne *et al.*, 1997; Plachot *et al.*, 2000).

## 1. INTRODUCCIÓ

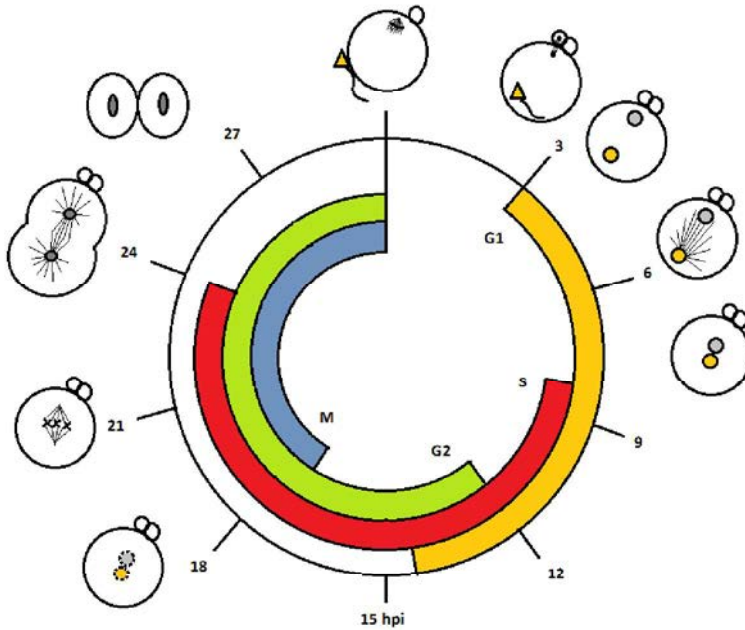


Figura 1. Representació simplificada de les fases del cicle cel·lular i la cronologia del procés de fecundació. Adaptat a partir de Asch *et al.*, 1995; Plachot *et al.*, 2000; Feenan i Herbert, 2006.

### 1.1.2. Alteracions en el procés de fecundació

Els errors que es produeixen durant el procés de fecundació tenen un efecte important sobre el nou embrió i en determinarà, en molts casos, la seva viabilitat.

Per tal d'avaluar el possible ús reproductiu dels embrions provinents de patrons pronuclears atípics, és convenient saber la tècnica de reproducció assistida (TRA) de la qual provenen, conèixer l'origen del material genètic i establir els possibles mecanismes de formació.

#### *Procedència dels zigots*

La tècnica de reproducció utilitzada per a la inseminació (FIVc o microinjecció intracitoplasmàtica, ICSI) té un paper important en la interpretació dels patrons

pronuclears, ja que existeixen alteracions en els mecanismes de fecundació que es donen més freqüentment quan s'aplica una tècnica o altra.

En els casos de FIVc, per exemple, la inseminació d'oòcits amb defectes a la zona pel·lúcida o d'oòcits immadurs o hipermadurats pot afavorir la fecundació per part de més d'un espermatozoide (polispèrmia) degut, en alguns casos, a una reacció cortical subòptima (Flaherty *et al.*, 1995; Ducibella, 1996; Sathananthan *et al.*, 1999; Feenan i Herbert, 2006). S'ha descrit, també, que la maduració incompleta del citoplasma de l'oòcit pot impedir la correcta descondensació del cap de l'espermatozoide o produir la condensació prematura dels cromosomes d'aquest. En ambdós casos s'impediria la correcta formació del pronucli masculí (Flaherty *et al.*, 1995, 1998; Plachot *et al.*, 2000; Rawe *et al.*, 2000; Feenan i Herbert, 2006).

Tot i que la manca de factors citoplasmàtics oocitaris també pot produir alteracions en la fecundació, en els casos d'ICSI, s'han observat altres mecanismes específics per casos d'inseminació amb microinjecció. En són un exemple la ejecció de l'espermatozoide cap a l'espai perivitel·lí de l'oòcit, l'alteració del àster de microtúbuls des del MTOC o la desestructuració insuficient de la membrana de l'espermatozoide, que dificultaria l'accés dels factors descondensadors de l'oòcit al nucli de l'espermatozoide (Perreault, 1992; Dozortsev *et al.*, 1994; Asch *et al.*, 1995; Flaherty *et al.*, 1998). Una altra possible causa dels errors observats en els casos d'inseminació per ICSI podria ser la rotació de l'oòcit dins la zona pel·lúcida, generalment fruit de l'acció mecànica durant la denudació, alterant la posició de la placa metafàsica respecte el primer corpuscle polar (Flaherty *et al.*, 1998; Rawe *et al.*, 2000). Aquest fet podria donar lloc a que durant el procés de microinjecció es produís una anomalia en la disposició del fus i dels cromosomes que produiria alteracions en la formació dels pronuclis.

### *Origen del material genètic*

L'origen del material genètic és de gran importància per prendre la decisió d'incloure o descartar un zigot en un cicle de TRA. Els embrions amb origen biparental asseguren l'aportació del material genètic masculí i femení en el nou embrió. En canvi, els zigots ginogenètics o androgenètics només són portadors del material genètic femení o masculí, respectivament, i han de ser descartats per a l'ús en cicles de TRA per les greus implicacions que comporten per al fetus

## 1. INTRODUCCIÓ

(Romanelli *et al.*, 2011; Inbar-Feigenberg *et al.*, 2013; Soler *et al.*, 2015). Igualment es descarten, per a ús reproductiu, els zigots portadors d'una càrrega extra de material genètic (triploides) (Carceller Beltrán *et al.*, 2004).

### *Mecanismes de formació dels patrons pronuclears atípics*

Els zigots que presenten un patró de fecundació diferent al considerat normal (2PN 2CP), tant si provenen de FIVc com d'ICSI, han de ser valorats estrictament per poder ser considerats per a un possible ús reproductiu.

L'absència de pronuclis amb presència de dos corpuscles polars (OPN 2CP) a les  $17\pm 1$  hpi, pot ser deguda a un accelerament en el cicle cel·lular del zigot (Feenan i Herbert, 2006). En aquests casos, la presència de divisió primerenca (*early cleavage*, EC) a les  $26\pm 1$  hpi podria explicar la aparició/desaparició dels pronuclis abans del moment de la valoració de la fecundació. La reobservació a les 25-27 hpi permetria detectar l'aparició de pronuclis tardans (Boada i Ponsà, 2008; ASEBIR, 2015). L'aparició/desaparició avançada o retardada dels pronuclis pot ser l'explicació de la observació d'un alt percentatge d'embrions euploids (64,71%) provinents de zigots de FIVc on no s'han observat pronuclis en el moment habitual de valoració de la fecundació (Yin *et al.*, 2016). Recentment s'ha descrit el naixement de nens sans després de transferència d'embrions provinents de zigots OPN 2CP, pel que l'ús reproductiu d'aquests embrions podria ser considerat una alternativa en els cicles de TRA on no es disposi de zigots amb patrons normals de fecundació (Li *et al.*, 2015). Malgrat tot, la manca de pronuclis amb presència de dos corpuscles polars també podria ser deguda a l'absència de fecundació i fragmentació del primer CP o a una aturada del procés de fecundació molt inicial amb extrusió del segon CP. El bloqueig del procés de fecundació podria ser deguda a mecanismes explicats anteriorment, com són la manca de descondensació del cap de l'espermatozoide o l'ejecció l'espermatozoide fora de l'oòcit (Flaherty *et al.*, 1998).

L'observació d'un únic pronucli (1PN) és conseqüència de diferents anomalies en el procés de fecundació que depenen de la tècnica d'inseminació utilitzada. L'origen d'aquests zigots, els mecanismes pels quals apareixen i les característiques citogenètiques dels embrions resultants es tracten amb profunditat en el següent apartat (1.1.3 Zigots monopronucleats).



La presència de dos pronuclis amb un únic corpuscle polar (2PN 1CP) evidencia la no extrusió de material genètic femení corresponent a la segona divisió meiótica. Aquests zigots tenen un contingut genètic digínic i han de ser considerats no aptes en els cicles de FIV (Boada i Ponsà, 2008; ASEBIR, 2015).

Els zigots tripronucleats (3PN) poden tenir diferent origen segons la tècnica d'inseminació de la que provinquin. En els casos d'observació de 3PN 2CP després de FIVc el contingut genètic més comú és diàndric, conseqüència de la fecundació de l'oòcit per part de dos espermatozoides (Rosenbusch *et al.*, 1997; Staessen i Van Steirteghem, 1997; Tarin *et al.*, 1999; Rosenbusch, 2008). L'observació de 3PN 2CP en els cicles d'ICSI és poc provable i la presència de 2CP es pot correspondre amb la fragmentació del primer CP (Boada i Ponsà, 2008). Per altra banda, l'observació de 3PN 1CP es dona tant en procediments de FIVc com d'ICSI. Es considera que aquests zigots són el producte de la no extrusió del segon CP i, per tant, tenen contingut genètic digínic (Macas *et al.*, 1996a; Grossmann *et al.*, 1997; Staessen i Van Steirteghem, 1997; Flaherty *et al.*, 1998; Rosenbusch, 2008; Papale *et al.*, 2012). Malgrat alguns estudis han descrit la probabilitat que alguns dels embrions provinents de zigots classificats com a 3PN 2CP siguin diploides (Macas *et al.*, 1996b; Grossmann *et al.*, 1997; Staessen i Van Steirteghem, 1997), tots els embrions derivats de zigots 3PN són considerats no aptes per ús reproductiu, ja que majoritàriament tenen dotació cromosòmica triploide (Staessen i Van Steirteghem, 1997; Boada i Ponsà, 2008; ASEBIR, 2015).

### 1.1.3. Zigots monopronucleats

La presència d'un pronucli després de la inseminació és un fenomen normal en espècies on l'oòcit ha completat la meiosi abans de la fecundació (Wilson, 1925; Longo, 1973), però la seva observació en humans es considera una anomalia del procés de fecundació (Fig. 2).

La presència de zigots monopronucleats s'ha confirmat tant en cicles de FIVc (Plachot *et al.*, 1987) com d'ICSI (Dozortsev *et al.*, 1994). El mecanisme de formació, el desenvolupament *in vitro* i la constitució cromosòmica dels embrions que se'n deriven són diferents segons la tècnica d'inseminació de la que provenen i, en conseqüència, en variarà la seva consideració pel que fa al seu possible ús reproductiu.

## 1. INTRODUCCIÓ



Figura 2. Imatge d'un zigot monopronuclear humà provinent d'ICSI.

### 1.1.3.1. Origen i mecanismes de formació

En cicles de FIVc un 7,7% dels zigots mostren un únic pronucli en el moment de la valoració de la fecundació, mentre que en els cicles d'ICSI s'observa en aproximadament el 5% del total d'oòcits inseminats (Staessen i Van Steirteghem, 1997; Itoi *et al.*, 2015).

S'han postulat diversos mecanismes responsables de l'aparició d'aquest patró pronuclear, depenent de si el pronucli conté material genètic matern (ginogenètic), patern (androgenètic) o d'ambdós progenitors (biparental).

#### *Origen matern*

L'activació partenogenètica de l'oòcit donarà lloc a la formació de zigots ginogenètics (Fig.3, a) (Levron *et al.*, 1995; Azevedo *et al.*, 2014). La denominada partenogènesi primària, on l'espermatozoide no es troba dins el citoplasma de l'oòcit, és conseqüència de la manca de fusió de membranes entre gàmetes o a l'extrusió de l'espermatozoide en FIVc (Fig.3, a, I). En els casos d'ICSI és conseqüència de l'activació de l'oòcit deguda a la microinjecció, amb posterior expulsió de l'espermatozoide cap a l'espai perivitel·lí. En la partenogènesi secundària, en canvi, s'observa l'espermatozoide dins l'ooplasma, però aquest mostra signes de descondensació incompleta del nucli o signes de condensació