

24. Fecundación

FECUNDACIÓN NORMAL (DOS PRONÚCLEOS, DOS CORPÚSCULOS POLARES) EN FIV-ICSI

La fecundación normal en la FIV-ICSI se confirma por la presencia de dos pronúcleos y dos corpúsculos polares, entre las 16-22 horas postinseminación (o microinyección). En el 80% de los ovocitos fecundados, aparecen 2 pronúcleos entre las 12-16 horas, que tienden a desaparecer a partir de las 22 horas post inseminación.

La única diferencia de los ovocitos fecundados normalmente en FIV o en ICSI es la cronología. La aparición de los pronúcleos se adelanta 2-4 horas en la ICSI⁽¹⁾.

La activación ovocitaria se inicia con la decondensación de la cromatina del espermatozoide y la formación de los pronúcleos. La morfología y sincronización de los pronúcleos es un criterio de calidad embrionaria independiente, relacionado estrechamente con la morfología y viabilidad embrionaria. En la actualidad es una herramienta fundamental para la selección embrionaria, ya que un patrón nuclear anómalo puede reflejar problemas que comprometan la viabilidad de un embrión, indetectables hasta su activación genética.

Algunos autores⁽²⁾, confirman que ciertos embriones desarrollados tras fecundación normal presentan problemas derivados de la incorporación espermática, alineación pronuclear o singamia que provocan que un 4% de los cigotos con dos pronúcleos y dos corpúsculos polares detengan su desarrollo.

Tampoco se puede descartar la segregación irregular de los cromosomas y que un cigoto con dos pronúcleos y dos corpúsculos polares pueda tener desigual distribución genética⁽³⁾. Munné, en 1995⁽⁴⁾ relaciona estas alteraciones con la edad de la mujer, ya que detecta, mediante Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) un aumento de embriones anormales conforme se incrementa la edad de la mujer.

La fecundación normal en FIV-ICSI se confirma por la presencia de dos pronúcleos y dos corpúsculos polares entre las 16 y 22 horas postinseminación.	C
La aparición de los pronúcleos en la ICSI puede producirse de dos a cuatro horas antes que en la FIV.	C
La morfología y sincronización de la aparición de los pronúcleos constituye uno de los criterios que se valoran en la calidad embrionaria.	C
La correcta morfología en la fecundación no asegura la viabilidad del embrión.	C

FECUNDACIÓN ANÓMALA EN FIV-ICSI

Zigotos con tres pronúcleos

Los cigotos con tres pronúcleos representan un grupo importante de pérdidas en la medicina reproductiva. Se producen también en condiciones naturales y representan el 15% de los abortos espontáneos por anomalías cromosómicas.

Esta alteración siempre debe comprobarse en el día +1, ya que estos cigotos se dividen normalmente y no se observan diferencias en cuanto a calidad embrionaria con respecto a los cigotos normales, e incluso presentan un menor porcentaje de fragmentación⁽²⁾. Un 18% de estos cigotos se detienen, un 56% se dividen en 3 blastómeras y un 29% pueden llegar a 8 células a las 48 horas, procedentes de 2 o 3 células.

Los embriones procedentes de cigotos tripronucleares, siempre deben descartarse en los tratamientos de reproducción asistida.

Tres pronúcleos tras FIV

El patrón nuclear de tres pronúcleos más habitual en FIV es tres pronúcleos con dos corpúsculos polares. Son cigotos dispérmicos por la penetración de más de un espermatozoide. Cromosómicamente la mayoría son mosaicismos (42,3%), mientras que los triploides son muy escasos (12,7%)⁽⁶⁾. Esto es debido a que el huso meiótico es organizado por el centrosoma del espermatozoide, y al penetrar más de uno, se forman husos meióticos tripolares, ya que tienen más de un centrosoma con dos centriolos en un polo^(6,7) y se dividen normalmente en tres blastómeras. A veces pueden tener un huso bipolar, cuando uno de los centriolos permanece inactivo y se dividen en dos células, aunque es un hecho infrecuente. Aunque las divisiones son normales, su microestructura es diferente⁽⁷⁾.

La presencia de tres pronúcleos tras FIV, constituye la alteración de la fecundación que se detecta con más frecuencia en los laboratorios de embriología humana.	RSAA
Los embriones con tres pronúcleos y dos corpúsculos polares, suelen tener origen dispérmico. Deben ser valorados siempre el día +1, y nunca deben transferirse.	C
El embriólogo, para intentar prevenir la polipenetración espermática, debe controlar el número de espermatozoides a inseminar. Sin embargo, otros factores ovocitarios causantes de este fenómeno no podrán ser controlados en el laboratorio.	RSAA

Tres pronúcleos tras ICSI

El 6,5% de los embriones originados por ICSI presentan tres pronúcleos⁽²⁾. La mayoría presentan tres pronúcleos y un corpúsculo polar. La penetración de más de un espermatozoide está descartada por definición en esta técnica. Por tanto se trata de zigotos monoespérmicos digínicos, originados por el fallo en el ovocito al no realizar la extrusión del segundo corpúsculo polar. Esto puede deberse a fallos madurativos del ovocito, a daños producidos en el ovocito por la inyección al alterar el citoesqueleto ovocitario o dañar la placa meiótica, o incluso a alteraciones producidas en la decumulación.

La mayoría son triploides perfectos o triploides descompensados por la separación anormal de sus cromosomas en la segunda división meiótica ($n\ 23\ p\ 23, n\ 23\ o\ n\ 23\ +x, p\ 23, n\ 23-x$)⁽³⁾.

Algunos autores⁽⁵⁾, encuentran un 55,7% de triploides y un 16% de mosaicismo. El cariotipo de los triploides es XXY y XXX, no encontrándose XYY, lo que demuestra su origen digínico.

Macas *et al.*, 1996⁽³⁾ encuentran patrones de origen dispérmico en ICSI: tres pronúcleos, dos corpúsculos polares que se deben a la inyección de un espermatozoide diploide en varones con oligoastenozoospermia severa.

Macas, también describe la observación tras ICSI de zigotos con tres pronúcleos y dos corpúsculos polares de ICSI diploides por la segregación anormal de cromosomas femeninos, que se separan en la anafase o principios de la telofase de la segunda división meiótica, formando un pronúcleo adicional con la extrusión normal del segundo corpúsculo polar ($n\ 46$). El 36% de los zigotos con tres pronúcleos son diploides⁽⁶⁾.

También pueden ser hipotriploides ($n: 69-x$)⁽⁹⁾ por la incompleta segregación de cromátidas femeninas que deben formar el segundo corpúsculo polar. Parte de las cromátidas que migran a la periferia para su expulsión permanecen en el citoplasma constituyendo el tercer pronúcleo con $3n < 69$, 3 pronúcleos 2 corpúsculos polares ($n\ 23\ p\ 23\ n\ 23-x$) y el 2° corpúsculo polar (x) o 3 pronúcleos 1 corpúsculo polar ($n23\ p\ 23\ n23-x$) y el primer corpúsculo polar ($n\ 23 + x$).

Algunos autores relacionan los embriones con tres pronúcleos en ICSI con pacientes altas respondedoras, con niveles elevados de estradiol. Sin embargo, aunque dichas pacientes presentan un mayor porcentaje de cigotos con 3 pronúcleos, las tasas de embarazo en estos ciclos no disminuye. Esto se debe a que no todos los ovocitos en Mill presentan el mismo estado madurativo citoplasmático y las pacientes con alta respuesta tienen más dispersión.

El 6,5% de los embriones que se generan en ICSI presentan 3 pronúcleos. La mayoría de ellos presentan 3 pronúcleos y 1 corpúsculo polar y casi todos suelen ser triploides perfectos.

C

Presencia de un solo pronúcleo y dos corpúsculos polares

Este patrón nuclear se produce por asincronía en la aparición de los pronúcleos o por activación partenogenética del ovocito.

Un pronúcleo y dos corpúsculos polares tras FIV

El 2-5% de los cigotos presentan un pronúcleo a las 20 h post inseminación. De éstos, el 48-80% son diploides, por lo que se confirma que han sido fecundados normalmente. Presentan un único pronúcleo, que se origina bien por fusión nuclear o por asincronía en la aparición de los pronúcleos. Una observación más tardía podrá confirmar la presencia del 2° pronúcleo⁽⁴⁾. Estos embriones únicamente podrán ser transferidos si se confirma la presencia de dos pronúcleos y dos corpúsculos polares.

Según Staessen *et al.*, el 13,1% son haploides, y de éstos, encuentran en un 70-75% señales. Y ello demuestra la penetración del espermatozoide, aunque no se origina el pronúcleo masculino por fallo en la activación ovocitaria. Por otro lado, el 25-30% de los cigotos con un pronúcleo resultan de una activación partenogenética del ovocito. Estos embriones permanecen con un pronúcleo y dos corpúsculos polares, pueden dividirse pero siempre deben ser descartados.

El patrón nuclear de un pronúcleo y dos corpúsculos polares se produce en la FIV con una frecuencia entre el 2-5%.

Los embriones con un pronúcleo y dos corpúsculos polares se pueden dividir, aún sin haber presentado su segundo pronúcleo, pero sólo serán transferibles si se observa la presencia posterior de un segundo pronúcleo tardío.

C

Un pronúcleo y dos corpúsculos polares tras ICSI

Los embriones obtenidos mediante ICSI que presentan un pronúcleo y dos corpúsculos polares constituyen el 4-7%. El 27,9% son diploides, con igual proporción de XX y XY⁽¹⁰⁾, por lo que su origen se debe a la formación asincrónica de los PN. Se observan en unas horas y si se consigue ver los dos pronúcleos se podrán transferir.

El 31,2% son haploides. De estos, el 72-86% proceden de la activación partenogenética del ovocito, que con ICSI se podría favorecer por el proceso de decumulación, o por el propio proceso de inyección (84,2% son X y 15,8% Y). Por lo tanto, la anomalía más frecuente en los cigotos con un pronúcleo de ICSI, se debe a un fallo en la activación ovocitaria y no a la inyección del espermatozoide, ya que otro estudio⁽¹¹⁾ demuestra que el espermatozoide estaba correctamente inyectado. Estos cigotos se pueden dividir normalmente, pero deben ser descartados.

La causa más frecuente es el fallo en la activación ovocitaria, que da lugar a embriones haploides y, por tanto, no transferibles⁽¹¹⁾.

La aparición asincrónica de los pronúcleos, debe permitir la visualización tardía del segundo pronúcleo. Estos embriones son diploides, y pueden transferirse⁽¹⁰⁾.

El patrón pronuclear de un pronúcleo y dos corpúsculos polares aparece en ICSI con una frecuencia de entre el 4 y 7%. Pude deberse a la aparición asincrónica de los pronúcleos, a un fallo en la activación ovocitaria o a la activación partenogenética.

C

Los embriones procedentes de ICSI con patrón pronuclear de un pronúcleo y dos corpúsculos polares, pueden dividirse, pero sólo serán transferibles aquellos en los que se visualice la aparición del pronúcleo tardío.

C

Fallo de fecundación

La fecundación por FIV o ICSI se confirma con la presencia de dos corpúsculos polares y dos pronúcleos a las 18-20 horas. La única diferencia entre los ovocitos fecundados normalmente tras FIV e ICSI es que, en este último caso, la aparición de pronúcleos se adelanta 2-

4 horas. El 65-80% de los ovocitos maduros resultan fecundados. La no observación de dos corpúsculos polares y dos pronúcleos en este periodo hace pensar en un fallo de fecundación. Se han sugerido múltiples causas que pueden justificar este fallo, ya que la fecundación es un proceso complejo que resulta de la unión del núcleo de un espermatozoide con el núcleo de un ovocito, a la vez que se produce la activación del citoplasma del ovocito. La unión y la fusión del espermatozoide con el ovocito es el desencadenante fisiológico que inicia la activación del mismo. Los espermatozoides aportan el centrosoma, el centro organizador de los microtúbulos de la célula, y los nuevos microtúbulos son irradiados dentro del ovocito inseminado desde esta estructura de origen paterno, formándose el aster⁽¹⁰⁾.

En ocasiones, algunos de los ovocitos que no tienen signos de estar fecundados, dan lugar a embriones de aspecto normal⁽²⁾. Parte de estos embriones provienen de una fecundación normal con una modificación en el tiempo de la penetración del espermatozoide o de la formación de los pronúcleos, indicando que los pronúcleos estaban ocultos debido a la granulosidad, o habían desaparecido por una velocidad de desarrollo anormal. Por otro lado la ausencia de pronúcleos después de la inseminación no indica que el espermatozoide no haya penetrado en el ovocito; distintos autores lo demuestran utilizando distintas técnicas: FISH, PCR, microscopía confocal, epifluorescencia, etc.⁽¹²⁻¹⁴⁾.

Los fallos en la formación de los pronúcleos surgen de defectos específicos en cualquiera de los gametos después de la penetración del espermatozoide, especialmente de la capacidad de organización de los microtúbulos por parte del centrosoma del espermatozoide⁽¹⁵⁾, del crecimiento de los microtúbulos astrales del espermatozoide responsable de la colocación del genoma y del desarrollo durante el primer ciclo celular. Disfunciones semejantes en la fecundación se han observado en los fallos de ICSI. Cohen *et al.*⁽¹²⁾ encontraron fallos de fecundación debidos a la no extrusión del segundo corpúsculo polar o bien a la activación ovocitaria, sin activación del espermatozoide. Barritt *et al.*, indican la existencia de deleciones en el ADN mitocondrial de ovocitos no fecundados.

Cuando ninguno de los ovocitos inseminados presenta signos de fecundación, es decir cuando existe un fallo total de fecundación, no necesariamente debe considerarse como una evidencia de infertilidad masculina. Hershlag *et al.*, 2002⁽¹⁶⁾, observan que, en los fallos de fecundación total en un primer ciclo, un 80% de los casos presentan fecundación normal en un siguiente ciclo, y que estos fallos podrían deberse a causas ciclo específicas no repetibles (cohorte de ovocitos, condiciones de cultivo, etc.); sugiere también, que en parejas con esterilidad de origen desconocido, el realizar un ciclo en el que se inseminan parte de los ovocitos con FIV y parte con ICSI (FIV-ICSI) podría garantizar el éxito del ciclo, así como explicar el fallo de la FIV.

A la hora de decidir la utilización de FIV-ICSI con el fin de evitar un fallo de fecundación en casos dudosos, debieran tenerse en cuenta diversos factores como: recuento total de

espermatozoides con motilidad progresiva post lavado, número de formas normales de espermatozoides, etc.⁽¹⁷⁾.

Si bien la ICSI no proporciona por sí misma mayor tasa de fecundación por ovocito que la FIV⁽¹⁸⁾, en casos dudosos, la utilización de FIV-ICSI con el fin de evitar un fallo de fecundación, sería más aconsejable que la utilización de ICSI al día siguiente como técnica de rescate de fallos de fecundación tras FIV, dado el riesgo de aumento de anomalías genéticas mediante este proceso.

La ausencia de pronúcleos y corpúsculos polares, durante la primera observación tras la inseminación o microinyección espermática, no siempre indica fracaso de fecundación, pero si no se ha observado la presencia de 2 PN y 2 CP, los embriones deben ser descartados.	C
El fracaso de fecundación puede deberse a causas diferentes (ovocitarias y/o espermáticas), según el tratamiento reproductivo realizado, FIV o ICSI.	RSAA
Los fallos de fecundación total (100% de los ovocitos inseminados) no siempre indican una incapacidad de los gametos para conseguir embriones.	C

PATRÓN NUCLEAR. CALIDAD DE LOS ZIGOTOS

La clave del éxito del laboratorio de embriología consiste en saber seleccionar los embriones que tienen más probabilidad de implantar, con el fin de transferir el menor número posible y así evitar el embarazo múltiple.

Para realizar una buena selección embrionaria debemos observar las características morfológicas de los gametos y la evolución del embrión⁽¹⁹⁾.

Existen numerosos trabajos que intentan definir los distintos criterios o marcadores de calidad embrionaria. Los trabajos de Elber sobre morfología ovocitaria, Tokura sobre madurez citoplasmática, Garelo sobre polaridad, Payne, Scott y Smith, Tesarik y Greco sobre morfología de los PN, Steer sobre morfología embrionaria, Gardner sobre morfología de blastocistos, o Ludin y Sakkas sobre división temprana, han tenido como objetivo reconocer marcadores de calidad embrionaria que nos permitieran seleccionar los embriones con mayor capacidad de implantación.

Sin embargo, ninguno de estos criterios por sí solos, puede predecir el poder implantatorio de un embrión. Edwards *et al.*⁽²⁰⁾ determinaron la importancia de combinar distintos

criterios de selección. Hasta hace poco tiempo la selección clásica de embriones se basaba en la clasificación morfológica del embrión el día del transfer. Desde los trabajos de Scott *et al.*, 1998⁽²¹⁾ y Tesarik *et al.*, 1999⁽²²⁾, cada vez ha tenido más importancia la observación del cigoto en fases tempranas de PN. El establecimiento de ciertos patrones nucleares, como un nuevo criterio de calidad, ayuda a predecir el comportamiento de un embrión y, si se suma a los criterios clásicos de calidad embrionaria, se consigue seleccionar los embriones con mejores tasas de implantación.

Scott *et al.* establecieron el primer sistema de evaluación nuclear observando la posición y tamaño de los pronúcleos, la distribución, tamaño y número de nucleolos y la presencia de halo citoplasmático. También consideraban la primera división embrionaria y establecían unos patrones nucleares que relacionaban directamente con la implantación. Scott observa que la presencia de halo citoplasmático por la translocación de organelas, mayoritariamente mitocondrias, que se produce después de la extrusión del 2º corpúsculo polar, se relaciona con una buena calidad embrionaria. También se le empieza a dar una gran importancia a los nucleolos, ya que son fundamentales para el desarrollo del cigoto. Los nucleolos son la estructura nuclear en la que se produce el ARN ribosomal y el ADN es incapaz de iniciar la transcripción sin asociarse a proteínas nucleolares. Durante la fase de pronúcleos los nucleolos son móviles y su distribución puede cambiar, siendo la alineación de los nucleolos el primer paso de la formación del eje embrionario.

Sin embargo, la clasificación más utilizada es la de Tesarik, *et al.*, 1999⁽²²⁾, mediante la cual es posible distinguir una serie de patrones nucleares según la observación de los pronúcleos, número de nucleolos y su distribución entre las 12-20 horas de la fecundación y relacionarlos directamente con la implantación.

Esta clasificación establece 6 clases de patrones nucleares, donde el P 0 se considera óptimo, y los patrones del 1 al 5 anormales. El P 0 comprende dos subclases: cigotos con menos de 7 nucleolos alineados, y cigotos con más de 7 nucleolos no alineados en ambos pronúcleos. A estos dos patrones, les da la misma valoración, ya que son consecuencia del *timing* de la fecundación dado que, con el tiempo, los nucleolos disminuyen en número, aumentan de tamaño y tienden a polarizarse. De esta manera se evita que pueda influir el tiempo en que se realiza la observación de los PN.

Valora sobre todo la sincronía y simetría en los dos pronúcleos y considera los patrones 1 al 5 anormales ya que reflejan una asincronía entre ambos pronúcleos, ya sea en su tamaño o en el número o distribución de nucleolos en ambos pronúcleos. La simetría en ambos pronúcleos es más importante que la polarización de los nucleolos.

Los embriones con un 100% de implantación correspondían al P 0 y siempre cumplían las siguientes condiciones:

- Nucleolos nunca polarizados en ambos pronúcleos si eran > 7 .
- Nucleolos polarizados en ambos pronúcleos si eran < 7 .
- No tener menos de 3 nucleolos en algún pronúcleo.
- No diferir en más de 3 nucleolos en ambos pronúcleos.
- Los nucleolos pueden ser polarizados o no, pero esta circunstancia debe darse en ambos pronúcleos.

En el año 2000 Tesarik compara estos patrones con la morfología en día +2 y la implantación. No encuentra diferencias significativas en la morfología, aunque el porcentaje de embriones de mejor morfología era superior en el P 0. Sin embargo sí aprecia diferencias en la implantación. Embriones de igual morfología en día +2, si provenían de patrones nucleares 0, tenían tasas de implantación 3 veces superiores. Utilizando los dos criterios, nuclear y morfología embrionaria, consigue aumentar la tasa de embarazo a 44,8% y la de implantación a 30,2%, frente a 22,1 y 11,2% respectivamente conseguidos al basarnos únicamente en la morfología embrionaria.

Por lo tanto el patrón nuclear permite seleccionar entre embriones morfológicamente idénticos en día 2 y es un criterio independiente al de morfología embrionaria.

Los patrones nucleares anormales reflejan anomalías moleculares cuyas consecuencias morfológicas se expresan en fases embrionarias posteriores, posiblemente cuando se activa el genoma embrionario.

El patrón nuclear sumado a la clasificación morfológica del día del transfer, aumenta la tasa de embarazo e implantación.

Wittermer *et al.*⁽²³⁾ llegan a las mismas conclusiones que Tesarik y demuestran que la inclusión de un solo embrión que cumple estas características sube la tasa de implantación de 19,7 a 35,6%.

Montag *et al.*⁽²⁴⁾ demuestran que los cigotos con menos de 7 nucleolos polarizados tienen mayor poder implantatorio y mejor calidad embrionaria.

Scott *et al.* relacionan este mismo patrón con la tasa de desarrollo a blastocisto y con la implantación.

El patrón nuclear se relaciona con calidad embrionaria, tasa de blastocisto, implantación y embarazo. Scott también recomienda retrasar la observación de los PN en FIV con respecto al ICSI, (18-20 horas en FIV y 16-18 horas en ICSI), ya que el patrón nuclear con menos de 7 nucleolos es más avanzado cronológicamente, y retrasar la observación aumenta el porcentaje de patrones nucleares óptimos.

También se relacionan los patrones nucleares con la edad; a partir de los 38 años, disminuye el porcentaje de patrones nucleares óptimos⁽²⁵⁾. Kahraman *et al.*⁽²⁶⁾ demuestran que los espermatozoides testiculares inmaduros tienen mayor porcentaje de patrones nucleares anormales. Balaban *et al.* relacionan patrón nuclear con división temprana, morfología, tasa de implantación y embarazo.

La calidad de los cigotos está condicionada por la calidad de los gametos.	C
La valoración del cigoto en fase de pronúcleos (patrón nuclear) ayuda a mejorar la selección embrionaria el día de la transferencia.	C
Los parámetros que se valoran en el patrón nuclear son: - Posición y tamaño de los pronúcleos. - Distribución, tamaño y número de nucleolos. - Presencia de halo citoplasmático.	C
El patrón nuclear más utilizado es el propuesto por Tesarik en 1999.	C
El patrón nuclear es un criterio independiente al de la morfología embrionaria, pero se relaciona con la calidad embrionaria, porcentaje de blastocistos y tasa de implantación.	C
El patrón nuclear anómalo refleja problemas moleculares cuyas consecuencias se expresan en fases embrionarias posteriores, posiblemente a partir de la activación del genoma embrionario.	C
Los patrones pronucleares anómalos son más frecuentes en mujeres con más de 38 años y cuando se utilizan espermatozoides testiculares inmaduros.	C

BIBLIOGRAFÍA

- Nagy ZP, Janssenswillen C, Janssens R, De Vos A, Staessen C, Van de Velde H, 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 ejaculate spermatozoa. *Hum Reprod* 1998; 13:1606-12.
- Plachot M. Cytogenetic analysis and developmental capacity of normal and abnormal embryos after IVF. *Hum Reprod* 1989; 4: 99-103.
- Macas E. The chromosomal complements of multipronuclear human zygotes resulting from intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996; 11: 2496-501.
- Munné S, Cohen J. Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod* 1998; Update 4: 842-55.
- Staessen C, Van Steirteghem AC. The chromosomal constitution of embryos developing from abnormally fertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection and conventional in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1997; 12: 321-27.
- Sathananthan AH, Kola I, Osborne J, Trounson A, Ng SC, Bongso A, Ratnam SS. Centrioles in the begin-

- ning of human development. *Nat Acad Sciences* 1991; 88: 4806-10.
7. Sathananthan AH, Tarin J, Giannaroli L. Development of the human dispermic embryo. *Hum Reprod* 1995; Update 5: 553-60.
 8. Grossmann M, Calafell JM, Brandy N, Vanrell JA, Rubio C, Pellicer A, Egozcue J, Vidal F, Santalo J. Origin of triplo-nucleate zygotes after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997; 1: 2762-5.
 9. Rosenbusch B, Schneider M. Hypotriploid triplo-nuclear oocytes with two polar bodies obtained after ICSI: Is irregular chromatid segregation involved? *Hum Reprod* 2000; 15: 1876-7.
 10. Staessen C, Van Steirteghem A. The chromosomal constitution of embryos developing from abnormally fertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection and conventional in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1997; 12: 321-37.
 11. Flaherty SP, Payne D, Swann N, Matthews C. Assessment of fertilization failure and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Fertil Dev* 1995: 197-210.
 12. Cohen J, Levron J, Palermo GD, Munne S, Adler A, Alickani M, Schattman G, Sultan K, Wiladsen S. Atypical activation and fertilization patterns in humans. *Theriogenology* 1995; 43: 129-40.
 13. Sofikitis N, Ono K, Yamamoto Y, Miyaguawa I. Intra-pronuclear predecondensed sperm head injection (IPSHI). A novel method to manage cases of ICSI failure due to lack of development of male pronucleus or failure pronuclei fusion. *Fertil Steril* 1997; 68: 166S.
 14. Rawe VY, Galaverna GD, Nodal FN, Brugo-Olmedo, S Vitullo P. Cellular events during fertilization failure in humans. *Fertil Steril* 2001; 76: 375-6.
 15. Khorram O, Simerly C, Jones J, Hewitson L, Schatten G. Advanced imaging of ART failures: A new diagnostic approach. *Fertil Steril* 1997; 68: 219-20.
 16. Hershlag A, Paine T, Kvapil G, Feng H, Napolitano B. In vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection split: an insemination method to prevent fertilization failure. *Fertil Steril* 2002; 77: 229-232.
 17. Rhemrev JPT, Lens JW, McDonnell J, Schomaker J, Vermeiden JPW. The post wash total progressively motile sperm cell count is reliable predictor of total fertilization failure during in vitro fertilization treatment. *Fertil Steril* 2001; 76: 884-91.
 18. Ruiz A, Remohi J, Guanes PP, Simon C, Pellicer A. The role of IVF and intracytoplasmic sperm injection in couples with unexplained infertility after failed intrauterine insemination. *Fertil Steril* 1997; 78: 171-3.
 19. Balaban B, Urman B, Isiklar A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R, Mumcu A, Nuhoglu A. The effect of pronuclear morphology on embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome. *Hum Reprod* 2001; 16: 2357-61.
 20. Edwards R, Beard H. Is the success of human IVF more a matter of genetics and evolution than growing blastocysts? *Hum Reprod* 1999; 16: 1-6.
 21. Scott L, Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod* 1998; 13: 1003-13.
 22. Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 1999; 14: 1318-23.
 23. Wittmer C, Bettahar-Lebugle J, Ohl J, Rongieres C, Nisand I, Gerlinger P. Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection. *Hum Reprod* 2000; 15: 2591-7.
 24. Montag M, Van der Ven H. Evaluation of pronuclear morphology as the only selection criterion for further embryo culture and transfer: results of a prospective multicentric study. *Hum Reprod* 2001; 16: 2384-9.
 25. Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod* 2000; 15: 2394-403.
 26. Kahraman S, Kumtepe Y, Sertyel S, Donmez E, Benhalifa M, Findikli N, Vanderzwalmen P. Pronuclear morphology scoring and chromosomal status of embryos in severe male infertility. *Hum Reprod* 2002; 17: 3193-200.

Bibliografía adicional

- Macas E, Imthurn B, Keller P. Increased incidence of numerical chromosome abnormalities in spermatozoa injected into human oocytes by ICSI. *Hum Reprod* 2001; 16:115-20
- Sachs A, Politch J, Jackson KV, Racowsky C, Hornstein MD, Ginsburg ES. Factors associated with the formation of triploid zygotes after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2000; 73: 1109-4.

- Levron J, Munne S, Willadsen S, Rosenwaks Z, Cohen J. Male and female genomes associated in a single pronucleus in human zygotes. *Biol Reprod* 1995; 52: 653-7.
- Tesarik J, Kopečný V. Development of human male pronucleus: ultrastructure and timing. *Gamete Res* 1989; 24: 135-49.
- Sakkas D, Shoukir Y, Chardonnens D, Bianchi PG, Campana A. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryos viability. *Hum Reprod* 1998; 13: 182-7.