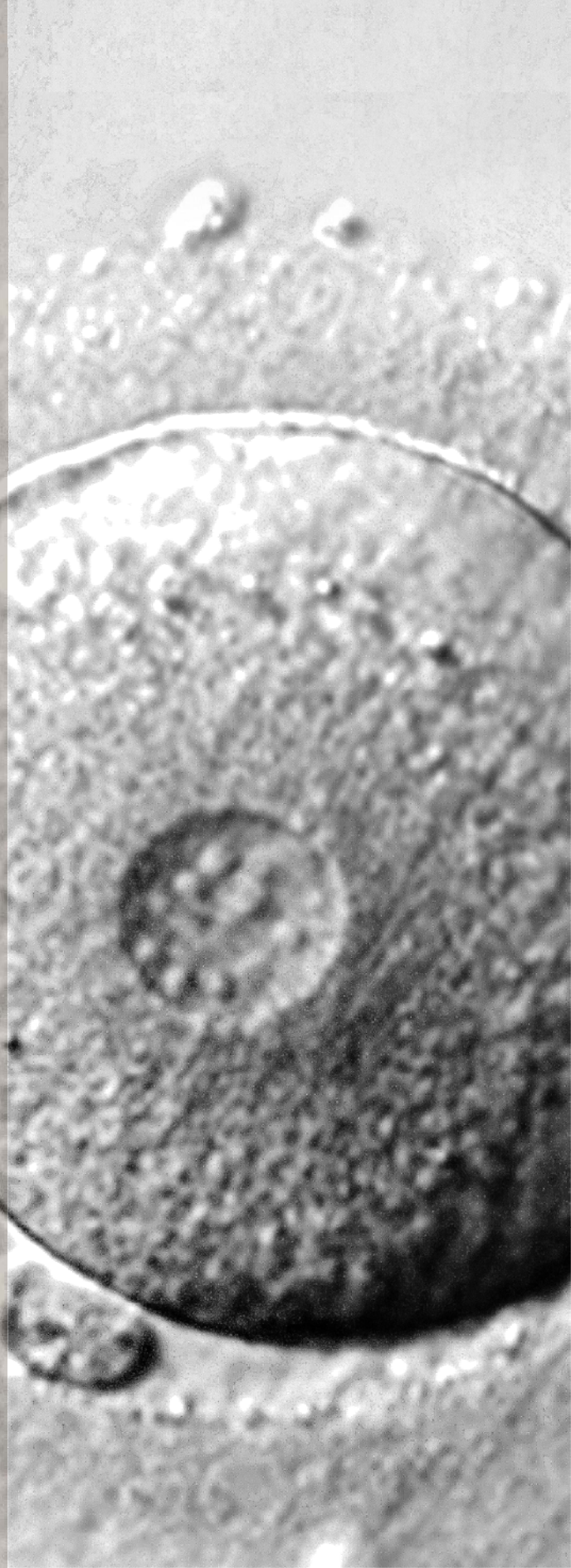


**Zigots
monopronucleats:
origen,
desenvolupament
i constitució
cromosòmica**

Sílvia Mateo Cuadros

Tesi Doctoral

Novembre 2017



DISCUSSION

Time-lapse monitoring has allowed to conduct a thorough study together with a detailed comparison of morphometric and kinetic parameters of the 1PN ICSI zygotes and their deriving embryos with the 2PN embryos.

The analysis of the embryo development showed an impaired *in vitro* development of embryos derived from the 1PN ICSI zygotes when compared to those derived from the 2PN zygotes. These data are in accordance with the high rate of chromosomal abnormalities previously reported in the 1PN-derived embryos that arrest their development in early stages (Sultan *et al.*, 1995; Staessen and Van Steirteghem, 1997; Lim *et al.*, 2000; Liao *et al.*, 2009; Van Der Heijden *et al.*, 2009; Mateo *et al.*, 2013, 2017) and the well-known deleterious effect of chromosome abnormalities in development.

The observation of a higher percentage of the 1PN deriving morulae showing partial compaction when compared to the 2PN-derived embryos may also reflect an abnormal chromosomal content as this phenomenon has been reported as a strategy to exclude aneuploid cells from the embryo (Lagalla *et al.*, 2017).

Furthermore, the highest percentage of the embryo arrest coincides with the stages of the embryo genome activation and it could be hypothesized that the arrest could be also be due to abnormalities in the embryo genome activation. This could be the result of the oocyte factors, that also originated the formation of a single pronucleus, or the genetic constitution of the embryos that interfere with the genome activation process (Jukam *et al.*, 2017).

The number of blastocysts obtained from the 1PN ICSI zygotes was higher in this work (28.9%) than previously reported (14.8-3.4% Mateo *et al.*, 2013, 2017; 10.7% Itoi *et al.*, 2015; 13.8% Bradley *et al.*, 2017). We consider that this could be due to the characteristics of the population studied, as in some of the aforementioned reports the embryos were derived from patients enrolled in cycles of preimplantation screening for aneuploidies (PGS), while there was no indication for PGS in our patients. Despite this fact, it needs to be mentioned that the morphological quality of the 1PN-derived blastocysts was noted to be significantly worse than in the control group.

The use of the time-lapse system has also allowed to observe abnormalities in the cleavage, showing that embryos from the monopronucleated ICSI zygotes

performed irregular divisions more often than the 2PN-derived embryos. This abnormal cleavage behaviour could be the consequence of an irregular mitotic spindle which would lead to chaotic chromosomal content. This mechanism was already proposed after the observation of 70.4% of chaotic embryos derived from 1PN zygotes (Mateo *et al.*, 2013).

The larger pronucleus diameter and area observed in some of the monopronucleated zygotes when compared to the 2PN zygotes is in accordance with previous reports (Otsu *et al.*, 2004; Boada *et al.*, 2012; Mateo *et al.*, 2013). It has also been observed that the 1PN-derived embryos that reach the blastocyst stage were those with largest PN diameter and area. This fact could be interpreted to be the result of a diploid genome englobed in a single pronucleus and has also been proposed by other authors (Levron *et al.*, 1995; Otsu *et al.*, 2004; Van Der Heijden *et al.*, 2009; Kai *et al.*, 2015).

The kinetic analysis of the 1PN ICSI zygotes showed differences when compared with the 2PN ICSI group. Differences were also shown between the two subgroups of the 1PN zygotes that formed a blastocyst and those that arrested their development before. The timing for the second polar body appearance was equally similar in all groups and was in line with the previously published studies (Azzarello *et al.*, 2012; Aguilar *et al.*, 2014). This means that the oocyte activation of the oocyte induced during ICSI was similar in the 1PN and the 2PN zygotes. The pronuclei from the 1PN zygotes had a delayed appearance and an earlier fading compared to the pronuclei from the 2PN zygotes, resulting in a shorter time of visible pronuclei in the 1PN zygotes. The delayed appearance of the pronuclei could be the consequence of anomalies produced during the fertilization process. The earlier fading, on the other hand, could be the consequence of the absence of juxtaposition that has to occur in the 2PN zygotes. The time for syngamy was elongated in all 1PN zygotes probably due to the difficulty to organize the metaphase plate.

A different behaviour in developmental kinetics was observed between the two subgroups of the 1PN-derived embryos, showing a slower developmental rate those that did not reach the blastocyst stage. The delayed development could be related to the chromosomal content of these 1PN-derived embryos, which usually derive to mosaic/aneuploid/chaotic embryos (Mateo *et al.*, 2013). Furthermore, the parental origin of the pronucleus could also play an important role as it has been reported that delayed cleavage occurs in the human parthenotes (Escribá *et al.*, 2016). The monopronucleated zygotes that reached

the blastocyst stage showed similar times for cleavage, from t2 to t9, to the 2PN-derived blastocysts which might suggest a similar origin involving a biparental chromosomal constitution. Indeed, the 1PN-derived blastocysts showed t4 and t8 values in the optimal range of the algorithm proposed by our group (Carrasco *et al.*, 2017), which supports the idea of the better prognosis for those 1PN zygotes that reach the blastocyst stage. Results from PGS studies in the 1PN-derived blastocysts showed a euploid rate of 56.2% (Bradley *et al.*, 2017) suggesting that the 1PN-derived embryos that reach the blastocyst stage are more likely to be chromosomally normal than those that arrest their development before. However, a possible gynogenetic or androgenetic origin cannot be ruled out and need to be taken into consideration when the chromosomal content of these embryos is evaluated (Azevedo *et al.*, 2014; Bradley *et al.*, 2017).

Different times of initiation of compaction and posterior events were observed between blastocysts obtained from the 1PN and the 2PN groups due to a delayed time for compaction and longer time of compaction duration in those coming from the 1PN zygotes, while the blastulation timing was similar. The delay in the compaction in the 1PN ICSI-derived embryos could be due to an abnormal chromosomal content, as embryos carrying aneuploidies showed a delay in the initiation of compaction with respect to euploid embryos (Campbell *et al.*, 2013a), but also to other mechanisms involved in the embryonic genome activation and the cellular differentiation.

The observation of the blastocyst collapses was more frequent among the 1PN-derived blastocysts than the 2PN-derived blastocysts, which could be associated with the low implantation rate (Marcos *et al.*, 2015) observed after the transferring of chromosomally normal 1PN-ICSI derived blastocysts (Bradley *et al.*, 2017).

In summary, it was observed that the 1PN ICSI zygotes have different developmental capacity as well as morphometric and kinetic behaviour from the 2PN ICSI zygotes. Of all the 1PN-derived embryos, only those that reached the blastocyst stage had similar morphokinetic development to the 2PN-derived blastocysts. At the same time, however, they still displayed certain altered parameters such as the larger size of the pronucleus, the shorter time of visible pronucleus and the longer time of syngamy which were all characteristics of the 1PN zygotes.

	STUDY 1PN GROUP			CONTROL 2PN GROUP				
median (range)	TOTAL 1PN	ARRESTED	BLASTOCYSTS	TOTAL	BLASTOCYSTS	<i>p</i> <i>val.</i> [§]	<i>p</i> <i>val.</i> [‡]	<i>p</i> <i>val.</i> [¶]
t2PB (hpi)	3.95 (1.46-12.70)	3.86 (1.46-10.60)	4.25 (1.76-12.70)	3.70 (1.93-8.60)	3.75 (1.93-8.60)	.091	.517	.091
tPNa (hpi)	8.79 [§] (3.45-26.06)	8.87 (3.45-26.06)	8.65 [¶] (4.92-20.21)	7.80 [§] (3.90-14.00)	7.70 [¶] (5.40-12.90)	.000	.338	.011
tPNf (hpi)	22.90 [§] (16.65-65.74)	23.27 [‡] (16.65-65.74)	22.00 ^{¶*} (17.29-29.47)	24.10 [§] (18.10-61.30)	23.40 [¶] (18.10-31.20)	.008	.016	.003
t2 (hpi)	27.36 (19.20-66.29)	27.61 [‡] (19.20-66.29)	26.50 [‡] (19.80-45.97)	26.92 (20.15-66.40)	26.10 (20.15-44.80)	.123	.008	.928
t3 (hpi)	37.61 (21.70-84.60)	38.47 (22.91-84.60)	36.83 (21.70-47.47)	37.10 (24.82-66.40)	37.09 (25.50-45.67)	.168	.052	.591
t4 (hpi)	41.42 [§] (26.49-112.90)	43.57 [‡] (27.05-112.90)	39.67 [‡] (26.49-60.48)	39.51 [§] (25.50-66.40)	38.42 (25.50-53.23)	.004	.019	.282
t5 (hpi)	48.42 (27.05-75.46)	49.76 [‡] (27.05-75.46)	46.86 [‡] (35.16-70.94)	49.61 (29.86-71.57)	49.59 (31.28-68.80)	.992	.040	.114
t6 (hpi)	53.04 (32.00-108.55)	54.24 (32.00-108.55)	51.37 (36.70-74.08)	52.04 (36.37-101.66)	51.75 (36.37-72.92)	.492	.126	.798
t7 (hpi)	57.38 (36.70-108.55)	60.29 [‡] (43.75-108.55)	55.18 [‡] (36.70-81.43)	55.63 (39.56-93.34)	54.10 (39.56-89.72)	.091	.021	.677
t8 (hpi)	61.92 (42.70-95.80)	63.35 (43.75-95.80)	61.25 (42.70-84.43)	57.95 (43.53-137.59)	57.05 (43.53-110.68)	.193	.057	.566
t9 (hpi)	68.78 (45.99-105.26)	73.00 (45.99-105.23)	68.48 (47.98-105.26)	67.40 (54.60-84.30)	67.50 (58.50-75.90)	.385	.276	.957
tSC (hpi)	96.50 [§] (63.60-129.10)	100.78 [‡] (81.00-129.10)	94.43 ^{¶*} (63.60-111.11)	84.80 [§] (50.70-114.20)	84.40 [¶] (50.70-114.20)	.000	.006	.000
tM (hpi)	118.40 [§] (88.83-150.40)	125.05 [‡] (103.60-150.4)	114.30 ^{¶*} (88.83-138.29)	100.35 [§] (81.70-139.40)	99.60 [¶] (81.70-139.40)	.000	.003	.000
tSB (hpi)	116.57 [§] (89.58-140.47)		116.57 [¶] (89.58-140.47)	101.40 [§] (82.40-141.90)	101.40 [¶] (82.40-141.90)	.000		.000
tB (hpi)	128.10 [§] (96.59-145.03)		128.10 [¶] (96.59-145.03)	110.80 [§] (85.40-155.60)	110.80 [¶] (85.40-155.60)	.000		.000
tEB (hpi)	122.40 [§] (98.34-139.00)		122.40 [¶] (98.34-139.00)	111.40 [§] (86.40-157.40)	111.40 [¶] (86.40-157.40)	.000		.000
tHB (hpi)	135.60 [§] (119.23-140.6)		135.60 [¶] (119.23-140.6)	116.75 [§] (101.20-155.9)	116.75 [¶] (101.20-155.9)	.002		.002

vPN (h)	13.76 [§] (5.25-50.74)	14.335 (5.25-50.74)	13.10 [*] (7.00-20.40)	16.20 [§] (10.00-52.10)	15.80 [*] (10.00-24.00)	.000	.081	.000
mtvPN (hpi)	16.18 (10.33-40.37)	16.38 [†] (10.33-40.37)	15.92 [†] (11.29-24.84)	16.00 (12.00-35.25)	15.75 (12.00-20.50)	.831	.021	.311
Syngamy (h)	3.53 [§] (0.34-34.05)	3.75 (0.34-34.05)	3.07 [‡] (2.23-16.50)	2.72 [§] (0.54-34.00)	2.62 [‡] (0.54-13.60)	.000	.148	.000
ECC1 (h)	22.86 (15.48-57.57)	23.67 [†] (16.35-57.57)	21.28 [†] (15.48-33.27)	23.04 (14.49-63.70)	22.25 (14.49-41.80)	.502	.001	.217
ECC2 (h)	13.80 [§] (0.00-85.34)	13.97 (0.00-85.34)	13.00 (4.00-29.06)	12.50 [§] (0.00-28.84)	12.25 (0.00-27.35)	.003	.346	.094
cc2 (h)	11.26 (0.00-58.17)	11.04 (0.00-58.17)	11.34 (0.00-16.32)	11.25 (0.00-15.51)	11.26 (0.00-15.01)	.930	.938	.926
ECC3 (h)	22.04 (6.00-53.27)	25.35 [†] (11.34-53.27)	19.42 [†] (6.00-38.16)	18.06 (11.01-104.22)	17.14 (11.01-68.61)	.363	.038	.871
cc3 (h)	12.26 (0.00-30.78)	12.76 (0.00-30.02)	12.24 (0.71-30.78)	12.88 (0.00-34.68)	12.88 (0.00-29.35)	.201	.351	.085
s2 (h)	3.25 [§] (0.00-69.80)	4.01 (0.00-69.80)	2.50 [‡] (0.00-28.03)	1.00 [§] (0.00-22.01)	0.80 [‡] (0.00-16.01)	.000	.149	.003
s3 (h)	14.71 [§] (1.00-42.29)	16.83 [†] (1.67-42.29)	13.51 [†] (1.00-30.75)	8.60 [§] (0.25-103.47)	6.65 (0.25-51.20)	.003	.020	.076
dcom (h)	21.30 [§] (3.50-51.80)	21.19 (3.50-49.70)	21.30 [*] (7.70-51.80)	15.60 [§] (4.00-39.50)	15.20 [*] (4.00-39.50)	.000	.628	.001
dB (h)	10.56 (3.25-23.70)		10.56 (3.25-23.70)	10.20 (1.30-28.30)	10.20 (1.30-28.30)	.615		.615
tBcol (h)			132.70 [‡] (117.10-170.3)		118.55 [‡] (108.50-160.6)			.008
tBre-exp (h)			135.45 [‡] (121.90-172.7)		121.20 [‡] (111.80-164.1)			.013
Ncol (mean±SD)			2.00±1.05 [‡]		1.17±0.51 [‡]			.001
dcol (h)			2.50 (1.30-5.30)		2.50 (1.20-3.80)			.974

Supplemental Table I. The results of the kinetic analysis of the 1PN and the 2PN ICSI zygotes. [§]1PN vs 2PN total groups. [‡]Arrested 1PN vs 1PN blastocyst groups. [¥]1PN blastocyst vs 2PN blastocyst groups.

REFERENCES

- Aguilar J, Motato Y, Escribá MJ, Ojeda M, Muñoz E, Meseguer M. The human first cell cycle: Impact on implantation. *Reprod Biomed Online* 2014;**28**:475–484.
- ASEBIR. *Cuadernos de embriología clínica. Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos. 3ª Edición*. 2015;
- Athayde Wirka K, Chen AA, Conaghan J, Ivani K, Gvakharia M, Behr B, Suraj V, Tan L, Shen S. Atypical embryo phenotypes identified by time-lapse microscopy: High prevalence and association with embryo development. *Fertil Steril* 2014;**101**:1637–1648.e5. Elsevier Inc.
- Azevedo a. R, Pinho MJ, Silva J, Sa R, Thorsteinsdottir S, Barros a., Sousa M. Molecular Cytogenetics of Human Single Pronucleated Zygotes. *Reprod Sci* 2014;**21**:1472–1482.
- Azzarello A, Hoest T, Mikkelsen AL. The impact of pronuclei morphology and dynamicity on live birth outcome after time-lapse culture. *Hum Reprod* 2012;**27**:2649–2657.
- Boada M, Gil Y, Mateo S, Jorda L, Barri PN, Veiga A. Morphokinetic differences on embryo development after normal or abnormal fertilization. *ASRM* 2012;, p. P-163.
- Bradley CK, Traversa M, Hobson N, Gee AJ, McArthur SJ. Clinical use of monopronucleated zygotes following blastocyst culture and preimplantation genetic screening, including verification of biparental chromosome inheritance. *Reprod Biomed Online* 2017;**34**:567–574. Elsevier.
- Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Hickman CFL. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reprod Biomed Online* 2013a;**26**:477–485. Reproductive Healthcare Ltd.
- Carrasco B, Arroyo G, Gil Y, Gómez MJ, Rodríguez I, Barri PN, Veiga A. Selecting embryos with the highest implantation potential using data mining and decision tree based on classical embryo morphology and morphokinetics. *J Assist Reprod Genet* 2017;**34**:983–990. Journal of Assisted Reproduction and Genetics.

- Ciray HN, Campbell A, Agerholm IE, Aguilar J, Chamayou S, Esbert M, Sayed S. Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group. *Hum Reprod* 2014;**29**:2650–2660.
- Cruz M, Garrido N, Herrero J, Pérez-Cano I, Muñoz M, Meseguer M. Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod Biomed Online* 2012;**25**:371–381.
- Escribá M-J, Escrich L, Galiana Y, Grau N, Galán A, Pellicer A. Kinetics of the early development of uniparental human haploid embryos. *Fertil Steril* 2016;**105**:1360–1368.e1. Elsevier.
- Grau N, Escrich L, Galiana Y, Meseguer M, García-Herrero S, Remohí J, Escribá M-J. Morphokinetics as a predictor of self-correction to diploidy in tripronucleated intracytoplasmic sperm injection derived human embryos. *Fertil Steril* 2015;**104**:728–735. Elsevier.
- Heijden GW Van Der, Berg IM Van Den, Baart EB, Derijck AAHA, Martini E, Boer P De. 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.
- Igashira C, Otsuki J, Furuhashi K, Katada Y, Sumimoto T, Kishi K, Matsuura M, Mukai M, Sumi C, Tsuji Y, *et al.* The difference in size between single pronuclei after ICSI and after IVF. *ASMR* 2016;; p. O-42.
- Itoi F, Asano Y, Shimizu M, Honnma H, Murata Y. Birth of nine normal healthy babies following transfer of blastocysts derived from human single-pronucleate zygotes. *J Assist Reprod Genet* 2015;**32**:1401–1407.
- Iwata K, Mio Y. Observation of human embryonic behavior in vitro by high-resolution time-lapse cinematography. *Reprod Med Biol* 2016;**15**:145–154.
- Joergensen MW, Agerholm I, Hindkjaer J, Bolund L, Sunde L, Ingerslev HJ, Kirkegaard K. Altered cleavage patterns in human tripronuclear embryos and their association to fertilization method: A time-lapse study. *J Assist Reprod Genet* 2014;**31**:435–442. Springer US: Boston.
- Jukam D, Shariati SAM, Skotheim JM. Zygotic Genome Activation in Vertebrates. *Dev Cell* 2017;**42**:316–332. Elsevier.
- Kai Y, Iwata K, Iba Y, Mio Y. Diagnosis of abnormal human fertilization status based on pronuclear origin and/or centrosome number. *J Assist Reprod*

- Genet* 2015;**32**:1589–1595.
- Lagalla C, Tarozzi N, Sciajno R, Wells D, Santo M Di, Nadalini M, Distratis V, Borini A. Embryos with morphokinetic abnormalities may develop into euploid blastocysts. *Reprod Biomed Online* 2017;**34**:137–146. Elsevier.
- Levron J, Munné S, Willadsen S, Rosenwaks Z, Cohen J. Male and female genomes associated in a single pronucleus in human zygotes. *Biol Reprod* 1995;**52**:653–657.
- Liao H, Zhang S, Cheng D, Ouyang Q, Lin G, Gu Y, Lu C, Gong F, Lu G. Cytogenetic analysis of human embryos and embryonic stem cells derived from monopronuclear zygotes. *J Assist Reprod Genet* 2009;**26**:583–589.
- Lim a. ST, Goh VHH, Su CL, Yu SL. Microscopic assessment of pronuclear embryos is not definitive. *Hum Genet* 2000;**107**:62–68.
- Liu Y, Chapple V, Roberts P, Ali J, Matson P. Time-lapse videography of human oocytes following intracytoplasmic sperm injection: Events up to the first cleavage division. *Reprod Biol* 2014a;**14**:249–256.
- Liu Y, Chapple V, Roberts P, Matson P. Prevalence, consequence, and significance of reverse cleavage by human embryos viewed with the use of the Embryoscope time-lapse video system. *Fertil Steril* 2014b;**102**:1295–1300.e2. Elsevier.
- Marcos J, Perez-Albala S, Mifsud A, Molla M, Landeras J, Meseguer M. Collapse of blastocysts is strongly related to lower implantation success : a time-lapse study. *Hum Reprod* 2015;**30**:2501–2508.
- Martinez F, Rodriguez I, Devesa M, Buxaderas R, Gómez MJ, Coroleu B. Should progesterone on the human chorionic gonadotropin day still be measured? *Fertil Steril* 2016;**105**:86–92. Elsevier.
- Mateo S, Parriego M, Boada M, Vidal F, Coroleu B, Veiga A. In vitro development and chromosome constitution of embryos derived from monopronucleated zygotes after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2013;**99**:897–902.
- Mateo S, Vidal F, Parriego M, Rodríguez I, Montalvo V, Veiga A, Boada M. Could monopronucleated ICSI zygotes be considered for transfer? Analysis through time-lapse monitoring and PGS. *J Assist Reprod Genet* 2017;905–911.

- Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, Ramsing NB, Remoh J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod* 2011;**26**:2658–2671.
- Milewski R, Ku P, Kuczyska A, Stankiewicz B, Ukaszuk K, Kuczyski W. A predictive model for blastocyst formation based on morphokinetic parameters in time-lapse monitoring of embryo development. *J Assist Reprod Genet* 2015;**32**:571–579.
- Mio Y, Iwata K, Yumoto K, Maeda K. Human Embryonic Behavior Observed with Time-Lapse Cinematography. *J Heal Med Informat* 2014;**5**:143.
- Montag M, Liebenthron J, Köster M. Which morphological scoring system is relevant in human embryo development? *Placenta* 2011;**32**:S252–S256. Elsevier.
- Otsu E, Sato A, Nagaki M, Araki Y, 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.
- Payne D, Flaherty SP, Barry MF, 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.
- Rubio I, Kuhlmann R, Agerholm I, Kirk J, Herrero J, Escribá M-J, Bellver J, Meseguer M. Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. *Fertil Steril* 2012;**98**:1458–1463. Elsevier.
- Staessen C, Steirteghem AC Van. The chromosomal constitution of embryos developing from abnormally fertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection and conventional in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1997;**12**:321–327.
- Sultan KM, Munné S, Palermo GD, Alikani M, Cohen J. Chromosomal status of uni-pronuclear human zygotes following in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1995;**10**:132–136.
- Tanaka A, Yumoto K, Iwata K, Mizoguchi M, Tsuneto M, Mio Y. Dynamic analysis of human parthenogenetic zygotes induced by artificial oocyte activation. *ASRM* 2016;, p. P-215.
- Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, Jonge CJ De, Baer TM, Reijo Pera R a. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome

activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol* 2010;**28**:1115–1121. Nature Publishing Group.

Yamaguchi K, Takayanagi T, Minamoto H, Suzuki N, Ando H. Time-lapse analysis of human embryos developing from mononuclear (1PN) oocytes after conventional in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Fertil Steril* 2013;**100**:S385. Elsevier.

CAPÍTOL 5

DISCUSSIÓ

5.1. ORIGEN DELS ZIGOTS MONOPRONUCLEATS D'ICSI

Els zigots monopronucleats amb dos corpuscles polars estudiats en el decurs d'aquesta tesi doctoral provenen de cicles de FIV inseminats mitjançant ICSI, pel que es pot acceptar com a certa la presència d'un espermatozoide dins el citoplasma de l'òocit.

La participació del material genètic masculí en els embrions derivats de zigots monopronucleats estudiats, s'ha avaluat a partir de la presència de cromosoma Y, que ha estat de fins un 35,2%. Aquests resultats permeten inferir que fins un 70,4% d'aquests embrions deriven d'un procés de fecundació. Malgrat tot, no podem descartar que alguns derivin de l'activació de l'òocit sense la intervenció de l'espermatozoide.

La informació obtinguda dels estudis cromosòmics, juntament amb els morfocinètics, ens permeten deduir l'origen i els mecanismes que han donat lloc als zigots monopronucleats d'acord amb les hipòtesis proposades per altres autors (revisat per Azevedo *et al.*, 2014 i Rosenbusch, 2014).

La majoria dels zigots monopronucleats en els nostres treballs mostren un diàmetre més gran que el dels pronuclis de zigots 2PN, i podria ser el resultat de la unió inicial del material genètic matern i patern en un únic pronucli. Aquest fenomen podria ser degut a la proximitat física dels dos materials en el moment de la formació de l'embolcall nuclear, i donaria lloc a embrions amb dotació cromosòmica diploide i d'origen biparental (Levron *et al.*, 1995; Flaherty *et al.*, 1998; Otsu *et al.*, 2004; Van Der Heijden *et al.*, 2009; Kai *et al.*, 2015).

Aquells zigots 1PN que mostren un pronucli amb diàmetre similar al dels zigots 2PN i resulten en embrions amb origen biparental, podrien formar-se seguint el model proposat per Azevedo i col·laboradors (Azevedo *et al.*, 2014). Aquests autors confirmen la presència en el citoplasma d'un nucli (masculí o femení) sense embolcall nuclear, que seria el resultat del trencament prematur de la membrana d'un dels dos pronuclis. També seria possible que en un pronucli es donés la formació correcta de l'embolcall, mentre que en l'altra no es pogués organitzar. Aquesta darrera hipòtesi explicaria tant les observacions d'Azevedo i col·laboradors com les nostres, ja que l'avaluació mitjançant tecnologia *time-*

5. DISCUSSIÓ

lapse dels embrions estudiats en els nostres treballs descarta la possibilitat de la formació i trencament prematur d'un dels dos embolcalls pronuclears.

L'observació en els nostres treballs de zigots 1PN d'ICSI, amb un únic pronucli amb diàmetre similar al dels pronuclis dels zigots 2PN d'ICSI, també pot reflectir la presència d'una única dotació cromosòmica. L'origen uniparental s'ha proposat com un dels possibles mecanismes per la formació dels zigots monopronucleats, i ha estat demostrat recentment amb la detecció d'un blastocist androgenètic provinent d'un zigot monopronucleat d'ICSI (Bradley *et al.*, 2017).

L'ús de la tecnologia TL ha permès descartar en els nostres treballs la formació asincrònica o la fusió de 2PN, mecanismes que també donen lloc a la observació de zigots 1PN (Staessen i Van Steirteghem, 1997; Montag *et al.*, 2016).

5.2. CONSTITUCIÓ CROMOSÒMICA DELS EMBRIONS DERIVATS DE ZIGOTS MONOPRONUCLEATS D'ICSI

Els resultats obtinguts en l'estudi de la dotació cromosòmica dels embrions derivats de zigots 1PN 2CP d'ICSI mostren que un alt percentatge d'aquests embrions són cromosòmicament anormals.

Els embrions derivats de zigots 1PN d'ICSI que presenten majors percentatges de cèl·lules haploides són aquells que aturen el seu desenvolupament en estadis primerencs de divisió, mentre que els embrions que assoleixen l'estadi de blastocist són majoritàriament diploides. Aquests resultats es corresponen amb els publicats i donen suport a la hipòtesi que els embrions haploides solen patir una selecció negativa al llarg del cultiu embrionari (Balakier *et al.*, 1993b; Levron *et al.*, 1995; Macas *et al.*, 1996a; Staessen i Van Steirteghem, 1997; Gras i Trounson, 1999; Lim *et al.*, 2000; Magli *et al.*, 2001; Liao *et al.*, 2009; Van Der Heijden *et al.*, 2009; Rosenbusch, 2014). Malgrat tot, s'observa que embrions amb un alt percentatge de cèl·lules haploides poden assolir l'estadi de blastocist.

Respecte a les taxes d'aneuploidia, s'ha observat un major percentatge d'embrions aneuploides entre els embrions en estadis primerencs respecte l'observat en blastocists (60,2% vs 26,7%). Les taxes d'aneuploidia reportades en blastocists 1PN d'ICSI per altres autors són lleugerament superiors a les nostres. Les diferències poden ser degudes a diferències entre poblacions

d'estudi (FIV-ICSI vs DGP). Malgrat tot, els resultats demostren que el cultiu embrionari fins a estadi de blastocist afavoreix la selecció d'embrions euploides fins a situar les taxes d'aneuploidies en blastocists derivats de zigots 1PN d'ICSI a nivells similars a les observades en embrions derivats de zigots 2PN 2CP d'ICSI (Bradley *et al.*, 2017).

L'elevada taxa de mosaïcisme detectada en els nostres treballs (53,3%-100%) es pot relacionar amb els errors en el procés de fecundació que donen lloc a la formació d'un únic pronucli. Aquests, poden afectar a la correcta segregació de cromosomes en la primera divisió embrionària i en divisions posteriors. Les anomalies en el procés mitòtic donarien lloc a les múltiples anomalies cromosòmiques que s'observen en els embrions derivats de zigots 1PN d'ICSI (fins un 70,4% d'embrions caòtics) amb presència de cèl·lules euploides, aneuploides, haploides i tetraploides (Mateo *et al.*, 2013). L'observació d'aquests tipus cel·lulars en baix percentatge pot considerar-se normal i s'ha confirmat la seva presència tant en embrions provinents de zigots monopronucleats com de zigots correctament fecundats (Delhanty *et al.*, 1997; Staessen i Van Steirteghem, 1997; Daphnis *et al.*, 2005). Malgrat tot, la incertesa de conèixer el percentatge real que suposen aquestes cèl·lules cromosòmicament anormals en un embrió genera controvèrsia en quant a les repercussions que pot tenir.

Per altra banda, les tècniques de FISH i aCGH, utilitzades per separat o combinades, han demostrat no ser prou adients per a l'anàlisi genètic d'embrions derivats de zigots 1PN doncs no permeten confirmar l'origen biparental. L'aplicació d'altres estratègies com l'anàlisi combinat per aCGH i *loci* STR, o l'ús de tècniques de CCS com els aSNP, serien tècniques més indicades per a l'estudi genètic d'aquests embrions (Bradley *et al.*, 2017).

5.3. DESENVOLUPAMENT *IN VITRO* DELS EMBRIONS DERIVATS DE ZIGOTS MONOPRONUCLEATS D'ICSI

5.3.1. Desenvolupament embrionari

Els resultats dels treballs realitzats són concordants i demostren una menor capacitat de desenvolupament *in vitro* dels embrions derivats de zigots 1PN d'ICSI respecte els zigots correctament fecundats.

5. DISCUSSIÓ

La majoria d'embrions derivats de zigots 1PN d'ICSI aturen el seu desenvolupament en estadis primerencs prèviament a la compactació cel·lular (55-66,7%), mentre que aquells que ho fan en estadi de mòrula representen un menor percentatge (16,1%-18,5%). El bloqueig del desenvolupament en aquests embrions es pot relacionar amb la qualitat i maduració oocitària alterada que podria afavorir l'aparició d'un únic pronucli en el procés de la fecundació, o a la major presència d'anomalies genètiques que s'han observat en embrions derivats de zigots 1PN d'ICSI. Els alts percentatges de bloqueig abans de la compactació, i baixos percentatges de bloqueig en estadi de mòrula, semblen mostrar que els factors que impedirien el correcte desenvolupament embrionari ho farien abans de la compactació, mentre que si aquest procés té lloc, l'embrió molt probablement seguirà endavant assolint l'estadi de blastocist.

Les taxes de blastocists observades en els nostres treballs realitzats en zigots 1PN provinents de cicles de FIV sense DGP mostren valors d'entre el 14,8% i el 28,9%, similars als observats per altres grups (10,7%-13,8%; Itoi *et al.*, 2015; Bradley *et al.*, 2017). La taxa de blastocist més baixa observada en els nostres estudis (3,4%) es correspon al treball realitzat en embrions provinents de cicles de DGP on també es va observar un major percentatge d'embrions bloquejats en estadi de mòrula (36,4%). En aquest treball la biòpsia embrionària es va realitzar en D+3 i no es pot descartar que pugui haver tingut un efecte deleteri en la evolució embrionària, tal i com han suggerit alguns autors (Scott *et al.*, 2013c).

La valoració de la morfologia embrionària ha mostrat una menor proporció de blastocists de bona qualitat en els provinents de zigots 1PN respecte els de 2PN, tal i com havien reportat altres grups (Itoi *et al.*, 2015; Bradley *et al.*, 2017), i confirma la menor capacitat de desenvolupament dels zigots 1PN d'ICSI respecte els 2PN.

5.3.2. Morfocinètica embrionària

La utilització de la tecnologia *time-lapse* per l'avaluació del desenvolupament embrionari dels zigots monopronucleats d'ICSI ha permès assegurar l'estudi d'un grup d'embrions amb un sol pronucli i dos corpuscles polars, i l'exclusió dels zigots 1PN que en algun moment han presentat més d'un pronucli fora dels temps habituals de valoració de la fecundació. Així mateix ha permès avaluar

paràmetres que no haguessin pogut ser estudiats mitjançant el cultiu tradicional amb observacions estàtiques.

L'activació de l'oòcit, amb l'aparició del segon corpuscle, té lloc en temps similars tant en els zigots 1PN com 2PN, essent comparable a la reportada per altres grups (Azzarello *et al.*, 2012; Aguilar *et al.*, 2014). La cinètica del pronucli dels zigots 1PN, en canvi, mostra diferències amb la dels zigots 2PN observant-se temps d'aparició del PN més retardats i temps de desaparició més avançats en els zigots 1PN, que es tradueixen en un temps de pronucli visible més curt. Aquestes diferències es poden relacionar amb les anomalies que es produeixen durant el procés de fecundació que donen lloc a la formació d'un únic pronucli i que poden tenir implicacions en el desenvolupament i constitució cromosòmica de l'embrió, tal i com s'ha explicat amb anterioritat.

L'estudi de la morfocinètica dels embrions derivats de zigots 1PN d'ICSI mostra que un alt percentatge d'aquests embrions realitza divisions anòmales, fenomen que pot estar relacionat amb l'elevada taxa d'aneuploidia detectada en embrions derivats de zigots 1PN d'ICSI, tal i com han relacionat alguns autors en embrions provinents de zigots 2PN (Zaninovic *et al.*, 2016). Per altra banda també ha permès detectar diferències segons la seva capacitat d'evolució *in vitro* ja que els embrions derivats de zigots 1PN d'ICSI que no van assolir l'estadi de blastocist van tenir una evolució més retardada i amb divisions cel·lulars més asincròniques. Els que van formar blastocist, en canvi, van tenir una cinètica similar als blastocists provinents de zigots 2PN d'ICSI.

Les diferències entre el desenvolupament *in vitro* dels blastocists derivats de zigots 1PN i 2PN s'observa a partir dels primers signes de compactació cel·lular. Els embrions derivats de zigots 1PN d'ICSI van mostrar un alentiment del seu desenvolupament que es va traduir en un temps d'inici de compactació retardat i un augment del temps requerit per la compactació, però amb temps similar de blastulació. La durada del procés de compactació d'embrions derivats de zigots correctament fecundats ha estat associada a la dotació cromosòmica dels blastocists resultants, observant-se un temps d'inici de compactació retardat en els embrions amb aneuploidies múltiples respecte els embrions euploides (Campbell *et al.*, 2013a). No podem descartar doncs, que el retard observat sigui conseqüència de la dotació cromosòmica alterada que presenten alguns blastocists derivats de zigots 1PN d'ICSI, tal i com s'ha observat en els nostres treballs.

5. DISCUSSIÓ

5.4. UTILITZACIÓ AMB FINALITAT REPRODUCTIVA DELS EMBRIONS DERIVATS DE ZIGOTS MONOPRONUCLEATS D'ICSI

L'ús reproductiu dels embrions derivats de zigots monopronucleats d'ICSI ha estat clàssicament restringit per considerar-los producte d'una fecundació anòmala. Així doncs, la informació de la que es disposa sobre les taxes d'embaràs, implantació i dades de nounats és molt escassa i es limita a uns pocs treballs. Barak i col·laboradors (Barak *et al.*, 1998) van reportar el naixement d'un nen sa després de la transferència en D+2 de quatre embrions provinents de zigots classificats com a 1PN d'ICSI. Més recentment s'han reportat simultàniament el naixement de dues nenes sanes després de l'anàlisi genètic preimplantacional dels embrions. Bradley i col·laboradors van descriure el naixement d'una nena sana i tres gestacions clíniques després de la transferència de 6 blastocists provinents de zigots 1PN d'ICSI avaluats a partir d'observacions estàtiques (Bradley *et al.*, 2017). L'altra naixement correspon al publicat pel nostre grup, on es va realitzar la transferència de dos blastocists provinents de zigots 1PN d'ICSI avaluats amb tecnologia *time-lapse* i per tant és l'únic que assegura l'estatus de zigot monopronucleat (Mateo *et al.*, 2017).

Altres autors descriuen que tot i haver transferit embrions derivats de zigots 1PN d'ICSI no han aconseguit embaràs, o bé han reportat un embaràs amb la coexistència d'una mola hidatiforme i un fetus normal després de la transferència de dos embrions provinents de zigots 1PN i 2PN (Petignat *et al.*, 2001; Itoi *et al.*, 2015). El cas reportat per Petignat i col·laboradors mostra el risc associat de la transferència d'embrions derivats de zigots monopronucleats que no han estat analitzats genèticament, i les greus conseqüències obstètriques i fetals que poden comportar (Lurain *et al.*, 1983).

Tenint en compte els resultats publicats fins el moment, tot sembla indicar que la utilització amb finalitat reproductiva dels embrions derivats de zigots 1PN d'ICSI ha de seguir estant restringida quan existeixen altres opcions, sobretot si es té en compte que es pot estimar que la probabilitat que un zigot monopronucleat d'ICSI assoleixi l'estadi de blastocist i sigui euploide amb origen biparental és d'entre el 0 i el 15,6% (0-28,9% taxa de blastocists, Otsu *et al.*, 2004, Mateo *et al.*, en premsa; 56,2% taxa d'euploidia en blastocists i 4,2% taxa d'origen uniparental, Bradley *et al.*, 2017).

És possible que en alguns casos l'única o última opció sigui la transferència d'un embrió provinent d'un zigot 1PN d'ICSI. Tenint en compte que s'ha demostrat que alguns d'aquests embrions poden donar lloc al naixement de nens sans, en els casos on no existeix una altra alternativa, el centre podria valorar la transferència d'un embrió derivat d'un zigot monopronucleat d'ICSI. En aquests casos, i prèviament a la transferència, els pacients haurien de ser informats de les opcions reals d'embaràs, dels riscos associats, i de la innegable necessitat de analitzar genèticament els embrions.

Aquesta seria, des del punt de vista ètic, l'opció que mantindria millor l'equilibri entre els principis bàsics de beneficència, no maleficència i autonomia. Aquesta alternativa beneficiaria als pacients ja que s'aportaria la possibilitat d'obtenir un embaràs en un cicle on no existia cap opció. L'obligatorietat d'analitzar genèticament els embrions prèviament a la transferència per assegurar-ne l'euploïdia i l'origen biparental minimitzaria els danys que la transferència d'aquests embrions pogués ocasionar. Finalment, serien els pacients qui, un cop rebuda i entesa tota la informació, decidirien lliurement el destí dels seus embrions.

Segons l'estat actual del coneixement es pot concloure que no tots els embrions derivats de zigots monopronucleats d'ICSI tenen el mateix origen i potencial reproductiu, per tant no tots haurien de tenir el mateix destí. No obstant, l'ús reproductiu dels embrions derivats de zigots monopronucleats d'ICSI no ha de ser en cap cas una opció per a la transferència en cicles on hi hagi disponibles altres embrions derivats de zigots 2PN.

