



**VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA**

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología

PROGRAMA DE DOCTORADO: 290F

OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA II

**PRODUCCIÓN DE BLASTOCISTOS DIPLOIDES,
HETEROPARENTALES A PARTIR DE PRE-EMBRIONES
TRIPRONUCLEARES HUMANOS PROCEDENTES DE FIV E ICSI**

Trabajo de Tesis Doctoral

Presentado por Dña. Noelia Grau Grau

Directores

Dra. Dña. María José Escribá Pérez

Dr. D. José Alejandro Remohí Giménez

Tutor

Dra. D. Vicente Serra Serra

Valencia, 2015

Memoria de Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor

Lugar de realización:

Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI), Valencia

Facultad a la que está adscrita:

Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología

Título:

PRODUCCIÓN DE BLASTOCISTOS DIPLOIDES, HETEROPARENTALES A
PARTIR DE PRE-EMBRIONES TRIPRONUCLEARES HUMANOS
PROCEDENTES DE FIV E ICSI.

Autora:

Noelia Grau Grau

Licenciada en Bioquímica por la Universidad de Valencia

Directores:

Dr. Dña. M^a José Escribá Pérez

Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI)

Dr. D. José Alejandro Remohí Giménez

Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI), Universidad de Valencia

Tutor

Dra. D. Vicente Serra Serra



Dra. Dña. María José Escribá Pérez, Doctora en Biología por la Universidad de Valencia.

CERTIFICA QUE:

Que el trabajo titulado "Producción de blastocistos diploides, heteroparentales a partir de pre-embryones tripronucleares humanos procedentes de FIV e ICSI", ha sido realizado íntegramente por Dña. Noelia Grau Grau bajo mi tutela y supervisión. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como Tesis Doctoral ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia, a 22 de Octubre de 2015.

Fdo. María José Escribá Pérez

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. J. Escribá', with a long horizontal stroke extending to the right.



Dra. D. José Alejandro Remohí Giménez, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Valencia, y presidente del Instituto Valenciano de Infertilidad.

CERTIFICA QUE:

Que el trabajo titulado “Producción de blastocistos diploides, heteroparentales a partir de pre-embiones tripronucleares humanos procedentes de FIV e ICSI”, ha sido realizado íntegramente por Dña. Noelia Grau Grau bajo mi tutela y supervisión. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como Tesis Doctoral ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia, a 22 de Octubre de 2015.

Fdo. José Alejandro Remohí Giménez

ÍNDICE

ÍNDICE.....	11
ÍNDICE DE TABLAS	19
ÍNDICE DE FIGURAS.....	23
ABREVIATURAS.....	27
INTRODUCCIÓN.....	31
Fecundación correcta	33
Anomalías en la fecundación	35
Fallos de fecundación.....	37
Fallo de fecundación: Presencia del primer corpúsculo polar con ausencia de pronúcleos (Fórmula: 1,0)	38
Fallo de fecundación: Presencia del primer y segundo corpúsculo polar con ausencia de pronúcleos (Fórmula: 2, 0)	43
Fecundación anómala.....	46
Fecundación anómala: Cigotos unipronucleares; presencia de los dos corpúsculos polares con ausencia de uno de los pronúcleos (Fórmula: 2,1)	47
Fecundación anómala: Cigotos tripronucleares; presencia de uno o dos corpúsculos polares con presencia de tres pronúcleos (Fórmula: 1,3 y 2,3)	54
Fecundación anómala: Otros	63
Rescate de pre-embiones con fecundación anormal. Restauración de la ploidía	64

Ovocitos MII no fecundados.....	64
Ovocitos con dos corpúsculos polares y ninguna estructura pronuclear.....	66
Cigotos unipronucleares.....	67
Pre-embiones en estadio de células en el momento de la observación de la fecundación.....	69
Cigotos tripronucleares.....	70
Autocorrección pre-embionaria: Mecanismos de corrección embrionaria	70
Eliminación microquirúrgica del pronúcleo supernumerario	75
JUSTIFICACIÓN	81
OBJETIVOS	87
Objetivo general.....	89
Objetivos particulares	89
METODOLOGÍA.....	91
Aprobaciones, consentimientos y lugar de ejecución	93
Población de estudio	94
Diseño experimental	95
Procedencia de los pre-embiones tripronucleares.....	99
Estimulación ovárica.....	99
Recuperación de ovocitos.....	100

Preparación de la muestra seminal.....	101
Preparación de ovocitos.....	103
Procedimiento de inseminación.....	104
Evaluación de la fecundación. Identificación de los cigotos tripnucleares (3PN).....	106
Cultivo pre-embionario in vitro	109
Incubador convencional.....	109
Incubador dotado de sistema time-lapse.....	110
Evaluación morfológica de los pre-embiones	113
Evaluación discreta del desarrollo pre-embionario: Cultivo convencional	113
División pre-embionaria	114
Grado de fragmentación celular de las blastómeras	115
Simetría y tamaño de las blastómeras	117
Grado de multinucleación	117
Compactación celular.....	117
Blastulación	119
Evaluación morfocinética de los pre-embiones	120
Parámetros morfocinéticos.....	121
Patrón de división embrionaria.....	126
Estudios genómicos	126

Estudio de ploidía en pre-embryones 3PN.....	127
Biopsia y fijación pre-embryonaria en estadio de células.....	127
Fijación de pre-embryones 3PN en estadio de blastocisto...	129
Hibridación in situ fluorescente (FISH).....	129
Visualización e interpretación de las señales de hibridación	132
Análisis de la herencia parental (Finger-printing)	133
Extracción de ADN genómico de la sangre de los progenitores	134
Extracción de ADN genómico en blastocistos	134
Amplificación y análisis de ADN genómico en los blastocistos y los parentales	135
Eliminación microquirúrgica del pronúcleo supernumerario: Epronucleación	136
Análisis estadístico	138
RESULTADOS.....	141
Estudio 1: Estudio comparado de la ploidía y composición parental en pre-embryones tripronucleares procedentes de FIV e ICSI.....	143
Estudio de la ploidía en pre-embryones tripronucleares procedentes de FIV e ICSI.....	143
Análisis de la ploidía en pre-embryones tripronucleares procedentes de FIV	143

Análisis de la ploidía en pre-embiones tripnucleares procedentes de ICSI.....	144
Estudio comparado de la ploidía en pre-embiones tripnucleares procedentes de FIV e ICSI.....	147
Estudio de la composición parental en pre-embiones tripnucleares procedentes de ICSI.....	149
Estudio 2: Producción de pre-embiones diploides heteroparentales a partir de cigotos tripnucleares procedentes de FIV (3PN-FIV). Eliminación microquirúrgica del pronúcleo supernumerario.....	149
Estudio 3: Producción de diploides heteroparentales a partir de pre-embiones tripnucleares procedentes de ICSI mediante mecanismo de autocorrección. Estudio morfocinético.	157
Patrón de división de los pre-embiones 3PN-ICSI.....	158
Estudio morfocinético del desarrollo de los pre-embiones 3PN-ICSI.....	159
Estudio morfocinético del desarrollo de los pre-embiones 3PN-ICSI en función de la ploidía.....	160
Predicción de la ploidía en pre-embiones 3PN-ICSI según los parámetros morfocinéticos.....	163
DISCUSIÓN.....	167
CONCLUSIONES.....	191
BIBLIOGRAFÍA.....	195

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados del análisis por FISH de los pre-embriones procedentes de cigotos unipronucleares tras aplicar las técnicas de FIV e ICSI.	53
Tabla 2. Estudio numérico de los cromosomas 13, 18, 21, X e Y de los 3PN-FIV en estadio de células y blastocisto.	143
Tabla 3. Estudio numérico de los cromosomas 13, 18, 21, X e Y de los 3PN-ICSI en estadio de células y blastocisto.	144
Tabla 4. Estudio comparado de la ploidía de los 3PN-FIV y 3PN-ICSI en estadio de células y blastocisto.	146
Tabla 5. Rendimiento técnico y capacidad de desarrollo de los cigotos 3PN-FIV epronucleados microquirúrgicamente, cigotos 3PN-FIV (controles negativos), y pre-embriones correctamente fecundados (controles positivos)	150
Tabla 6. Ploidía y formula cromosómica de los pre-embriones 3PN-FIV tras la eliminación microquirúrgica del pronúcleo extra y de los 3PN-FIV control negativo (no manipulados).	153
Tabla 7. Variables directas e indirectas de los pre-embriones 3PN y 2PN correctamente fecundados.	160
Tabla 8. Media \pm SD de los tiempos de las siete primeras divisiones (t2-t8) en pre-embriones tripronucleares (3PN) y bipronucleares (2PN) de acuerdo a la ploidía (triploides o diploides).	163

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagen de un cigoto correctamente fecundado.	37
Figura 2. Imágenes representativas de los diferentes tipos de cigotos que podemos observar al evaluar la fecundación.	38
Figura 3. Frecuencias de los diferentes tipos de cigotos observados al evaluar la fecundación.	39
Figura 4. Frecuencias comparadas tras FIV e ICSI de las posibles causas de fallos en el proceso de la fecundación.	46
Figura 5. Esquema de las posibles etiologías de la generación de los cigotos unipronucleares.	57
Figura 6. Imágenes representativas y fotografías de un cigoto tripronuclear diándrico y un cigoto tripronuclear digínico.	62
Figura 7. Imágenes representativas de las posibles combinaciones en la composición cromosómica de los pre-embriones tripronucleares (3PN) diándricos en los que se ha producido la extrusión del segundo corpúsculo polar (CP), según la formación del huso mitótico.	64
Figura 8. Imágenes de las posibles localizaciones de las células aneuploides en los pre-embriones que presentan mosaicismo.	77
Figura 9. Representación gráfica de los tres mecanismos propuestos para que se produzca la auto-corrección de los embriones.	78
Figura 10. Posibles combinaciones de corpúsculos polares (CP) y pronúcleos (PN) observadas en los cigotos en el momento de la evaluación de la fecundación.	108
Figura 11. Imágenes de morfología de los pre-embriones.	115
Figura 12. Imágenes de los diferentes estadios de desarrollo de un pre-embrión 3PN.	118

Figura 13. Apariencia morfológica de los pre-embiones humanos TPN-I cultivados en sistema de time-lapse.	120
Figura 14. Representación gráfica de los eventos del desarrollo embrionario (modelo A) para determinar las variables morfocinéticas directas e indirectas.	123
Figura 15. Representación gráfica de los seis posibles modelos de acuerdo al patrón de división de las blastómeras de los pre-embiones.	125
Figura 16. Representación de electroferogramas de tres loci informativos de STR (D16S3395, D16S475, D16S3024) para el cromosoma 16.	146
Figura 17. Apariencia morfológica de los blastocistos humanos cultivados en co-cultivo.	151
Figura 18. Triple hibridación in situ fluorescente para la región centromérica de los cromosomas X, Y Y 18 de los blastocistos 3PN-FIV microquirúrgicamente corregidos control negativo.	152
Figura 19. Representación en electroferogramas de 10 loci polimórficos.	155
Figura 20. Imagen representativa de los cuatro posibles modelos de autocorrección de los pre-embiones tripronucleares.	184

ABREVIATURAS

n	Dotación cromosómica haploide
2n	Dotación cromosómica diploide
3n	Dotación cromosómica triploide
FIV	Fecundación <i>in vitro</i>
ICSI	Técnica de microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (del inglés Intracytoplasmic Sperm Injection)
VG	Vesícula Germinal
MI	Metafase 1
MII	Metafase 2
MII	Metafase 3
CP	Corpúsculo polar
1CP	Primer corpúsculo polar
2CP	Segundo corpúsculo polar
PN	Pronúcleo
1PN	Unipronucleares
2PN	Bipronucleares
3PN	Tripronucleares
3PN-FIV	Tripronucleares generados tras aplicar la técnica de FIV convencional
3PN-ICSI	Tripronucleares generados tras aplicar la técnica ICSI
BTC	Blastocisto
NI	No informativo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
RNAse	Ribonucleasa
ARN	Ácido Ribonucleico
SDS	Dodecilsulfato sódico
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
FISH	Hibridación in situ fluorescente, (del inglés Fluorescent in situ hybridation)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, (del inglés polymerase chain reaction)
Ca 2+	Calcio
Mg 2+	Magnesio
G2	Fase de crecimiento 2, (del inglés grow 2)
ZP	Zona Pelúcida
IMPIVA	Instituto de la pequeña y mediana industria de la generalitat
CI	Consentimiento informado
DGP	Diagnóstico Genético Preimplantacional

GnRH/ LHRH	Hormona liberadora de gonadotropina
hCG	Gonadotropina coriónica humana
CCCO	Complejo cumulo-corona-ovocito
OMS	Organización mundial de la salud
HTF	Human tubal fluid
PVP	Polivinilpirrolidona
D0	Día de la inseminación de los ovocitos, mediante FIV o ICSI
D1	Primer día de desarrollo
D2	Segundo día de desarrollo
D3	Tercer día de desarrollo
D4	Cuarto día de desarrollo
D5	Quinto día de desarrollo
D6	Sexto día de desarrollo
ASEBIR	Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción
IMC	Masa celular interna
TE	Trofoectodermo
t2	Tiempo de división a dos células
t3	Tiempo de división a tres células
t4	Tiempo de división a cuatro células
t5	Tiempo de división a cinco células
t6	Tiempo de división a seis células
t7	Tiempo de división a siete células
t8	Tiempo de división a ocho células
cc2	Duración del segundo ciclo celular
cc3	Duración del tercer ciclo celular
SD	Grado de sincronía de división
95CI	Intervalo de confianza del 95%
RR	Riesgos relativos
ROC	Receiver Operating Characteristic
AUC	Área bajo la curva

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La fecundación es el proceso mediante el cual dos células altamente diferenciadas, el ovocito y el espermatozoide, con dotación cromosómica haploide (n) interactúan y se combinan para dar lugar a un cigoto con dotación cromosómica diploide ($2n$) heteroparental. Para que este proceso tenga lugar, los gametos masculino y femenino maduros deben encontrarse, reconocerse e interactuar para dar lugar a una nueva entidad genética, el pre-embrión.

La fecundación *in vitro* (FIV) se define como la penetración de un espermatozoide previamente capacitado en un ovocito maduro fuera del tracto genital femenino. Se puede realizar mediante la FIV convencional, basada en la co-incubación de ambos gametos parentales o mediante la técnica de microinyección Intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI, del inglés Intracytoplasmic Sperm Injection), que consiste en la inyección de un único espermatozoide capacitado en el interior del citoplasma de un ovocito maduro (en estadio de MII), según la metodología de transferencia nuclear.

FECUNDACIÓN CORRECTA

Con la descarga de gonadotropinas ovulatorias, el ovocito inmaduro reanuda la meiosis y completa la primera división meiótica, por la que cromosomas homólogos se separan en dos estructuras citoplasmáticas asimétricas haploides: el ovocito metafase II (MII) propiamente dicho y una pequeña fracción citoplasmática rodeada de membrana, el primer corpúsculo polar (1CP).

INTRODUCCIÓN

El ovocito MII queda detenido en este estadio metafásico estable hasta que un estímulo eficiente de activación, que en condiciones normales es el espermatozoide fecundante, induzca la reanudación de la meiosis II, que culminará con la segunda división meiótica, y por la que se producirá la separación de cromátidas hermanas, quedando 23 de éstas en el ovocito y las otras 23 en el segundo corpúsculo polar. Esta reanudación del primer ciclo celular pre-embionario supone la entrada del ovocito en interfase por lo que las cromátidas hermanas maternas que permanecen en el ooplasma quedarán confinadas dentro de la membrana, que resultará con la formación del pronúcleo materno. Al mismo tiempo, la cabeza espermática experimentará remodelaciones morfológicas y fisiológicas, quedando las 23 cromátidas paternas confinadas sincrónicamente con la formación del pronúcleo materno, en una estructura pronuclear, el pronúcleo paterno.

Así, la correcta fecundación se define por la presencia de: dos estructuras pronucleares, semejantes en tamaño y yuxtapuestas en la región central del cigoto y, dos corpúsculos polares en el espacio perivitelino (Figura 1). Cualquier alteración en el número de ambos elementos se considera una fecundación anómala.

Tras la fecundación in vitro, sea cual sea el procedimiento aplicado, la evaluación de la fecundación se realiza 17-20 horas tras la co-incubación o microinyección intracitoplasmática bajo observación microscópica (Nagy et al. 1998, Payne et al. 1997).

INTRODUCCIÓN

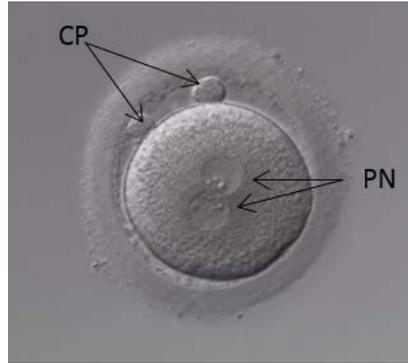


FIGURA 1. Imagen de un cigoto correctamente fecundado: se observa la presencia del primer y segundo corpúsculo polar (CP) y las dos estructuras pronucleares (PN).

En términos generales, la tasa de fecundación correcta se estima en torno al 60-70% de los ovocitos inseminados o microinyectados (Flaherty et al. 1995, Palermo et al. 1993, Payne et al. 1994, Van Steirteghem et al. 1993), existiendo por tanto un 30-40% de fecundación anómala o fallo de fecundación.

ANOMALÍAS EN LA FECUNDACIÓN

Como ha sido mencionado en el apartado anterior, consideramos que el ovocito no ha fecundado correctamente cuando tras la inseminación dicho ovocito presenta una combinación numérica diferente a los dos corpúsculos polares en el espacio perivitelino y a las dos estructuras pronucleares en el interior citoplasmático.

INTRODUCCIÓN

Las posibilidades abarcan desde la ausencia de fecundación a la fecundación anómala, que recoge todas aquellas combinaciones en número de corpúsculos y pronúcleos diferentes a la normal.

Por otro lado, es posible también observar ovocitos atrésicos y degenerados, así como pre-embriónes en estadio de células en el momento de la evaluación de la fecundación (Figura 2).

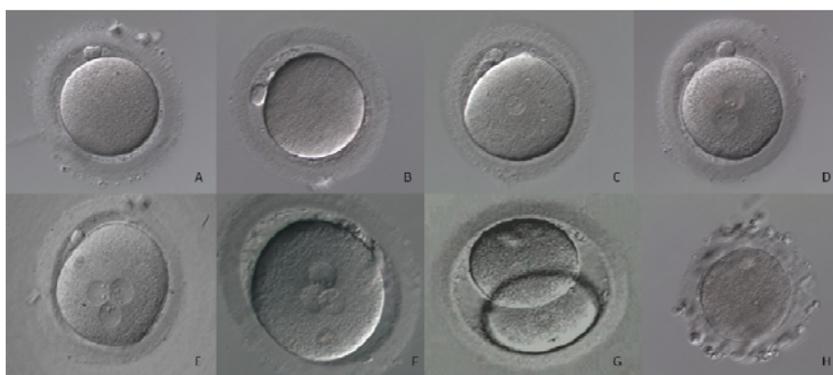
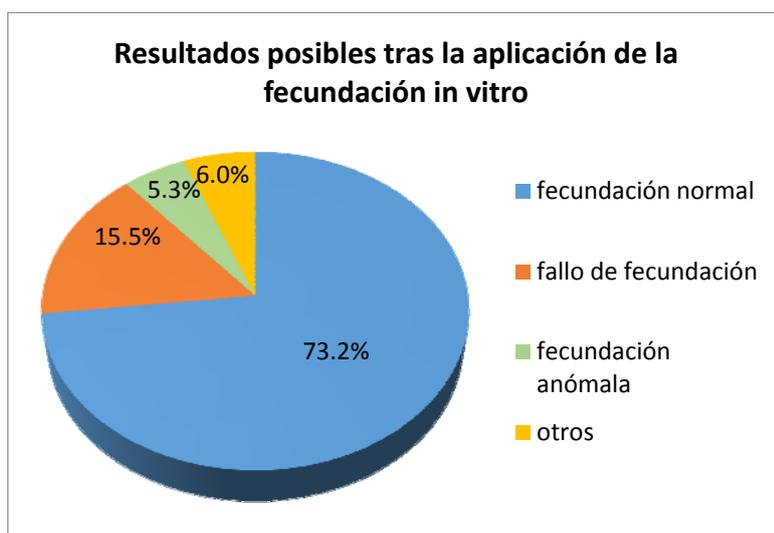


FIGURA 2. Imágenes representativas de los diferentes tipos de cigotos que podemos observar al evaluar la fecundación: A) Ovocito no fecundado, con la presencia de un único CP y ausencia de PN B) Cigoto en el que se ha producido la expulsión del segundo CP pero no se han generado los PN; C) Cigoto unipronuclear, con la presencia de dos corpúsculos polares y un único pronúcleo; D) Cigoto bipronuclear correctamente fecundado; E) Cigoto tripronuclear en el que se observan los tres pronúcleos pero no se ha producido la expulsión del segundo corpúsculo polar; F) Cigoto tripronuclear en el que se observan los tres pronúcleos y el primer y segundo corpúsculos polares; G) Pre-embrión en estadio de células en el momento en que observamos la fecundación, debido a una división partenogenética de éste.; H) Ovocito degenerado.

INTRODUCCIÓN

Los datos en IVI valencia en el año 2014 en cuanto a fecundación son los que se muestran en el siguiente gráfico (Figura 3).

FIGURA 3. Frecuencias de los diferentes tipos de cigotos observados al evaluar la fecundación. Obsérvese que el 73.2% de los cigotos presentan fecundación correcta, con presencia de 2 corpúsculos polares y 2 pronúcleos; un 15.5% representa ausencia de fecundación y un 5.3% fecundación anómala.



Fallos de fecundación

Hablamos de fallo en la fecundación cuando no se produce la formación de los pronúcleos, ya sea con expulsión o no del segundo corpúsculo polar.

Como se ha indicado anteriormente, este resultado representa 15.5%.

INTRODUCCIÓN

El origen de estos fallos de fecundación puede ser diverso (Asch et al. 1995, Simerly et al. 1995, Van Blerkom et al. 1995). Puede que los ovocitos sean incapaces de iniciar el proceso de activación (Tesarik and Testart 1994) o bien que la meiosis se reanude pero no culmine de forma normal, produciéndose una activación ovocitaria incompleta (Tesarik and Kopecny 1989a).

Fallo de fecundación: Presencia del primer corpúsculo polar con ausencia de pronúcleos (Fórmula: 1,0)

Se considera que ha habido un fallo en el proceso de fecundación si tras 17-20 horas post-inseminación o microinyección se observase un único corpúsculo polar, el primero, y ninguna estructura pronuclear; rindiendo un fórmula común en los laboratorios de fecundación in vitro conocida coloquialmente como "1,0".

Los fallos en la fecundación se dan alrededor del 10-25% de los ciclos de fecundación in vitro (Chen et al. 1995).

Tras aplicar la FIV convencional, las causas del fallo en la fecundación pueden ser múltiples, siendo el principal motivo tras FIV la ausencia de penetración espermática y representando el 55.5% de los ovocitos no fecundados (Rawe et al. 2000a). La causa de esta ausencia de penetración espermática puede tener un origen diverso; bien defectos en la zona pelúcida, en la reacción acrosómica o en la fusión del espermatozoide al oolema:

- Problemas seminales (Kruger, LIU):

INTRODUCCIÓN

- Problemas en la penetración de las cubiertas ovocitarias por parte del espermatozoide debido a fallo en la capacitación o en la reacción acrosómica.
 - Fallos en la descondensación de la cabeza espermática. Se ha observado una mayor tasa de fragmentación del ADN paterno en los casos en que hay un fallo de descondensación del ADN del espermatozoide (Lopes et al. 1998).
 - Patologías espermáticas que imposibilitan la correcta interacción espermatozoide – ovocito o la activación ovocitaria; por ejemplo: casos de globozoospermia.
- Problemas ovocitarios:
- Alteraciones en la unión del espermatozoide al oolema por:
(i) endurecimiento de la zona pelúcida; (ii) preactivación ovocitaria asociados a la estimulación ovárica; a la manipulación ovocitaria previa (choques térmicos, osmóticos, vitrificación, entre otros).
 - Ausencia o mutaciones de receptores de las ZP que imposibilitan la correcta interacción espermatozoide- ovocito (Patrat et al. 2000, Wassarman et al. 2004).
 - Problemas de madurez ovocitaria; especialmente en aquellos casos de FIV donde la co-incubación gamética se realiza sin conocer el grado de madurez ovocitaria en los ovocitos inseminados. Así, si bien la maduración nuclear y citoplasmática ovocitaria podría culminar durante el periodo de co-incubación gamética, es posible que no haya habido tiempo suficiente para que el proceso de fecundación curse y,

INTRODUCCIÓN

por tanto, encontrarnos en un momento precoz del proceso de fecundación (Eppig et al. 1994). Alternativamente, es posible que durante el tiempo de co-incubación, los ovocitos inmaduros culminen el proceso de maduración nuclear; no así su maduración citoplasmática y por tanto no siendo capaces de descondensar la cabeza espermática aún habiéndose producido penetración espermática en un ambiente citoplasmático inmaduro (Zenzes et al. 1990).

- Problemas en la activación ovocitaria, siendo la principal causa de fallo en la fecundación.
- Problemas en la interacción espermatozoide-ovocito debido a alteraciones en el reconocimiento mutuo entre el espermatozoide y el ovocito (Van Blerkom et al. 1995).

Tras la aplicación de la ICSI, al haberse introducido un único espermatozoide directamente en el citoplasma ovocitario, se evitan algunas de las causas originarias del fallo de fecundación descritas tras la FIV convencional, como podrían ser los fallos de reconocimiento e interacción entre las cubiertas ovocitarias y envolturas espermáticas, por ejemplo. Aun así, tras realizar la ICSI la causa de los ovocitos no fecundados, pueden tener su origen por causa tanto espermática como ovocitaria.

Por ello, tras aplicar ICSI, el 83% de los ovocitos no fecundados permanecen en estadio de MII, presentando el núcleo espermático una descondensación parcial o incluso en estado de condensación (Flaherty et al. 1995). Puesto que el factor espermático,

INTRODUCCIÓN

posiblemente la fosfolipasa C zeta, está implicado en el desencadenamiento de la respuesta ovocitaria de activación, es posible explicar el fallo en la activación del ovocito por una ausencia o incorrecta ubicación de dicho factor espermático en la cabeza del espermatozoide fecundante; así, en última instancia, si el espermatozoide no induce la correcta señalización para que se produzca la señal inicial o subsidiaria de calcio intracelular, ocurrirá una incompetente activación ovocitaria y por ende, la ausencia de interfase cigótica (Tesarik and Mendoza 1999).

El pseudo-desencadenamiento inicial y transitorio del calcio, que tiene lugar durante la inyección, comprende una entrada de Ca^{+2} extracelular, procedente del medio en el que se realiza el ICSI, siendo este incremento de Ca^{+2} similar al que se produce durante la fusión del espermatozoide al ovocito en condiciones normales. Sin embargo, este pseudo-desencadenamiento de calcio puede ser insuficiente cuando se emplean medios de manipulación con baja concentración de calcio, cuando la ICSI se realiza demasiado rápida o cuando no se realiza la aspiración del citoplasma ovocitario previniéndose la ruptura de la membrana plasmática (Tesarik and Mendoza 1999). De no producirse este adecuado incremento inicial de calcio intracelular, no se inducirá la correcta liberación subsidiaria de calcio intracitoplasmático y, por ende, habrá ausencia de una respuesta ovocitaria de activación correcta.

Por otro lado, puede que el fallo en el pseudo-desencadenamiento de calcio sea inherente al espermatozoide debido a la ausencia o

INTRODUCCIÓN

retraso en la liberación del factor espermático en el citoplasma del ovocito (Vitullo and Ozil 1992). Así, pese a producirse el inicial incremento en la concentración de calcio intracelular de forma adecuada, no se efectuaran las correspondientes oscilaciones de calcio subsiguientes, resultando en ausencia o incompleta activación ovocitaria (Tesarik and Mendoza 1999).

Por otro lado, se ha reportado la ausencia de espermatozoide fecundante en el ooplasma ovocitario en más del 10% de los ovocitos que presentan fallo de fecundación tras ICSI; probablemente debido a la expulsión del espermatozoide a través del orificio de microinyección o a un fallo en la inyección espermática, por ejemplo por ausencia de rotura del ooplasma (Flaherty et al. 1995, Rawe et al. 2000a, Sakkas et al. 1996).

Así, concluimos, tal y como muestra la siguiente figura (Figura 4) que de entre los fallos de fecundación por FIV y por ICSI, la principal causa de los fallos de fecundación tras FIV es el fallo en la entrada del espermatozoide debida principalmente a defectos en la zona pelúcida, en la reacción acrosómica o en la fusión de la membrana al oolema. Tras ICSI, en la mayoría los casos se inicia el proceso de fecundación, pero se detiene en diferentes puntos. En el 39,9% de los casos la detención se produce debida a un fallo en la activación ovocitaria, fundamentalmente producida por fallo en la descondensación espermática. Otra de las causas posibles de fallo en la fecundación tras ICSI es el arresto metafásico. Y por último, tanto

INTRODUCCIÓN

tras FIV como ICSI se dan en igual proporción los defectos en la formación o migración de los pronúcleos (Rawe et al. 2000b).

Fallo de fecundación: Presencia del primer y segundo corpúsculo polar con ausencia de pronúcleos (Fórmula: 2, 0)

En el momento de la evaluación de la fecundación, entre los ovocitos con ausencia de fecundación, están aquellos que presentan el primer y el segundo corpúsculo polar en el espacio perivitelino; no observándose, sin embargo, presencia de pronúcleos; rindiendo una fórmula común en los laboratorios de fecundación in vitro conocida coloquialmente como "2,0".

El estudio cromosómico de dichos pre-embriones revela que más del 50% son diploides, presentando la mitad de ellos señal para el cromosoma Y (Jamieson et al. 1994, Manor et al. 1996). Estos resultados pueden explicarse por la variabilidad en la duración de los ciclos celulares entre ovocitos/cigotos; de forma en que aquellos cigotos con un primer ciclo celular corto, los pronúcleos no serían identificables en el momento habitual en el que se evalúa la fecundación (Manor et al. 1996). En tales cigotos, la rotura de las membranas pronucleares (pronuclear fading) ya habría ocurrido de forma prematura; encontrándose por tanto en la fase G2 del primer ciclo celular. En este sentido, se ha documentado que los pre-embriones con rotura de membrana pronuclear prematura y por consiguiente, con primera división mitótica temprana, dan lugar a pre-embriones con una mayor tasa de formación de blastocistos,

INTRODUCCIÓN

además de una mayor tasa gestación e implantación; sin embargo, pese a que este colectivo de pre-embryones presente un correcto desarrollo embrionario, con buena morfología (Rienzi et al. 2005) es necesario asegurar su euploidía, ya que la ausencia de pronúcleos no garantiza su origen bipronuclear (2PN); pudiendo haber contenido en origen cualquier otra fórmula.

Por otra parte, la observación de ambos corpúsculos polares con ausencia de pronúcleos podría ser debida a que el ovocito reanuda la meiosis tras la entrada del espermatozoide, pero no prospera hacia la formación de los pronúcleos; es decir, son ovocitos que aunque inician el proceso de activación, no son capaces de formar las estructuras pronucleares debido a una activación ovocitaria incompleta. Estos ovocitos reciben colectivamente el nombre de ovocitos metafase III (MIII) y fueron descritos inicialmente en ratón y posteriormente en humanos; en estos ovocitos, los cromosomas maternos se reorganizan en una nueva placa metafásica y no prosperan hacia estructuras pronucleares (Kubiak 1989). Estudios cromosómicos y ultraestructurales del citoesqueleto microtubular indican que el 44.5% de estos ovocitos, quedan detenidos en diferentes fases del primer ciclo celular, si bien hubieron sido penetrados e iniciaron el proceso de pre-activación por el espermatozoide fecundante (Rawe et al. 2000b, Simerly et al. 1995). La incidencia de ovocitos MIII cuando se producen fallos de activación en el ovocito es mayor tras ICSI que tras FIV, siendo su frecuencia de 20% y 9,5% respectivamente (Rawe et al. 2000b).

INTRODUCCIÓN

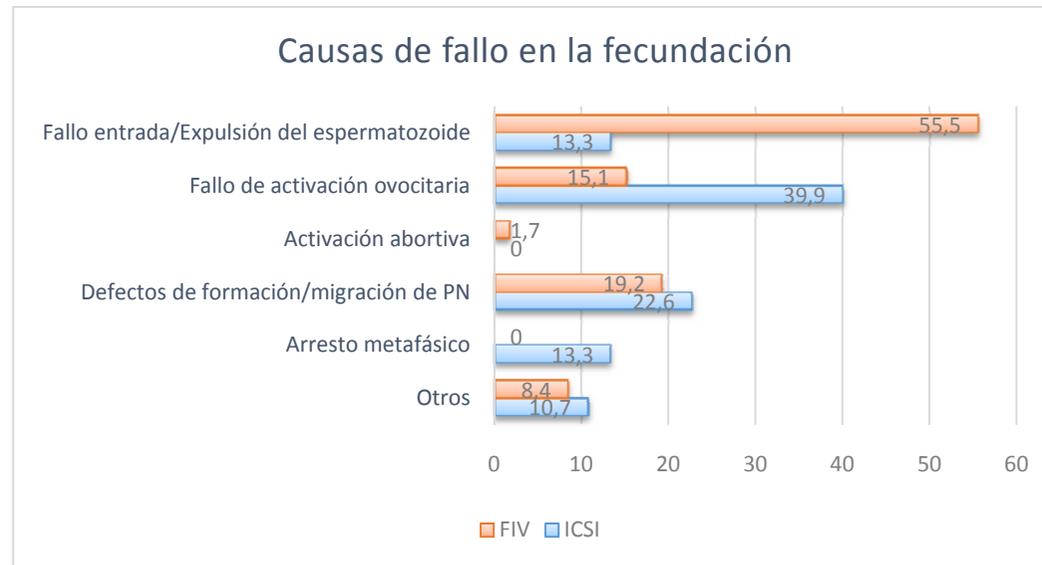


FIGURA 4. Frecuencias comparadas tras FIV e ICSI de las posibles causas de fallos en el proceso de la fecundación.

Fecundación anómala

Se considera que un cigoto ha fecundado de forma anómala, cuando observamos la presencia de un número de pronúcleos diferente a los dos esperados, independientemente de que se haya producido o no la expulsión del segundo corpúsculo polar.

Las dos anomalías principalmente observadas tras aplicar procedimientos de FIV convencional o ICSI se refieren al número de pronúcleos observado y engloban genéricamente a los cigotos unipronucleares (1PN) y los cigotos tripronucleares (3PN), aunque, en ocasiones, pueden también observarse cigotos poliploides, caracterizados por contener más de tres pronúcleos.

La mayoría de los pre-embiones anómalamente fecundados son capaces de dividirse, dando lugar a pre-embiones con apariencia morfológica similar a aquéllos bipronucleares a pesar de su ploidía y composición parental.

El porcentaje de pre-embiones unipronucleares y polipronucleares tras FIV varía desde el 2.7% al 12.5% respectivamente (Balakier et al. 1993b, Staessen et al. 1993, Sultan et al. 1995), mientras que tras la aplicación de ICSI dicho porcentaje oscila del 4.9% al 11.4%, respectivamente (Macas et al. 1996, Sultan et al. 1995, Van Steirteghem et al. 1993).

Fecundación anómala: Cigotos unipronucleares; presencia de los dos corpúsculos polares con ausencia de uno de los pronúcleos (Fórmula: 2,1)

Los cigotos unipronucleares se caracterizan morfológicamente por haber extruido el segundo corpúsculo polar y presentar una única estructura pronuclear, siendo su incidencia en humanos del 1.6 - 6.7%, independientemente de la técnica de fecundación aplicada (FIV o ICSI (Balakier et al. 1993a, Munné et al. 1993, Plachot and Crozet 1992a, Reichman et al. 2010, Staessen et al. 1993, Staessen and Van Steirteghem 1997b)). Su capacidad de desarrollo in vitro es comparable a la observada en los pre-embriones fecundados correctamente, presentando una elevada capacidad de progresar hasta el estadio de blastocisto.

En la bibliografía consultada se ha reportado que tras el analizar su composición cromosómica mediante FISH, los pre-embriones procedentes de cigotos unipronucleares resultantes de aplicar ambas técnicas FIV e ICSI, un 24.3% de los mismos son haploides, un 48.6% diploides y, el resto son poliploides (3.2%) o mosaicos (23.9%) (Feenan and Herbert 2006).

Un estudio realizado por el grupo de Staessen (Staessen and Van Steirteghem 1997b) mostró que la proporción de pre-embriones haploides y diploides era variable, según la técnica de origen (tabla1), postulándose diferentes causas para explicar el origen de los cigotos

INTRODUCCIÓN

unipronucleares, siendo clave su ploidía (haploides vs diploides) y la tecnología de fecundación aplicada.

Cigotos unipronucleares haploides

La incidencia de pre-embriones haploides, derivados de cigotos unipronucleares fue mayor cuando la técnica de fecundación in vitro aplicada fue ICSI que cuando fuera FIV (31.2% vs. 13.1 %), respectivamente (Staessen and Van Steirteghem 1997a).

Para los cigotos haploides procedentes de FIV convencional, la principal causa que justifica su origen fue en un principio la **activación partenogénica prematura** (Cohen et al. 1995, Cohen et al. 1995, Staessen et al. 1993), debida a que la reanudación de la meiosis hubiera sido desencadenada por una causa interna o externa, independiente del espermatozoide; en cambio, se observó que el origen de los cigotos unipronucleares haploides podría ser ginogenético o androgenético, al igual que sucedería en los cigotos unipronucleares procedentes de ICSI ((Balakier et al. 1993b, Staessen and Van Steirteghem 1997b). Al observarse señal específica del cromosoma Y en el 36% de los cigotos y, teniendo en cuenta que la mitad de los espermatozoides contienen el cromosoma X y la otra mitad el cromosoma Y, podría deducirse que en el 70-75% de los cigotos unipronucleares se hubiera producido la entrada del espermatozoide (Staessen and Van Steirteghem 1997a).

Tras la aplicación de ambas técnicas, FIV e ICSI, los cigotos unipronucleares haploides podrían originarse como resultado de la

INTRODUCCIÓN

ausencia de la formación del segundo pronúcleo, es decir un fallo en la dinámica de la cromatina, no habiéndose constituido el pronúcleo materno; en cuyo caso el cigoto unipronuclear resultante sería un androgenota o, alternativamente, obviándose la constitución del pronúcleo paterno, resultando, por tanto, un ginogenota haploide (Figura 5).

En relación al origen ginogenético de los cigotos unipronucleares, un estudio realizado por el grupo de Dozorstev (Dozortsev et al. 1994) en cigotos monopronucleares generados por ICSI se observó que en el 52% de los cigotos unipronucleares, la cabeza espermática permanecía condensada en el citoplasma ovocitario, no formándose ninguna estructura pronuclear paterna (Dozortsev et al. 1994). Este hecho fue confirmado posteriormente por el grupo de Flaherty (1995), reportando que en el 80% de los cigotos unipronucleares procedentes de ICSI era posible identificar un espermatozoide condensado (Flaherty et al. 1995). Balakier (1993) describió esta misma causa para explicar el origen uniparental de los cigotos unipronucleares procedentes de FIV (Balakier et al. 1993b).

Existen tres posibles causas que podrían explicar el fallo en la formación de pronúcleo masculino; generándose por tanto ginogenotas haploides: (i) la ausencia de entrada espermática tras FIV o la eyeción del espermatozoide tras la aplicación de la ICSI; (ii) la ausencia de descondensación o remodelación de la cabeza espermática y por ende, la persistencia del espermatozoide en estado condensado y (iii) la descondensación parcial de la cromatina

INTRODUCCIÓN

espermática (Flaherty et al. 1995); siendo en la mitad de los casos, el fallo en la descondensación de la cromatina espermática, la causa de la ausencia de formación pronuclear en los cigotos unipronucleares haploides tras ICSI; dichos pre-embiones serían haploides ginogenéticos.

Se pueden observar cigotos unipronucleares androgenéticos si éstos se han generado por un fallo en la formación del pronúcleo materno. Su incidencia es baja, supone cerca de un 4% de los pre-embiones unipronucleares haploides (Kovacic and Vlajsavljevic 2000). Esta situación puede originarse cuando se produce la expulsión de los dos sets de cromosomas maternos en el segundo corpúsculo polar (no disyunción en la meiosis II) (Levron et al. 1995). En este caso el pronúcleo haploide paterno cursaría con extrusión del segundo corpúsculo polar, que contendría toda la cromatina materna.

Cigotos unipronucleares diploides

De entre los cigotos unipronucleares, se ha descrito que la incidencia de diploides ronda el 50% (Plachot and Crozet 1992b, Staessen et al. 1993); habiéndose observado en diferentes estudios que dicha proporción más elevada cuando los cigotos unipronucleares proceden de FIV convencional que de ICSI (56.9% vs. 28.0%, respectivamente) (Staessen and Van Steirteghem 1997a, Sultan et al. 1995, Van der Heijden, Godfried W et al. 2009).

INTRODUCCIÓN

TABLA 1. Resultados del análisis por FISH de los pre-embriones procedentes de cigotos unipronucleares tras aplicar las técnicas de FIV e ICSI.

	ICSI (n,%)	FIV (n,%)
DIPLOIDES	17 (27.9)	56 (48.7)
XX1818	10	31
XY1818	6	25
YY1818	1	0
HAPLOIDES	19 (31.2)	15 (13.1)
X18	16	14
Y18	3	1
TRIPLOIDES	0	1(0.8)
XXX181818	0	1
MOSAICOS	9 (14.8)	12 (10.4)
X18/XX1818	6	10
X18/XXX1818181	2	2
X18/XXX181818/XXXX18181818	1	0
MOSAICOS COMPLEJOS	16 (26.0)	31 (27.0)
CON Y	12	15
SIN Y	4	16

INTRODUCCIÓN

Hay tres hechos que apoyan la hipótesis de que los cigotos unipronucleares podrían corresponderse con cigotos correctamente fecundados, que son: (i) la capacidad de desarrollo in vitro hasta el estadio de blastocisto (Gras and Trounson 1999); (ii) el desarrollo de una línea de células madre embrionarias humanas diploides 46XX derivada de un cigoto unipronuclear (Suss-Toby et al. 2004) y; (iii) el registro de gestaciones tras la transferencia de pre-embriones derivados de cigotos unipronucleares (Barak et al. 1998, Gras and Trounson 1999, Staessen and Van Steirteghem 1997a, Sultan et al. 1995).

El origen de la diploidía de los cigotos unipronucleares fue explicada, en primera instancia, por la **asincronía en la formación de los pronúcleos** (Munné et al. 1993, Staessen et al. 1993); se ha observado asincronía pronuclear en el 25% de los cigotos unipronucleares, observándose ambos pronúcleos transcurridas 4 horas desde la primera evaluación (Staessen et al. 1993); esta hipótesis ha sido corroborada mediante estudios de cultivo embrionario según tecnología time-lapse, según los cuales se ha observado una asincronía en el desarrollo de los pronúcleos en 38% de los ovocitos fecundados, dicha asincronía se ha calculado que oscila entre 30 minutos y 2 horas (Payne et al. 1997).

Pese a lo anteriormente indicado, en el 75% de los casos no se observa la formación del segundo pronúcleo, argumentando que el origen de los cigotos unipronucleares de FIV podría deberse a la **yuxtaposición de ambos pronúcleos parentales en una única**

INTRODUCCIÓN

membrana nuclear (Levron et al. 1995, Tesarik and Mendoza 1996). En los mamíferos, no se produce fusión pronuclear; sin embargo, lo que sí puede ocurrir es la formación de una envoltura nuclear alrededor de los dos pronúcleos (Levron et al. 1995), lo cual ocurriría si el espermatozoide se deposita cerca del huso meiótico del ovocito en el momento de la ICSI. Desafortunadamente, este hipotético origen no ha podido ser confirmado mediante observación en tiempo real, empleando tecnología time-lapse (Payne et al. 1997).

Por último, cabe mencionar el excepcional caso reportado por el grupo de Staessen, en el que uno de los pre-embriones unipronucleares diploides de ICSI resultó ser diploide monoparental (YY). Entre las posibles causas para su formación, cabe destacar la fecundación del ovocito por parte de un espermatozoide diploide, sin que intervenga el material genético del ovocito, o bien, la fecundación por un espermatozoide haploide con posterior diploidización del genoma de nuevo, sin que intervenga el material genético ovocitario (Staessen and Van Steirteghem 1997b).

Cigotos unipronucleares mosaicos

Los cigotos unipronucleares mosaicos representan el 40.8% de los unipronucleares derivados tras ICSI y el 37.4% de aquéllos de FIV (Tabla 1). Los pre-embriones mosaicos pueden tener combinaciones de blastómeras haploides con diploides, triploides e incluso tetraploides. Pero además, se han identificado pre-embriones

INTRODUCCIÓN

mosaicos complejos, que son aquéllos en los que cada núcleo presenta una composición cromosómica diferente.

Se ha propuesto que los pre-embriónes mosaicos, derivados de cigotos unipronucleares se generan tras la activación del ovocito, seguida de una diploidización espontánea tras la primera división. En cambio en los mosaicos complejos se producen segregaciones cromosómicas anormales, como ocurre en los pre-embriónes correctamente fecundados (Munne et al. 1994); sin embargo, su incidencia es bastante mayor debido a que los pre-embriónes procedentes de cigotos unipronucleares son más inestables (Staessen and Van Steirteghem 1997b).

Fecundación anómala: Cigotos tripronucleares; presencia de uno o dos corpúsculos polares con presencia de tres pronúcleos (Fórmula: 1,3 y 2,3)

Los pre-embriónes tripronucleares se caracterizan por presentar tres estructuras pronucleares, independientemente de la fórmula corpuscular. Es generalmente aceptado que los pre-embriónes procedentes de cigotos tripronucleares presenten una fórmula cromosómica triploide ($3n$) en lugar de la normal diploide ($2n$), pudiéndose dar dos combinaciones parentales diferentes: que el cigoto tripronuclear este compuesto por un set cromosómico materno y dos paternos (tripronuclear diándrico) o un set cromosómico paterno y dos maternos (tripronuclear digínico) (Dyban and Baranov 1978, Edwards et al. 1967).

INTRODUCCIÓN

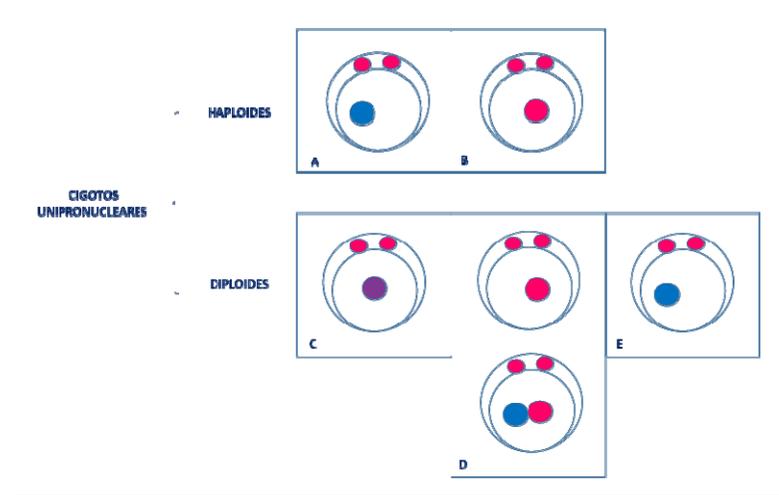


FIGURA 5. Esquema de las posibles etiologías de la generación de los cigotos unipronucleares. (A) Cigoto unipronuclear androgenético haploide (presencia única del pronúcleo masculino); (B) Cigoto unipronuclear ginogenota haploide (presencia única del pronúcleo femenino); (C) Cigoto unipronuclear diploide con presencia de un único pronúcleo en el que se ha producido yuxtaposición de ambos pronúcleos en una única membrana nuclear; (D) Cigoto unipronuclear diploide con presencia de uno de los pronúcleos en el momento de evaluación de la fecundación, apareciendo tardíamente el segundo pronúcleo; (E) Cigoto unipronuclear diploide con la presencia de un único pronúcleo en el que se ha producido yuxtaposición de dos pronúcleos de origen paterno.

INTRODUCCIÓN

El mecanismo por el que se pueden producir cigotos tripronucleares depende principalmente de la tecnología de fecundación que les dio origen.

Tras aplicar técnicas de reproducción asistida, se observan cigotos con tres pronúcleos (tripronucleares) con una frecuencia del 5-8.1% tras fecundación in vitro convencional (Pieters et al. 1992b, Porter et al. 2003) o del 2.5-6.2% tras microinyección intracitoplasmática (Pieters et al. 1992a, Rosenbusch 2008).

Los cigotos tripronucleares diándricos resultan de la fecundación de un ovocito haploide por dos espermatozoides (dispermia) o bien, son resultado de una fecundación monospérmica por un espermatozoide diploide. En general, estos cigotos tripronucleares diándricos son morfológicamente identificables además de por presentar las típicas tres estructuras pronucleares que le dan nombre, por la presencia de los dos corpúsculos polares en el espacio perivitelino, resultado de una respuesta ovocitaria de activación normal. Estos cigotos rinden una fórmula común en los laboratorios de fecundación in vitro conocida coloquialmente como "2,3" (Figura 6).

Por su parte, los cigotos tripronucleares digínicos resultan de una fecundación monospérmica haploide y son morfológicamente identificables por la presencia de las tres estructuras pronucleares típicas junto con un único corpúsculo polar, el primero, en el espacio perivitelino. Estos cigotos rinden una fórmula común en los

INTRODUCCIÓN

laboratorios de fecundación in vitro conocida coloquialmente como “1,3” (Figura 6).

Además de la esperada triploidía, en los pre-embriones tripronucleares generados tras la aplicación de ambas técnicas, FIV e ICSI, el análisis citogenético mediante FISH y análisis del cariotipo nos muestran que se forman complementos cromosómicos tetraploides o complejos mosaicos derivados de la ausencia de un equilibrio en los complementos cromosómicos paternos y maternos; dando lugar a una segregación cromosómica caótica (Feenan and Herbert 2006).

La elevada incidencia de mosaicismo en los pre-embriones tripronucleares podría ser atribuida a divisiones celulares caóticas; especialmente en los pre-embriones tripronucleares derivados de una fecundación dispérmica, en los que se produce una doble herencia centriolar, cada uno de los cuales seguirá su dinámica de multiplicación propia tras la rotura de la membrana pronuclear (Palermo et al. 1994b); (Figura 7).

En cuanto al potencial de desarrollo de los pre-embriones tripronucleares, en general, independientemente de su origen, digínicos o diándricos, los pre-embriones triploides, son capaces de desarrollarse hasta estadios post-implantaciones. De hecho, se han descrito gestaciones de pre-embriones triploides generados in-vivo, que supone el 15% - 18% de anomalías citogenéticas en los abortos espontáneos (Dyban and Baranov 1978). Los pre-embriones con dotación cromosómica triploide son generalmente letales durante el desarrollo embrionario o fetal en mamíferos (Fryns and Witters

INTRODUCCIÓN

2003), siendo muy inusual el nacimiento de niños triploides en los cuales se produce la muerte en el periodo postnatal temprano. In vivo, el origen de la triploidía suele ser por dispermia; de hecho se ha descrito que el 85% de pre-embryones triploides humanos son de origen diádrico debido a la polispermia (Jacobs et al. 1982, Surti et al. 1979), habiéndose reportado pocos casos de pre-embryones triploides digínicos (Lauritsen et al. 1979, Uchida and Freeman 1985).

Cigotos tripronucleares procedentes de FIV

En los tratamientos de FIV convencional, la observación de cigotos tripronucleares suele ser mayoritariamente debida a una fecundación polispermica (Ho et al. 1994), no pudiendo descartar que su origen se deba a la fecundación de un ovocito haploide por un espermatozoide diploide (McFadden et al. 2002). Aunque es poco habitual que se produzca la fecundación por parte de espermatozoides diploides, la frecuencia aumenta cuando se trata de muestras de varones infértiles oligozoospermicos (Egozcue et al. 2000, Egozcue et al. 2002), donde pueden haber ocurrido errores en las meiosis I ó II (Codina-Pascual et al. 2006). Sea cual fuere el origen, los cigotos formados son diádricos y presentan dos estructuras pronucleares paternas y una materna, cursando con una correcta respuesta de activación ovocitaria evidente por la presencia de los dos corpúsculos polares en el espacio perivitelino.

El análisis cromosómico de los pre-embryones tripronucleares, resultantes tras la aplicación de la FIV convencional revela que el 86%

INTRODUCCIÓN

son dispérmicos en origen (Plachot and Crozet 1992a), por lo que generalmente se acepta que los cigotos tripronucleares identificados tras FIV convencional son diándricos y originados por la penetración de dos espermatozoides haploides y resultado de un bloqueo de la polispermia ineficiente (Rosenbusch et al. 1997, Trounson et al. 1999). La incidencia de polispermia puede verse alterada por (i) la variación de la concentración de estradiol; (ii) el envejecimiento ovocitario dado por un incremento en el tiempo pre-inseminación; (iii) la concentración, motilidad y porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales en la muestra de inseminación (Ho et al. 1994); (iv) la sobre-inseminación o empleo de una concentración superior a 100.000 espermatozoides/mL para la co-incubación gamética; (vi) deficiencia en la reacción cortical sub-óptima de los ovocitos y/o (vii) la inseminación de ovocitos con zonas pelúcidas dañadas (Sathananthan et al. 1999).

La dispermia produce la formación de dos pronúcleos de origen paterno y, al igual que ocurre en la fecundación monospérmica, el ovocito reanuda y culmina la meiosis con la expulsión del segundo corpúsculo polar.

Cuando se produce la fecundación dispérmica, el ovocito contendrá además de un set extra de cromosomas paternos, un centriolo adicional. Contando con dos centriolos, el huso mitótico generado será tripolar en lugar del característico bipolar, presente en los cigotos correctamente fecundados. En consecuencia, las segregaciones cromosómicas y el patrón de división suelen ser

INTRODUCCIÓN

caóticos (Sathananthan et al. 1996). En este sentido, la formación de un huso mitótico tripolar debido a la presencia de dos centriolos, da lugar a una elevada proporción de cigotos tripronucleares que se dividen en el primer ciclo celular en tres células (Kola et al. 1987).

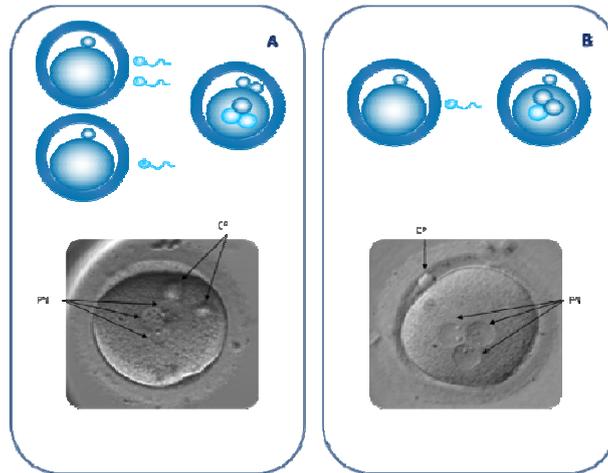


FIGURA 6. Imágenes representativas y fotografías de un cigoto tripronuclear diándrico y un cigoto tripronuclear digínico; (A) se observa la presencia de los dos corpúsculos polares (CP) y tres estructuras pronucleares (PN), dos de origen paterno y una de origen materno, su origen puede ser la fecundación polispérmica debida a la entrada de dos espermatozoides o la fecundación por un espermatozoide diploide; (B) se observa la presencia del primer corpúsculo polar (CP) y tres estructuras pronucleares (PN), una de origen paterno y dos de origen materno; se genera debido a la no extrusión del segundo corpúsculo polar.

INTRODUCCIÓN

Cigotos tripronucleares procedentes de ICSI

Tras la aplicación de la técnica de ICSI, aseguramos que únicamente ha penetrado un espermatozoide en el ovocito. Por tanto, el origen de los cigotos tripronucleares después de una ICSI es fundamentalmente digínico, debido a la no expulsión del segundo corpúsculo polar (Staessen and Van Steirteghem 1997b, Van Steirteghem et al. 1993); bien por defectos estructurales en el huso meiótico o bien por causas citoplasmáticas que puedan alterar la conformación del mismo (Grossmann et al. 1997). Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de un origen diándrico debido a que la principal indicación de la ICSI es el factor masculino y, por tanto, es posible la microinyección de un espermatozoide con defectos en la meiosis I ó II y por tanto diploide (Codina-Pascual et al. 2006).

Los cigotos tripronucleares digínicos presentan tres pronúcleos y un solo corpúsculo polar, el primero, debido a que no se produce la expulsión del segundo corpúsculo polar y suelen originarse tras la microinyección monospérmica. Su origen puede deberse a errores en la segregación cromosómica; debido a la disrupción de los microtúbulos si se produce la microinyección cerca del huso meiótico del ovocito (Macas et al. 1996), el set cromosómico materno que iba a ser expulsado en el segundo corpúsculo polar permanecería en el interior del ooplasma y conformaría el tercer pronúcleo (Rawe et al. 2000a).

INTRODUCCIÓN

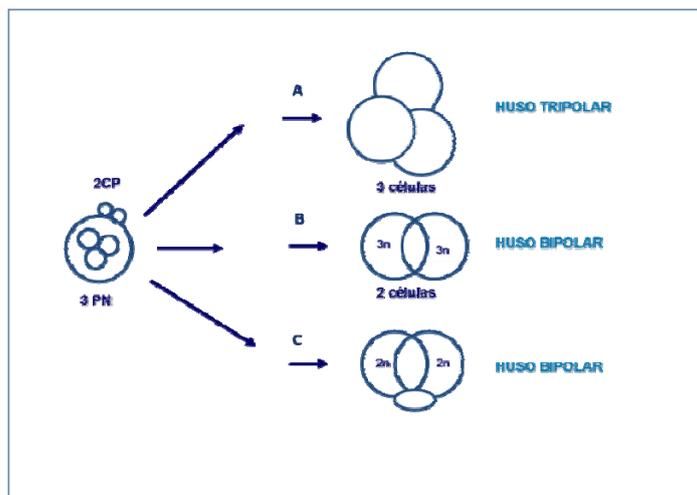


FIGURA 7. Imágenes representativas de las posibles combinaciones en la composición cromosómica de los pre-embriónes tripronucleares (3PN) diándricos en los que se ha producido la extrusión del segundo corpúsculo polar (CP), según la formación del huso mitótico; (A) se generan 3 células con composición cromosómica anormal debido a la formación de un huso mitótico tripolar; (B) se generan dos células triploides debido a el reparto cromosómico equitativo tras la formación de un huso mitótico diploide; (C) tras la formación de un huso mitótico bipolar tras producirse un reparto desigual se crean dos células diploides y una haploide.

Los estudios citogenéticos realizados sobre cigotos tripronucleares procedentes de ICSI reportados indican un porcentaje variable de pre-embriónes diploides tras ser analizados por FISH desde 13.2% hasta el 36% (Balakier 1993, Grossmann et al. 1997, Macas et al. 1996, Staessen and Van Steirteghem 1997a). Este hecho podría ser explicado mediante el proceso de diploidización inmediata de los pre-

INTRODUCCIÓN

embriones en estadio de cigoto mediante la eliminación de uno de los complementos cromosómicos haploides, debido a la formación de un fragmento citoplasmático que contenga el pronúcleo materno extra. Si dicho fragmento degenerara se obtendría un pre-embrión diploide puro, en el caso de que no sea así se obtendría un pre-embrión mixoploide $2n/n$ (Rosenbusch and Schneider 2009).

Fecundación anómala: Otros

Ovocitos degenerados

Los ovocitos degenerados tras la aplicación de la técnica ICSI suponen alrededor de un 10% del total de ovocitos microinyectados (Schwartz et al. 1996, Van Steirteghem et al. 1993). Su causa puede ser: (i) daños en el huso meiótico en el momento de la microinyección, (ii) exceso de fluido microinyectado junto con el espermatozoide o (iii) anormales niveles hormonales tras la estimulación; en este sentido se ha observado que las bajas concentraciones de estradiol, dan lugar a ovocitos con membranas frágiles que pueden resultar dañadas con la microinyección (Palermo et al. 1996).

Pre-embiones en estadio de células (Partenogenotas)

La presencia de pre-embiones en estadio de células en el momento de evaluación de la fecundación puede deberse a que una división partenogenética ovocitaria haya tenido lugar como resultado de pre-activación sin penetración espermática.

INTRODUCCIÓN

Por otra parte, es también posible, como ya se ha indicado anteriormente, que los pre-embriones partenogenéticos resulten de una fecundación correcta asociada a un desarrollo pre-embionario inusualmente acelerado.

RESCATE DE PRE-EMBRIONES CON FECUNDACIÓN ANORMAL. RESTAURACIÓN DE LA PLOIDÍA

Definimos la restauración de la ploidía como la corrección de aquéllos pre-embriones que habiendo mostrado una fecundación anómala, restablecen la condición diploide.

Dicha corrección se puede dar de forma natural por los mecanismos de autocorrección embrionaria, intrínsecos a cada pre-embrión o bien, inducidos mediante micromanipulación de éstos.

Se ha demostrado que células embrionarias procedentes de pre-embriones no viables, cromosómicamente anormales, pueden dar lugar a células normales según un proceso de autocorrección embrionaria (Munné et al. 2005).

Ovocitos MII no fecundados

La estrategia generalmente más aceptada para rescatar aquellos ovocitos en los que se ha producido un fallo de fecundación por FIV convencional consiste en practicar una re-inseminación mediante ICSI (proceso conocido como rescate mediante ICSI), para obtener pre-embriones normalmente fecundados (Lundin et al. 1996, Lundin et al. 2001, Morton et al. 1997, Tsirigotis et al. 1995). Este procedimiento

INTRODUCCIÓN

se ha utilizado en casos de fecundación anormalmente baja o incluso en fallos totales de la fecundación y su causa parece encontrarse asociada al protocolo de estimulación ovárica utilizado, defectos ovocitarios o espermáticos (Benadiva et al. 1999).

Empleando este procedimiento de rescate, las tasas de fecundación varían desde el 28% al 60%, siendo las tasas de embarazo generalmente muy bajas y variables (0%-38.5%) (Lundin et al. 1996, Morton et al. 1997, Tsirigotis et al. 1995, Yuzpe et al. 2000) observándose además tras la aplicación de esta técnica de rescate una mayor incidencia de pre-embryones tripronucleares.

El factor clave para aplicar el rescate por ICSI es la hora de realización del ICSI, ya que de ello depende la tasa de fecundación normal en pro de la mayor incidencia de cigotos tripronucleares (Nagy et al. 1995).

Además del efecto del tiempo de re-inseminación sobre la tasa de fecundación normal, existe también una relación directa (Edwards and Brody 1995b)(Edwards and Brody 1995a) entre el tiempo que transcurre desde la obtención de los ovocitos y su inseminación con el desarrollo embrionario (Edwards and Brody 1995b). Así, el tiempo óptimo para realizar el ICSI de rescate oscila entre las 19 y 22 horas desde la inseminación inicial de los ovocitos (Yuzpe et al. 2000), observándose una tasa de embriones normales entorno al 50% (Morton et al. 1997, Nagy et al. 1995).

Por otro lado, se ha descrito que si el fallo en el proceso de la fecundación es debido a una muestra de semen anormal e

INTRODUCCIÓN

intentamos realizar el rescate mediante ICSI, lo esperable es que la situación no mejorará debido al empelo del mismo origen seminal sobre ovocitos envejecidos (Edwards and Brody 1995b). De hecho, se ha reportado que la tasas de anomalías cromosómicas tras realizar dicho procedimiento es muy elevada, llegando a ser del 100% (Pehlivan et al. 2004). Por lo tanto, se puede concluir que, el rescate del fallo de fecundación mediante un ICSI demorado no es un procedimiento seguro, debido a la alta incidencia de anomalías cromosómicas observada.

En los ovocitos MII procedentes de ICSI no se realiza dicho rescate, debido a que dichos ovocitos ya han sido microinyectados por un espermatozoide y si se realizase la inyección de un segundo espermatozoide, los cigotos resultantes serían con una elevada probabilidad triploides.

Ovocitos con dos corpúsculos polares y ninguna estructura pronuclear

Como ya se ha comentado anteriormente, el origen de tales estructuras puede deberse bien a un ciclo celular anómalamente acelerado, o bien a una activación ovocitaria incompleta. En consecuencia, se ha reportado que en primer caso, un 50% de los ovocitos son diploides (Jamieson et al. 1994, Manor et al. 1996) y dan lugar a una mayor tasa de formación de blastocistos además de una mayor tasa implantación y gestación; no quedando otra estrategia que el escrutinio de las filmaciones cuando sea posible o la espera y

INTRODUCCIÓN

evaluación del “early cleavage” cuando el sistema de cultivo fuere convencional. En tales situaciones, la estrategia embriológica adecuada será llevar los pre-embryones hasta el estadio de blastocisto y analizar su ploidía y heteroparentalidad.

Por otra parte, aquellos cigotos que presentan dos corpúsculos polares y ninguna estructura pronuclear, causada por una activación ovocitaria incompleta, y por tanto, siendo MIII, en el caso de ovocitos que han iniciado el proceso de activación, pero no ha culminado, podrían ser rescatados mediante activación subsidiaria de dichos ovocitos de forma artificial. Dicho procedimiento solamente ha sido descrito de forma experimental en ratón (Kubiak 1989).

Cigotos unipronucleares

Como ya se ha indicado anteriormente, aproximadamente un 50% los pre-embryones unipronucleares tanto los generados tras la aplicación de FIV convencional como ICSI son diploides, habiéndose reportado nacidos vivos (Itoi et al. 2015).

Actualmente, disponemos de criterios que nos ayudan a predecir la euploidía en los pre-embryones unipronucleares; sin embargo, la única forma de asegurar tal aserción es mediante el estudio citogenético por FISH, PGS y fingerprinting. Entre estos criterios se encuentran:

- Re-evaluación póstuma de los cigotos unipronucleares con la finalidad de constatar la posible formación de un segundo

INTRODUCCIÓN

pronúcleo si lo hubiese, debido a la existencia un desfase en la formación de ambos pronúcleos (Payne et al. 1997, Staessen et al. 1993).

- Evaluación del diámetro pronuclear, ya que un diámetro anormalmente aumentado podría sugerir una condición diploide (Tesarik and Kopecny 1989b); sin embargo, y pese a existir referencias a este aspecto, no se ha realizado ningún estudio que correlacione el tamaño pronuclear con la ploidía de los pre-embryones unipronucleares.
- Evaluación del número de precursores nucleolares podría ser otro posible predictor de diploidía, ya que se ha reportado que el número de éstos es casi el doble en los cigotos unipronucleares diploides que en aquéllos haploides (Tesarik and Mendoza 1996).
- Evaluación del potencial de desarrollo pre-embryonario in vitro hasta el estadio de blastocisto podría ser también un indicador de diploidía. El grupo de Itoi (2015) propone que los pre-embryones unipronucleares procedentes de FIV convencional dan lugar a una mayor tasa de blastocistos que aquéllos procedentes de ICSI (Itoi et al. 2015); siendo además, los pre-embryones unipronucleares que alcanza el estadio de blastocisto, con mayor frecuencia diploides que aquéllos que, siendo unipronucleares ven detenido su desarrollo pre-embryonario ya en estadio de células (Sultan et al. 1995). Por su parte, este mismo grupo concluye que todos los pre-embryones unipronucleares procedentes de FIV convencional que progresan in vitro hasta el estadio de blastocistos fueron analizados y mostraron ser diploides (Otsu et al. 2004).

INTRODUCCIÓN

Por todo ello, los cigotos unipronucleares pudieran ser rescatados mediante el mero cultivo in vitro a blastocisto y análisis cromosómico ulterior; estando esta estrategia especialmente indicada cuando la metodología de fecundación que les dio origen fue la FIV convencional (Nagy et al. 1998, Staessen and Van Steirteghem 1997b, Sultan et al. 1995, Van der Heijden, Godfried W et al. 2009). Por el hecho de no existir un método diagnóstico de ploidía en los cigotos unipronucleares, no procede, por ende, aplicar ninguna manipulación adicional sobre los mismos para de corregir su ploidía.

Pre-embriones en estadio de células en el momento de la observación de la fecundación

Si la causa de la división prematura de los pre-embriones es la división partenogenética, no vamos a poder restablecer su ploidía.

Sin embargo, si la causa de que los pre-embriones se encuentren en estadio de células en el momento de evaluación la fecundación es debido a un primer ciclo celular acelerado, podremos rescatarlos, en el caso de que se hayan cultivado en sistema de time lapse, en cuyo caso se podrá observar la formación de los pronúcleos y se podrá discriminar, si dichos pre-embriones proceden de cigotos correctamente fecundados.

En caso de que no se hayan cultivado en sistema time-lapse, el único modo de saber si realmente son pre-embriones correctamente fecundados, si la fecundación ha sido anómala o si se han producido por división partenogenética es realizar el análisis genético de éstos.

Cigotos tripnucleares

Autocorrección pre-embionaria: Mecanismos de corrección embrionaria

La autocorrección de los pre-embiones es un mecanismo propiamente pre-embionario que previene la prosperidad de las anomalías cromosómicas. Hay descritos diversos mecanismos por lo que pre-embiones trisómicos, sufren un proceso de autocorrección que permiten recuperar la condición diploide de cada juego cromosómico inicialmente alterado (Kalousek et al. 1993, Ledbetter and Engel 1995, Wolstenholme 1996). Este fenómeno de pérdida cromosómica en las células aneuploides ha sido denominado “rescate de cigotos trisómicos” (Kalousek et al. 1993).

El rescate de cigotos trisómicos ha sido descrito que acontece a medida que avanza el desarrollo pre-embionario, quedando demostrado que tras el cultivo prolongado *in vitro*, la proporción de células aneuploides disminuye en pro de un incremento en la proporción de células euploidias (Munné et al. 2005). En este sentido, se ha reportado que cuando la proporción de células euploides en los pre-embiones mosaicos es de al menos un 66%, el pre-embrión es capaz de desarrollarse y dar lugar a un blastocisto euploide que puede incluso culminar su desarrollo con el nacimiento de un bebé sano (Li et al. 2005). Por lo tanto, aunque el mosaicismo fuere un fenómeno que ocurre de forma frecuente durante el periodo pre-implantatorio, éste puede ser eliminado o paliado en

INTRODUCCIÓN

tanto en cuanto avance el desarrollo pre-embrionario (Barbash-Hazan et al. 2009). En este sentido, se ha demostrado que tras derivar células madre embrionarias a partir de pre-embriones aneuploides, la mayoría de las colonias derivadas fueron caracterizadas como euploides, lo cual sugiere que las aneuploidías no son permanentes, sino más bien son susceptibles de corrección (Peura et al. 2008).

El mecanismo propuesto para restaurar la ploidía en los pre-embriones tripronucleares se denomina “rescate de trisómicos” y, se define como la pérdida del set de cromosomas extra en tales pre-embriones. Los pre-embriones tripronucleares se consideran trisómicos completos, es decir presentan un set cromosómico extra para cada uno de los cromosomas. El mecanismo exacto por el que se produce este rescate se desconoce (Los et al. 1998); sin embargo, se ha demostrado que la capacidad de desarrollo hasta el estadio de blastocisto es mayor en pre-embriones trisómicos que en pre-embriones que presentan otras aneuploidías (Rubio et al. 2007a). En este sentido, se han propuesto tres mecanismos mediante los cuales puede darse éste fenómeno de normalización cromosómica: retraso de anafase (en inglés, *anaphase lagging*), no disyunción cromosómica (en inglés, *chromosome nondisjunction*) y destrucción cromosómica (en inglés, *chromosome demolition*) en las divisiones post-cigóticas tempranas (Munné et al. 2005).

INTRODUCCIÓN

Retraso de anafase o Anaphase lagging

Este mecanismo de rescate de trisómicos, consiste en una separación retrasada de cromátidas hermanas durante la división mitótica. Este retraso suele afectar a un juego cromosómico, de forma que uno de los cromosomas no se incorpora en ninguna de las células hijas, produciéndose un reparto desigual y, resultando una célula hija trisómica y otra disómica corregida (Kalousek 2000). (Figura 9.A)

No disyunción cromosómica o Non disjunction

Este mecanismo de rescate de trisómicos consiste en un error en el mecanismo de separación de las cromátidas durante la división mitótica; provocando un reparto cromosómico desequilibrado. Este fenómeno provoca un retraso en el desarrollo pre-embriionario; sin embargo, parece ser el mecanismo de corrección más eficiente por generar una célula hija tetrasómica letal y otra corregida con carga disómica que, teóricamente, no verá alterada su velocidad o ritmo de multiplicación (Tarin et al. 1992). En este caso, el número de células que constituyen el embrión queda reducido, dando lugar a un desarrollo pre-embriionario enlentecido o retrasado (Figura 9.B).

Destrucción cromosómica o Chromosome demolition

La destrucción cromosómica es un mecanismo de rescate de trisómicos consistente en la fragmentación y eliminación de uno de los tres juegos cromosómicos tras un error en la alineación y/o separación cromosómica durante la metafase y anafase,

INTRODUCCIÓN

respectivamente; como resultado, se obtiene dos células hijas disómicas normalizadas (Los et al. 1998). Este mecanismo resultaría ser el más eficiente en cuanto a la diploidización de los pre-embriones tripnucleares (Figura 9.C).

Cualquiera que fuera el mecanismo de corrección pre-embionaria, en la mayoría de los casos, los pre-embriones habrían sido parcialmente corregidos hacia la euploidía, generándose pre-embriones mosaicos; es decir, en un mismo pre-embrión coexistirían células corregidas euploides y células no corregidas, aneuploides, lo cual puede dar a lugar a diferentes grados de normalidad, dependiendo de la localización y proporción de las células diploides.

El mosaicismo cromosómico se define como la presencia de dos o más líneas celulares cromosómicamente diferentes en un mismo individuo, generado por un fallo en la segregación cromosómica durante alguna de las mitosis, dando lugar a ganancia o pérdida de cromosomas (aneuploidías). El mosaicismo puede ser general cuando se presentan dos o más líneas celulares en todo el organismo, o confinado; es decir, cuando el mosaicismo únicamente se presenta en un área determinada.

Dependiendo del destino de las células alteradas (placenta o embrión), se puede producir un fenómeno conocido como mosaicismo confinado a la placenta, pudiéndose dar de forma total o parcial. Si el confinamiento es total, la placenta pudiera ser completamente trisómica, coexistiendo con un feto diploide,

INTRODUCCIÓN

resultante de la pérdida de los cromosomas trisómicos en el tejido embrionario (Kalousek et al. 1993, Ledbetter et al. 1992, Vejerslev and Mikkelsen 1989) o, por el contrario, podría formarse una placenta disómica y un embrión trisómico, en cuyo caso es no viable (Figura 8).

En cualquier caso, los pre-embriones mosaicos con células euploides, presentan un desarrollo embrionario diferencial respecto a los uniformemente aneuploides, ya que es posible que se produzca un enriquecimiento en la población de células euploides respecto de aquéllas aneuploides como resultado de las tasas de división diferenciales ((Munné et al. 2005).

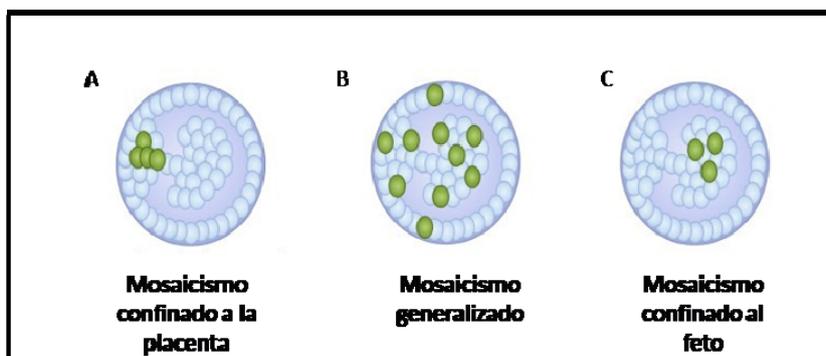


FIGURA 8. Imágenes de las posibles localizaciones de las células aneuploides en los pre-embriones que presentan mosaicismo: (A) Localización de las células aneuploides únicamente en la placenta; embrión euploide; (B) Localización de las células aneuploides generalizada, presencia de éstas tanto en el feto como en la placenta; (C) Las células aneuploides se localizan únicamente en el feto, quedando la placenta libre de éstas, euploide.

Eliminación microquirúrgica del pronúcleo supernumerario

La diploidía en los pre-embryones tripronucleares puede ser restaurada mediante la eliminación microquirúrgica del pronúcleo extra (Kattera and Chen 2003b, Palermo et al. 1994b), reportándose incluso el caso de un nacido vivo sano con cariotipo 46XY, tras la eliminación del pronúcleo extra en un cigoto dispérmico (Kattera and Chen 2003b).

El primer trabajo en el que se realizó la eliminación microquirúrgica de un pronúcleo (epronucleación) fue realizado en ratón (Modlinski 1975b). Estos autores, empleando técnicas de micromanipulación eliminaron uno de los pronúcleos de un cigoto correctamente fecundado, obteniéndose un cigoto haploide uniparental. El rendimiento técnico, tras ulteriores mejoras en los medios de manipulación y cultivo, así como en el diseño de las pipetas de micromanipulación lograron mejorar notablemente el rendimiento técnico hasta un 61% (Ivakhnenko et al. 2000).

En mamíferos se han realizado diversos estudios de diploidización de cigotos tripronucleares; logrando incluso comprobar la eficiencia de reconstitución mediante estudios de ploidía y composición parental (Escribá and García-Ximénez 2001, Hoppe and Illmensee 1982, McGrath and Solter 1983, Modlinski 1975a, Surani et al. 1986).

INTRODUCCIÓN

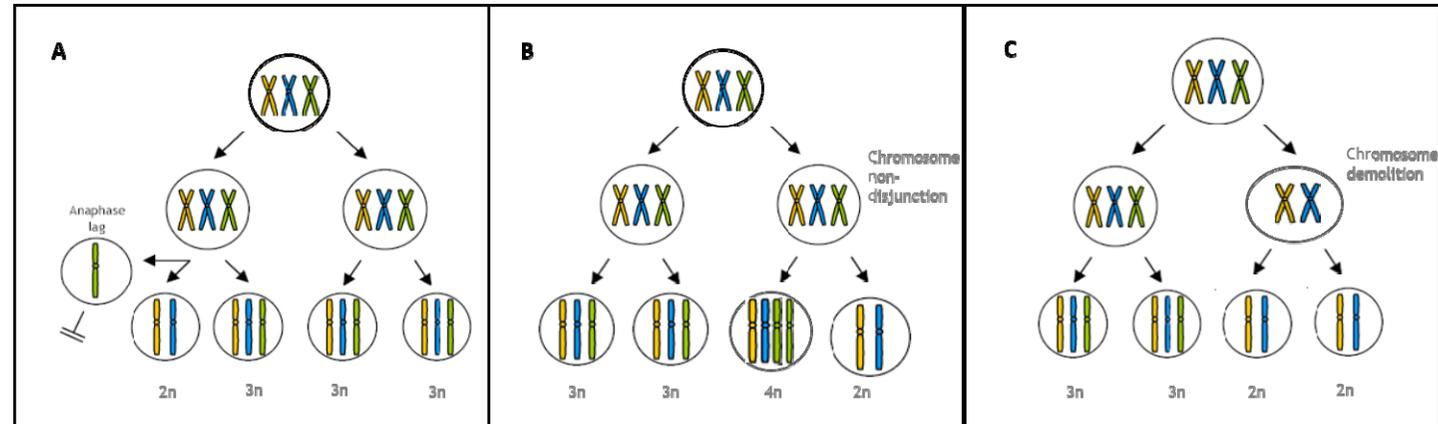


FIGURA 9. Representación gráfica de los tres mecanismos propuestos para que se produzca la auto-corrección de los embriones: anaphase-lag, generándose una célula diploide y otra triploide (A), chromosome non-disjunction, donde se genera una célula diploide y una tetraploide letal (B) y chromosome demolition, generándose dos células diploides (C).

INTRODUCCIÓN

En humanos, la eliminación microquirúrgica de uno de los pronúcleos es técnicamente posible, dando lugar a pre-embriones bipronucleares diploides (Gordon et al. 1989, Kattera and Chen 2003c, Malter and Cohen 1989b, Palermo et al. 1994c, Rawlins et al. 1988a). Sin embargo, la aplicación de la técnica en la práctica clínica rutinaria es muy limitada debido a las restricciones éticas y legales y a las pruebas de viabilidad cromosómica y de composición heteroparental que requieren, habiendo sido únicamente reportado un caso clínico en humanos, en el que tras la epronucleación selectiva realizada en cigotos humanos tripronucleares y ulterior transferencia intrauterina, nació un varón sano (Kattera and Chen 2003b).

El proceso de diploidización por micromanipulación se realiza generalmente sobre cigotos tripronucleares generados tras la aplicación de la FIV convencional; es decir, con cigotos diándrico, aunque también se han realizado estudios con aquéllos procedentes de ICSI.

La diploidización de cigotos tripronucleares consiste en la extracción del pronúcleo supernumerario. En el caso de los cigotos dispérmicos, la eliminación del pronúcleo extra no es suficiente (Palermo et al. 1994b); es necesario además, eliminar el centriolo extra asociado al pronúcleo paterno supernumerario. La entrada de dos espermatozoides, además de una composición genómica extra, ofrece un set de centriolos adicional que debe ser junto con la información genética eliminados a fin de restablecer la correcta

INTRODUCCIÓN

monospermia (Kattera and Chen 2003c). La presencia de más de un centriolo funcional da lugar a la formación de husos multipolares y en consecuencia, distribuciones cromosómicas caóticas que rendirán blastómeras aneuploides.

El éxito de la técnica de pronucleación selectiva reside en la capacidad de restablecer la diploidía y heteroparentalidad; por lo tanto, la principal limitación de esta técnica consiste en identificar la identidad parental del pronúcleo supernumerario.

El principal indicador del origen parental de los pronúcleos es su localización intracitoplasmática, tamaño y presencia de restos espermáticos próximos (Malter and Cohen 1989b).

Poco tiempo tras la activación ovocitaria inicial, el pronúcleo materno se localiza en la zona más proximal al segundo corpúsculo polar (Goud et al. 1999, Malter and Cohen 1989a, Palermo et al. 1994a, Tang et al. 1994a); el 92% de los casos, el pronúcleo materno es aquél situado más cerca de segundo corpúsculo polar (Payne et al. 1997), el cual puede ser identificado por su tamaño, ligeramente mayor al del primer corpúsculo polar, y además, por estar conectado a la membrana ooplásmica (Kaufman 1978, Markert 1982).

Por lo que respecta al tamaño pronuclear, aunque se ha reportado que el pronúcleo paterno suele ser mayor que el materno (Rawlins et al. 1988b), en el momento en que evaluamos la fecundación, se observa que el tamaño de ambos pronúcleos es similar (Gordon et al. 1989, Kattera and Chen 2003b, Malter and Cohen 1989b, Palermo et

INTRODUCCIÓN

al. 1994b, Wiker et al. 1990b).

La presencia de restos espermáticos en la proximidad del pronúcleo paterno, aunque ha sido descrita (Rawlins et al. 1988b) no es detectable bajo microscopio convencional, siendo sólo observable en un 1% de los casos tras un examen exhaustivo (Wiker et al. 1990a), por lo tanto no es un elemento determinante a la hora de identificar el origen parental del pronúcleo supernumerario de los cigotos tripronucleares.

Por lo tanto, el único criterio de identidad parental de un pronúcleo es su proximidad al segundo corpúsculo polar, siendo el criterio más fiable y objetivo que nos permite identificar al pronúcleo materno (Payne et al. 1997).

Existen varios trabajos dirigidos a restablecer la condición bipronuclear en los cigotos tripronucleares procedentes de ICSI, mediante el empleo de técnicas de epronucleación selectiva. Si bien el principio es el mismo que el descrito para los cigotos tripronucleares procedentes de FIV convencional, la posibilidad de identificar el pronúcleo materno extra es complejo, rindiendo eficacias de supervivencia y desarrollo poco alentadoras (Kattera and Chen 2003a, Palermo et al. 1994c).

INTRODUCCIÓN

JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACIÓN

Para incrementar la calidad de los servicios de salud, y favorecer una mejor y más rápida implantación de los avances científicos se debe integrar la investigación con la práctica clínica.

En Biomedicina, específicamente en el campo de reproducción asistida, para mejorar las técnicas utilizadas así como para la puesta a punto de dichas técnicas se requieren estudios previos, para los que se necesitan pre-embriónes, preferiblemente de la misma especie, con potencial de desarrollo, y que sean genéticamente normales. Además para la formación del personal cualificado en las técnicas de reproducción asistida también se necesita material biológico de calidad. La disponibilidad y uso de estos pre-embriónes no debe dar lugar a conflictos éticos ni legales, por lo tanto no serían válidos, para la puesta a punto y ensayos preliminares de diferentes tecnologías, el empleo de pre-embriónes útiles con una finalidad reproductiva (Ley 14/2006). En este sentido, la mejor opción sería poder hacer uso de pre-embriónes humanos descartados en los procesos de reproducción asistida, que tengan potencial de desarrollo y que podamos demostrar que sean homólogos a aquéllos reproductivamente viables.

En el presente trabajo se propone como modelo de estudio el uso de pre-embriónes tripnucleares, procedentes de FIV e ICSI, de forma que, de demostrarse su potencial de desarrollo y la posibilidad de restaurar la ploidía los pre-embriónes tripnucleares constituirían un modelo biológico válido para los objetivos formativos y de investigación antes mencionados.

JUSTIFICACIÓN

Por otra parte, y más allá del uso formativo, de demostrarse que los pre-embriones tripronucleares presentasen un potencial de desarrollo in vitro y una composición cromosómica y parental homologable a aquéllos correctamente fecundados, podrían considerarse una fuente válida para la derivación de líneas de células madre embrionarias, cuya implicación en los estudios de medicina regenerativa es clave.

Además de estas aplicaciones, los pre-embriones tripronucleares podrán tener una finalidad reproductiva estricta, particularmente útil en aquellos casos clínicos en los que las pacientes no dispongan en un ciclo en curso de pre-embriones normalmente fecundados tras aplicar técnicas de reproducción asistida, constituyendo, los pre-embriones tripronucleares un último recurso reproductivo siempre y cuando hayan mostrado su potencial de desarrollo in vitro y demostrado, mediante los análisis genómicos pertinentes, su normalidad cromosómica y parental.

En IVI Valencia se realizaron 3845 procedimientos en 2014, lo que se corresponde con 33675 ovocitos inseminados por ambas técnicas. El 5.3% de los cigotos son pre-embriones que mostraron fecundación anómala; siendo el 2.0% tripronucleares, lo cual supone una disponibilidad de 669 pre-embriones tripronucleares en un año por año.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Optimizar la obtención de blastocistos diploides heteroparentales a partir de pre-embryones tripronucleares procedentes de fecundación in vitro convencional y microinyección intracitoplasmática de espermatozoides.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener blastocistos diploides heteroparentales tras restablecimiento de la condición bipronuclear en los cigotos tripronucleares procedentes de FIV mediante la eliminación microquirúrgica del pronúcleo supernumerario.
- Obtener blastocistos diploides heteroparentales tras cultivo y estudio morfocinético del desarrollo pre-embryonario de los cigotos tripronucleares procedentes ICSI.

METODOLOGÍA

APROBACIONES, CONSENTIMIENTOS Y LUGAR DE EJECUCIÓN

Este estudio se realizó dentro del marco legal impuesto en el Real Decreto 223/2004 y la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica, gozando de la aprobación del Comité Ético de IVI Valencia el 26 de Octubre del 2007, la comisión Nacional de Reproducción Asistida y de la Consellería de Sanitat de la Generalitat Valenciana, con fecha 18 de Febrero de 2009.

Este proyecto, además ha sido financiado por el IMPIVA ([Instituto de la Pequeña y Mediana Industria de la Generalidad Valenciana](#): IMIDTF/2007/167; IMIDTG/2008/27; IMIDTF/2009/134; IMIDTF/2010/106) e IVI Valencia.

Todos los pre-embriónes empleados en los estudios de morfofocinética embrionaria y estudio genético pertenecen a pacientes de IVI Valencia, las cuales habían firmado el consentimiento informado (CI) de FIV/PGD.

A los pacientes, cuyos pre-embriónes iban a ser sometidos a microcirugía se les informó previamente del contenido del proyecto de investigación y de su repercusión. Únicamente los pre-embriónes pertenecientes las parejas que aceptaron y firmaron el contrato de donación y el CI de donación correspondiente fueron incluidos en el presente trabajo.

METODOLOGÍA

En ningún caso, el destino último de los pre-embriones tripronucleares fue reproductivo.

Todas las experiencias descritas en el presente documento de tesis han sido íntegramente desarrolladas en el laboratorio de Fecundación in Vitro (FIV) y de Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP), ubicados en las instalaciones del Instituto Valenciano de Infertilidad-Universidad de Valencia (IVI-UV) IVI-1, sitio en Plaza Policía local nº 1, Valencia. Por otra parte, los estudios genómicos de las muestras fueron realizados en IGENOMIX (Parque Científico Universitat de València; sitio en calle Catedrático Agustín Escardino, 9. Paterna de Valencia), en los departamentos PGD Molecular Cytogenetics (determinaciones de ploidía) y PGD Molecular Genetics (test de parentalidad o identidad genética).

POBLACIÓN DE ESTUDIO

En el presente estudio se han incluido un total de 328 pre-embriones 3PN y 964 pre-embriones 2PN control.

La edad media de las pacientes incluidas en este estudio fue de 34.9 ± 4.6 años (19 - 45 años).

Se emplearon pre-embriones 3PN cuyos gametos no procedían en ningún caso de ovocitos o semen donado. En las pacientes incluidas en el estudio, las causas de la infertilidad fueron: infertilidad de origen tubárico (30%), infertilidad de origen idiopático (30%),

endometriosis (14%), edad avanzada (17%) o síndrome de ovarios poliquísticos (8%). La etiología masculina fue normal.

DISEÑO EXPERIMENTAL

A fin de abordar nuestro objetivo principal: obtención de blastocistos diploides heteroparentales procedentes de FIV o ICSI, los pre-embiones tripronucleares (3PN) se identificaron a las 16-20 horas tras aplicar ambas técnicas de fecundación in vitro: FIV o ICSI. En este momento, los 3PN se asignaron a cada uno de los estudios detallados a continuación.

***Estudio 1:** Estudio comparado de ploidía y composición parental en pre-embiones tripronucleares procedentes de FIV (3PN-FIV) e ICSI (3PN-ICSI).*

***Estudio 2:** Producción de pre-embiones diploides heteroparentales a partir de pre-embiones tripronucleares procedentes de FIV: Eliminación microquirúrgica del pronúcleo supernumerario.*

***Estudio 3:** Producción de pre-embiones diploides heteroparentales a partir de pre-embiones tripronucleares procedentes de ICSI: Mecanismo de autocorrección. Estudio morfocinético predictivo.*

Los pre-embiones 3PN, incluidos en estos tres estudios fueron cultivados desde el estadio de cigoto (día 1) hasta el día 5 ó 6 de desarrollo.

METODOLOGÍA

La ploidía se determinó en estadio de células, en día 2, 3 ó 4 de desarrollo, cuando los pre-embriónes objeto de estudio contuviesen 6 o más células y menos del 20% de fragmentos. Así mismo, en algunos embriónes en día 5 ó 6 se determinó la ploidía de los pre-embriónes cuando alcanzaron el estadio de blastocisto.

Estudio 1: Estudio comparado de ploidía y composición parental en pre-embriónes tripnucleares procedentes de FIV (3PN-FIV) e ICSI (3PN-ICSI).

En el Estudio 1, se analizó la ploidía y composición parental de los pre-embriónes 3PN-FIV y 3PN-ICSI que cumplían los criterios para ser biopsiados en estadio de células y/o aquéllos que alcanzaron el estadio de blastocisto.

Se incluyeron 135 pre-embriónes 3PN siendo 64 procedentes del procedimiento de fecundación in vitro convencional FIV (3PN-FIV) y 71 procedentes del procedimiento de fecundación in vitro mediante microinyección intracitoplasmática o ICSI (3PN-ICSI).

Determinación de la ploidía en 3PN-FIV vs. 3PN-ICSI

De los 64 cigotos 3PN-FIV identificados, 18 pre-embriónes fueron biopsiados en estadio de células y 8 en blastocistos, mientras que de los 71 cigotos 3PN-ICSI, 32 cumplieron criterios para ser biopsiados en estadio de células y de los 20 que alcanzaron el estadio de blastocisto, 16 fueron seleccionados para determinar la ploidía.

METODOLOGÍA

Análisis de la composición parental en 3PN-ICSI

De los 71 cigotos 3PN-ICSI, 32 cumplieron criterios para ser biopsiados en estadio de células y de los 20 que alcanzaron el estadio de blastocisto, 4 fueron seleccionados para realizar el análisis de la composición parental.

Se incluyeron en este estudio 4 blastocistos 3PN-ICSI

Estudio 2: Producción de pre-embryones diploides heteroparentales a partir de pre-embryones tripronucleares procedentes de FIV (3PN-FIV): Eliminación microquirúrgica del pronúcleo supernumerario.

En el Estudio 2, se evaluó la posibilidad de eliminar microquirúrgicamente el pronúcleo *supernumerario* de los cigotos 3PN-FIV con la finalidad de restablecer la ploidía.

Para el desarrollo de este estudio, se emplearon 114 cigotos 3PN-FIV, destinando 72 de ellos a la eliminación microquirúrgica del pronúcleo supernumerario y 42 cigotos 3PN-FIV como control negativo. Como grupo control positivo, se emplearon 947 pre-embryones 2PN-F.

Todos los cigotos incluidos en este estudio, tanto los controles como los experimentales se cultivaron en incubador convencional hasta el estadio de blastocisto, empleando la técnica de co-cultivo pre-embryonario con células endometriales como método de cultivo embryonario prolongado.

METODOLOGÍA

De los 72 cigotos 3PN-FIV identificados, 51 sobrevivieron a la micromanipulación, alcanzando el estadio de blastocisto 21 de ellos. Ocho blastocistos fueron seleccionados para determinar la ploidía y seis para analizar la composición parental.

De los 42 cigotos que conformaban el grupo control negativo, 8 alcanzaron el estadio de blastocisto, pudiéndose determinar la ploidía en 4 de ellos.

Estudio 3: Producción de pre-embryones diploides heteroparentales a partir de pre-embryones tripnucleares procedentes de ICSI (3PN-ICSI): Mecanismo de autocorrección. Estudio morfocinético.

En el Estudio 3, se estudió la morfocinética de los pre-embryones 3PN-ICSI, una vez conocida su ploidía.

En el Estudio 3 se identificaron e incluyeron inicialmente 79 cigotos 3PN-ICSI, pertenecientes a pacientes con indicación de PGD y resultantes de la aplicación de la técnica de ICSI sobre ovocitos autólogos no criopreservados. Tras la identificación de los 3PN en el momento de evaluación de la fecundación (día 1 de desarrollo), estos cigotos fueron cultivados en sistema time-lapse hasta el estadio de blastocisto. Tras conocer la ploidía en 30 pre-embryones 3PN-ICSI, del escrutinio de las filmaciones del desarrollo in vitro de éstos se obtuvieron los parámetros morfocinéticos directos e indirectos en los 23 pre-embryones que resultaron ser diploides y triploides.

METODOLOGÍA

Como pre-embriónes control se seleccionaron retrospectivamente 17 pre-embriónes correctamente fecundados (2PN), producidos tras ICSI de ovocitos autólogos no criopreservados. Los pre-embriónes 2PN, fueron cultivados hasta D3 de desarrollo en sistema time-lapse y transferidos intrauterinamente en D3 de desarrollo a sus progenitoras; obteniéndose finalmente 17 nacidos vivos sanos. Del escrutinio de las filmaciones de estos 17 pre-embriónes se obtuvieron los parámetros morfocinéticos directos e indirectos del grupo control y detallados en el apartado 4.6.

PROCEDENCIA DE LOS PRE-EMBRIONES TRIPRONUCLEARES

Los protocolos de estimulación folicular, preparación del semen, punción y obtención de ovocitos e inyección intracitoplasmática del semen y cultivo pre-embriionario desde el día de la inseminación (día 0) y hasta la evaluación de la fecundación (día 1) se describen en Rubio et al. 2007 (Rubio et al. 2007b).

Estimulación ovárica

Para iniciar el tratamiento, a cada paciente se le practicó una ecografía vaginal en día 2-3 de regla, con el fin de comprobar la presencia de un cuerpo lúteo en uno de los dos ovarios como indicador de que fue un ciclo menstrual ovulatorio. En caso afirmativo, se inició la administración subcutánea de agonistas de las

METODOLOGÍA

gonadotropinas naturales GnRH ó LHRH, con el fin de inducir la desensibilización hipofisaria.

Tras la siguiente menstruación, se realizó una segunda ecografía para comprobar la desensibilización hipofisaria y el estado basal de los ovarios y se inició el tratamiento de estimulación ovárica con gonadotropinas exógenas. La monitorización del ciclo se realizó mediante ecografía vaginal con sonda transvaginal para contabilizar y medir los folículos en desarrollo.

Cuando se constató la presencia de 2 o más folículos con un mínimo de 17 mm de diámetro, se indujo la ovulación con una dosis única de la hormona gonadotrófica (hCG) y se programó la punción folicular 36 horas más tarde.

Recuperación de ovocitos

Transcurridas 36 horas tras la administración de hCG, se procedió a la recuperación de los ovocitos contenidos en los folículos mediante punción folicular ecoguiada.

La técnica consistió en introducir la sonda transvaginal del ecógrafo con una guía acoplada que permite el acoplamiento de la aguja de aspiración. Mediante ecografía, se localizó el ovario más accesible y se puncionó el folículo más cercano al punto de entrada de la aguja. Entonces se conectó la bomba de succión, de presión continua, aspirándose el contenido intrafolicular, que fue recogido en un tubo de aspiración. El tubo de aspiración lleno se deposita en un bloque

METODOLOGÍA

térmico regulado a 37° con el fin de mantener constante la temperatura del aspirado hasta que el contenido sea inspeccionado y procesado en el laboratorio de FIV. Realizada la punción de todos los folículos de un ovario, se extrajo la aguja y se procedió a localizar y puncionar el ovario contralateral, de forma similar.

El contenido de cada tubo de aspiración fue vertido en una placa petri de 60mm e inspeccionado bajo visión estereoscópica; los complejos cumulo-corona-ovocitos (CCCO) identificados fueron captados con ayuda de pipetas pasteur estériles y transferidos a placas de cultivo que contenían 7 mL de Gamete Buffer® (Cook Medical, Barcelona, Spain). En cada placa, los complejos CCCO se recortaron con ayuda de agujas con la finalidad de eliminar los restos de sangre y exceso de granulosa. Tras un segundo lavado en 7 mL de Gamete Buffer®, los CCCO limpios fueron cultivados in vitro individualmente en gotas de 50 µL de medio human tubal fluid (hTF) suplementado con 10% de albúmina humana o Fertilization Medium® (Cook Medical, Irlanda) a 37°C al 5% CO₂ durante 4 horas. En cada placa, debidamente identificada, se cultivaron hasta 6 CCCO.

Preparación de la muestra seminal

Tanto para realizar FIV convencional como ICSI, la muestra seminal recogida debe ser capacitada con el fin de mejorar e incrementar el potencial de fertilidad de los espermatozoides. Durante este proceso se consigue mejorar la muestra seminal, obteniéndose un mayor número de espermatozoides móviles y morfológicamente normales.

METODOLOGÍA

El proceso consiste en seleccionar aquellos espermatozoides con mejor movilidad mediante la eliminación del plasma seminal, los espermatozoides inmóviles y las células inmaduras y detritos.

Tras obtener la muestra de semen, se incubó durante un periodo mínimo de 15 minutos entre 20 y 37 °C hasta obtener la completa licuefacción. Tras este periodo de tiempo se evaluó el semen según los criterios de la OMS, estudiándose el volumen, concentración, movilidad y morfología.

Seguidamente se procedió a la capacitación, que se realiza mediante las técnicas de swim-up o centrifugación en gradientes de densidad.

En los casos en que se realizó fecundación in vitro convencional (FIV), el semen capacitado se diluyó en medio human tubal fluid (HTF, BCN) suplementado con 10% de albúmina humana o Fertilization Medium® (Cook Medical, Barcelona, España) para trabajar a una concentración de 100.000 espermatozoides móviles por ml. Una vez obtenida la dilución se preparan las placas de inseminación, que constan de 3 microgotas de 100 µl de medio de lavado y seis microgotas de la dilución de inseminación de 50 µL cada una.

En los casos con indicación de ICSI, el semen es procesado igualmente mediante la técnica swim-up o gradientes de densidad, pero no se realizó dilución de la muestra. La muestra de semen capacitada se usó para la microinyección intracitoplasmática del ovocito diluida con PVP con la finalidad de ralentizar el movimiento

espermático para que el embriólogo sea capaz de capaces de seleccionar, procesar y captar los espermatozoides.

Preparación de ovocitos

Los ovocitos con indicación de FIV, no requieren de ninguna otra manipulación adicional desde su obtención hasta el momento de la inseminación más que una breve incubación de 2-4 horas en las condiciones de cultivo convencional a fin de lograr su estabilización en las condiciones de cultivo estándar.

Por su parte, los ovocitos candidatos ser inseminados mediante la técnica de ICSI requieren de la eliminación de la células de la granulosa/cúmulo que los rodean (decumulación) a fin de facilitar la micromanipulación durante el proceso de microinyección. En síntesis, tras 2-4 horas desde la punción folicular, los ovocitos son decumulados mediante una breve incubación en una solución de hialuronidasa (80 UI/ml) y suave pipeteo, empelando capilares de diferente diámetro hasta la total eliminación de las células del cúmulo. Tras la decumulación, se constata el grado de maduración de los ovocitos, seleccionando aquéllos maduros (metafase II, MII), morfológicamente identificables por la presencia del primer corpúsculo polar (1CP) en el espacio perivitelino y, descartando aquéllos inmaduros (en estadio de vesícula germinal (VG) o metafase I (MI), atrésicos o degenerados.

Procedimiento de inseminación

Fecundación in vitro convencional (FIV)

Se trata de co-incubar el ovocito en condiciones de cultivo in vitro, previa obtención y preparación de los gametos. Tras examinar las gotas de inseminación, 4-6 horas post punción folicular, con ayuda de la pipeta pasteur se pasaron los CCCO de forma individual a cada una de las gotas de inseminación con el mínimo volumen de medio posible para no diluir la concentración final del capacitado. Las placas de inseminación seguidamente se introdujeron en el incubador a 37°C y 5 % CO₂ durante 18-22 horas.

Microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

Consiste en la microinyección intracitoplasmática de un espermatozoide en el interior de un ovocito MII previamente decumulado. Una vez decumulados los ovocitos y procesada la muestra de semen, se preparó la placa de ICSI. Las micromanipulaciones requieren del empleo de pipetas de sujeción (Holding; Cook, Australia) y de microinyección (Cook, Australia) y de un microscopio invertido con óptica Hoffman[®] (Olympus, Barcelona, España).

La placa de ICSI está formada por tres gotas de lavado de los ovocitos con medio tamponado Gamete Buffer[®] (Cook Medical, Barcelona,

METODOLOGÍA

España), tantas gotas de medio tamponado como ovocitos tengamos (con un máximo de 6 para evitar cambios de pH y/o temperatura) y dos gotas de polivinilpirrolidona (PVP; Global[®], Canadá), en una de las cuales se añade una pequeña alícuota de la muestra del semen previamente procesado con la finalidad de impedir el movimiento rápido de los espermatozoides y posibilitar la manipulación de éstos. Todo ello es cubierto con 9 ml de aceite mineral atemperado Culture Oil[®] (Cook Medical, Barcelona, España). Una vez preparada la placa, se procede a disponer los ovocitos individualmente en las diferentes gotas y se traslada la placa al microscopio.

Previamente a la microinyección del espermatozoide en el ovocito, aquéllos fueron inmovilizados mediante desestabilización de su flagelo. La inmovilización se realizó mediante un movimiento perpendicular al eje del espermatozoide y hacia abajo, de forma que adquiriera una angulación. Tras lavar el espermatozoide en la gota de PVP e introduce en la pipeta de microinyección mediante aspiración para posteriormente, ya en la gota que contiene el ovocito, realizar la microinyección. Para ello, el ovocito se posiciona de tal modo que sea visible el 1CP y quede situado en una disposición horaria correspondiente a las 12:00 horas, para evitar realizar la microinyección en la posible zona donde se encuentra el huso meiótico.

Realizada la microinyección, todos los ovocitos fueron lavados y cultivados individualmente en microgotas de cultivo con medio Cleavage Medium (Cook Medical, Barcelona, España) cubierta con

aceite mineral Culture Oil® (Cook Medical, Barcelona, España) y mantenidos en las condiciones de cultivo estándar (37°C y 5 % CO₂) durante 18-22 horas.

Evaluación de la fecundación. Identificación de los cigotos tripronucleares (3PN)

Transcurridas 18-22 horas desde la inseminación o microinyección, se evaluó la fecundación mediante escrutinio de la presencia y número de corpúsculos polares (CP) y pronúcleos (PN).

Tras FIV convencional, los ovocitos fueron liberados de las células del cúmulo con ayuda de un capilar de diámetro adecuado; posteriormente, los ovocitos son lavados en medio limpio a fin de eliminar restos espermáticos y células del cúmulo. Los ovocitos limpios se cultivaron individualmente en microgotas de medio de cultivo cleavage, a fin de evaluar su fecundación.

Por su parte, tras la realización de la ICSI, y transcurridas 18-22 horas desde la microinyección, se procedió a valorar la fecundación directamente en la placa de cultivo.

Cualquiera que sea la técnica de fecundación empleada, la fecundación se evaluó bajo invertido equipado con óptica Hoffman (40x) y según los criterios descritos a continuación.

La correcta fecundación comprende aquéllos cigotos que presentaban dos corpúsculos polares el 1CP y el 2CP en el espacio

METODOLOGÍA

perivitelino y dos estructuras pronucleares. Los embriones correctamente fecundados fueron lavados en medio limpio y cultivados de forma individual en una placa de crecimiento de medio Cleavage (Cook Medical, Barcelona, España). Estos cigotos, correctamente fecundados son aquéllos propios del procedimiento de reproducción asistida, que de proseguir adecuadamente su desarrollo serán en última instancia candidatos a transferencia o criopreservación. Según sea indicación embriológica, se cultivaron en sistema time-lapse o convencional, siguiendo la rutina clínica preestablecida en nuestro laboratorio de FIV.

Por su parte, es posible obtener otras combinaciones numéricas de CP y PN. Podemos observar:

- a. ovocitos que no han fecundado, con la presencia de un CP y ningún PN
- b. ovocitos en los que se observan dos CP y ningún PN
- c. ovocitos que no han extruido el 2CP pero si se observan 2 PN
- d. cigotos que presentan un CP y más de dos estructuras pronucleares
- e. cigotos que presentan dos CP y más de dos PN

A efectos del presente trabajo, se seleccionaron aquellos cigotos que presentaran tres estructuras pronucleares, idénticas en tamaño y ubicadas centralmente en el interior citoplasmático; indicando el número de corpúsculos polares en el espacio perivitelino.

METODOLOGÍA

Concretamente, en el caso de los cigotos procedentes de FIV, se seleccionaron aquellos cigotos que presentaban 2CP y 3PN (3PN-FIV), mientras que aquéllos cigotos procedentes de ICSI se seleccionaron aquéllos que presentaban el 1CP y 3PN (3PN-ICSI).

De acuerdo al estudio en el que fueran incluidos, los 3PN fueron bien cultivados en gotas e incubador convencional, bien en sistema time-lapse tal y como se detalla a continuación, en medio IVF-20 o Cleavage Medium según sea práctica contemporánea del laboratorio de FIV de IVI Valencia, donde se realizó la presente investigación.

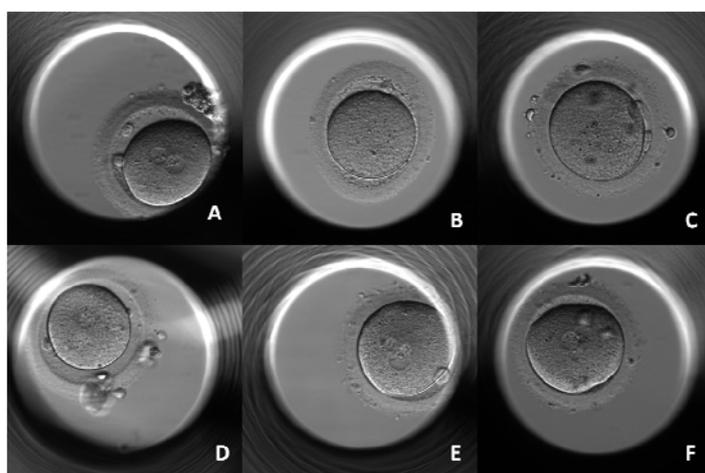


FIGURA 10. Posibles combinaciones de corpúsculos polares (CP) y pronúcleos (PN) observadas en los cigotos en el momento de la evaluación de la fecundación; (A) cigoto en el que se observan 2 CP y 2 estructuras PN, (B) ovocito que no ha fecundado, se observa un único CP y ningún PN, (C) ovocito que presenta dos CP, y ningún PN, (D) cigoto que presenta un CP y

METODOLOGÍA

dos PN, (E) cigoto que presenta un CP y tres estructuras PN, (F) cigoto que presenta dos CP y tres estructuras PN.

CULTIVO PRE-EMBRIONARIO IN VITRO

Identificados los pre-embriónes 3PN procedentes de ambas técnicas de fecundación (3PN-FIV vs. 3PN-ICSI), se cultivaron en sistema de cultivo secuencial desde D1 (día en que se valora la fecundación) hasta D5/D6 o co-cultivo pre-embriónico desde D2 hasta D5/6 de desarrollo pre-embriónico bajo las mismas condiciones en las que se cultivan aquéllos correctamente fecundados.

Incubador convencional

Cultivo secuencial convencional

Tanto los cigotos 3PN procedentes de FIV (3PN-FIV) como los procedentes de ICSI (3PN-ICSI) e incluidos en este trabajo de investigación fueron cultivados individualmente en microgotas de 50µL en medio de cultivo IVF-20 (Scandinavian IVF, EMB, Barcelona, España) o en medio Cleavage bajo aceite mineral en incubadores (HeraCell) 37°C y 5%CO₂ durante dos días.

En día 3 de desarrollo (D3), los pre-embriónes 3PN se transfirieron a nuevas microgotas de 50µL CCM (CCM, Vitrolife, Göteborg, Suecia), donde fueron individualmente cultivados en las mismas condiciones mencionadas anteriormente durante dos o tres días más. En día 5 de desarrollo embrionario (D5), los pre-embriónes que no hubieran

METODOLOGÍA

alcanzado el estadio de blastocisto se transfirieron de nuevo a placas de CCM nuevas, hasta D6 de desarrollo.

Co-cultivo pre-embionario

Los cigotos 3PN-FIV ó 3PN-ICSI fueron cultivados hasta día 2 de desarrollo en IVF-20 según el protocolo de cultivo secuencial. En D2 de desarrollo, los pre-embiones se cultivaron sobre una monocapa de células de epitelio endometrial humano (Mercader et al. 2003).

Y en las que se añadió 500 µL de una mezcla de medio de cultivo IVF-20:-CCM (1:1; v/v) durante 24 horas. En D3 de desarrollo, se sustituyó el medio de cultivo anteriormente indicado por 500 µL de medio de cultivo CCM durante 48-72 horas.

Incubador dotado de sistema time-lapse

Los sistemas de evaluación discreta evalúan la morfología pre-embionaria en ciertos puntos predefinidos del tiempo durante el desarrollo pre-embionario pre-implantacional, con la consiguiente falta de información acerca de lo que ocurre entre los tiempos analizados (Meseguer et al. 2011). Una evaluación continua o semi-continua del desarrollo pre-embionario proporcionaría una visión conjunta de la cinética del desarrollo del pre-embrión.

Así, conocer de manera exacta el tiempo en el que ocurre cada uno de los principales hitos del desarrollo pre-embionario pre-implantacional solventaría la ausencia de información entre los

METODOLOGÍA

diferentes puntos de observación que se llevan a cabo en la evaluación morfológica discreta. Es por esto que surge un nuevo sistema no invasivo de evaluación de la calidad pre-embionaria basada en la monitorización del desarrollo pre-embionario, el sistema time-lapse (TMS).

El sistema time-lapse ofrece la posibilidad de monitorizar el desarrollo pre-embionario, mediante la toma de imágenes de cada uno de los pre-embiones en un tiempo predefinido, incrementando así la cantidad y calidad de la información disponible sobre la cinética de los pre-embiones (Rubio et al. 2014), pudiendo identificar nuevos marcadores de calidad pre-embionaria.

En estos sistemas, las muestras biológicas se cultivan directamente en un incubador que lleva asociado un dispositivo de captura imágenes a intervalos de tiempo pre-programados, las cuales serán posteriormente procesadas y transformadas en una secuencia de vídeo, a partir de la cual se podrán extraer datos morfológicos, dinámicos y cuantitativos (Wong et al. 2010). De este modo, se ven incrementados de manera considerable los datos y las observaciones morfológicas disponibles para que los embriólogos determinen la calidad de los pre-embiones y seleccionen aquéllos con mayor potencial de implantación. Esta técnica ofrece la posibilidad de controlar los pre-embiones de forma segura sin alterar de las condiciones idóneas de cultivo (Kirkegaard et al. 2012).

METODOLOGÍA

La experiencia en IVI con la tecnología time-lapse es materializada con el EmbryoScope: un incubador diseñado por la empresa Unisense Fertitech (Dinamarca), que permite llevar a cabo un método no invasivo, cuantitativo y objetivo de valoración de la morfocinética pre-embrionaria. Meseguer et al. (Meseguer et al. 2011) analizaron el efecto de estos sistemas sobre la viabilidad de los pre-embriones, demostrando la superioridad del sistema en cultivo continua (EmbryoScope) sobre las tasas de gestación e implantación y en comparación con los incubadores convencionales.

El EmbryoScope permite determinar el comienzo, duración e intervalos de tiempo entre divisiones celulares, además de proporcionar unas condiciones seguras para el cultivo del embrión a la vez que aumentan en gran medida el número de observaciones disponibles para llevar a cabo un estudio completo del desarrollo pre-embrionario pre-implantacional.

Los pre-embriones fueron cultivados en de forma individualizada en placas de EmbryoScope (EmbryoSlides) que contienen 12 micropocillos con 25µl de medio cada uno cubiertos por 4 ml de aceite mineral.

Tras valorar la fecundación, los cigotos 3PN-ICSI se cultivaron en medio cleavage medium hasta D3 de desarrollo y desde el tercer día de desarrollo hasta el quinto o sexto se cultivaron en CCM.

El sistema de cultivo en time-lapse sólo fue empleado con cigotos 3PN-ICSI

EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS PRE-EMBRIONES

La capacidad de desarrollo in vitro de los pre-embriones 3PN se evaluó diariamente de forma discreta (cultivo convencional) o semi-continua (time-lapse) desde el primer día de desarrollo (D1) hasta el quinto o sexto día (D5/6).

Evaluación discreta del desarrollo pre-embionario: Cultivo convencional

La evaluación clásica, discontinua o morfológica fue el primer método usado para la valoración de los pre-embriones, y todavía sigue siendo el método más comúnmente utilizado durante los ciclos de reproducción asistida. Existe una correlación ampliamente aceptada entre la morfología del pre-embrión y su tasa de implantación en el útero materno.

Los pre-embriones se examinaron y evaluaron cada 24 horas bajo un microscopio invertido equipado con tecnología Hoffmann a 400 aumentos con un objetivo en contraste de fases y platina calefactada. La evaluación de la morfología pre-embionaria se realizó entre 44-47 horas (día 2) y 67-71 horas (día 3) post inseminación según los criterios de ASEBIR(Ardoy et al. 2008).

Se evaluaron los diferentes parámetros embrionarios: número de células, la simetría de las blastómeras, la fragmentación celular, el

grado de multinucleación y la compactación celular (Aparicio et al. 2013).

División pre-embionaria

El número de células refleja el ritmo de división de los pre-embiones cultivados in vitro y es un importante indicador de la capacidad de desarrollo e implantación del embrión.

Actualmente y acorde con ASEBIR (Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción) se clasifican como pre-embiones óptimos aquellos que en día 2 tengan entre 2 y 5 células, preferentemente 4 células, y como pre-embiones subóptimos aquellos que en día 2 posean 6 o más células.

Respecto a la evaluación en día 3, se consideran como óptimos aquellos pre-embiones que posean entre 6 y 10 células y subóptimos aquellos que posean menos de 6 o más de 10 células. Aquellos pre-embiones con menos de 4 células en día 3 se consideran no viables y suelen estar bloqueados.

Muchos estudios han investigado la relación entre el tiempo de la primera división pre-embionaria y en el potencial de desarrollo in vitro (Hesters et al. 2008). El inicio temprano de la primera división mitótica se define como una división celular que resulta en un embrión de dos células de 25 a 27 horas después de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, lo cual influye en tasa de embarazo (Edwards et al. 1984).

METODOLOGÍA

Varios estudios muestran que un inicio temprano de la división pre-embionaria se corresponde con un mayor número de células y mayor viabilidad, dando lugar a mayores tasas de embarazo en comparación con pre-embiones con un ritmo de división más lento (Fenwick et al. 2002, Lundin et al. 2001, Sakkas et al. 1998, Salumets et al. 2001, Shoukir et al. 1997).

No obstante, sigue sin ser un parámetro claro si la división temprana es un predictor independiente de embarazo o si se correlaciona con otras variables tales como la morfología del pre-embrión o el número de células (Meseguer et al. 2011).

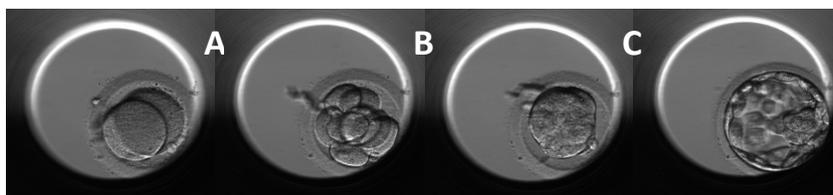


FIGURA 11. Imágenes de morfología de los pre-embiones; se observa la división de las blastómeras en estadio de: (A) 2 células, (B) 8 células; observamos en (C) la compactación de las blastómeras y en (D) el proceso de blastulación.

Grado de fragmentación celular de las blastómeras

Tras la fecundación, el cigoto experimenta una serie de divisiones mitóticas que producen un incremento en el número de células. A estas células se les denominan blastómeras.

METODOLOGÍA

La fragmentación total o parcial de una o más blastómeras del embrión es un fenómeno frecuente en los pre-embiones humanos desarrollados in vitro y un importante parámetro a la hora de analizar la viabilidad durante el desarrollo pre-embionario pre-implantacional (Van Royen et al. 2003). Los fragmentos se forman cuando parte del citoplasma de las blastómeras se proyecta y se separa. Estos fragmentos son restos de citoplasma rodeados de membrana plasmática carentes de ADN.

Los pre-embiones que presentan fragmentos tienen un menor grado de implantación, lo que puede ser debido a que, cuanto mayor es el grado de fragmentación, menos cantidad de citoplasma hay disponible para mantener una adecuada división celular y, por tanto, hay un número más bajo de blastómeras. Así mismo, la aparición de fragmentos pueden ser consecuencia de muerte por apoptosis (Hardarson et al. 2001).

Se ha observado que los perfiles de expresión génica de los pre-embiones fragmentados no son los mismos que aquéllos mostrados por pre-embiones no fragmentados; siendo la expresión de genes pro-apoptóticos más intensa en pre-embiones fragmentados (Liu et al. 2000).

De manera que, ASEBIR considera como óptimos aquellos pre-embiones con un porcentaje de fragmentación menor del 20-25% (Figura 12), preferentemente menos del 10%.

Simetría y tamaño de las blastómeras

Las células del cigoto no siempre se dividen simétrica y sincrónicamente. Una división se considera asimétrica cuando la diferencia entre el diámetro de las blastómeras es mayor del 20%, relacionándose esta desigualdad con una menor probabilidad de implantación (Hardarson et al. 2001). Se considera normal que todas las blastómeras tengan un tamaño similar si el pre-embrión tiene un número par de células. En cambio, si las divisiones celulares no son sincrónicas, el número de células es impar y lo habitual será encontrar tamaños celulares diferentes (Arday et al. 2008).

Grado de multinucleación

En la fecundación in vivo, la multinucleación o aparición de más de un núcleo en las blastómeras se asocia a casos relacionados con cáncer o con efectos negativos que distintos factores puedan tener sobre las células. En el ámbito de la reproducción in vitro, este fenómeno se asocia con una menor tasa de implantación, un mayor número de alteraciones cromosómicas y un mayor número de abortos (Van Royen et al. 2003).

Compactación celular

Alrededor del día 4 tras la inseminación, las células del pre-embrión inician el proceso de compactación. El embrión continúa dividiéndose homogéneamente, pero sus células comienzan a compactarse, formando el estadio de mórula (Figura 11C), en el cual las

METODOLOGÍA

blastómeras ya no son totipotentes sino pluripotentes (no pueden generar un organismo completo pero pueden dar lugar a tejidos de las tres capas embrionarias).

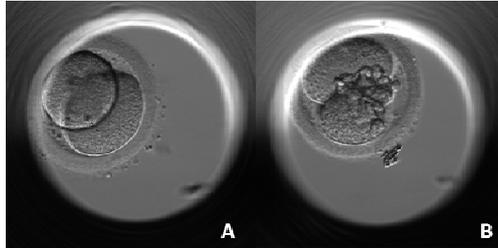


FIGURA 12. Imágenes de morfología de los pre-embryones donde podemos observar diferentes grados de fragmentación embrionaria (A) ausencia de fragmentación, (B) presencia de fragmentación localizada.

En este punto el pre-embrión comienza su propio metabolismo y comienzan a diferenciarse los primeros tejidos. La compactación celular marca el inicio de la primera diferenciación que ocurre durante el desarrollo pre-embriionario temprano y es un proceso altamente regulado. Un evento que caracteriza a este proceso es el aumento en el número de sitios de adhesión entre las blastómeras, en las que comienzan a expresarse proteínas de adhesión celular, principalmente la cadherina-E (Gilbert 2005), expresada en todas las células tempranas en pre-embryones y que juega un papel

indispensable en la compactación celular pre-embrionaria, lo que produce que las blastómeras se agrupen y formen una esfera compacta de células.

Blastulación

En día 5, se forma una cavidad denominada blastocele, en esta etapa el pre-embrión recibe el nombre de blastocisto (figura 2D).

Los blastocistos humanos son evaluados en día 5 o 6 de desarrollo in vitro. Este estadio comprende diversos estadios basados en la expansión de la cavidad del blastocele y del número y de cohesión de las células de la masa celular interna (IMC), que son las células que originarán los tejidos del embrión, y del trofoectodermo (TE), que son las células que darán lugar a los órganos extraembrionarios como la placenta y las membranas amnióticas.

De los blastocistos que presenten un blastocele que permita una adecuada evaluación de la ICM y la TE a 120 horas post-ICSI, se definen como blastocistos óptimos o de buena pronóstico aquéllos que presentan abundantes células así como un alto grado de compactación (Cruz et al. 2012, Herrero et al. 2013).

Como puede observarse, existe una relación directa y demostrada entre determinados marcadores morfológicos y la viabilidad pre-embrionaria, medida en términos de probabilidad de implantación y embarazo (Hasler 1998).

Evaluación morfofocinética de los pre-embryones

Se evaluaron los parámetros morfofocinéticos definidos por Meseguer et al. (Meseguer et al. 2011). Mediante el software de análisis de imagen, EmbryoViewer (Unisense-Fertilitech, Aarhus, Denmark) marcamos cada uno de los eventos del desarrollo embrionario como tiempo tras ICSI (Figura 13).

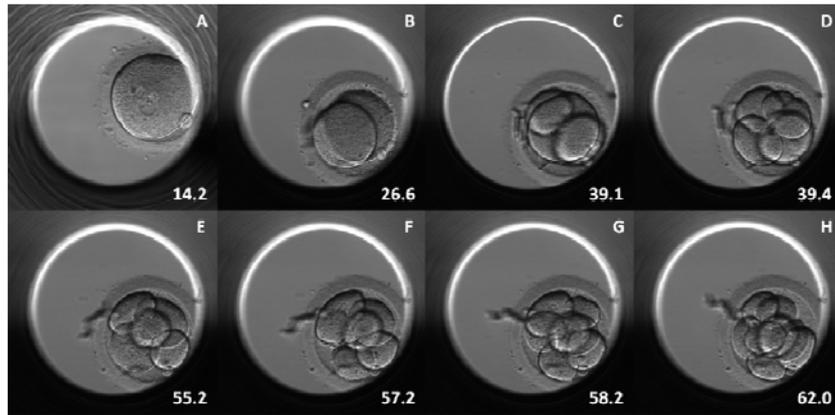


FIGURA 13. Apariencia morfológica de los pre-embryones humanos TPN-I cultivados en sistema de time-lapse (A) observamos los tres PN, (B) primera división embrionaria; t2, (C) segunda división embrionaria; t3, (D) tercera división embrionaria; t4, (E) cuarta división embrionaria; t5, (F) quinta división embrionaria; t6, (G) sexta división embrionaria (t7), (H) séptima división embrionaria (t8).

Parámetros morfocinéticos

A fin de realizar el análisis morfocinético del desarrollo pre-embionario, se revisaron las filmaciones de cada pre-embrión a fin de recabar los tiempos exactos (variables directas) del desarrollo reportados por Herrero et al. (Herrero et al. 2013), divisiones en estadio de 2 (t2), 3 (t3), 4 (t4), 5 (t5), 6 (t6), 7 (t7) y 8 células (t8). El tiempo de división fue definido como el momento en que se ha completado la división celular (citocinesis).

Tras determinar los tiempos de división embrionario de 2 a 8 células, se calcularon las siguientes variables indirectas en horas (Figura 14).

Duración del segundo ciclo celular (cc2)

- Duración del segundo ciclo celular de la primera blastómera en dividirse desde el estadio de 2 a 3 células; $cc2a=t3-t2$.
- Duración del segundo ciclo celular de la segunda blastómera en dividirse desde el estadio de 2 a 4 células; $cc2b=t4-t2$.
- La duración media del segundo ciclo celular; $acc2=(cc2a+cc2b)/2$.

Duración del tercer ciclo celular (cc3)

A fin de determinar la duración del tercer ciclo celular en cada una de las blastómeras que conforman un pre-embrión es necesaria la trazabilidad de cada blastómera a lo largo del desarrollo pre-embionario, tal y como se muestra en la Figura 15.

METODOLOGÍA

- Duración del tercer ciclo celular de la primera blastómera en dividirse a 5 células; $cc3a = t5 - t3$ o $cc3a = t5 - t4$, según el patrón de división correspondiente (Modelo A-C ó D-F, respectivamente).
- Duración del tercer ciclo celular de la segunda blastómera en dividirse a 6 células; $cc3b = t6 - t3$ (Modelo A, D ó E) o $cc3a = t6 - t4$ (Modelo B, C ó F).
- Duración del tercer ciclo celular de la tercera blastómera en dividirse a 7 células; $cc3c = t7 - t4$ (Modelo A, B ó D) o $cc3a = t7 - t3$ (modelo C, E ó F).
- Duración del tercer ciclo celular de la cuarta blastómera en dividirse a 8 células; $cc3d = t8 - t4$ (Modelo A, B ó D) o $cc3a = t8 - t3$ (Modelo C, E ó F).
- La duración media del tercer ciclo celular; $acc3 = (cc3a+cc3b+cc3c+cc3d) / 4$.

Grado de sincronía de división (SD)

La sincronía de las divisiones fue calculada para el segundo (SD2) y tercer (SD3) ciclo celulares.

- $SD2 = cc2a/cc2b$, estando en el rango 0-1.
- $SD3 = ((cc3a+cc3b+cc3c+cc3d)/4)/(t8-t3)$, estando también en el rango 0-1.

METODOLOGÍA

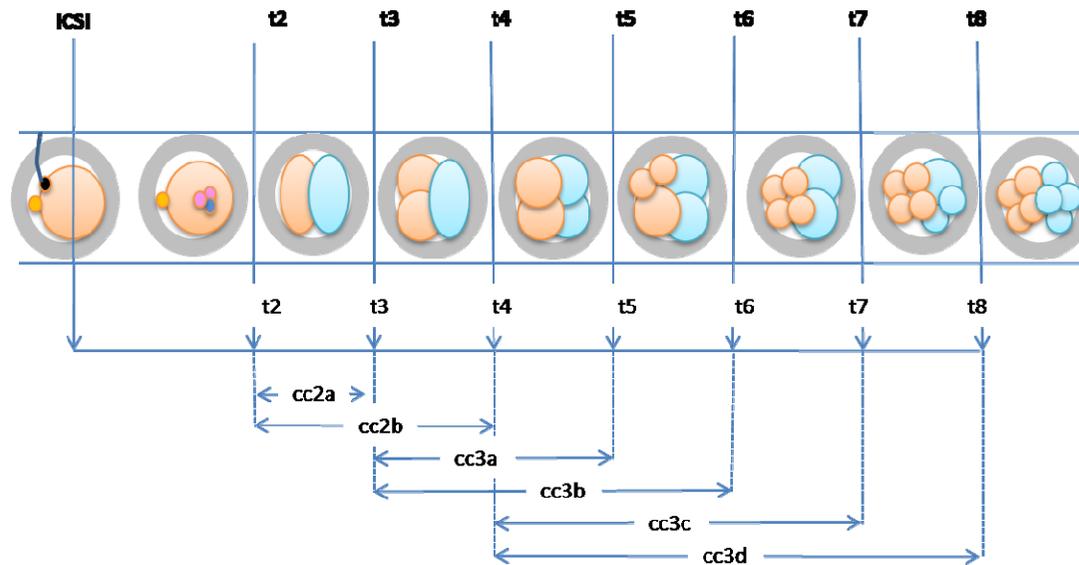


FIGURA 14. Representación gráfica de los eventos del desarrollo embrionario (modelo A) para determinar las variables morfocinéticas directas e indirectas.

METODOLOGÍA

El tiempo de referencia (t_0) es el momento en que se realice el ICSI. Las variables morfocinéticas directas fueron: Los tiempos de división de los pre-embriones a estadio de 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- y 8-células (t_2 , t_3 , t_4 , t_5 , t_6 , t_7 , t_8). Las variables morfocinéticas indirectas fueron: la duración del Segundo ciclo celular de la primera blastómera en dividirse del estadio de 2- a 3-células ($cc2a=t_3-t_2$); duración del segundo ciclo celular de la segunda blastómera en dividirse del estadio de 2- a 4-células ($cc2b=t_4-t_2$); duración del tercer ciclo celular de la primera ($cc3a=t_5-t_3$), segunda ($cc3b=t_6-t_4$), tercera ($cc3c=t_7-t_4$) y cuarta ($cc3d=t_8-t_4$) blastómera en dividirse en estadio de 5-, 6-, 7- y 8-cell , respectivamente (Figura 12).

En la figura 15 se muestran los 6 posibles patrones de división de las blastómeras.

Para determinar el patrón de división celular en los pre-embriones 3PN (diploides y triploides) y los pre-embriones 2PN, se siguieron las divisiones tempranas marcando los eventos en las grabaciones de los 3 primeros días de desarrollo de cada embrión cultivado en sistema time-lapse de forma individual.

Tras la primera división se obtuvieron dos blastómeras. La siguiente división dio lugar a un pre-embrión de 3 células y definió la blastómera que se dividió en primer lugar (llamada *a*), que se distingue de la blastómera hermana que se divide la segunda (llamada *b*), dando lugar a un pre-embrión en estadio de 4 células. La siguiente división dio lugar a un pre-embrión de 5 células; la

METODOLOGÍA

blastómeras que se generaron en la primera división dio al pre-embrión de 5 células fueron llamadas *a1* o *b1*, dependiendo de la blastómera de la que procedían (*a* o *b*). Las sucesivas divisiones hacia los estadios de 6-, 7- y 8-células se definieron las blastómeras correspondientes en estadios de 4 células *a/b2*, *a/b3* y *a/b4*.

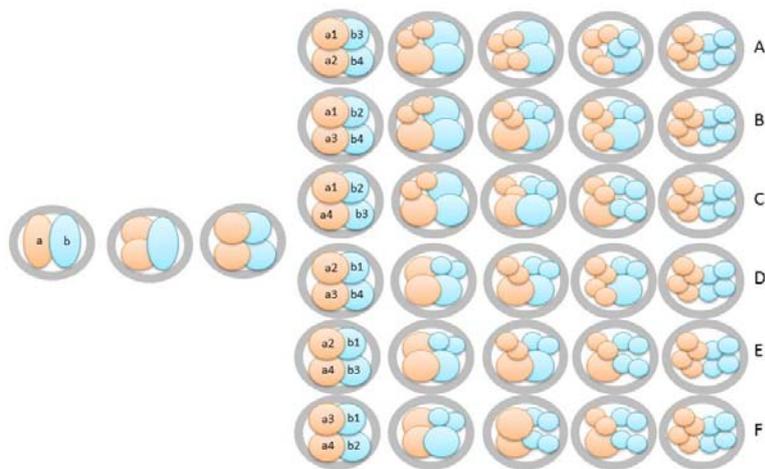


FIGURA 15. Representación gráfica de los seis posibles modelos de acuerdo al patrón de división de las blastómeras de los pre-embriones.

Patrón de división embrionaria

Las divisiones blastoméricas fueron monitorizada a lo largo del desarrollo de los pre-embriones 3PN-ICSI y 2PN desde una célula (cigoto) hasta el estadio de 8 células.

Referente a las anomalías en el desarrollo se identificaron aquellas divisiones directas de los cigotos a 3 células (DC1_3); también se marcaron aquellas divisiones en las que una blastómera se dividía directamente a tres células en distintos estadios de desarrollo (estadio de 2-, 3-, 4- y 5-células: DC2-4; DC3-5; DC4-6; DC5-7); en consecuencia, los pre-embriones resultantes estarían formados por 4-, 5-, 6- y 7-blastómeras asimétricas.

Otra de las desviaciones del patrón normal de desarrollo pre-embrionario comprende aquellos pre-embriones que si bien se dividen en dos células hijas similares en tamaño, presentan una duración del segundo (cc2a) o tercer (cc3a) ciclo celular anormalmente corto (<5h; (Rubio et al. 2014), definiéndose como pre-embriones con división directa en estadio de 2 a 3 (DC2-3) o de 4 a 5 células (DC4-5).

ESTUDIOS GENÓMICOS

Los estudios genómicos, realizados sobre pre-embriones 3PN comprenden aquéllos para la determinación de la ploidía mediante hibridación in situ y fluorescente y aquéllos que pretenden identificar la composición parental en los pre-embriones (finger-printing).

Estudio de ploidía en pre-embriones 3PN

Los estudios de ploidía se realizaron en aquellos pre-embriones 3PN-FIV ó 3PN-ICSI que en estadio de células presentaban más de 6 células en D3/4 de desarrollo, menos de un 20% de fragmentación y buena simetría entre las células que los conformaban. Adicionalmente, los estudios de ploidía también se realizaron, cuando fue posible, en aquellos 3PN-FIV y 3PN-ICSI que alcanzaron el estadio de blastocisto.

Biopsia y fijación pre-embrionaria en estadio de células

En D3 de desarrollo, se procedió a biopsiar cada uno de los pre-embriones a analizar, la técnica de biopsia embrionario en estadio de células se realizó en pre-embriones que presentan entre 6-10 células, ya que se ha comprobado que en este estadio la extracción de 1 o 2 blastómeras no afecta negativamente al posterior desarrollo (Hardy et al. 1990), con fragmentación menor al 25% y presencia 5 o más células con un solo núcleo. La biopsia embrionaria se realizó siguiendo el protocolo usado rutinariamente para el PGS/PGD en el Laboratorio de Fecundación in vitro de IVI Valencia (Rubio et al. 2007a).

Para realizar la biopsia, cada uno de los pre-embriones fueron incubados en microgotas de 30µl de medio tamponado sin Ca²⁺ y Mg²⁺ (GPGD TM, Vitrolife, Göteborg, Suecia) a 37°C. Para iniciar la micromanipulación se posicionó y fijó el embrión a biopsiar con

METODOLOGÍA

ayuda de la pipeta de sujeción (Holding micropipets, Humagen TM, Ahrlottesville, VA, USA) caracterizada por tener un diámetro externo de 100µm, 20 µm de diámetro interno y un ángulo de 30º (Biopsia Micropipets, Humagen, Charlottesville, VA, USA), de modo que la zona donde se practicará el orificio para acceder al contenido intrazonal quedara orientado en una posición horaria correspondiente a las 3:00. Una vez posicionado el pre-embrión, se practicó el orificio mediante 6-8 pulsos de láser (Octax TM, Herbron, Alemania), usado de forma rutinaria en nuestro laboratorio debido a su fácil manejo y rapidez. La intensidad del pulso fue de 100-150 mW para generar un orificio de unos 30-35 µm de diámetro. Con ayuda de la pipeta de biopsia y, mediante aspiración controlada, se retiraron una o dos células del embrión, las cuales fueron situadas en el lado opuesto de misma gota de manipulación en la que encuentra el pre-embrión ahora ya biopsiado. Finalizada la biopsia, los pre-embriones fueron individualmente retirados de la placa de biopsia y lavados repetidas veces en una placa con medio de cultivo para eliminar los restos de medio de biopsia (GPGD) y, posteriormente cultivados en CCM según las condiciones de cultivo antes mencionadas. Por su parte, las blastómeras extraídas permanecieron en la placa de biopsia y transportadas hasta las instalaciones donde se realizó su fijación.

Las blastómeras extraídas de cada embrión, debidamente identificadas, fueron procesadas para fijar sus núcleos según el método de Tarkowski modificado (Tarkowski 1966)(Rubio et al. 2007). En síntesis, cada blastómera aislada se depositó sobre un portaobjetos previamente desengrasado, retirándose

METODOLOGÍA

cuidadosamente el exceso de medio, al tiempo que se valora la expansión de la blastómera sobre el portaobjetos. Una vez retirado todo el medio, se añade verticalmente sobre la extensión, una primera gota de la solución de fijación "Carnoy" (metanol-acético 3:1; Merk TM, Darmstad, Alemania (Mercader et al. 2003); tras evaporarse, el proceso se repitió sucesivamente hasta la completa eliminación de los restos de citoplasma quedando el núcleo blastomérico totalmente extendido sobre el portaobjetos, limpio de restos citoplasmáticos.

Fijación de pre-embryones 3PN en estadio de blastocisto

Los blastocistos expandidos en D5/6 de desarrollo se fijaron utilizando el protocolo de Tarkowsky modificado (Harper et al. 1994). En síntesis, cada blastocisto fue individualmente incubado en medio G-PGD, carente de Ca^{2+} y Mg^{2+} (G-PGD, VitroLife, Scandinavian IVF) durante 1-5 min antes de eliminar la zona pelúcida mediante incubación en una solución ácida Tyrode (ph 2.3-2.5, Origio). Los blastocistos sin zona pelúcida se dispusieron en un portaobjetos desengrasado con mínimo volumen de medio de cultivo y, los núcleos fueron expandidos añadiendo una solución fijadora 0.01N HCl/0.1%Tween 20. Cuando el citoplasma se disolvió los núcleos fueron re-fijados con ácido metanol-acético.

Hibridación in situ fluorescente (FISH)

Las blastómeras y blastocistos fijados se analizaron mediante un protocolo de hibridación in situ fluorescente (FISH, del inglés

METODOLOGÍA

Fluorescent in situ hybridation) secuencial para estudio de aneuploidías de 5 cromosomas tras dos rondas de hibridación con sondas de ADN marcadas con moléculas fluorescentes (Rubio et al. 2005).

El análisis cromosómico de las blastómeras fijadas y blastocitos se realizó con el kit comercial Aneuvysion (Vysis Inc., Downers Grove, IL). Este kit, consta de una mezcla de sondas específicas de locus para los cromosomas 13 (13q14, locus RB1, Spectrum Green) y 21 (21q22.13-q22.2, loci D21S259, D21S341, D21S342, Spectrum Orange), y una mezcla de sondas centroméricas para los cromosomas 18 (p11.1-q11.1 locus D18Z1, Spectrum Green) y X (Xp11-q11, locus DXZ1, Spectrum Orange) y para la región heterocromática del cromosoma Y (Yq12, locus DYZ3, Spectrum Aqua).

La hibridación de las blastómeras así como de los blastocistos completos se realiza mediante dos rondas de hibridación seriadas, seguidas de la observación mediante fluorescencia de las extensiones.

Para la correcta hibridación de las sondas con el ADN embrionario, es necesaria una co-desnaturalización de las sondas de ADN y los núcleos embrionarios, lográndose mediante calor; para ello, las preparaciones se incuban en una placa calefactora (Hybrite, Vysis Inc. Downers Grove, IL, USA) durante 3 minutos a 73°C y a continuación se hibridó durante 1-2 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo se retira la cola y el cubre y los portaobjetos se sumergen en una cubeta

METODOLOGÍA

coplin con 0.4xSSC (Vysis Inc. Downers Grove, IL, USA) atemperado a 73°C en un baño térmico durante 2 minutos. Posteriormente, se realiza un segundo lavado de 30 segundos en una cubeta con 2x SSC 0.1% NP-40 (Vysis Inc. Downers Grove, IL, USA) a temperatura ambiente para finalmente aplicar 10 µl de la contratinción DAPI II sobre el área de hibridación y visualizar así toda la cromatina. La preparación es finalmente protegida con un cubreobjetos de 20x20 mm.

La primera ronda de hibridación se inicia con la deshidratación de las extensiones mediante incubaciones en una serie creciente de alcoholes de 70, 85 y 100% de etanol (v/v, Merck), colocando los portaobjetos 1 minuto en cada cubeta. Posteriormente, las extensiones se secan al aire, a temperatura ambiente. Seguidamente, se deposita sobre el área de hibridación 1µl de la mezcla de sonda para los cromosomas 13 y 21, protegiéndola con cubreobjetos de 5mm de diámetro y sellándola. Se contabilizó el número de marcas fluorescentes presentes en cada núcleo para cada uno de los cromosomas analizados.

Realizada y contabilizada la primera ronda de hibridación para los cromosomas 13 y 21, se procede con una segunda ronda de hibridación, cuya finalidad es la hibridación y observación de los cromosomas 18, X e Y. Para ello, las preparaciones son desprotegidas del cubreobjetos e incubadas en 2xSSC/0.1% NP-40 durante 3 minutos, agitando ligeramente y a temperatura ambiente. Posteriormente se procede con una ronda de deshidratación en una

METODOLOGÍA

serie creciente de alcoholes de 70, 85 y 100% etanol (Merck), durante un minuto en cada alcohol. Tras la deshidratación, las extensiones se dejan secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se deposita 1 µl de la mezcla de sondas para los cromosomas 18, X e Y sobre el área de hibridación y se protege nuevamente con un cubreobjetos de 5mm de diámetro, sellándose la preparación con cola. Nuevamente, se procede a la co-desnaturalización del ADN calentando la preparación como se describe anteriormente y permitiendo la hibridación

A continuación se coloca 1 µl de la mezcla de sondas para los cromosomas 18, X e Y sobre el círculo señalado en el portaobjetos, se cubre con un cubre de 5mm de diámetro y se sella con cola.

Transcurrido este tiempo, se desprotege la preparación con la retirada del cubreobjetos y se sumergen las preparaciones durante 2 minutos en una cubeta coplin 0.4xSSC atemperada a 73°C en un baño térmico, seguido de un segundo lavado de 30 segundos en una cubeta con 2x SSC/0.1% NP-40 a temperatura ambiente. Nuevamente, se aplica 10 µl de la contratinción DAPI II (Vysis Inc. Downers Grove, IL, USA) sobre el área de hibridación para visualizar toda la cromatina y se protege la muestra con un cubre de 20x20 mm.

Visualización e interpretación de las señales de hibridación

La visualización e interpretación de las señales de hibridación se realizan con un microscopio de epifluorescencia (Olympus optical Co.

METODOLOGÍA

AX70, Japón) equipado con filtros individuales específicos para la FITC, Texas-Red, Gold, Aqua-Blue y con triple filtro DAPI/Texas-Red/FITC. Las imágenes se grabaron en una video-cámara Olympus DP-70.

Las determinaciones de la ploidía se realizan contabilizando el número de marcas fluorescentes observadas en cada núcleo para cada uno de los cromosomas. Tras la primera ronda de hibridación se observaron señales de color verde para el cromosoma 13 y rojo para el 21. Tras la segunda ronda de hibridación se observaron señales de color verde, rojo y azul para los cromosomas 18, X e Y, respectivamente.

Los embriones se consideraron informativos cuando al menos estaban presentes dos autosomas. Se definieron 3 tipos de ploidía: diploide, cuando se identificaron 2 señales cromosómicas, triploide, cuando se detectaron 3 señales y anormal, para las diferentes fórmulas cromosómicas, incluyendo pre-embriónes mosaicos y caóticos.

Análisis de la herencia parental (Finger-printing)

Para evaluar la composición parental de los blastocistos 3PN, se procedió a hacer el diagnóstico genético preimplantacional con reacción en cadena de la polimerasa (lisis celular).

Extracción de ADN genómico de la sangre de los progenitores

Para la extracción del ADN de la sangre de los parentales de los embriones, se extrajeron muestras de sangre de 10ML de ambos progenitores, paterno y materno en tubos que contenían EDTA, y fueron conservadas a -20°C hasta que se procedió a la extracción.

El procesado de las muestras de sangre de los progenitores se realizó según las técnicas estándar, tras descongelar la muestra de sangre se añadió una solución de lisis, que contenía detergente (SDS) y proteinasa K, para degradar las proteínas presentes y RNAsa, para degradar el ARN presente. Seguidamente se centrifugó la muestra para separar todo el lisado celular en forma de precipitado, obteniéndose una fase acuosa donde se presenta el ADN genómico. A continuación se purificó el ADN precipitándolo en presencia de Etanol y se separó mediante centrifugación.

Extracción de ADN genómico en blastocistos

Los blastocistos fueron individualmente incubados en medio G-PGD, carente de Ca^{2+} y Mg^{2+} (G-PGD, VitroLife, Scandinavian IVF) durante 1-5 min antes de eliminar la zona pelúcida mediante incubación en una solución ácida Tyrode (ph 2.3-2.5, Origio). Los blastocistos sin zona pelúcida, se dispusieron en tubos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de 0.2 ml que contenían 2.5 μl de tampón (5 μl) de lisis alcalino (50mM KCl, 10 mM Tris-HCl a ph 8.3, 0.5% Tween-20 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteinasa K); éstos fueron identificados y congelados

METODOLOGÍA

inmediatamente a -80°C hasta que se realizase la amplificación de ADN por PCR.

Amplificación y análisis de ADN genómico en los blastocistos y los parentales

Para la amplificación de ADN, los tubos que contenían los blastocistos congelados se incubaron a 50°C durante 30 minutos y fueron entonces dispuestos en un termociclador a 65°C durante 10 minutos.

Se amplificaron de forma independiente los loci de repeticiones cortas en tándem (short tándem repeat) del ADN procedente de los blastocistos y de sus parentales, empleando PCR multiplex y el kit Repli-g Midi (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. KIT AmpFISTR Profiler Plus PCR amplification kit (Applied Biosystems, FosterCity, CA)

Para el análisis de los fragmentos, se empleó $1.5\ \mu\text{l}$ del ADN amplificado usando ABI Prism 310. Los datos se analizaron usando el software GeneScanAnalysis 3.1.2 (AppliedBiosystems). Para estudiar la herencia uni o heteroparental de los blastocistos, se estudió el haplotipo de los blastocistos y se comparó con aquéllos propios de los parentales (madre y padre).

ELIMINACIÓN MICROQUIRÚRGICA DEL PRONÚCLEO SUPERNUMERARIO: EPRONUCLEACIÓN

La eliminación microquirúrgica del pronúcleo supernumerario de los 3PN-FIV se realiza mediante el empleo de técnicas de micromanipulación.

Para ello, los cigotos 3PN-FIV se incubaron y manipularon individualmente en microgotas de 25 μ l de medio IVF-20 (Scandinavian IVF, EMB, Barcelona, España) suplementado con 7.5 μ g/ml de cytochalasin B (C6762; Sigma, Madrid, España) y 0.1M de demecolcina (D1925; Sigma); todo ello cubierto con aceite mineral (Cook, Barcelona, España).

El tiempo de permanencia de los cigotos 3PN en la solución de micromanipulación se limitó a 3 minutos bajo condiciones controladas de temperatura, a fin de no comprometer la viabilidad posterior de los mismos; por ello, los cigotos se dispusieron de uno en uno por placa. La eliminación del pronúcleo supernumerario se realizó bajo microscopía de Hoffman (Diaphot 300, Nikon, Barcelona, España), equipado con micromanipuladores hidráulicos (MM188, Narishige, Londres, UK) y empleando dos tipos de pipetas de micromanipulación: una pipeta de sujeción estándar (Humagen: con 100 μ m de diámetro externo y 20 μ m de diámetro interno) y una aguja (pipeta) de microinyección de 6 μ m diámetro externo.

Las pipetas se dispusieron en un ángulo de 45º usando un sistema estándar de inyección (IM-26-2; Narishige).

METODOLOGÍA

Tras sujetar los cigotos 3PN-FIV con la pipeta holding, éstos fueron rotados y repositionados hasta identificar claramente los tres pronúcleos y los dos corpúsculos polares a fin de poder seleccionar y eliminar el PN extra. Los tres pronúcleos se posicionan de forma piramidal típica en el centro del citoplasma. El pronúcleo supernumerario masculino que debe ser eliminado, es aquél ubicado más alejado del segundo corpúsculo polar.

La técnica de epronucleación consiste en la eliminación del pronúcleo extra; para ello se inserta la micropipeta a través de la zona pelúcida y se ubica intracitoplasmáticamente en la región se encuentran los pronúcleos. En este momento se ejerce presión negativa para eliminar el pronúcleo deseado; se mantiene dicha presión al tiempo que se realiza una suave aspiración. Con el pronúcleo capturado, la pipeta y el pronúcleo son suavemente dragados del área de singamia hacia la superficie del oolema. La aspiración continúa hasta la total eliminación del pronúcleo y parte del citoplasma circundante. Completada la aspiración, se retira la pipeta y el cigoto manipulado es liberado.

Tras la manipulación, cada cigoto es lavado 3 veces en medio IVF-20 y cultivado en una atmósfera al 5%CO₂ a 37°C durante 3 horas. En este momento se comprueba la supervivencia, así como el número de pronúcleos que contienen. Solamente aquellos cigotos supervivientes y que presentan dos pronúcleos son cultivados en sistema de co-cultivo embrionario; siendo los demás contabilizados pero descartados de ulterior cultivo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para cada variable continua, la normalidad de las muestras se comprobó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Las variables continuas que se ajusten a una distribución normal, se analizaron mediante ANOVA, de acuerdo a la composición pronuclear y la ploidía. Los datos se presentaron como media \pm SD, y 95% de intervalo de confianza (95CI). El valor p de 0.05 indica significancia estadística.

Las variables discretas (capacidad de desarrollo embrionario de los pre-embriónes 3PN y 2PN a blastocisto; supervivencia, éxito de la pronucleación, patrón de división, modelo de desarrollo embrionario) fueron comparada estadísticamente usando el test de Chi-cuadrado. Se aplicó la corrección de Yates para continuidad cuando había un grado de libertad. Igualmente se calcularon los riesgos relativos (RR) con su correspondiente intervalo de confianza del 95% para las comparaciones entre variables categóricas.

En los casos en que se estableció un modelo predictivo, se realizó mediante una regresión logística binomial usando el método de pasos hacia adelante. Mediante las curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) se analizó el valor predictivo de las variables incluidas en el modelo, el AUC (área bajo la curva) comprendida entre 0 y 1

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el SPSS 17.0 (Chicago, IL, USA).

RESULTADOS

**ESTUDIO 1: ESTUDIO COMPARADO DE LA PLOIDÍA Y
COMPOSICIÓN PARENTAL EN PRE-EMBRIONES
TRIPRONUCLEARES PROCEDENTES DE FIV E ICSI.**

**Estudio de la ploidía en pre-embriones
tripronucleares procedentes de FIV e ICSI**

**Análisis de la ploidía en pre-embriones tripronucleares
procedentes de FIV**

Tras cultivar 64 cigotos 3PN-FIV, 18 pre-embriones (28.1%) cumplieron con los criterios para ser biopsiados en D3 (n=16) o D4 (n=2) de desarrollo, conteniendo 8.1 ± 1.8 células (95% CI: 6.2-9.9 células) en promedio.

Tras realizar los estudios de ploidía mediante hibridación in situ fluorescente (FISH) se obtuvieron resultados en 16 pre-embriones 3PN-FIV, siendo dos de ellos no informativos para los cromosomas analizados; dos embriones fueron diploides, tres triploides y once presentaban una fórmula embrionaria diferente ($p=0.001$, Tabla 1). Tal y como se muestra, se observó un porcentaje comparable de embriones diploides y triploides (12.5% vs 18.7% respectivamente; $P>0.05$).

De los 18 pre-embriones 3PN-FIV biopsiados, ocho alcanzaron el estadio de blastocisto (50%). Tras realizar los análisis cromosómico

RESULTADOS

en todos los 8 blastocistos, se obtuvo resultados de 4 de ellos (33.0 ± 19.8 células); los otros cuatro resultaron no informativos. Tres blastocistos 3PN-FIV fueron triploides y uno resultó diploide (75.0% vs 25.0%; $p > 0.05$; Tabla 2).

Análisis de la ploidía en pre-embiones tripronucleares procedentes de ICSI

Tras cultivar 71 cigotos 3PN-ICSI, 32 pre-embiones cumplieron criterios para ser biopsiados (45.1%) bien en D2 ($n=1$), D3 ($n=19$) o D4 ($n=12$) de desarrollo, siendo 7.2 ± 1.4 (95% CI: 5.8-8.7 células) el número medio de células en el momento de la biopsia.

De los 32 pre-embiones 3PN-ICSI biopsiados, se obtuvo resultado de ploidía en 25 de ellos (78.1%), los 7 resultantes no fueron informativos. Trece embiones resultaron diploides, ocho triploides y los otros cuatro tenían formulas embrionarias diferentes ($p=0.02$, Tabla 3). No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de pre-embiones 3PN-ICSI diploides y triploides en estadio de células (52% vs 32%, respectivamente; $p=0.25$).

Respecto a la capacidad de desarrollo a blastocistos, 20 pre-embiones 3PN-ICSI biopsiados alcanzaron el estadio de blastocisto (62.5%), conteniendo en promedio 29.8 ± 10.8 células. Respecto al análisis de ploidía, éste se realizó en 16 de ellos, obteniéndose resultado en once y siendo 5 blastocistos no informativos. Seis blastocistos fueron diploides y cinco triploides (54.5% vs 45.4 %; $p > 0.05$)

RESULTADOS

TABLA 2. Estudio numérico de los cromosomas 13, 18, 21, X e Y de los 3PN-FIV en estadio de células y blastocisto.

Embrión	Nº de señales cromosómicas					Ploidía en células	Alcanza estadio BTC	Fórmula cromosómica	Ploidía en estadio de BTC
	13	18	21	X	Y				
1	2	2	2	2	0	Diploide	No		
2	1	2	2	0	2		No		
3	3	1	2	2	1		No		
4	3	1	2	2	1		No		
5	2	1	1	0	1		No		
6	2	1	2	0	1		No		
7	NI	NI	NI	NI	NI		No		
8	2	0	0	1	0		Sí	69XXY (17); 138,XXXXYY (2)	Triploide
9	3	3	3	2	1	Triploide	Sí	69XXY (38); 138,XXXXYY (3); 46,XX (6)	Triploide
10	NI	0	2	1	1		No		
11	3	3	3	2	1	Triploide	Sí	NI	
12	1	1	1	1	0		Sí	NI	
13	NI	3	2	3	0		No		
14	3	1	5	2	1		No		
15	2	2	2	2	0	Diploide	Sí	46,XX (23)	Diploide
16	NI	NI	NI	NI	NI		Sí	69XXY (11)	Triploide
17	2	2	1	3	0		Sí	No analizado	
18	3	3	3	2	1	Triploide	Sí	No analizado	

BTC= Blastocisto/ NI = no informativo para los cromosomas analizados

RESULTADOS

TABLA 3. Estudio numérico de los cromosomas 13, 18, 21, X e Y de los 3PN-ICSI en estadio de células y blastocisto.

Embrión	Nº de señales cromosómicas					Ploidía en células	Alcanza estadio BTC	Fórmula cromosómica	Ploidía en estadio de BTC
	13	18	21	X	Y				
1	2	2	2	1	1	Diploide	Sí	46, XY (26); 92, XXYY (6)	Diploide
2	2	2	2	1	1	Diploide	Sí	46, XY (49)	Diploide
3	3	3	3	2	1	Triploide	No		
4	3	3	3	NI	NI	Triploide	No		
5	3	3	3	3	0	Triploide	Sí	N.I.	
6	2	2	2	1	1	Diploide	Sí	46, XY (19);92, XXYY (1)	Diploide
7	3	NI	3	2	1	Triploide	Sí	N.I	
8	3	3	3	3	0	Triploide	Sí	69, XXX (20);92, XXXX (1)	Triploide
9	NI	NI	NI	NI	NI		Sí	69, XXX (28)	Triploide
10	NI	NI	NI	NI	NI		Sí	69,XXY (28); 115,XXXXY(1)	Triploide
11	2	2	2	1	1	Diploide	Sí	46, XY (46)	Diploide
12	2	2	2	1	1	Diploide	Sí	46, XY (22); 92, XXYY (2)	Diploide
13	NI	NI	NI	NI	NI		Sí	46, XY (10); 92, XXYY (2)	Diploide
14	2	2	2	1	1	Diploide	No		
15	2	2	2	1	1	Diploide	No		
16	NI	NI	NI	NI	NI		No		
17	NI	NI	NI	NI	NI		No		
18	3	3	3	2	1	Triploide	Sí	69, XXY (30)	Triploide
19	3	3	3	2	1	Triploide	Sí	N.I.	
20	0	2	2	1	1	Diploide	No		
21	NI	NI	NI	NI	NI		No		
22	NI	NI	NI	NI	NI		Sí	69, XXY (22); 92, XXYY (2); 138, XXXXXY (3)	Triploide
23	2	1	1	1	1		Sí	N.I.	
24	3	3	3	3	0	Triploide	Sí	N.I.	
25	2	2	2	2	0	Diploide	Sí	Heteroparental	
26	2	2	2	2	0	Diploide	Sí	Heteroparental	
27	2	2	2	2	0	Diploide	Sí	Heteroparental	
28	2	2	2	2	0	Diploide	No		
29	3	1	2	2	0		No		
30	2	1	2	1	0		No		
31	1	1	0	1	0		No		
32	2	2	2	1	1	Diploide	Sí	Heteroparental	

BTC= Blastocisto/ NI = no informativo para los cromosomas analizados

Estudio comparado de la ploidía en pre-embriones tripronucleares procedentes de FIV e ICSI

En el momento de la biopsia, los pre-embriones TPN-F y TPN-I contuvieron un número medio de células comparable, siendo en promedio 7.5 ± 1.6 células ($p=0.097$).

Según el origen de los pre-embriones TPN (FIV vs ICSI), hay diferencias en cuanto a la distribución de la ploidía embrionaria. En el grupo TPN-I observamos en estadio de células una proporción de pre-embriones diploides significativamente mayor que en los TPN-F (52% vs 12.5%; $p=0.02$) mientras que el número de pre-embriones triploides fue comparable en ambos grupos (32% vs 18.7% respectivamente; $p=0.56$; 26.8%). El número de pre-embriones con fórmula embrionaria diferente de la diploide o triploide fue mayor para los TPN-F que para los TPN-I (68.7% vs 16.0%; $p=0.002$).

En cuanto a la capacidad de desarrollo in vitro, tanto los pre-embriones TPN-F y TPN-I mostraron unas tasas de desarrollo a blastocistos comparables (62.5% vs 44.4% respectivamente; $p=0.3$); obteniendo en promedio un 56.0% de llegada a blastocisto.

RESULTADOS

En función del origen de los TPN, el porcentaje de blastocistos diploides fue comparable (TPN-F: 25% vs. TPN-I: 54.5%) así como también lo fue el porcentaje de blastocistos triploides (TPN-F: 75.0% vs. TPN-I: 45.5%); probablemente debido al reducido tamaño muestra del grupo de TPN-F (Tabla 4).

TABLA 4. Estudio comparado de la ploidía de los 3PN-FIV y 3PN-ICSI en estadio de células y blastocisto.

Origen	Ploidía en células			Estadio BTC	Ploidía en BTC	
	Diploide n (%)	Triploide n (%)	Otros n (%)		Diploide n (%)	Triploide n (%)
3PN-FIV	2 (12.5)	3 (18.7)	11 (68.7)	8 (44.4)	1 (25)	3 (75)
3PN-ICSI	13 (52)	8 (32)	4 (16)	20 (62.5)	6 (54.5)	5 (45.5)
P-valor	0.02	0.56	0.002	0.3	0.3	0.3

BTC: Blastocisto

Estudio de la composición parental en pre-embryones tripnucleares procedentes de ICSI.

El análisis de composición parental se realizó en cuatro blastocistos 3PN-ICSI, diagnosticados como diploides tras el estudio de la ploidía en el estadio de células (tres 46, XX y uno 46, XY).

Tras el análisis genómico del ADN de los cuatro blastocistos y su comparación con sus correspondientes progenitores mostró que los cuatro blastocistos una herencia génica heteroparental para las repeticiones cortas repetidas en los 3 loci ubicados en los tres cromosomas estudiados (FIG. 16).

ESTUDIO 2: PRODUCCIÓN DE PRE-EMBRIONES DIPLOIDES HETEROPARENTALES A PARTIR DE CIGOTOS TRIPRONUCLEARES PROCEDENTES DE FIV (3PN-FIV). ELIMINACIÓN MICROQUIRÚRGICA DEL PRONÚCLEO SUPERNUMERARIO.

La eliminación microquirúrgica del pronúcleo supernumerario se realizó en 72 cigotos 3PN humanos procedentes de FIV (3PN-FIV). Tras la manipulación, 51 cigotos sobrevivieron y presentaron dos pronúcleos (Tabla 5).

Los 51 pre-embryones correctamente diploidizados y supervivientes a la micromanipulación se dividieron tras 24 horas de cultivo y el 96% de éstos alcanzaron el estadio de 6-8 células en D3 de desarrollo. En

RESULTADOS

d5, 21 de los pre-embriões micromanipulados (41%) alcanzaron el estadio de blastocisto.

El desarrollo in vitro de los pre-embriões 3PN-FIV epronucleados fue estadísticamente comparable al observado en los pre-embriões control positivos, tanto en la capacidad de alcanzar el estadio de 8 células (85%) como blastocisto (50%; $p>0.05$). Además, en D5, los blastocistos derivados de cigotos 3PN-FIV epronucleados y también, los controles positivos se caracterizaron morfológicamente por poseer una masa celular interna bien definida y un trofoectodermo bien conformado (Figura 17 A y B).

Estos resultados contrastan con aquéllos obtenidos a partir de los pre-embriões control negativos (3PN-FIV no manipulados), que mostraron una capacidad de desarrollo in vitro significativamente más limitada, obteniéndose solamente 19% de blastocistos, caracterizados morfológicamente por poseer una masa celular interna reducida o ausente y un trofoectodermo de apariencia lineal (FIG 17 C).

Los resultados obtenidos mediante FISH en estadio de blastocisto, en D5 de desarrollo embrionario se recogen en la Tabla 6. Efectivamente, 87.5% de los blastocistos derivados de los pre-embriões 3PN-FIV epronucleados fueron informativos (7/8) y 75% (3/4) de los pre-embriões controles.

Cuatro blastocistos microquirúrgicamente epronucleados fueron diploides, tres de ellos 46, XY y uno 46, XX (FIG 18 A y B); dos resultaron mixoploides con coexistencia de líneas celulares diploides y tetraploides (46, XX / 92, XXXX y 46, XY / 92, XXYY) y el último

RESULTADOS

embrión microquirúrgicamente corregido mostró un complemento tetraploide (92, XXXX).

En el grupo control negativo (3PN-FIV), los resultados del FISH, realizado en tres blastocistos, confirmaron la esperada condición triploide (69 XXY; Figura 18 C).

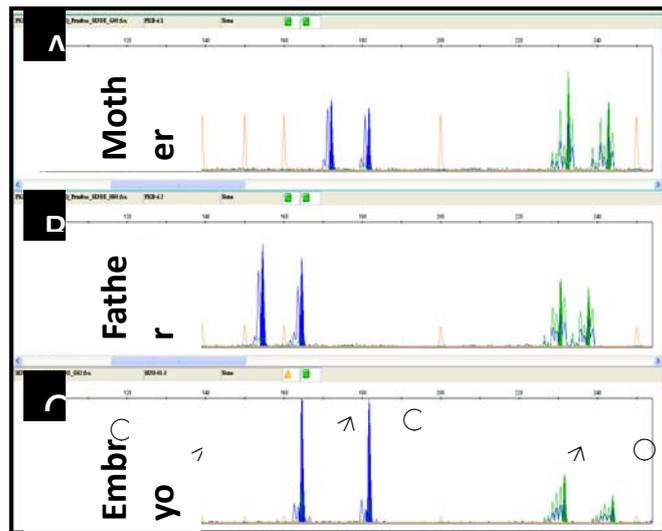


FIGURA 16. Representación de electroferogramas de tres loci informativos de STR (D16S3395, D16S475, D16S3024) para el cromosoma 16. Los análisis correspondientes a las muestras de sangre de los parentales incluidos en este estudio (Madre: A y Padre B). Los electroferogramas de los blastocistos corregidos microquirúrgicamente de estos parentales (Embrión, C). Obsérvese la informatividad de la herencia heteroparental en todos los loci.

RESULTADOS

TABLA 5. Rendimiento técnico y capacidad de desarrollo de los cigotos 3PN-FIV epronucleados microquirúrgicamente, cigotos 3PN-FIV (controles negativos), y pre-embiones correctamente fecundados (controles positivos)

	Nº de cigotos		Nº de pre-embiones (%) que alcanzan el estadio de			
	Iniciales	Cultivados	División	8células	Mórula	Blastocisto
Epronucleados	72	51 ^a	51 (100)	49 (96)	24 (47)	21(41) ^{b,d}
Control negativo	42	42	42 (100)	40 (95)	15 (36)	8 (19) ^{c,e}
Control positivo	947	947	938 (99)	808 (85)		478 (50) ^f

^a nº cigotos que sobreviven a la epronucleación y contienen dos pronúcleos

^b 18 blastocistos fueron de apariencia normal (35%). 8 blastocistos fueron fijados y analizados por FISH y 6 fueron analizados por STR-DNA.

^c 4 blastocistos 3PN-FIV control se analizaron por FISH.

^{d,e} p=0.038; ^{d,f} p=0.25; ^{e,f} p=0.00013

RESULTADOS

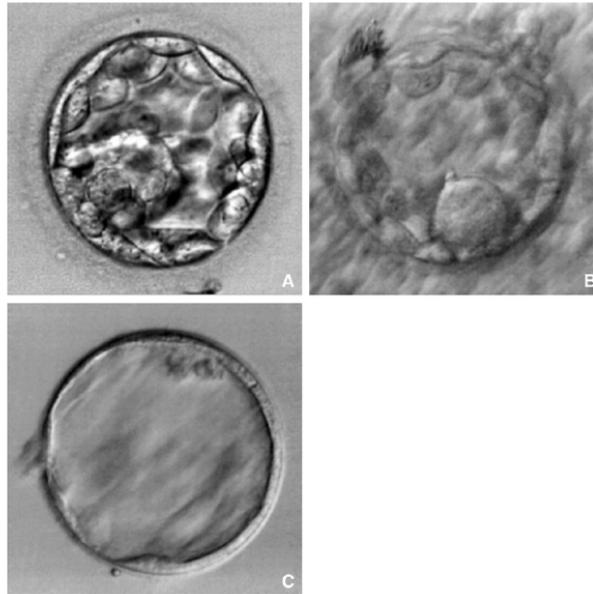


FIGURA 17. Apariencia morfológica de los blastocistos humanos cultivados in vitro y procedentes de cigotos (A) bipronucleares correctamente fecundados, (B) 3PN-FIV diploidizados microquirúrgicamente y (C) 3PN-FIV control.

El ADN genómico de las muestras de todos los parentales y de cuatro de los seis blastocistos microquirúrgicamente corregidos y analizados (67%) rindió electroferogramas con la amplificación parental esperada para el análisis de los loci STR. De los otros 2 blastocistos no se obtuvo información, debido a un fallo en la amplificación del ADN. La comparación de los electroferogramas obtenidos de los pre-embriones con el ADN genómico de su progenitores indicó que los

RESULTADOS

cuatro blastocistos amplificados fueron diploides y genéticamente heteroparentales (Figura 19). Tres fueron compatibles con el sexo XX y uno fue XY.

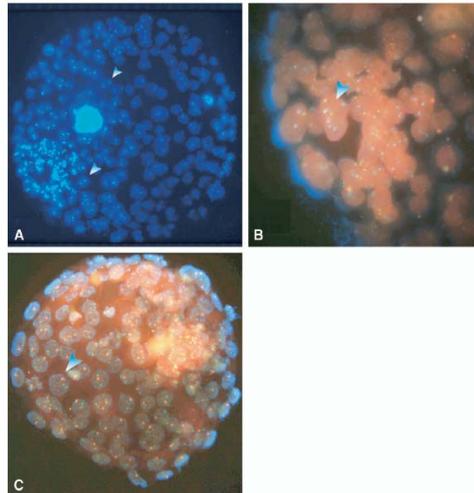


FIGURA 18. Triple hibridación in situ fluorescente para la región centromérica de los cromosomas X (señal verde), Y (señal naranja) Y 18 (señal azul) de los blastocistos 3PN-FIV microquirúrgicamente corregidos (A Y B) y 3PN-FIV control negativo (C).

RESULTADOS

TABLA 6. Ploidía y fórmula cromosómica de los pre-embriones 3PN-FIV tras la eliminación microquirúrgica del pronúcleo extra y de los 3PN-FIV control negativo (no manipulados).

Embrión	Origen	Fórmula cromosómica	Ploidía
1	Diploidizado	46XY	Diploide (2n)
2	Diploidizado	46XY	Diploide (2n)
3	Diploidizado	46XY	Diploide (2n)
4	Diploidizado	46XX	Diploide (2n)
5	Diploidizado	46XX/92XXXX	Mixoploide (2n/4n)
6	Diploidizado	46XY/92XXYY	Mixoploide (2n/4n)
7	Diploidizado	92XXXX	Tetraploide (4n)
8	Diploidizado	NI	
9	Control	69XXY	Triploide (3n)
10	Control	69XXY	Triploide (3n)
11	Control	69XXY	Triploide (3n)
12	Control	NI	

RESULTADOS

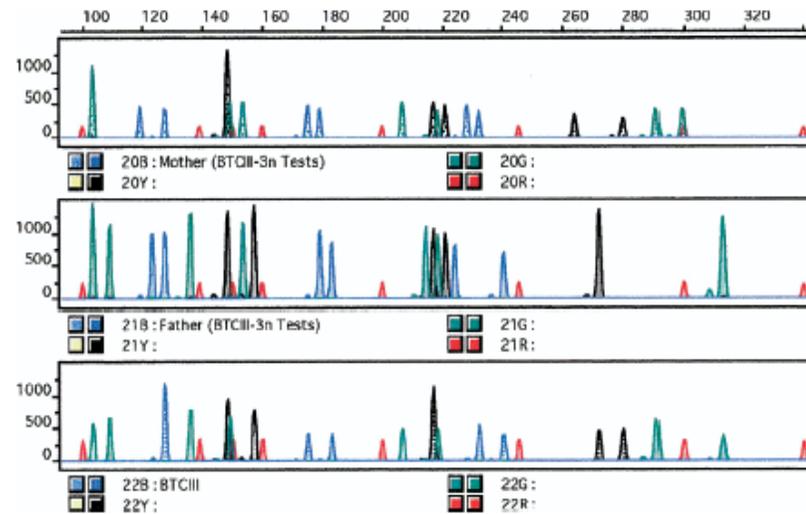


FIGURA 19. Representación en electroferogramas de 10 loci polimórficos. Las 2 primeras filas se corresponden a las muestras de sangre de una pareja incluida en el estudio (madre y padre). El electroferograma correspondiente a la tercera fila corresponde a un blastocisto corregido, hijo de dicha pareja (BTCIII). Se observa la herencia heteroparental en aquellos loci informativos.

ESTUDIO 3: PRODUCCIÓN DE DIPLOIDES HETEROPARENTALES A PARTIR DE PRE-EMBRIONES TRIPRONUCLEARES PROCEDENTES DE ICSI MEDIANTE MECANISMO DE AUTOCORRECCIÓN. ESTUDIO MORFOCINÉTICO.

Tras el cultivo de 79 cigotos 3PN-ICSI, 35 pre-embriões 3PN-ICSI cumplieron criterios morfológicos para estudiar la ploidía en estadio de células (n=15), blastocistos (n=4) o ambos (n=16). Dichos pre-embriões estaban formados por 8.3 ± 2.0 células (95CI: 7.4-9.2 células) en estadio de células y los blastocistos contenían un promedio de 30.1 ± 12.2 células (95CI: 20.3-39.8).

Tras 5 días de cultivo, 20 embriões de buen pronóstico, alcanzaron el estadio de blastocisto (57.1%).

El estudio cromosómico mediante FISH fue informativo en 30 de los 35 3PN-ICSI analizados. Siete 3PN-ICSI fueron diagnosticados como diploides (23.3%), 16 fueron triploides (53.3%) y siete presentaban una fórmula cromosómica diferente (23.3%; $p=0.017$), incluyendo dos mosaicos ($2nXX/4nXXXX$ and $3nXXY/6nXXXXYY$). La tasa de evolución in vitro hasta el estadio de blastocisto fue mayor para los pre-embriões persistentemente triploides que para aquéllos 3PN-ICSI diploides (68.7% vs. 28.6%), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0.18$); probablemente debido al tamaño muestral.

RESULTADOS

Los 23 pre-embriões 3PN-ICSI, diagnosticados como triploides y diploides y, los 17 pre-embriões 2PN control (todos ellos diploides, ya que dieron lugar a recién nacidos vivos sanos), se incluyeron en el siguiente estudio comparativo del desarrollo morfocinético.

Patrón de división de los pre-embriões 3PN-ICSI

En relación con el patrón de división, todos los embriões 3PN-ICSI y 2PN (n=40) se dividieron de 1 a 2 células independientemente del número de pronúcleos presentes en el momento de evaluación de la fecundación y la ploidía. Ningún cigoto 3PN-ICSI ni 2PN se dividió directamente en 3 células.

Las desviaciones del desarrollo embrionario estándar, basadas en alteraciones en el patrón de división o la duración del ciclo celular, se observaron en mayor medida en pre-embriões 3PN diploides (42.8%) que aquéllos persistentemente triploides y pre-embriões 2PN (5.9% and 0%, respectivamente; $p=0.04$).

Particularmente, un patrón de división alterado, consistente en la división de una blastómera en 3 células hijas en vez de 2 como es usual, se observó en dos pre-embriões 3PN-ICSI diploides y ocurrió en el tránsito del estadio de 2 a 3 células. Por lo tanto, los embriões progresaron del estadio de 2 a 4 células (DC2-4) y del estadio de 3 a 5 células (DC3-5), respectivamente, conservándose una duración del cc2 dentro del rango normal.

RESULTADOS

Otra desviación del desarrollo normal consistió en una duración del segundo ciclo celular anormalmente corta ($cc2a < 1$ h), mientras que las blastómeras mostraron un patrón de división normal en dos células. El acortamiento inusual del $cc2a$ (DC2-3) se observa en 2 embriones 3PN-ICSI, uno diploide y otro triploide.

Sorprendentemente, ningún embrión con patrón de desarrollo alterado progresó hasta estadio de blastocisto.

No se observó ninguna alteración en el patrón de desarrollo y/o duración del ciclo celular en ninguno de los 17 embriones 2PN control.

Estudio morfocinético del desarrollo de los pre-embryones 3PN-ICSI

En relación con la morfocinética, los tiempos de división de las blastómeras fueron más tardíos en embriones 3PN-ICSI que en aquellos 2PN (Tabla 7; $p < 0.05$). Sin embargo, el tiempo de división a cinco células (t_5) ocurrió en tiempos comparables, independientemente del número de pronúcleos en el momento de la fecundación, siendo en promedio 54.8 ± 9.6 h; (95CI:51.5-58.1h).

Respecto a las variables indirectas, la duración del segundo y tercer ciclo celular de cada blastómera fueron significativamente más prolongados en los pre-embryones 3PN-ICSI que en los 2PN control (Tabla 7).

RESULTADOS

En cuanto a las variables indirectas, la duración promedio del segundo (acc2) y tercer ciclo celular (acc3) de cada blastómera, así como la duración media de ambos ciclos celulares fue significativamente mayor en pre-embriónes 3PN-ICSI que en 2PN (Tabla 7).

Respecto a la sincronía blastomérica, no se observaron diferencias significativas de acuerdo al número de pronúcleos que presentaban los cigotos en el momento de la fecundación ni en las divisiones de 2 a 4 células (SD2) ni de 4 a 8 células (SD3) siendo 0.91 ± 0.21 (95CI: 0.842 – 0.98) y 0.83 ± 0.11 (95CI: 0.79 – 0.88), respectivamente.

Estudio morfocinético del desarrollo de los pre-embriónes 3PN-ICSI en función de la ploidía

Tras analizar la ploidía de los pre-embriónes 3PN-ICSI, los 3PN persistentemente triploides, se dividieron al estadio de 2 y 3 células (t2 y t3) significativamente más tarde que los pre-embriónes 2PN control; en cambio los 3PN-ICSI diploides lo hicieron en un tiempo intermedio (Tabla 8). En las siguientes divisiones celulares, que comprenden el desarrollo embrionario desde el estadio de 4 a 8 células (de t4 a t8), los embriónes persistentemente triploides siempre se dividieron más tarde que los diploides (2PN o 3PN-ICSI diploides), siendo los tiempos de división promedio los siguientes: t4: 38.6 ± 4.1 h; t5: 51.1 ± 6.0 h; t6: 53.7 ± 5.5 h; t7: 55.0 ± 6.3 h; t8: 57.5 ± 6.9 h.

TABLA 7. Variables directas e indirectas de los pre-embryones 3PN-ICSI y 2PN correctamente fecundados. Las variables directas son los tiempos en que ocurren las divisiones embrionarias (media \pm SD), a 2- (t2), 3-(t3), 4-(t4), 5-(t5), 6- (t6), 7- (t7) y 8-(t8) células, expresadas en horas post-ICSI. Las variables indirectas, expresadas en horas, indican la duración de la primera y segunda blastómera en dividirse en estadio de dos células (cc2a y cc2b); duración del tercer ciclo celular en cada blastómera (cc3a-cc3d) y media de la duración del segundo (acc2) y tercer ciclo celular (acc3). Se presenta también la sincronía blastomérica en la división en el segundo (SD2) y tercer (SD3) ciclo celular. En todas las variables, los valores entre paréntesis muestran el intervalo de confianza del 95%.

Tiempos (horas pos ICSI)	3PN-ICSI (n=23)	2PN (n=17)	Promedio
t2	29.9 \pm 3.8 (28.2 - 31.8) ^b	26.2 \pm 2.1 (25.2 - 27.3) ^a	54.8 \pm 9.6 (51.5 - 58.1)
t3	41.3 \pm 5.4 (38.6 - 44.0) ^b	38.0 \pm 2.7 (36.6 - 39.4) ^a	
t4	42.3 \pm 5.6 (39.6 - 45.0) ^b	38.6 \pm 2.9 (37.1 - 40.0) ^a	
t5	56.7 \pm 12.9 (50.3 - 63.1) ^a	52.8 \pm 3.6 (50.9 - 54.6) ^a	
t6	61.8 \pm 11.2 (56.0 - 67.2) ^b	53.8 \pm 3.7 (51.8 - 55.7) ^a	
t7	62.9 \pm 12.1 (56.2 - 69.6) ^b	54.6 \pm 3.9 (52.6 - 56.6) ^a	
t8	63.9 \pm 10.2 (58.0 - 69.7) ^b	57.0 \pm 5.3 (54.3 - 59.7) ^a	
cc2a	12.7 \pm 1.4 (11.9-13.4) ^b	11.8 \pm 0.9 (11.3-12.3) ^a	
cc2b	13.1 \pm 1.5 (12.4-13.9) ^b	12.3 \pm 1.2 (11.7-12.9) ^a	
acc2	13.0 \pm 1.4 (12.2-13.7) ^b	12.1 \pm 1.0 (11.5-12.6) ^a	
cc3a	19.8 \pm 6.6 (16.3-23.3) ^b	14.7 \pm 1.9 (13.7-15.6) ^a	
cc3b	22.8 \pm 7.1(19.1-26.4) ^b	15.5 \pm 2.0 (14.4-16.5) ^a	
cc3c	21.9 \pm 7.7(17.4-26.3) ^b	16.2 \pm 2.2 (15.1-17.4) ^a	
cc3d	22.0 \pm 5.5(18.5-25.5) ^b	18.3 \pm 3.8 (16.3-20.3) ^a	
acc3	19.6 \pm 4.1(16.8-22.4) ^b	16.0 \pm 2.2(14.9-17.2) ^a	
SD2	0.86 \pm 0.28 (0.73-1.00) ^a	0.96 \pm 0.04 (0.94-0.98) ^a	0.91 \pm 0.21 (0.842 - 0.98)
SD3	0.79 \pm 0.14 (0.70-0.88) ^a	0.87 \pm 0.07 (0.83-0.91) ^a	0.83 \pm 0.11 (0.79 - 0.88)

^{a,b}(p<0.05).

RESULTADOS

Respecto a las variables indirectas, los pre-embriones persistentemente triploides en estadio de 2 células, mostraron que la primera blastómera en dividirse tuvo un ciclo celular de mayor duración que los embriones 2PN control, mientras que los 3PN-ICSI diploides tuvieron una duración intermedia (cc2a; Tabla 8). Contrariamente a estas observaciones, la duración del ciclo celular de la segunda blastómera en dividirse (cc2b) fue comparable en todos los pre-embriones, independientemente de la ploidía, siendo en promedio de 12.5 ± 1.34 h (95IC: 12.1-13.0h).

El análisis de la duración del tercer ciclo celular en función de la ploidía, mostró que la primera, segunda y cuarta blastómera en dividirse tuvieron ciclos celulares significativamente más largos en los pre-embriones persistentemente triploides que en aquellos diploides (2PN y 3PN diploides; promedio cc3a: 14.6 ± 2.1 h; cc3b: 15.5 ± 2.0 h; cc3d: 18.2 ± 3.8 h). La duración del ciclo celular de la tercera blastómera en dividirse (cc3c) fue significativamente más largo en pre-embriones 3PN-ICSI persistentemente triploides que en 2PN control, mientras que cc3c fue intermedio en los pre-embriones 3PN-ICSI diploides (Tabla 8).

La duración media de segundo (acc2) y tercer (acc3) ciclo celular fue mayor en los pre-embriones 3PN-ICSI persistentemente triploides que en los diploides (2PN y 3PN-ICSI diploides; Tabla 8).

Respecto a la sincronía de ciclo celular (SD2 y SD3), no se observaron diferencias significativas entre los tipos pre-embionario estudiados,

RESULTADOS

siendo en promedio 0.91 ± 0.21 (95CI: 0.842 – 0.98) y 0.83 ± 0.11 (95CI: 0.79 – 0.88), respectivamente.

Predicción de la ploidía en pre-embryones 3PN-ICSI según los parámetros morfocinéticos

A fin de determinar el valor de las variables morfocinéticas descritas anteriormente como predictores de ploidía de los pre-embryones 3PN-ICSI, se desarrolló un análisis binomial de regresión logística, usando el método de pasos hacia adelante. Según este análisis, la variable con mayor poder predictivo es t_5 (tiempo en el que el embrión alcanzó el estadio de 5 células en horas post ICSI).

El modelo predictor de ploidía queda representado por la siguiente fórmula matemática:

$$\text{CONDICIÓN DIPLOIDE} = e^{[8.324 - 0.162 (t_5, h \text{ post-ICSI})]}$$

El valor estimado por el modelo (R^2 Nagelkerke) fue 0.531. El valor predictivo se obtiene introduciendo los valores de t_5 de los pre-embryones 3PN-ICSI y calculando la función exponencial.

El valor predictivo del modelo fue definido de acuerdo al área bajo la curva, AUC (IC95) proporcionado calculado mediante análisis ROC (Receiver Operating Characteristics). En este caso el valor de AUC fue 0.895 (95IC 0.762-1.000), el cual fue significativo ($p=0.003$).

RESULTADOS

TABLA 8. Media \pm SD de los tiempos de las siete primeras divisiones (t2-t8) en pre-embriones tripnucleares (3PN) y bipnucleares (2PN) de acuerdo a la ploidía (triploides o diploides). Todos los datos se presentan como media \pm SD (intervalo de confianza del 95%, 95CI) en horas post-ICSI. Se incluyen las variables cinéticas indirectas: duración del segundo (cc2) y tercer (cc3) ciclo celular, calculadas para blastómeras individuales (cc2a y cc2b; cc3a-d); la duración media del cc2 y cc3 (acc2 y acc3), y grados de sincronía de las divisiones blastoméricas en cc2 y cc3 (SD2 y SD3, respectivamente). Los valores con un superíndice diferente en una misma línea indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0.05$). Cuando existieron diferencias significativas entre grupos, se calculó el promedio de la variable estudiada.

Tiempos (horas post ICSI)	3PN-ICSI	3PN-ICSI	2PN	Promedio	
	Diploide (n=7)	Triploide (n=16)	Diploide (n=17)		
t2	28.5 \pm 3.6(24.7-32.4)ab	30.7 \pm 3.8(28.4-32.9)b	26.2 \pm 2.1(25.2-27.3)a	12.5 \pm 1.3 (12.1-13.0)	
t3	38.6 \pm 4.4(33.9-43.2)ab	42.6 \pm 5.5(39.1-46.1)b	38.0 \pm 2.7(36.6-39.4)a		
t4	38.6 \pm 7.0(31.3-46.0)a	44.0 \pm 4.2(41.4-46.5)b	38.6 \pm 2.9(37.1-40.0)a		
t5	46.9 \pm 8.5(39.0-54.8)a	63.0 \pm 11.3(55.4-70.6)b	52.8 \pm 3.6(50.9-54.6)a		
t6	53.7 \pm 8.8(45.5-61.8)a	66.6 \pm 9.7(60.1-73.2)b	53.8 \pm 3.7(51.8-55.7)a		
t7	56.0 \pm 10.4(46.4-65.6)a	69.0 \pm 10.6(60.1-77.8)b	54.6 \pm 3.9(52.6-56.6)a		
t8	58.7 \pm 10.2(49.3-68.1)a	69.0 \pm 7.6(62.0-76.1)b	57.0 \pm 5.3(54.3-59.7)a		
cc2a	11.9 \pm 0.8(10.9-12.9)ab	13.0 \pm 1.5(12.1-14.0)b	11.8 \pm 0.9(11.3-12.3)a		
cc2b	12.8 \pm 1.3 (11.5-14.2)a	13.3 \pm 1.6(12.3-14.3)a	12.3 \pm 1.1(11.7-12.9)a		
acc2	12.4 \pm 1.1 (11.1-13.7)a	13.2 \pm 1.6(12.3-14.2)b	12.1 \pm 1.0(11.5-12.6)a		
cc3a	14.4 \pm 3.2(10.4-18.4)a	22.3 \pm 6.4(18.0-26.5)b	14.7 \pm 1.9(13.7-15.6)a		
cc3b	18.6 \pm 4.7(13.6-23.5)a	25.1 \pm 7.4(20.1-30.0)b	15.5 \pm 2.0(14.4-16.5)a		
cc3c	18.3 \pm 5.2(12.8-23.7)ab	24.6 \pm 8.5(17.4-31.7)b	16.2 \pm 2.2(15.1-17.4)a		
cc3d	18.0 \pm 4.4(12.5-23.5)a	24.9 \pm 4.5(20.7-29.0)b	18.3 \pm 3.8(16.3-20.3)a		
acc3	16.5 \pm 4.3(9.6-23.5)a	21.3 \pm 3.1(18.5-24.2)b	16.0 \pm 2.2(14.9-17.2)a		
SD2	0.78 \pm 0.36(0.40-1.16)	0.90 \pm 0.25(0.75-1.05)	0.96 \pm 0.04(0.94-0.98)		0.91 \pm 0.21 (0.84-0.98)
SD3	0.77 \pm 0.15(0.58-0.96)	0.80 \pm 0.13(0.66-0.94)	0.87 \pm 0.07(0.83-0.91)		0.83 \pm 0.11 (0.79-0.88)

^{a,b}($p < 0.05$).

RESULTADOS

Si tras sustituir el valor t_5 para un pre-embrión 3PN-ICSI concreto en la fórmula matemática, el valor resultante fuere igual o mayor a 0.5, el pre-embrión estudiado será, con una probabilidad del 0.895, diploide.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Los embriones 3PN, independientemente del procedimiento de fecundación que le dio origen, muestran una capacidad de desarrollo a blastocisto similar (56% en promedio), capacidad comparable a aquélla para embriones de buen pronóstico (50%) derivados de cigotos correctamente fecundados, lo que sugiere que ni la ploidía ni la composición parental afecta a la capacidad de desarrollo pre-embionario in vitro.

Por lo que refiere a la capacidad de autocorrección a la diploidía, los pre-embiones tripronucleares procedentes de FIV muestran una menor capacidad de autocorrección que aquéllos procedentes de ICSI ya en estadio de células (12.5%: 2/16 vs. 52.0%: 13/25) y en estadio de blastocisto (25%: 1/4 vs. 50%: 10/20).

En el presente trabajo hemos observado que los pre-embiones 3PN-FIV, pese a desarrollarse hasta el estadio de blastocisto, el porcentaje de blastocistos triploides (75%; 1/3), y también aquéllos en estadios de células (18.7%; 3/16), fue significativamente mayor comparada a la incidencia de blastocistos diploides (25%; 1/4), y también en estadios tempranos de desarrollo (12.5%: 2/16). La baja frecuencia de pre-embiones diploides sugiere que en los 3PN de FIV no operan los mecanismos de autocorrección hacia la diploidía o si operan, son ineficientes.

La identificación puntual de un 3PN-FIV diploide podría explicarse bien por haberse producido la fecundación por parte de un espermatozoide diploide, lo cual sucede en 0.2-0.3% de los casos, en

DISCUSIÓN

particular en sémenes oligozoospermicos (Egozcue et al. 2000) o bien por un origen digínico. Esta posibilidad resultaría de un mecanismo de no disyunción de cromátidas hermanas en la segunda meiosis; el segundo corpúsculo polar estaría vacío de contenido cromosómico y por tanto, el cigoto sería digínico en origen; la primera posibilidad planteada, podría resultar en un cigoto triploide diándrico, pero que sólo presentaría un centriolo. Cualquiera que fuere el origen para este “anómalo” 3PN-FIV, lo cierto y verdad es que en él hubieran operado los mecanismos de corrección similares a los observados en los pre-embriones 3PN-ICSI. No obstante, y cualquiera que sea el origen de este embrión, cabría considerarlo como un artefacto en el grupo experimental y por tanto obviado en la discusión de los patrones descritos para estos embriones.

Por su parte, el hecho de que la mayoría de los pre-embriones 3PN-FIV en estadio de células poseen un mayor número de embriones caóticos (68.8%: 11/16), no observándose tal fórmula cromosómica en los estadios de blastocisto sugiere que tales embriones caóticos se bloquearían a lo largo del desarrollo. Efectivamente, asumiendo el origen dispérmico para estos pre-embriones, Palermo et al (1994) reportaron que la mayoría de pre-embriones dispérmicos detienen su desarrollo antes de alcanzar la diferenciación embrionaria (Palermo et al. 1994a), resultado del elevado número de errores de segregación derivados de la herencia centriolar doble y, por lo tanto, de la anómala conformación de los usos mitóticos.

DISCUSIÓN

Pese a la ausencia de mecanismos de autocorrección pre-embionaria a lo largo del desarrollo en los pre-embiones 3PN-FIV, la restauración de la condición diploide heteroparental es posible mediante la eliminación microquirúrgica del pronúcleo paterno junto una fracción del material pericentriolar adyacente al mismo (Gordon et al. 1989, Ivakhnenko et al. 2000, Kattera and Chen 2003b, Malter and Cohen 1989a, Rawlins et al. 1988a, Tang et al. 1994a). La técnica de epronucleación selectiva aquí presentada ha mostrado ser eficiente, permitiendo restablecer la condición bipronuclear en el 70.8% de los cigotos intervenidos, siendo además capaces de desarrollarse in vitro tan eficientemente como aquéllos control correctamente fecundados (41% vs. 50%). Mediante esta tecnología no sólo se corrigió la condición pronuclear sino que además, mediante las tecnologías de análisis genómico, constatamos el restablecimiento de la condición diploide heteroparental en todos los pre-embiones 3PN-FIV intervenidos.

La eliminación microquirúrgica del pronúcleo paterno supernumerario en los cigotos humanos tripronucleares fue reportada por primera vez en 1988 (Rawlins et al. 1988b). Estos autores lograron eliminar el pronúcleo supernumerario mediante micromanipulación, en presencia de citocalasina B, un agente inhibidor del citoesqueleto y, reportaron tasas de supervivencia muy bajas, no obteniéndose división de los cigotos. Usando la misma técnica el grupo de Gordon (Gordon et al. 1989) obtuvo el 100% de supervivencia tras la micromanipulación de cigotos tripronucleares, en presencia de agentes relajantes del citoesqueleto; resultados que

DISCUSIÓN

fueron confirmados por el grupo de Ivanenko en 2000 (Ivakhnenko et al. 2000).

La citocalasina B es un metabolito fúngico que inhibe la polimerización de la actina. El uso de relajantes del citoesqueleto se considera importante para reducir los daños mecánicos causados por la micromanipulación y porque optimiza las tasas de supervivencia (Malter and Cohen 1989b). Sin embargo, ha de tenerse en cuenta que la citocalasina es citotóxica, pudiendo causar fragmentación celular, retraso en el desarrollo, arresto temprano en el desarrollo e inestabilidad del huso. Dichos daños son dependientes de la concentración y tiempo de exposición, siendo seguro su uso en concentraciones de 7.5 µg/ml durante tiempos inferiores a 10 minutos; es por ello que en nuestro trabajo se ha ajustado el tiempo de exposición, reduciéndolo desde 30 minutos (Gordon et al. 1989, Rawlins et al. 1988b) hasta un máximo de 10 minutos de exposición (Escribá and García-Ximénez 2001). Haciendo dichos ajustes, los cigotos se epronuclearon usando agentes relajantes del citoesqueleto y obteniéndose pre-embriones que se dividieron y desarrollaron in vitro hasta el estadio de blastocisto (41%) con la misma eficiencia que aquellos cigotos correctamente fecundados, no manipulados (50%).

En la mayoría de protocolos de transferencia nuclear (Collas and Robl 1990, Smith and Wilmut 1989, Willadsen 1986) así como en aquéllos de epronucleación selectiva (Gordon et al. 1989, Rawlins et al. 1988a), aplicadas en diferentes especies de mamíferos, se incluye el

DISCUSIÓN

uso de agentes relajantes del citoesqueleto para mejorar el subsiguiente desarrollo de los pre-embriones.

Históricamente, los esfuerzos por eliminar el pronúcleo supernumerario sin el empleo de agentes relajantes del citoesqueleto no rindió eficacias de supervivencia satisfactorias; así Gordon et al. (1989) no logró que ningún cigoto sobreviviera y Malter y colaboradores (1989), sólo lograron un 36% de supervivencia (Malter and Cohen 1989a). Sin embargo, años más tarde, en 2003, el grupo de Kattera, reportó por primera vez el nacimiento de un bebe sano tras transferir un cigoto tripronuclear, microquirúrgicamente corregido en ausencia de agentes relajantes, obteniéndose un 100% de supervivencia y división pre-embrionaria. Por lo tanto, en humanos, la eliminación del pronúcleo paterno supernumerario ha sido desarrollada tanto con (Escribá and García-Ximénez 2001, Gordon et al. 1989, Ivakhnenko et al. 2000, Rawlins et al. 1988a) como sin (Gordon et al. 1989, Ivakhnenko et al. 2000, Malter and Cohen 1989a) la intervención de agentes relajantes del citoesqueleto, en asociación a técnicas de micromanipulación.

El efecto que la citocalasina B pudiera ejercer sobre el desarrollo pre-embrionario ulterior es mínimo siempre la concentración y los tiempos de exposición sean mínimos y adecuados. Efectivamente, en 1996, se reportó el primer nacimiento de ratones normales tras eliminar el pronúcleo paterno supernumerario de pre-embriones tripronucleares, en presencia de citocalasina B (Feng and Gordon 1996) y, en el presente trabajo, en humanos, hemos reportado el

DISCUSIÓN

desarrollo de los cigotos 3PN-FIV selectivamente epronucleados, en presencia de citocalasina B, hasta el estadio de blastocisto, rindiendo tasas satisfactorias: 45%.

La capacidad de desarrollo in vitro de los cigotos 3PN corregidos ha sido optimizada en los sucesivos trabajos reportados; en publicaciones anteriores se describe la ausencia de división en los pre-embriónes manipulados (Rawlins et al. 1988a); el desarrollo hasta el estadio de 8 células (Palermo et al. 1994b), y la limitada capacidad de los pre-embriónes para desarrollarse hasta los estadios de compactación (Gordon et al. 1989, Malter and Cohen 1989a). Esta limitada capacidad de desarrollo podría deberse al proceso técnico en sí, o a la anómala ploidía y herencia parental presente en el pre-embrión tras la epronucleación.

El éxito del proceso de epronucleación, es decir la restauración de la diploidía y heteroparentalidad en los pre-embriónes tripronucleares de FIV depende de la correcta identificación y eliminación del pronúcleo paterno supernumerario. La elección y eliminación correcta del pronúcleo paterno extra dará lugar a pre-embriónes diploides heteroparentales 46XX y 46XY (Kattera and Chen 2003b). De no eliminarse completamente el pronúcleo supernumerario, los pre-embriónes resultantes serán aneuploides (Gordon et al. 1989); mientras que la elección y eliminación de un pronúcleo erróneo, es decir la eliminación de un pronúcleo materno, daría lugar a pre-embriónes androgenotas diploides biparentales que pudieran derivar en molas hidatiformes completas con composición cromosómica

DISCUSIÓN

diploide androgenética 46XX o 46XY (Kajii and OHAMA 1977, Surti et al. 1979).

En ratones se siguen tres criterios a la hora de seleccionar el pronúcleo: (i) la observación de un remanente de la cola espermática asociada al pronúcleo, (ii) el tamaño ligeramente aumentado del pronúcleo masculino y (iii) la mayor distancia del pronúcleo paterno respecto al segundo corpúsculo polar (Malter and Cohen 1989b).

En humanos, los restos espermáticos en la proximidad del pronúcleo paterno no han sido observados. De hecho, tales remanentes fueron observados en únicamente un 1% de los cigotos humanos analizados (Wiker et al. 1990a). Por lo que se refiere al tamaño pronuclear, dicha variable no se considera un marcador discriminativo del origen parental, debido a propia dinámica de los pronúcleos (Gordon et al. 1989, Wiker et al. 1990a). Por lo tanto, la elección del pronúcleo paterno se ha basado en el presente trabajo según su disposición intracitoplasmática más distal al segundo corpúsculo polar, asumiendo que el pronúcleo materno es aquél situado en la posición más cercana al segundo corpúsculo polar (Kattera and Chen 2003b, Malter and Cohen 1989b, Palermo et al. 1994b, Tang et al. 1994b, Wiker et al. 1990b).

Otra variable también relevante en la selección del pronúcleo supernumerario es el poder distinguir entre un pronúcleo y un pseudo-pronúcleo, los cuales se caracterizan morfológicamente por la ausencia de nucléolos (Van Blerkom et al. 1987).

DISCUSIÓN

Además de la correcta elección del pronúcleo paterno supernumerario, el éxito de la epronucleación depende de la correcta eliminación del centrosoma extra asociado al pronúcleo paterno. El centrosoma es una estructura intracelular especializada, compuesta por dos centriolos dispuestos de forma perpendicular junto con el material pericentriolar. Su función radica en ser el centro organizador de microtúbulos y son esenciales para regular la singamia y la primera división mitótica tras la fecundación (Palermo et al. 1994a, Palermo et al. 1997). Los experimentos de epronucleación realizados en cigotos digínicos y dispérmicos y, el estudio citogenético posterior de los pre-embriones derivados demuestra la herencia paterna del centrosoma en humanos (Palermo et al. 1994c). Debido a la asociación del centrosoma con el pronúcleo paterno, el procedimiento de epronucleación lleva asociado la aspiración del pronúcleo paterno supernumerario y el citoplasma adyacente (aproximadamente 10 picolitros) para eliminar el centriolo y de este modo restaurar la herencia centrosómica (Kattera and Chen 2003a). En caso de no realizarse la eliminación centrosómica en el proceso de epronucleación, los husos *in vitro* posteriores serán multipolares, afectando de forma negativa al posterior desarrollo de los pre-embriones (Palermo et al. 1994c, Plachot and Crozet 1992b, Plachot and Mandelbaum 1990, Sathananthan et al. 1999) causado por una mala organización de los cromosomas y dando lugar a pre-embriones mosaicos o caóticos (Edwards et al. 1990, Lawler et al. 1991, Palermo et al. 1994a).

DISCUSIÓN

La corrección de los pre-embriónes 3PN-FIV humanos ha sido usado con fines reproductivos en un caso (Kattera and Chen 2003b), con resultados óptimos. Pero debido a que el origen parental del pronúcleo eliminado podría afectar severamente a los resultados reproductivos, los estudios de polimorfismos en el DNA para identificar la herencia heteroparental en los pre-embriónes resultantes, resulta obligada y recomendada antes de realizar la transferencia embrionaria.

En países donde la manipulación de pre-embriónes anormales no tiene otra finalidad que la investigación, como en España, se propone el uso de los pre-embriónes tripronucleares, descartados de los ciclos de fecundación in vitro, como una fuentes alternativa de pre-embriónes cromosómicamente normales para investigación en células madre, por ejemplo. Esta opción podría ser de especial interés en países donde el uso de pre-embriónes normales o la creación de pre-embriónes humanos para la investigación en células madre no está permitida.

En todo caso, la manipulación y uso de pre-embriónes corregidos cromosómicamente procedentes de cigotos tripronucleares depende más de las leyes gubernamentales que de las limitaciones técnicas o biológicas.

Los pre-embriónes 3PN-ICSI, digínicos en origen son capaces de autocorregirse hacia la diploidía y la heteroparentalidad ya en el estadio de células tal y como sugiere las tasa de diploides y triploides

DISCUSIÓN

observadas tanto en estadio de células (48.3% y 37.9%, respectivamente) como en blastocisto (50% y 45%, respectivamente). A diferencia de estos resultados, reportados en el “estudio 1”, recogido en este trabajo de tesis, el “estudio 3” mostró unas tasas de autocorrección ligeramente diferentes; donde un 23.3% fueron diploides y un 53.3% persistentemente triploides. Estas discrepancias podrían deberse bien al medio de cultivo utilizado durante los 3 primeros días de desarrollo (IVF vs. Cleavage Medium) o bien a las particularidades del cultivo per se; en el “estudio 1” experimento el sistema de cultivo fue en microgota, mientras que en el “estudio 3”, el sistema empleado fue time-lapse, donde además obtuvimos una mayor tasa de desarrollo a blastocisto (44.4% vs. 57.1%), tal y como ha sido previamente descrito incluso para aquellos pre-embiones que presentan aneuploidías (Lemmen et al. 2008, Meseguer et al. 2011, Wong et al. 2010).

El estudio morfocinético exhaustivo de los pre-embiones 3PN-ICSI nos permite describir por primera vez la morfocinética y los patrones de división de los pre-embiones 3PN de acuerdo a su ploidía. Observamos que la población de pre-embiones 3PN no es una población homogénea ni morfocinéticamente ni en cuanto a patrones de división exhibidos, lo cual nos da la oportunidad de predecir la capacidad de los pre-embiones 3PN de ser diploides analizando la variable t5.

Escrich et al. y Joergensen et al. (Escrich et al. 2013, Joergensen et al. 2014a) reportaron que, morfocinéticamente, los pre-embiones 3PN-

DISCUSIÓN

ICSI, pero no aquellos bipronucleares, muestran un retraso en todos los tiempos de división, excepto en el tiempo de división a 5 células, y que el segundo y tercer ciclo celular son significativamente más largos (cc2 y cc3) comparados con los pre-embriones 2PN, lo cual también ha sido observado en el presente trabajo. Sin embargo, y dado que en el primer estudio del presente trabajo, constatamos que los pre-embriones 3PN-ICSI no son una población homogénea, estando constituida por pre-embriones diploides y triploides, observamos que efectivamente la población de pre-embriones 3PN-ICSI no es tampoco una población homogénea para la mayoría de las variables morfocinéticas. En particular, i) los pre-embriones 3PN triploides siempre se divide más tarde que los embriones diploides, tanto los bipronucleares, como los tripronucleares después de la tercera división (t_4); ii) la media de la duración del tercer ciclo celular, pero no del segundo fue mayor en los pre-embriones triploides que los diploides (3PN y 2PN).

El retraso observado en las divisiones de los pre-embriones 3PN-ICSI triploides respecto a los 3PN-ICSI diploides y 2PN podría ser consecuencia de la variable duración de las fases que constituyen el primer ciclo celular. Sin embargo, este aspecto no ha sido estudiado, debido a que el cultivo en time lapse de los pre-embriones 3PN-ICSI empieza tras identificar los tres pronúcleos en el momento de evaluación de la fecundación y, por lo tanto, el primer evento registrado es la desaparición de los pronúcleos. Sin embargo, debido a que el tiempo de referencia (t_0) fue el momento en que se realizó el ICSI, para todos los pre-embriones estudiados, las discrepancias en

DISCUSIÓN

los tiempos de división cabe atribuirse a la ploidía de cada embrión. Aun así, en cualquier caso, el estudio de las variables indirectas nos ofrece una descripción morfocinética del desarrollo de los pre-embryones, independiente de las referencias temporales. Para poder discutir sobre las similitudes y discrepancias entre los pre-embryones diploides y triploides en relación a la duración de los ciclo celulares, consideramos los pre-embryones triploides como aneuploides completos. Nuestras observaciones se corresponden con las reportadas por Campbell et al. (Campbell et al. 2013b), quienes observaron que la duración del segundo ciclo celular es comparable entre pre-embryones euploides y aneuploides y también con aquellas observaciones remitidas por Basile et al. (), quienes observaron diferencias en la duración del tercer ciclo celular entre pre-embryones cromosómicamente normales y anormales.

A pesar de las diferencias descritas, los pre-embryones 3PN y 2PN son sincronos en cuanto a las divisiones blastoméricas durante el curso de los estadios de 2 a 4 células (s2) y desde el estadio de 4 a 8 células (s3), independientemente de la ploidía. Estos resultados contrastan con los observados por Joergensen et al. y Escrich et al. (Escrich et al. 2013, Joergensen et al. 2014b), quienes reportan que los pre-embryones 2PN resultaron más sincronos que los pre-embryones 3PN, y sugieren que los pre-embryones 3PN permanecen en estadio de 3 células durante más tiempo. La aparente discrepancia podría deberse a que la "sincronía" se define de diferente forma. Mientras que Meseguer et al. (Meseguer et al. 2011) definen S1 y S2 como el tiempo que permanecen en estadio celular de 3 y 5 células, en el

DISCUSIÓN

presente trabajo la descripción de sincronía se refiere a la ratio del segundo y tercer ciclos celulares. Por lo tanto, no cabe realizar dicha comparación. Por lo tanto, podemos concluir que en la población de pre-embriónes 3PN, los pre-embriónes diploides, pero no los triploides, son más similares morfocinéticamente a los pre-embriónes 2PN diploides y, que las diferencias morfocinéticas observadas entre pre-embriónes 3PN y 2PN se deberían interpretar de forma cautelosa debido a que éstas dependen de la proporción de pre-embriónes diploides y triploides que forman la población de pre-embriónes 3PN.

Por lo que respecta al estudio detallado del patrón de división de los pre-embriónes 3PN, monitorizados a lo largo del desarrollo bajo sistema time lapse y en un sistema de cultivo embrionario continuo hasta el día 3 de desarrollo, se observó que tanto los cigotos 3PN como los 2PN derivados de ICSI, se dividen en 2 células después de la primera citocinesis, como se había descrito previamente, con una metodología de cultivo similar (Escrich et al. 2013, Joergensen et al. 2014a)(Escrich et al. 2013, Joergensen et al. 2014a), o con el uso de condiciones de cultivo convencionales y evaluación discreta de los pre-embriónes (Grau et al. 2011, Staessen and Van Steirteghem 1997a)(Grau et al. 2011, Staessen and Van Steirteghem 1997a). Observamos que el 57% de los pre-embriónes diploides, y el 93.7% de los triploides 3PN-ICSI siguieron un patrón estándar de división desde el estadio de 2 células hasta 8 células, comparable con los pre-embriónes control.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se ha constatado que los pre-embriones tripronucleares, que cabría considerarlos como aneuploides puros (o trisómicos completos) son capaces de autocorregirse en estadios tempranos de desarrollo, ya antes de alcanzar el estadio de 8 células tal y como sugieren las tasas de diploides y triploides observadas en el estadio de células, porcentajes que se mantienen en correspondencia con aquéllos finalmente observadas en el estadio de blastocisto. En este sentido, estudios previos han descrito que los pre-embriones aneuploides presentan mecanismos propios mediante los cuales son capaces de autocorregirse y restaurar la diploidía (Barbash-Hazan et al. 2009, Munné et al. 2005).

Los resultados obtenidos y recogidos en el presente documento de tesis nos permiten proponer la existencia de mecanismos de autocorrección pre-embionaria que parecen operar eficientemente ya en el estadio de cigoto y también, aunque de forma ineficiente, en ulteriores estadios embrionarios, basados en alteraciones en el patrón de división o la duración del ciclo celular.

Si bien los 3PN-ICSI se asumen ser de origen digínico, el mecanismo de autocorrección podría estaría basado en la ausencia de duplicación del haplotipo materno en la fase S del primer ciclo celular, siendo el pronúcleo paterno el que orquestara el curso del ciclo celular (Escriba and García-Ximénez 2000a). Según esto, sugerimos que los pre-embriones 3PN-ICSI están dotados de un mecanismo de autocorrección del genoma que podría ser

DISCUSIÓN

desencadenado de forma temprana, ya en el estadio de cigoto (Figura 20. Modelo 1).

En el presente trabajo hemos observado desviaciones del desarrollo embrionario estándar, que fueron más frecuentes en los pre-embryones 3PN-ICSI diploides (42.8%) que en los 3PN triploides y los 2PN diploides, lo cual sugiere que dichas desviaciones en el patrón de división y la duración más corta del ciclo celular podría estar relacionadas con diferentes mecanismos de autocorrección que operarían en los pre-embryones 3PN-ICSI en los estadios de células.

La primera estrategia propuesta está basada en la alteración del patrón de división embrionario, por el cual una de las blastómeras se divide en tres células hijas del mismo tamaño (Figura 20. Modelo 2).

Aunque la división directa de los cigotos 3PN-ICSI en tres blastómeras podría teóricamente dar lugar a pre-embryones diploides uniformes, este patrón de división no fue observado en nuestro estudio y en cambio, sí fue observado y reportado por Joergensen et al. (Joergensen et al. 2014b). Estos autores observaron que el 25% de cigotos 3PN-ICSI se dividen directamente a 3 células; sin embargo no se proporciona información acerca de la simetría de las blastómeras resultantes ni tampoco acerca de la ulterior competencia en el desarrollo *in vitro* o *in vivo*; por lo tanto, no pudiéndose por tanto concluir que tales pre-embryones 3PN-ICSI en estadio de tres células son resultado de un patrón de división alterado o de un ciclo celular anormalmente corto.

DISCUSIÓN

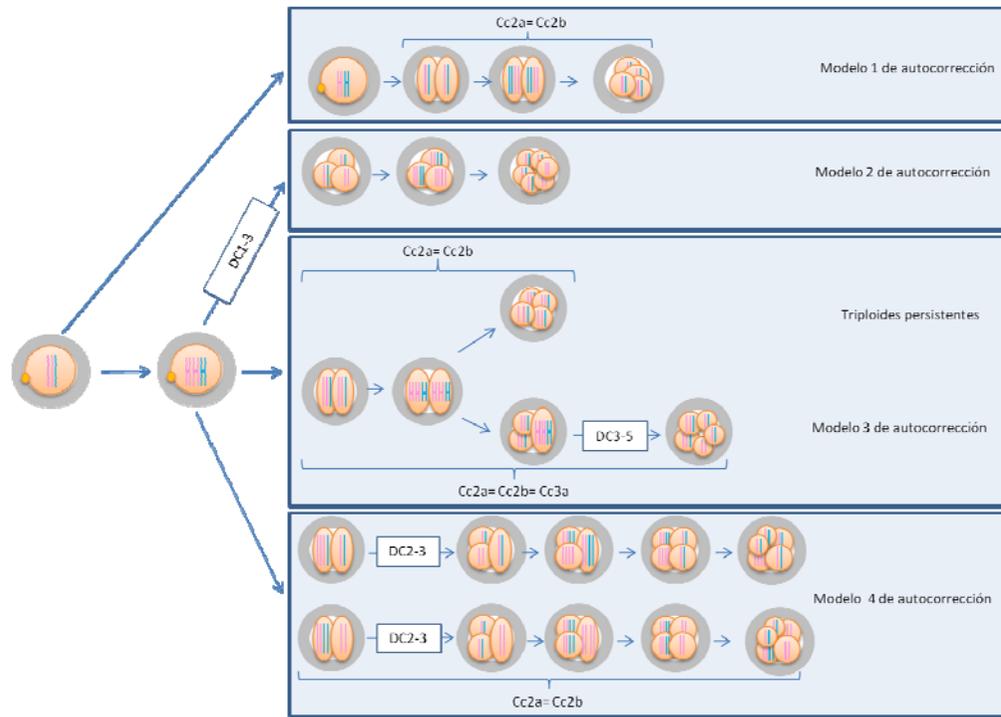


FIGURA 20. Imagen representativa de los cuatro posibles modelos de autocorrección de los pre-embriónes tripnucleares.

DISCUSIÓN

Alternativamente, en nuestra población de pre-embriónes 3PN-ICSI, se observó un patrón de división anómalo por el que una blastómera se divide en tres células hijas del mismo tamaño. La incidencia de este patrón de división alterado fue observado en un 28.6% de los pre-embriónes 3PN diploides, tanto en el estadio de 2 como en el de 3 células, no observándose alteración alguna en la duración del ciclo celular que se mantuvo constante. Este hecho, nunca anteriormente descrito, podría explicarse por la formación de un huso mitótico tripolar, resultado de la duplicación del centriolo paterno en la fase S del segundo ciclo celular, ya que los pre-embriónes 3PN-ICSI se generan por fecundación monospermica. (Figura 20. Modelo 3-B).

La segunda estrategia propuesta para restaurar la ploidía los pre-embriónes 3PN-ICSI en estadio de células se basa en la división cigótica en dos células, seguida por una división inmediata (o directa) de una de las blastómeras en dos células hijas simétricas en la siguiente hora. Tras esta inusual corta duración del ciclo celular, el embrión estará formado por tres células hijas asimétricas. Ésta divergencia del desarrollo estándar se observó en un 8.7% de nuestra población de pre-embriónes 3PN y podrían dar lugar a blastómeras diploides por obviarse la replicación del ADN y centriolos. Previamente, se ha descrito la incidencia de divisiones directas similares en estadio de 2 o 3 células, que ocurren en el 8.8-14% de pre-embriónes 2PN-ICSI (Escriba and García-Ximénez 2000b, Joergensen et al. 2014c), o más (Wong et al. 2010) , y en el 25% de pre-embriónes 3PN-ICSI (Joergensen et al. 2014c) (Figura 20. Modelo 4).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, la alteración del patrón de división embrionaria o, la alteración cinética del ciclo celular (acortamiento) podrían ser la clave para corregir los pre-embiones 3PN-ICSI al menos parcialmente, dando lugar a la diploidización de la mayoría de blastómeras que constituyen los pre-embiones 3PN. Así, cabe esperar la coexistencia de células con diferente ploidía en el mismo pre-embrión. Sin embargo, este elevado nivel de mosaicismo reinante, bien inducido por un desarrollo alterado o empeorado tras eliminar una célula diploide en la biopsia o por ambos, podría ser el responsable del menor potencial de desarrollo a blastocisto observado en los pre-embiones diploides 3PN-ICSI que mostraron cualquiera de las dos alteraciones descritas (patrón de división o cinética del ciclo celular), lo que nos lleva a reforzar la hipótesis de que la corrección de la ploidía en los pre-embiones 3PN-ICSI tiene lugar ya en el estadio de cigoto.

Esta afirmación queda reforzada por el hecho de que ninguno de los pre-embiones 2PN control que dieron lugar a recién nacidos vivos presentaron patrón de desarrollo alterado. Esto nos permite argumentar, que con independencia del número de pronúcleos en el momento de la fecundación y/o de la ploidía, los pre-embiones con un patrón de división alterado o con una duración del ciclo celular demasiado corta, presentan una disminución en la competencia del desarrollo para progresar al estadio de blastocisto. Efectivamente, Rubio et al. (Rubio et al. 2012) reportaron que solamente el 1.3% de pre-embiones 2PN que se dividían directamente de 2 a 3 células (ciclo celular inusualmente corto $cc2<5h$) implantan tras su

DISCUSIÓN

transferencia intrauterina; sin embargo, no disponemos de datos referentes a su potencial de desarrollo in vitro. Campbell (Campbell et al. 2013b) describió tanto en los blastocistos euploides (20%) como en los aneuploides (26%) el fenómeno de división directa en estadios tempranos del desarrollo; sin embargo, la posterior competencia del desarrollo in vivo no fue determinada ya que los embriones con un desarrollo detenido no fueron incluidos en el estudio. El grupo de Joergensen (Joergensen et al. 2014a) reportó que el 25% y el 8.8% de los pre-embriones 3PN-ICSI y 2PN-I, respectivamente, presentaron divisiones directas en el estadio de 2 o 3 células. Desafortunadamente, estos autores no hacen referencia a la competencia para alcanzar in vitro el estadio de blastocisto.

Finalmente, tras analizar la importancia del patrón de desarrollo y las variables morfocinéticas que hemos estudiado en el presente trabajo, podemos afirmar que la variable t5 es un predictor de la ploidía de los pre-embriones 3PN-ICSI. Esta variable ha mostrado tener una elevada fiabilidad, con un valor de confianza del 90%. Además, la variable t5 está directamente relacionada en dos variables morfocinéticas (t_2-t_5 y $cc_3=t_5-t_3$), que han sido descritas como descriptores discriminativos del comportamiento morfocinético de los pre-embriones humanos normales y anormales (Campbell et al. 2013a) además de establecerse como una de las principales variables de selección pre-embrionaria para la determinación de la competencia en el desarrollo en los pre-embriones 2PN tal y como se describe en el algoritmo reportado por Meseguer (Meseguer et al. 2011). Así, en nuestra población de pre-

DISCUSIÓN

embriones 3PN-ICSI, los pre-embriones diploides autocorregidos pueden identificarse morfocinéticamente por presentan una cinética similar a los pre-embriones correctamente fecundados y, su ploidía podría predecirse mediante el valor de la variable t_5 sin perturbar el curso de su desarrollo in vitro. Éstos hallazgos abren de nuevo la discusión acerca del uso potencial de los pre-embriones 3PN-ICSI tras el cultivo prolongado en sistema time-lapse, aunque el modelo matemático aquí propuesto debe ser validado empleando una base de datos de pre-embriones 3PN-ICSI diferente para de determinar la sensibilidad y especificidad del presente test diagnóstico.

Por lo tanto, los mecanismo de autocorrección de los pre-embriones 3PN hacia la diploidía a lo largo del desarrollo embrionario parecen ser operativos únicamente en los 3PN –ICSI, lo que indica que la composición parental más que la ploidía limita o compromete dicha capacidad de autocorrección. Siendo por tanto, recomendable aplicar estrategias microquirúrgicas de autocorrección cuando los tripronucleares tiene un posible origen diádrico.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- La composición parental no afecta a la capacidad de desarrollo a blastocisto en los pre-embriones triploides.
- Los blastocisto derivados de 3PN-FIV son una población homogénea en términos de ploidía, no así los derivados de ICSI.
- Los pre-embriones 3PN-ICSI, pero no los de FIV son capaces de autocorregirse a la diploidía y heteroparentalidad a lo largo del desarrollo pre-embionario in vitro.
- La composición parental más que la ploidía condiciona la capacidad de autocorrección pre-embionaria en los pre-embriones 3PN.
- En los pre-embriones 3PN-FIV la condición diploide y heteroparental puede restablecerse mediante epronucleación microquirúrgica del pronúcleo supernumerario.
- En los pre-embriones 3PN-ICSI la ploidía condiciona su morfocinética. Los 3PN-ICSI presentan una dinámica cinética comparable a los pre-embriones 2PN.
- T5 es una variable cinética predictiva de la ploidía de los pre-embriones 3PN-ICSICSI.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Aparicio B, Cruz M and Meseguer M. Is morphokinetic analysis the answer?. *Reproductive biomedicine online* 2013;**27**:654-663.

Arday M, Calderón G, Cuadros J, Figueroa M, Herrero R and Moreno J. II Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos 2008:.

Asch R, Simerly C, Ord T, Ord V and 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. *Mol Hum Reprod* 1995;**1**:239-248.

Balakier H. Tripronuclear human zygotes: the first cell cycle and subsequent development. *Hum Reprod* 1993;**8**:1892-1897.

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

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

Barak Y, Kogosowski A, Goldman S, Soffer Y, Gonen Y and Tesarik J. Pregnancy and birth after transfer of embryos that developed from single-nucleated zygotes obtained by injection of round spermatids into oocytes. *Fertil Steril* 1998;**70**:67-70.

Barbash-Hazan S, Frumkin T, Malcov M, Yaron Y, Cohen T, Azem F, Amit A and Ben-Yosef D. Preimplantation aneuploid embryos undergo self-correction in correlation with their developmental potential. *Fertil Steril* 2009;**92**:890-896.

Benadiva CA, Nulsen J, Siano L, Jennings J, Givargis HB and Maier D. Intracytoplasmic sperm injection overcomes previous fertilization failure with conventional in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1999;**72**:1041-1044.

BIBLIOGRAFÍA

Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M and Hickman CFL. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reproductive biomedicine online* 2013a;**26**:477-485.

Chen HL, Copperman AB, Grunfeld L, Sandler B, Bustillo M and Gordon JW. Failed fertilization in vitro: second day micromanipulation of oocytes versus reinsemination. *Fertil Steril* 1995;**63**:1337-1340.

Codina-Pascual M, Navarro J, Egozcue J and Benet J. A human tetraploid pachytene spermatocyte as the possible origin of diploid sperm: a case report. *Hum Reprod* 2006;**21**:1795-1797.

Cohen J, Levron J, Palermo G, Munné S, Adler A, Alikani M, Schattman G, Sultan K and Willadsen S. Atypical activation and fertilization patterns in humans. *Theriogenology* 1995;**43**:129-140.

Collas P and Robl JM. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. *Biol Reprod* 1990;**43**:877-884.

Cruz M, Garrido N, Herrero J, Pérez-Cano I, Muñoz M and Meseguer M. Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reproductive biomedicine online* 2012;**25**:371-381.

Dozortsev D, De Sutter P and Dhont M. Behaviour of spermatozoa in human oocytes displaying no or one pronucleus after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1994;**9**:2139-2144.

Dyban AP and Baranov VS. The cytogenetics of mammal development 1978:.

Edwards J, Yuncken C, Rushton D, Richards S and Mittwoch U. Three cases of triploidy in man. *Cytogenetic and Genome Research* 1967;**6**:81-104.

Edwards RG, Fishel S, Cohen J, Fehilly C, Purdy J, Slater J, Steptoe P and Webster J. Factors influencing the success of in vitro fertilization

BIBLIOGRAFÍA

for alleviating human infertility. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer* 1984;**1**:3-23.

Edwards RG and Brody SA. Principles and practice of assisted human reproduction. 1995a. Saunders Philadelphia.

Edwards R, Crow J, Dale S, Macnamee M, Hartshorne G and Brinsden P. Preimplantation diagnosis and recurrent hydatidiform mole. *The Lancet* 1990;**335**:1030-1031.

Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F and Egozcue J. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 2000;**6**:93-105.

Egozcue S, Blanco J, Vidal F and Egozcue J. Diploid sperm and the origin of triploidy. *Hum Reprod* 2002;**17**:5-7.

Eppig JJ, Schultz RM, O'Brien M and Chesnel F. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* 1994;**164**:1-9.

Escriba M and García-Ximénez F. Influence of sequence duration and number of electrical pulses upon rabbit oocyte activation and parthenogenetic in vitro development. *Anim Reprod Sci* 2000b;**59**:99-107.

Escribá M and García-Ximénez F. Reconstruction of the heteroparental diploid condition in rabbit zygotes by nuclear transfer. *Theriogenology* 2001;**55**:771-784.

Escrich L, Grau N, Meseguer M, Gamiz P, Vilorio T and Escriba M. Detailed kinetics and morphology analysis of human triplo-nucleated embryos: a comparison with correctly fertilized transferred embryos 2013;**28**:171-171.

Feenan K and Herbert M. Can 'abnormally' fertilized zygotes give rise to viable embryos?. *Human Fertility* 2006;**9**:157-169.

BIBLIOGRAFÍA

Feng YL and Gordon JW. Birth of normal mice after removal of the supernumerary male pronucleus from polyspermic zygotes. *Hum Reprod* 1996;**11**:341-344.

Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP and Herbert M. Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum Reprod* 2002;**17**:407-412.

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

Fryns J and Witters I. Fetal wastage: molecular basis. *eLS* 2003:.

Gilbert SF. *Biología del desarrollo*. 2005. Ed. Médica Panamericana.

Gordon JW, Grunfeld L, Garrisi GJ, Navot D and Laufer N. Successful microsurgical removal of a pronucleus from tripronuclear human zygotes. *Fertil Steril* 1989;**52**:367-372.

Goud P, Goud A, Van Oostveldt P, Van der Elst J and Dhont M. Fertilization abnormalities and pronucleus size asynchrony after intracytoplasmic sperm injection are related to oocyte postmaturity. *Fertil Steril* 1999;**72**:245-252.

Gras L and Trounson AO. Pregnancy and birth resulting from transfer of a blastocyst observed to have one pronucleus at the time of examination for fertilization. *Hum Reprod* 1999;**14**:1869-1871.

Grau N, Escrich L, Martín J, Rubio C, Pellicer A and Escribá M. Self-correction in tripronucleated human embryos. *Fertil Steril* 2011;**96**:951-956.

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

BIBLIOGRAFÍA

Hardarson T, Hanson C, Sjogren A and 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.

Hardy K, Martin KL, Leese HJ, Winston RM and Handyside AH. Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum Reprod* 1990;**5**:708-714.

Harper JC, Coonen E, Ramaekers FC, Delhanty JD, Handyside AH, Winston RM and Hopman AH. Identification of the sex of human preimplantation embryos in two hours using an improved spreading method and fluorescent in-situ hybridization (FISH) using directly labelled probes. *Hum Reprod* 1994;**9**:721-724.

Hasler JF. The current status of oocyte recovery, in vitro embryo production, and embryo transfer in domestic animals, with an emphasis on the bovine. *J Anim Sci* 1998;**76**:52-74.

Herrero J, Tejera A, Albert C, Vidal C, de los Santos, Maria José and Meseguer M. A time to look back: analysis of morphokinetic characteristics of human embryo development. *Fertil Steril* 2013;**100**:1602-1609. e4.

Hesters L, Prisant N, Fanchin R, Lozano DHM, Feyereisen E, Frydman R, Tachdjian G and Frydman N. Impact of early cleaved zygote morphology on embryo development and in vitro fertilization–embryo transfer outcome: a prospective study. *Fertil Steril* 2008;**89**:1677-1684.

Ho PC, Yeung WS, Chan YF, So WW and Chan ST. Factors affecting the incidence of polyploidy in a human in vitro fertilization program. *Int J Fertil Menopausal Stud* 1994;**39**:14-19.

Hoppe PC and Illmensee K. Full-term development after transplantation of parthenogenetic embryonic nuclei into fertilized mouse eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;**79**:1912-1916.

BIBLIOGRAFÍA

Itoi F, Asano Y, Shimizu M, Honnma H and Murata Y. Birth of nine normal healthy babies following transfer of blastocysts derived from human single-pronucleate zygotes. *J Assist Reprod Genet* 2015:1-7.

Ivakhnenko V, Cieslak J and Verlinsky Y. A microsurgical technique for enucleation of multipronuclear human zygotes. *Hum Reprod* 2000:15:911-916.

Jacobs P, Szulman A, Funkhouser J, Matsuura J and Wilson C. Human triploidy: relationship between parental origin of the additional haploid complement and development of partial hydatidiform mole. *Ann Hum Genet* 1982:46:223-231.

Jamieson ME, Coutts JR and Connor JM. The chromosome constitution of human preimplantation embryos fertilized in vitro. *Hum Reprod* 1994:9:709-715.

Joergensen MW, Agerholm I, Hindkjaer J, Bolund L, Sunde L, Ingerslev HJ and Kirkegaard K. Altered cleavage patterns in human tripronuclear embryos and their association to fertilization method: A time-lapse study. *J Assist Reprod Genet* 2014c:31:435-442.

Kajii T and OHAMA K. Androgenetic origin of hydatidiform mole. *Nature* 1977:268:633-634.

Kalousek DK. Pathogenesis of chromosomal mosaicism and its effect on early human development. *Am J Med Genet* 2000:91:39-45.

Kalousek DK, Langlois S, Barrett I, Yam I, Wilson DR, Howard-Peebles PN, Johnson MP and Giorgiutti E. Uniparental disomy for chromosome 16 in humans. *Am J Hum Genet* 1993:52:8-16.

Kattera S and Chen C. Normal birth after microsurgical enucleation of tripronuclear human zygotes: case report. *Hum Reprod* 2003a:18:1319-1322.

Kaufman MH. The experimental production of mammalian parthenogenetic embryos. *Methods in mammalian reproduction* 1978:21-47.

BIBLIOGRAFÍA

Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Grøndahl ML, Kesmodel US and Ingerslev HJ. A randomized clinical trial comparing embryo culture in a conventional incubator with a time-lapse incubator. *J Assist Reprod Genet* 2012;**29**:565-572.

Kola I, Trounson A, Dawson G and Rogers P. Tripronuclear human oocytes: altered cleavage patterns and subsequent karyotypic analysis of embryos. *Biol Reprod* 1987;**37**:395-401.

Kovacic B and Vlaisavljevic V. Configuration of maternal and paternal chromatin and pertaining microtubules in human oocytes failing to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. *Mol Reprod Dev* 2000;**55**:197-204.

Kubiak JZ. Mouse oocytes gradually develop the capacity for activation during the metaphase II arrest. *Dev Biol* 1989;**136**:537-545.

Lauritsen J, Bolund L, Friedrich U and Therkelsen A. Origin of triploidy in spontaneous abortuses. *Ann Hum Genet* 1979;**43**:1-5.

Lawler SD, Fisher RA and Dent J. A prospective genetic study of complete and partial hydatidiform moles. *Obstet Gynecol* 1991;**164**:1270-1277.

Ledbetter D, Zachary J, Simpson J, Golbus M, Pergament E, Jackson L, Mahoney M, Desnick R, Schulman J and Copeland K. Cytogenetic results from the US Collaborative Study on CVS. *Prenat Diagn* 1992;**12**:317-345.

Ledbetter DH and Engel E. Uniparental disomy in humans: development of an imprinting map and its implications for prenatal diagnosis. *Hum Mol Genet* 1995;**4 Spec No**:1757-1764.

Lemmen J, Agerholm I and Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reproductive biomedicine online* 2008;**17**:385-391.

BIBLIOGRAFÍA

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

Li M, DeUgarte CM, Surrey M, Danzer H, DeCherney A and Hill DL. Fluorescence in situ hybridization reanalysis of day-6 human blastocysts diagnosed with aneuploidy on day 3. *Fertil Steril* 2005;**84**:1395-1400.

Liu H, He Z, Mele CA, Veeck LL, Davis O and Rosenwaks Z. Expression of apoptosis-related genes in human oocytes and embryos. *J Assist Reprod Genet* 2000;**17**:521-533.

Lopes S, Jurisicova A and Casper RF. Gamete-specific DNA fragmentation in unfertilized human oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;**13**:703-708.

Los FJ, Van Opstal D, Van Den Berg C, Braat AP, Verhoef S, Swaay W, Van Den Ouweland, Ans MW and Halley DJ. Uniparental disomy with and without confined placental mosaicism: a model for trisomic zygote rescue. *Prenat Diagn* 1998;**18**:659-668.

Lundin K, Bergh C and Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod* 2001;**16**:2652-2657.

Lundin K, Sjogren A and Hamberger L. Reinsemination of one-day-old oocytes by use of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1996;**66**:118-121.

Macas E, Imthurn B, Rosselli M and Keller PJ. The chromosomal complements of multipronuclear human zygotes resulting from intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996;**11**:2496-2501.

Malter HE and Cohen J. Embryonic development after microsurgical repair of polyspermic human zygotes. *Fertil Steril* 1989a;**52**:373-380.

BIBLIOGRAFÍA

Manor D, Kol S, Lewit N, Lightman A, Stein D, Pillar M and Itskovitz-Eldor J. Undocumented embryos: do not trash them, FISH them. *Hum Reprod* 1996;**11**:2502-2506.

Markert CL. Parthenogenesis, homozygosity, and cloning in mammals. *J Hered* 1982;**73**:390-397.

McFadden DE, Jiang R, Langlois S and Robinson WP. Dispermy--origin of diandric triploidy: brief communication. *Hum Reprod* 2002;**17**:3037-3038.

McGrath J and Solter D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* 1983;**220**:1300-1302.

Mercader A, Garcia-Velasco JA, Escudero E, Remohí J, Pellicer A and Simón C. Clinical experience and perinatal outcome of blastocyst transfer after coculture of human embryos with human endometrial epithelial cells: a 5-year follow-up study. *Fertil Steril* 2003;**80**:1162-1168.

Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsoe KM, Ramsing NB and Remohi J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod* 2011;**26**:2658-2671.

Modlinski JA. Haploid mouse embryos obtained by microsurgical removal of one pronucleus. *J Embryol Exp Morphol* 1975a;**33**:897-905.

Morton PC, Yoder CS, Tucker MJ, Wright G, Brockman WD and Kort HI. Reinsemination by intracytoplasmic sperm injection of 1-day-old oocytes after complete conventional fertilization failure. *Fertil Steril* 1997;**68**:488-491.

Munné S, Tang Y, Grifo J and Cohen J. Origin of single pronucleated human zygotes. *J Assist Reprod Genet* 1993;**10**:276-279.

Munné S, Velilla E, Colls P, Bermudez MG, Vemuri MC, Steuerwald N, Garrisi J and Cohen J. Self-correction of chromosomally abnormal

BIBLIOGRAFÍA

embryos in culture and implications for stem cell production. *Fertil Steril* 2005;**84**:1328-1334.

Munne S, Grifo J, Cohen J and Weier HU. Chromosome abnormalities in human arrested preimplantation embryos: a multiple-probe FISH study. *Am J Hum Genet* 1994;**55**:150-159.

Nagy Z, Staessen C, Liu J, Joris H, Devroey P and Van Steirteghem A. Prospective, auto-controlled study on reinsemination of failed-fertilized oocytes by intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1995;**64**:1130-1135.

Nagy ZP, Janssenswillen C, Janssens R, De Vos A, Staessen C, Van de Velde H and Van Steirteghem AC. Timing of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in humans after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with testicular spermatozoa and after ICSI or in-vitro fertilization on sibling oocytes with ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod* 1998;**13**:1606-1612.

Otsu E, Sato A, Nagaki M, Araki Y and Utsunomiya T. Developmental potential and chromosomal constitution of embryos derived from larger single pronuclei of human zygotes used in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2004;**81**:723-724.

Palermo G, Joris H, Derde MP, Camus M, Devroey P and 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 G, Munne S and Cohen J. The human zygote inherits its mitotic potential from the male gamete. *Hum Reprod* 1994a;**9**:1220-1225.

Palermo GD, Alikani M, Bertoli M, Colombero LT, Moy F, Cohen J and Rosenwaks Z. Oolemma characteristics in relation to survival and fertilization patterns of oocytes treated by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996;**11**:172-176.

BIBLIOGRAFÍA

Palermo GD, Colombero LT and Rosenwaks Z. The human sperm centrosome is responsible for normal syngamy and early embryonic development. *Rev Reprod* 1997;**2**:19-27.

Patrat C, Serres C and Jouannet P. The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biology of the Cell* 2000;**92**:255-266.

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

Pehlivan T, Rubio C, Ruiz A, Navarro J, Remohí J, Pellicer A and Simón C. Embryonic chromosomal abnormalities obtained after rescue intracytoplasmic sperm injection of 1-day-old unfertilized oocytes. *J Assist Reprod Genet* 2004;**21**:55-57.

Peura T, Bosman A, Chami O, Jansen RP, Texlova K and Stojanov T. Karyotypically normal and abnormal human embryonic stem cell lines derived from PGD-analyzed embryos. *Cloning and stem cells* 2008;**10**:203-216.

Pieters M, Dumoulin J, Ignoul-Vanvuchelen R, Bras M, Evers J and Geraedts J. Triploidy after in vitro fertilization: cytogenetic analysis of human zygotes and embryos. *J Assist Reprod Genet* 1992a;**9**:68-76.

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

Plachot M and Mandelbaum J. Oocyte maturation, fertilization and embryonic growth in vitro. *Br Med Bull* 1990;**46**:675-694.

Porter R, Han T, Tucker MJ, Graham J, Liebermann J and Sills ES. Estimation of second polar body retention rate after conventional insemination and intracytoplasmic sperm injection: in vitro observations from more than 5000 human oocytes. *J Assist Reprod Genet* 2003;**20**:371-376.

BIBLIOGRAFÍA

Rawe VY, Olmedo SB, Nodar FN, Doncel GD, Acosta AA and Vitullo AD. Cytoskeletal organization defects and abortive activation in human oocytes after IVF and ICSI failure. *Mol Hum Reprod* 2000a;**6**:510-516.

Rawlins RG, Binor Z, Radwanska E and Dmowski WP. Microsurgical enucleation of tripronuclear human zygotes. *Fertil Steril* 1988a;**50**:266-272.

Reichman DE, Jackson KV and 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.

Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Romano S, Minasi MG, Ferrero S, Sapienza F, Baroni E and Greco E. Significance of morphological attributes of the early embryo. *Reproductive biomedicine online* 2005;**10**:669-681.

Rosenbusch BE. Mechanisms giving rise to triploid zygotes during assisted reproduction. *Fertil Steril* 2008;**90**:49-55.

Rosenbusch BE and Schneider M. Separation of a pronucleus by premature cytokinesis: a mechanism for immediate diploidization of tripronuclear oocytes?. *Fertil Steril* 2009;**92**:394. e5-394. e8.

Rosenbusch B, Schneider M and Sterzik K. The chromosomal constitution of multipronuclear zygotes resulting from in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1997;**12**:2257-2262.

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

Rubio C, Rodrigo L, Pérez-Cano I, Mercader A, Mateu E, Buendía P, Remohí J, Simón C and Pellicer A. FISH screening of aneuploidies in preimplantation embryos to improve IVF outcome. *Reproductive biomedicine online* 2005;**11**:497-506.

BIBLIOGRAFÍA

Rubio I, Galán A, Larreategui Z, Ayerdi F, Bellver J, Herrero J and Meseguer M. Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope. *Fertil Steril* 2014;**102**:1287-1294. e5.

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

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

Sakkas D, Shoukir Y, Chardonens D, Bianchi PG and 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.

Sakkas D, Urner F, Bianchi PG, Bizzaro D, Wagner I, Jaquenoud N, Manicardi G and Campana A. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996;**11**:837-843.

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

Sathananthan AH, Ratnam SS, Ng SC, Tarin JJ, Gianaroli L and Trounson A. The sperm centriole: its inheritance, replication and perpetuation in early human embryos. *Hum Reprod* 1996;**11**:345-356.

Sathananthan AH, Tarin JJ, Gianaroli L, Ng SC, Dharmawardena V, Magli MC, Fernando R and Trounson AO. Development of the human dispermic embryo. *Hum Reprod Update* 1999;**5**:553-560.

BIBLIOGRAFÍA

Schwartz P, Magerkurth C and Michelmann HW. Scanning electron microscopy of the zona pellucida of human oocytes during intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Hum Reprod* 1996;**11**:2693-2696.

Shoukir Y, Campana A, Farley T and 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.

Simerly C, Wu G, Zoran S, Ord T, Rawlins R, Jones J, Navara C, Gerrity M, Rinehart J and Binor Z. The paternal inheritance of the centrosome, the cell's microtubule-organizing center, in humans, and the implications for infertility. *Nat Med* 1995;**1**:47-52.

Smith LC and Wilmut I. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vivo of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol Reprod* 1989;**40**:1027-1035.

Staessen C, Janssenswillen C, Devroey P and 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 AC. The chromosomal constitution of embryos developing from abnormally fertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection and conventional in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1997a;**12**:321-327.

Sultan KM, Munne S, Palermo GD, Alikani M and Cohen J. Chromosomal status of uni-pronuclear human zygotes following in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1995;**10**:132-136.

Surani M, Barton S and Norris M. Nuclear transplantation in the mouse: heritable differences between parental genomes after activation of the embryonic genome. *Cell* 1986;**45**:127-136.

BIBLIOGRAFÍA

Surti U, Szulman A and O'Brien S. Complete (classic) hydatidiform mole with 46, XY karyotype of paternal origin. *Hum Genet* 1979;**51**:153-155.

Suss-Toby E, Gerecht-Nir S, Amit M, Manor D and Itskovitz-Eldor J. Derivation of a diploid human embryonic stem cell line from a mononuclear zygote. *Hum Reprod* 2004;**19**:670-675.

Tang Y, Munné S, Reing A, Schattman G, Grifo J and Cohen J. The parental origin of the distal pronucleus in dispermic human zygotes. *Zygote* 1994a;**2**:79-85.

Tarin JJ, Conaghan J, Winston RM and Handyside AH. Human embryo biopsy on the 2nd day after insemination for preimplantation diagnosis: removal of a quarter of embryo retards cleavage. *Fertil Steril* 1992;**58**:970-976.

Tarkowski A. An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenetic and Genome Research* 1966;**5**:394-400.

Tesarik J and Kopecny V. Development of human male pronucleus: ultrastructure and timing. *Gamete Res* 1989a;**24**:135-149.

Tesarik J and Mendoza C. In vitro fertilization by intracytoplasmic sperm injection. *Bioessays* 1999;**21**:791-801.

Tesarik J and Mendoza C. Spermatid injection into human oocytes. I. Laboratory techniques and special features of zygote development. *Hum Reprod* 1996;**11**:772-779.

Tesarik J and Testart J. Treatment of sperm-injected human oocytes with Ca²⁺ ionophore supports the development of Ca²⁺ oscillations. *Biol Reprod* 1994;**51**:385-391.

Trounson AO, Tarín JJ and Sathananthan H. Origin and ploidy of multipronuclear zygotes. *Reproduction, Fertility and Development* 1999;**11**:273-279.

BIBLIOGRAFÍA

Tsirigotis M, Nicholson N, Taranissi M, Bennett V, Pelekanos M and Craft I. Late intracytoplasmic sperm injection in unexpected failed fertilization in vitro: diagnostic or therapeutic?. *Fertil Steril* 1995;**63**:816-819.

Uchida IA and Freeman VC. Triploidy and chromosomes. *Obstet Gynecol* 1985;**151**:65-69.

Van Blerkom J, Bell H and Henry G. The occurrence, recognition and developmental fate of pseudo-multipronuclear eggs after in-vitro fertilization of human oocytes. *Hum Reprod* 1987;**2**:217-225.

Van Blerkom J, Davis PW and Lee J. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 1995;**10**:415-424.

Van der Heijden, Godfried W, Van den Berg, Ilse M, Baart EB, Derijck AA, Martini E and De Boer P. Parental origin of chromatin in human monopronuclear zygotes revealed by asymmetric histone methylation patterns, differs between IVF and ICSI. *Mol Reprod Dev* 2009;**76**:101-108.

Van Royen E, Mangelschots K, Vercruyssen M, De Neubourg D, Valkenburg M, Ryckaert G and Gerris J. Multinucleation in cleavage stage embryos. *Hum Reprod* 2003;**18**:1062-1069.

Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smits J, Wisanto A and Devroey P. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993;**8**:1061-1066.

Vejjerslev LO and Mikkelsen M. The European collaborative study on mosaicism in chorionic villus sampling: data from 1986 to 1987. *Prenat Diagn* 1989;**9**:575-588.

Vitullo AD and Ozil J. Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse oocyte activation. *Dev Biol* 1992;**151**:128-136.

BIBLIOGRAFÍA

Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES, Qi H and Williams Z. Egg–sperm interactions at fertilization in mammals. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2004;**115**:S57-S60.

Wiker S, Malter H, Wright G and Cohen J. Recognition of paternal pronuclei in human zygotes. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer* 1990a;**7**:33-37.

Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 1986;**320**:63-65.

Wolstenholme J. Confined placental mosaicism for trisomies 2, 3, 7, 8, 9, 16, and 22: their incidence, likely origins, and mechanisms for cell lineage compartmentalization. *Prenat Diagn* 1996;**16**:511-524.

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

Yie SM, Collins JA, Daya S, Hughes E, Sagle M and Younglai EV. Polyploidy and failed fertilization in in-vitro fertilization are related to patient's age and gamete quality. *Hum Reprod* 1996;**11**:614-617.

Yuzpe AA, Liu Z and Fluker MR. Rescue intracytoplasmic sperm injection (ICSI)—salvaging in vitro fertilization (IVF) cycles after total or near-total fertilization failure. *Fertil Steril* 2000;**73**:1115-1119.

Zenzes MT, de Geyter C, Bordt J, Schneider HP and Nieschlag E. Abnormalities of sperm chromosome condensation in the cytoplasm of immature human oocytes. *Hum Reprod* 1990;**5**:842-846.

