

Análisis cromosómico y potencial de desarrollo de cigotos monopronucleares y apronucleares

Cytogenetic constitution and developmental potential of embryos derived from apronuclear and monopronuclear zygotes

G. Campos¹, M. Parriego¹, F. Vidal², B. Coroleu¹, A. Veiga^{1,3}

¹Servei de Medicina de la Reproducció. Institut Universitari Dexeus, Barcelona. ²Unitat de Biologia Cel.lular. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. ³Banc de Línies Cel.lulars. Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona. Barcelona.

Resumen

Introducción: *La presencia de 2 pronúcleos (PN) y 2 corpúsculos polares (CP) se relaciona con un patrón de fecundación normal y un contenido cromosómico diploide, siendo descartados para la transferencia aquellos embriones con un número distinto de pronúcleos. Este estudio intenta aportar nuevos datos sobre la constitución genética y la capacidad de desarrollo de cigotos 1PN 2CP y 0PN 2CP. Material y Métodos:* Se incluyeron en el estudio 346 embriones procedentes de 25 ciclos de FIV-ICSI-DGP. La valoración de la fecundación se realizó a las 16-20 horas post inseminación y la biopsia embrionaria en el tercer día de desarrollo. El análisis citogenético de los embriones se realizó mediante Hibridación in Situ Fluorescente (FISH). Se evaluaron los cromosomas 13, 15, 16, 18, 21, 22, X e Y en los casos de screening de aneuploidías y los cromosomas implicados en la reorganización en los casos de translocaciones cromosómicas. Los embriones fueron clasificados retrospectivamente en 3 grupos en función del número de pronúcleos observados: (1) 2PN 2CP (n= 264); (2) 0PN 2CP (n= 65) y (3) 1 PN 2CP (n= 17) Resultados: Los porcentajes de embriones normales para los cromosomas estudiados fueron: 26.2% en el grupo 1, 40% en el grupo 2 y 14,3% en el grupo 3. Los embriones procedentes del cigotos 0PN mostraron una capacidad de desarrollo in vitro significativamente superior ($p<0,05$) al resto de embriones, con una tasa de blastocisto del 56,6% respecto al 16,5% (2PN) y al 7,2% (1PN). Conclusiones: Los embriones procedentes de cigotos unipronucleares deberían descartarse para la transferencia debido a su elevada probabilidad de ser cromosómicamente anormales. A diferencia, los embriones del grupo 2 podrían ser considerados como aptos. Las tasas de normalidad cromosómica y de capacidad de desarrollo de este grupo de embriones, superiores al grupo control, parecen indicar que probablemente nos encontramos ante un pool de embriones, con una mayor velocidad de división que podría relacionarse con tasas de embarazo superiores.

Palabras clave: Pronúcleo. Euploidía. División temprana. Blastocisto.

Correspondencia: Dra. Mónica Parriego
Servicio de Medicina de la Reproducción
Instituto Universitario Dexeus
08017 Barcelona. España
Mònica Parriego. monpar@dexeus.com

Summary

Introduction: Presence of 2 pronuclei (PN) and 2 polar bodies (CP) is usually related with normal fertilization and a diploid state, while those with a different PN number are routinely discarded being considered as abnormal. The aim of this study was to contribute with new data to the knowledge of chromosomal status and developmental potential of apronuclear and unipronuclear zygotes.

Materials and Methods: Three hundred and forty six ICSI embryos from the PGD program were classified in 3 groups: (1) 2PN 2CP (n= 264); (2) 0PN 2CP (n= 65) and (3) 1 PN 2CP (n= 17). Presence of pronuclear formation was evaluated 16-20 h after oocyte insemination. Cytogenetic analysis of day 3 biopsied embryos was performed for chromosomes 13, 15, 16, 18, 21, 22, X and Y in aneuploidy screening cases and for the chromosomes involved in the reorganization for translocation carriers.

Results: Percentages of chromosomally normal embryos were: 26.2% (group 1), 40% (group 2) and 14.3% (group 3). Embryos derived from apronuclear zygotes showed significantly higher developmental competence ($p<0.05$), with a higher blastocyst formation rate (56.6% vs 16.5%, and 56.6% vs 7.2%). **Conclusions:** Embryos derived from unipronuclear zygotes should be discarded not only due to their chromosome constitution but also to their low developmental competence. Embryos from apronuclear zygotes (group 2) could be considered for transfer. The higher rates of normal chromosomal content and developmental potential found in the group 2 suggest that this pool of embryos could be in fact, early cleavage embryos, and therefore associated with better implantation and pregnancy rates.

Key words: Pronuclei. Euploidy. Early cleavage. Blastocyst.

INTRODUCCIÓN

La valoración de la fecundación en los laboratorios de fecundación in vitro (FIV) suele realizarse 16-20 horas después de la inseminación o la microinyección intracitoplasmática (ICSI), considerándose que se ha producido correctamente cuando son visibles dos pronúcleos (PN) y dos corpúsculos polares (CP). Esta primera observación permite además estimar la capacidad de desarrollo del cigoto a partir de la valoración de parámetros pronucleares como son el aspecto, el número y localización de los pronúcleos y nucleolos junto con la presencia de halo citoplasmático (1). En estudios recientes se han relacionado algunos de estos parámetros pronucleares con la constitución cromosómica del embrión (2).

Los datos existentes en la literatura en relación a los cigotos con un solo PN tras la ICSI han puesto de manifiesto que suelen ser ovocitos que se han activado por partenogénesis y por tanto se trata de estructuras celulares con dotación haploide. A diferencia, la mayoría de los cigotos monopronucleares producidos tras inseminación convencional, han demostrado ser embriones diploides normales, y su aparición sea probablemente debida a la asincronía en la formación de los pronúcleos. Por lo tanto se trataría de fenómenos distintos según la técnica de inseminación utilizada (3).

La presencia de cigotos con 2 corpúsculos polares pero sin visualizarse los pronúcleos se observa oca-

sionalmente tanto tras FIV convencional como tras FIV-ICSI. Una diferente velocidad de formación y desmantelamiento de las membranas pronucleares podría ser la causa y, si fuera así, podría tratarse mayoritariamente de embriones cromosómicamente diploides (4).

El objetivo de este trabajo fue analizar retrospectivamente la dotación cromosómica de los embriones procedentes de este tipo de cigotos a partir de los datos obtenidos del programa de Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) intentando aportar nuevos datos de utilidad para determinar si se trata o no de embriones potencialmente transferibles.

MATERIAL Y MÉTODOS

Un total de 346 embriones procedentes de 25 ciclos de FIV-DGP realizados entre Febrero de 2003 y Mayo de 2004 en el Servei de Medicina de la Reproducció del Institut Universitari Dexeus fueron incluidos en este estudio.

Las indicaciones para la inclusión en el programa de DGP fueron: parejas con fallos repetidos de implantación (8 ciclos), meiosis masculina alterada (6 ciclos), portadores de translocaciones cromosómicas equilibradas (6 ciclos), parejas con abortos de repetición (2 ciclos) y otros motivos (3 ciclos).

La media de edad de las pacientes fue de 33,6 años (rango: 21-41). La estimulación de la ovulación

y el cultivo de gametos y embriones se realizaron de acuerdo con los protocolos estándares utilizados en nuestro centro (5). Todos los ovocitos maduros fueron inseminados mediante ICSI. La valoración de la fecundación se realizó entre 16 y 20 horas tras la inseminación. Los embriones fueron evaluados a las 48 y 72 horas post microinyección. La biopsia embrionaria se realizó en D+3 (D0, día de la punción folicular) mediante tecnología láser, limitándose a aquellos embriones con >4 células y < 30% de fragmentación (6). Sólo cuando el número de células era superior a 7, o cuando las características del primer núcleo fijado lo requiriesen, se biopsiaron 2 blastómeros. Las células se fijaron individualmente según la metodología de Tarkowski ligeramente modificada (7) y fueron procesadas para el análisis mediante hibridación in situ fluorescente (FISH). La evaluación cromosómica en los casos de screening de aneuploidías se realizó para los cromosomas 13, 15, 16, 18, 21, 22, X e Y. En los casos de translocaciones cromosómicas se aplicaron sondas distales a los puntos de rotura que permitieron detectar los productos desequilibrados. Los embriones biopsiados se mantuvieron en cultivo hasta D+5, momento en que, conociendo el resultado del DGP, se realizó la transferencia embrionaria.

Para el análisis de los resultados, los embriones fueron clasificados retrospectivamente en función del número de pronúcleos observados en D+1: Grupo 1: 2 PN + 2 CP (264 embriones, grupo control), Grupo 2: 0PN + 2CP (65 embriones), Grupo 3: 1 PN + 2 CP (17 embriones). La hora media de observación de los pronúcleos fue comparable en los tres grupos (19,2 h en el grupo 1, 19,5 en el grupo 2, y 19,1 en el grupo 3).

RESULTADOS

Cigotos 2 PN

A las 48 horas post ICSI un 90,2% de los cigotos incluidos en este grupo habían progresado en su desarrollo y el 78% fueron biopsiados en D+3. La tasa de blastocisto de los embriones biopsiados de este grupo fue del 16,5% (tabla 1).

La caracterización genética de estos embriones mostró que el 26,2% de los embriones resultaron normales para los cromosomas analizados, un 52,4% anormales y en el resto (21,4%) no se obtuvo un diagnóstico concluyente (tabla 2). Las anomalías cromosómicas se distribuyeron del siguiente modo: embriones aneuploides (48,2%), embriones con aneuploidías complejas (46,3%), embriones caóticos (4,6%) y embriones haploides (0,9%).

Tabla 1

Desarrollo embrionario por grupo de estudio

	NºCigotos	Nº de embriones (%)		
		Divididos 48h	Biopsiados	Blastocistos
Grupo 1	264	238 (90,2%)	206 (78,0%)	34 (16,5%)
Grupo 2	65	37 (57,0%)	30 (46,2%)	17 (56,6%)*
Grupo 3	17	16 (94,1%)	14 (82,4%)	1 (7,2%)

* p<0.05

Tabla 2

Constitución cromosómica por grupo de estudio

	Normal	Anormal	no concluyente
Grupo 1	54 (26,2%)	108 (52,4%)	44 (21,4%)
Grupo 2	12 (40%)	13 (43,3%)	5 (16,7%)
Grupo 3	2 (14,3%)	9 (64,3%)	3 (21,4%)

Cigotos apronucleares

De los 65 cigotos apronucleares estudiados, 37 (57%) se dividieron, aunque sólo 30 (46,2%) fueron considerados aptos para la biopsia. La evaluación posterior a la biopsia reveló que 17 embriones (56,6%) evolucionaron hasta el estadio de blastocisto (véase tabla 1).

Los resultados del análisis genético reflejaron que un 40% de los embriones procedentes de estos cigotos fueron caracterizados como normales, un 43,3% como anormales y en un 16,7% de los casos no se obtuvo un diagnóstico concluyente (tabla 2). Las anomalías cromosómicas fueron clasificadas en aneuploidías (61,5%), aneuploidías complejas (30,8%) y haploidías (7,7%).

Cuando se evaluó el estatus cromosómico en función de la capacidad de desarrollo embrionario, se diagnosticaron como normales un 47,1% (8/17) de los cigotos que alcanzaron el estadio de blastocisto mientras que en los embriones bloqueados en estadios tempranos el porcentaje de normalidad cromosómica fue del 30,7% (4/13).

Cigotos monopronucleares

Respecto al grupo de embriones con 1 PN 2 CPs en D+1, el 94,1% inició la división celular y el 82,4% fue considerado apto para la biopsia, no cumpliendo el resto los criterios morfológicos establecidos para llevarla a cabo.

Evaluando el desarrollo posterior, se observó que sólo un embrión (7,2%) alcanzó el estadio de blasto-

cisto, mientras que los 13 restantes (92,8%) se bloquearon y no continuaron su desarrollo posterior (tabla 1).

El 14,3% de los embriones analizados fue caracterizado como normal, el 64,3% como anormal, mientras que de 3 embriones (21,4%) no se obtuvo un diagnóstico concluyente (tabla 2). El cigoto que consiguió evolucionar hasta el estadio de blastocisto resultó ser cromosómicamente normal para los cromosomas analizados.

Las anomalías cromosómicas se distribuyeron del siguiente modo: haploidías (33,3%), aneuploidías (22,2%), aneuploidías complejas (33,3%) y caóticos (11,1%).

Al comparar la capacidad de desarrollo hasta blastocisto entre los cigotos de los 3 grupos de estudio se observaron diferencias, siendo la tasa de blastocisto de los embriones del grupo 2 significativamente superior ($p < 0,05$) a la observada en los otros grupos (56,6% vs 16,5% y 56,6% vs 7,2%).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar las tasas de anomalía cromosómica entre los distintos grupos estudiados: 108/206 (52,4%) en el grupo 1, 13/30 (43,3%) en el grupo 2 y 9/14 (64,3%) en el grupo 3, aunque se observa una tendencia hacia una mayor tasa de embriones anormales en los embriones procedentes de 1PN que no alcanza significación estadística debido al diferente número de embriones incluidos en los distintos grupos (tabla 2).

DISCUSIÓN

Cigotos Apronucleares

Se estima que en el 1% de cigotos que muestran 2 CPs no se observan PN en D+1 (8). En función de si se produce o no división embrionaria cabría especular sobre diversas hipótesis.

En el caso de los cigotos apronucleares con 2 CP en los que no se observa división posterior, estaríamos frente a posibles defectos de fecundación. El bloqueo de la formación de pronúcleos posteriormente a la extrusión del segundo CP podría dar lugar a este tipo de cigoto por defectos específicos de los gametos tales como la incapacidad de estructurar los microtúbulos por parte del centrosoma del espermatozoide (9, 10). De todos modos, no creemos que esta sea la causa del elevado porcentaje de cigotos OPN de nuestro estudio. La explicación que estimamos más plausible sería que se hubieran incluido en este

grupo ovocitos no fecundados con el primer CP fragmentado.

En el caso de los cigotos apronucleares con 2 CP en los que si se observa división posterior podría tratarse de que una granulosidad importante del citoplasma enmascarara los pronúcleos, fenómeno descrito en el trabajo de Munné y cols. (8). La valoración meticulosa de los pronúcleos al microscopio invertido, practica habitual en el laboratorio, permite la observación de estas estructuras incluso en presencia de granulosidad importante.

La hipótesis más probable es la que la que atribuye la ausencia de pronúcleos en el momento de la observación a una desaparición temprana de éstos debida a un elevado ritmo de división celular. Por lo tanto, los cigotos apronucleares incluidos en nuestro trabajo que continuaron su desarrollo posterior son probablemente embriones con elevado ritmo de división o *early cleavage* (EC). Este fenómeno de EC se ha relacionado con calidad embrionaria y potencial de implantación. Así, los datos publicados hasta el momento indican que los cigotos con EC dan lugar a embriones de mejor calidad y con mayor tasa de blastocisto. Su transferencia permite además aumentar significativamente la tasa de embarazo (11-15).

En nuestro estudio observamos un porcentaje superior de embriones cromosómicamente normales en el grupo de cigotos apronucleares respecto al grupo control (40% vs 26,2%). En el único estudio publicado hasta el momento que analiza constitución cromosómica de embriones procedentes de cigotos apronucleares (3) los autores describen que el 57% de los embriones analizados son diploides sobre un total de 23 embriones. Si se tiene en cuenta que en nuestro estudio el número de cromosomas analizados es superior, podría considerarse que los resultados de los dos estudios son equivalentes.

También resulta significativamente superior la tasa de blastocisto observada en este grupo de embriones respecto al grupo control (56,6% vs 16,5%). Por lo tanto, a partir de nuestros datos se puede relacionar EC con elevada calidad embrionaria a la vez que con tasas de euploidía superiores y, por lo tanto, la transferencia de dichos embriones deberían reflejar superiores tasas embarazo. Aunque somos conscientes de que la no observación de los pronúcleos no es la situación ideal, a partir de los resultados obtenidos en nuestro estudio debemos plantearnos el uso de dichos embriones para la paciente. Un ajuste de los *timings* de observación de los pronúcleos sería de utilidad para detectarlos en este grupo de embriones con alto ritmo de división y transferirlos con mayor seguridad.

Cigotos Monopronucleares

Generalmente existe consenso en los laboratorios de FIV en considerar como aptos los embriones procedentes de 1 PN tras inseminación convencional y descartar los obtenidos tras ICSI. Todos los embriones incluidos en nuestro estudio se obtuvieron tras ICSI. La tasa de división embrionaria (94,1%) y el porcentaje de embriones con morfología correcta en D+3 (82,4%) de los embriones procedentes de cigotos monopronucleares, resultan totalmente equivalentes a los observados en el grupo control, por lo que el motivo de no transferir estos embriones no recae en criterios de evaluación morfológica en estadios tempranos sino en los datos procedentes de estudios de contenido cromosómico y de capacidad de desarrollo hasta blastocisto.

Nuestros datos muestran que solo el 14,3% de estos embriones resultan ser diploides normales, porcentaje inferior al descrito en estudios anteriores (2). Esta diferencia podría ser debida, de nuevo, al superior número de cromosomas analizados en nuestro estudio. La tasa de haploidía encontrada en nuestra serie (33,3%) coincide con las descritas en publicaciones precedentes (31-47%) (2, 16) y confirma que un porcentaje importante de estos cigotos resultan por activación partenogenética debido al ICSI. El desarrollo de un reducido porcentaje de embriones diploides normales a partir de cigotos con 1 PN puede tener distintos orígenes. La asincronía en la aparición de los pronúcleos (16), la fusión de los pronúcleos masculino y femenino (17) o la diploidización se han sugerido como causas posibles. Se ha mencionado que la fusión pronuclear, observada clásicamente en especies donde la finalización de la meiosis precede a la fecundación, podría ser una variante normal de fecundación en la especie humana. De hecho, se han descrito dos patrones distintos de cigotos 1PN según su tamaño, con un solo pronúcleo $> 29 \mu\text{m}$ o bien $\leq 29 \mu\text{m}$ (18). La fusión del pronúcleo masculino y femenino se postula como la responsable de la formación de los pronúcleos de mayor tamaño y se correlacionaría con tasas más elevadas de formación de blastocisto (18% frente a 0%). La diploidización temprana o no extrusión del segundo corpúsculo, aunque parece poco probable, no puede descartarse como fuente de alguno de estos embriones diploides. Nuestro diseño experimental no permitió conocer el origen de los embriones cromosómicamente normales procedentes de cigotos monopronucleares.

La baja tasa blastocisto que se ha obtenido en este grupo de embriones, inferior a los otros dos grupos de estudio, es consecuencia directa de la menor propor-

ción de embriones cromosómicamente normales. La selección en contra de los embriones con anomalías cromosómicas a lo largo del cultivo embrionario ya ha sido ampliamente descrita en estudios anteriores (19-21) y existe consenso en la incompatibilidad del estatus haploide con el estadio de blastocisto. Mediante el cultivo largo hasta blastocisto se podrían eliminar estos embriones con dotación haploide aunque no embriones con ciertas aneuploidías y embriones mosaico. Estudios que aportaran más datos sobre los tipos de anomalía cromosómica de este grupo de embriones así como de su viabilidad posterior ayudarían a valorar la utilidad del cultivo prolongado como metodología para reconsiderar como aptos los embriones que alcanzaran el estadio de blastocisto.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos sugieren que se debe actuar de manera distinta frente a embriones procedentes de cigotos apronucleares respecto a los monopronucleares tras ICSI. Mientras que los segundos habría que descartarlos rutinariamente por su alta probabilidad de ser cromosómicamente anormales, los datos de este trabajo apuntan a que los embriones procedentes de cigotos apronucleares con 2 CP podrían ser considerados como aptos para la paciente. La desaparición de los pronúcleos en los cigotos de este grupo se produciría antes de la observación de los mismos, y por lo tanto se trataría de embriones con patrón de división temprana o *early cleavage*. Las tasas de normalidad cromosómica y de blastocisto de estos embriones, superiores a las del grupo control, parecen indicar que probablemente nos encontramos ante un *pool* de embriones de elevada calidad, con un ritmo de desarrollo superior al habitual que podría relacionarse con tasas de embarazo superiores.

La estricta observación de los pronúcleos no más tarde de 18 horas post ICSI así como la valoración de la división temprana 26 horas tras la inseminación, pueden aportar datos valiosos en la valoración embrionaria, facilitando la selección de embriones con elevada capacidad de desarrollo y menos anomalías cromosómicas. Todo ello podría contribuir a la mejora de los resultados en cuanto a tasas de embarazo e implantación.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Scott L.:** Pronuclear scoring as a predictor of embryo development. *Reprod BioMed Online* 2003; 6: 201-204.

2. **Balaban B, Yakin K, Urman B, Isiklar A, Tesarik J.:** Pronuclear morphology predicts embryo development and chromosome constitution. *Reprod BioMed Online* 2004; 8: 695-700.
3. **Staessen C and Van Steirteghem C.:** 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.
4. **Manor D, Kol S, Lewit N, et al.:** Undocumented embryos: do not trash them, FISH them. *Hum. Reprod* 1996; 11: 2502-2506.
5. **Calderón G, Belil I, Aran B, Veiga A, Gil Y, Boada M, Martínez F, Parera N, Coroleu B, Penella J, Barri PN.:** Intracytoplasmic sperm injection versus conventional in-vitro fertilization: first results. *Hum Reprod* 1995; 10: 2835-2839.
6. **Boada M, Carrera M, De La Iglesia C, Sandalinas M, Barri PN, Veiga A.:** Successful use of a laser for human embryo biopsy in preimplantation genetic diagnosis: report of two cases. *J Assist Reprod Genet.* 1998; 15: 302-307.
7. **Santaló J, Estop AM, Egozcue J.:** The chromosome complement of first cleavage mouse embryos after in vitro fertilization. *J Vitro Fertil Embryo Transfer* 1986; 3: 99-105.
8. **Munné S and Cohen J.:** Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod Update.* 1998; 4: 842-855.
9. **Asch R, Simerly C, Ord T, Ord VA, Schatten G.:** The stages at which human fertilization arrests: microtubule and chromosome configurations in inseminated oocytes which failed to complete fertilization and development in humans. *Hum Reprod.* 1995; 10: 1897-1906.
10. **Hewitson LC, Simerly CR, Tengowski MW, Sutovsky P, Navara CS, Haavisto AJ, Schatten G.:** Microtubule and chromatin configurations during rhesus intracytoplasmic sperm injection: successes and failures. *Biol Reprod.* 1996; 55: 271-280.
11. **Boiso I, Veiga A, Edwards R.:** Fundamentals of human embryonic growth in vitro and the selection of high-quality embryos for transfer. *Reprod BioMed Online* 2002; 5: 328-350.
12. **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.
13. **Sakkas D, Shoukir Y, Chardonnens D, et al.:** 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.
14. **Lundin K, Bergh C, Hardarson T.:** Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod* 2001; 16: 2652-2657.
15. **Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP and Herbert.:** Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum Reprod* 2002; 17: 407-412.
16. **Sultan KM, Munné S, Palermo GD, et al.:** Ploidy assessment of embryos derived from single-pronucleated human zygotes obtained by regular IVF and intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Hum Reprod* 1995; 10: 132-136.
17. **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.
18. **Otsu MS, et al.:** Developmental potential and chromosomal constitution of embryos derived from larger single pronuclei of human zygotes used in in vitro fertilization. *Fert Steril* 2004; 81: 723-724.
19. **Magli MC, Jones GM, Gras L, Gianaroli L, Korman I, Trounson AO.:** Chromosome mosaicism in day 3 aneuploid embryos that develop to morphologically normal blastocysts in vitro. *Hum Reprod* 2000; 15: 1781-1786.
20. **Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M, Calderon G, Cohen J, Munné S.:** Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Hum Reprod* 2001; 16: 1954-1958.
21. **Rubio C, Simón C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohí J, Pellicer A.:** Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Reprod* 2003; 18: 182-188.