

Embriología

Valoración de cigotos y correlación con la calidad embrionaria

Zygote valuation and correlation with embryo quality

Raquel Blanes Zamora^{1,2}, Rebeca Vaca Sánchez^{1,2}, Jonay González Pérez^{1,2}, Rubí Nieves Rodríguez Díaz², Delia Rosa Báez Quintana^{1,2}, José Carlos Alberto Bethencourt^{1,2}.

¹Centro de Endocrinología de la Reproducción de Tenerife (CERT).

²Hospital Universitario de Canarias (HUC). Tenerife. Santa Cruz de Tenerife. SPAIN.

Resumen

El objetivo de este estudio es determinar la correlación entre algunos parámetros morfológicos del cigoto y la calidad embrionaria que desarrollan con el fin de obtener el máximo de información en la primera observación a las 18-20 horas postinseminación. Material y métodos: se estudia un total de 312 cigotos de 54 ciclos ICSI en los que se registran los parámetros: presencia de halo claro en el citoplasma, disposición de los nucleolos Alineados, Semialineados o No Alineados, tamaño relativo de los pronúcleos, número de nucleolos, bloqueo de la primera división, y se correlacionan con calidad embrionaria. Resultados: se encuentran diferencias significativas en la obtención de embriones de buena calidad cuando el cigoto tiene halo claro, cuando los nucleolos presentan disposición Alineada o Semialineada, y cuando los pronúcleos tienen igual tamaño. El bloqueo de la división se produce con mayor frecuencia cuando los pronúcleos son de distinto tamaño, los nucleolos no alineados y no hay presencia de halo claro. Conclusiones: ya en la primera observación podemos determinar que cigotos tienen un mayor potencial para desarrollar embriones de buena calidad, que a su vez, darán mayores tasas de gestación con sólo una observación sencilla al microscopio.

Palabras clave: Cigoto. Halo claro. Nucleolos. Bloqueo primera división.

Summary

The objective of this study is to determine the correlation between some morphologic parameters in the zygote and embryo quality to obtain the maximum information in the first observation at 18-20 hours postinsemination. Material and Methods: we studied 312 zygotes from 54 ICSI cycles and registered the following parameters: presence of cytoplasmic halo, nucleoli organization as Aligned, Semialigned or Non Aligned, pronuclear relative size, nucleoli number, first division arrest, and correlation with embryo quality. Results: we founded significant differences obtaining more good quality embryos when zygotes had clear cytoplasmic halo, when nucleoli had organization Aligned or

Correspondencia: Dra. Raquel Blanes Zamora
Centro de Endocrinología de la Reproducción de Tenerife
(CERT)
Rambla Santa Cruz, 155
38001 SANTA CRUZ DE TENERIFE
e-mail: rblaneszamora@yahoo.es

Semialigned, and when pronuclei had same size. The first division arrest is more frequent when pronuclei are different size, nucleoli non aligned and there is no clear halo. Conclusions: Since the first observation we can determine which zygotes have a better potential to develop good quality embryos that will give higher pregnancy rates only with a simple first observation at microscope.

Key words: Zygote. Clear halo. Nucleoli. First division arrest.

INTRODUCCIÓN

Cuando se realiza una técnica de reproducción asistida, la prueba de que un ovocito ha sido fecundado es la visualización de los dos pronúcleos (PN): masculino y femenino, y dos corpúsculos polares (CP) en el espacio perivitelino. Si se ha realizado una microinyección espermática (ICSI), pueden observarse los dos pronúcleos tan pronto como 4 horas tras la microinyección y si se trata de una fecundación in vitro (FIV), a las 5-6 horas postinseminación, sin embargo, el mayor porcentaje de cigotos se observan a las 16-18 horas postinseminación en ICSI y a las 18-20 horas en FIV.

En la rutina diaria del laboratorio de reproducción, se hace una única observación para determinar la presencia de 2PN y 2CP. Si en esta primera observación se puede determinar aquellos parámetros morfológicos que pudieran ser correlacionados con la subsiguiente calidad embrionaria, y por tanto con el potencial de implantación, podría obtenerse una serie de ventajas a nivel clínico y de procedimiento de trabajo en el laboratorio; en primer lugar podría seleccionarse embriones en estadio de cigoto para su transferencia o para su crioconservación, puesto que esta ofrece mejores tasas de supervivencia en este estadio (1), o también sería de utilidad a la hora de determinar que embriones se seleccionan para hacer un cultivo largo a blastocisto, entre otras ventajas.

Es por tanto el objetivo de este trabajo determinar aquellos posibles parámetros morfológicos fácilmente identificables en el cigoto que puedan suponer un criterio predictivo de la calidad embrionaria, y consecuentemente del potencial de implantación que va a tener cada embrión.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio se tomaron un total de 312 cigotos procedentes de 54 ciclos aplicados a 46 pacientes sometidas a ICSI en nuestro centro, con edades comprendidas entre 30 y 42 años.

Tras la extracción de los ovocitos se siguió el protocolo convencional de ICSI: incubación de los ovocitos extraídos durante 3 horas con medio IVF Medicult, posterior decumulación con hyaluronidasa 80 IU/ml, seguido por la microinyección de los ovocitos maduros MII.

La primera observación de la fecundación se realiza al día siguiente de la extracción a las 16-18 horas postinseminación, registrándose los siguientes parámetros:

I) Tamaño relativo de los pronúcleos

Se valora si el tamaño de los dos pronúcleos es igual o si por el contrario, uno de los dos pronúcleos, presenta un tamaño mayor y apreciable subjetivamente en la observación al microscopio. No se toman medidas de los diámetros de los pronúcleos, sino que se valora únicamente la igualdad o desigualdad de los tamaños pronucleares.

II) Número de nucleolos en cada pronúcleo:

Hacemos un recuento del número de nucleolos que hay en cada pronúcleo para determinar si este parámetro tiene o no alguna correlación con la calidad embrionaria.

III) Disposición de los dos corpúsculos polares:

Vemos aquí para cada cigoto si sus dos corpúsculos polares están juntos o si por el contrario están separados, en cuyo caso determinamos la distancia de separación aproximada en grados.

IV) Alineación de los nucleolos:

Clasificamos aquí tres categorías en función de la disposición de los nucleolos:

A) Nucleolos Alineados (A): cuando en los dos pronúcleos la disposición de los nucleolos es alineada en la zona de yuxtaposición de ambos, observándose una organización en esta disposición (Fig 1).

B) Nucleolos Semialineados (S): si sólo en uno de los dos pronúcleos la disposición de los nucleolos es alineada en la zona de unión de los dos pronúcleos, mientras que el otro pronúcleo presenta los nucleolos en disposición dispersa, no alineada (Fig.2).

C) Nucleolos no alineados (NA): cuando los pronúcleos de los dos nucleolos presentan una disposición dispersa, sin alineación alguna ni organización de los mismos (Fig.3).

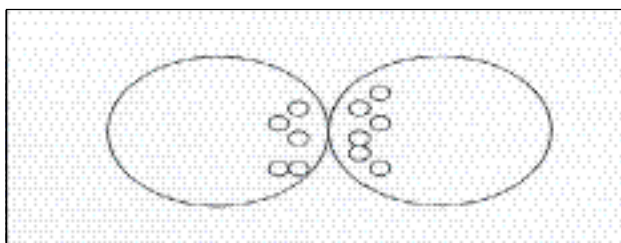


Figura1: PN Alineados (A)

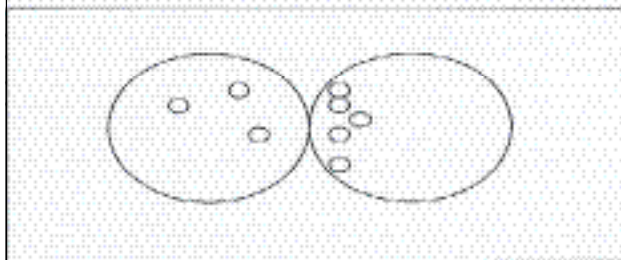


Figura2: PN Semialineados (S)

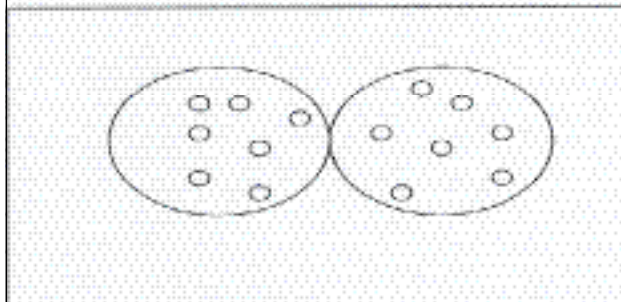


Figura3: PN No Alineados (NA)

V) Halo claro:

Al igual que el parámetro antes mencionado, el ca-

rácter que hemos denominado halo claro (HC), hace referencia a la apariencia del citoplasma en este caso de la periferia del cigoto. La presencia de HC indica una zona periférica de baja densidad granular que se observa al microscopio como una zona de mayor claridad.

VI) Calidad embrionaria en día +2:

Realizamos la valoración de la calidad embrionaria en el día +2 a las 40-47 horas postinseminación. Consideramos el número de blastómeras y el grado de fragmentación para clasificar cada embrión en una gradación del 1 al 5 siendo el grado 1 el de mejor calidad. Grado 1: 4 células, <10% fragmentación, igual tamaño de las blastómeras y ausencia de blastómeras multinucleadas; grado 2: 4 células, 10-20% de fragmentación, ausencia de blastómeras multinucleadas; grado 3: <4 células o bien 4 células y 20-50% de fragmentación o blastómeras desiguales y ausencia de blastómeras multinucleadas; grado 4: 50-75% de fragmentación o presencia de blastómeras multinucleadas; grado 5: >75% de fragmentación o la mitad de las blastómeras multinucleadas. En este estudio hemos tomado los embriones de más de 3 células de grado 1 y de grado 2 en el día +2 como embriones de buena calidad, y a partir de grado 3 los hemos considerado dentro de la categoría de embriones de mala calidad, y es con este parámetro con el que hemos correlacionado todos los demás. Además se han registrado los cigotos bloqueados que no han realizado la primera división embrionaria.

VII) Fecundación anómala:

Hemos registrado todos los cigotos con fertilización anómala: 1PN, 3PN y 4PN, y hemos determinado si estos cigotos se bloquean o se desarrollan como embriones, y en este último caso, si dan lugar a embriones de buena o mala calidad.

Análisis Estadístico: Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS versión 11.1 para Windows. Se aplica el test de la chi-cuadrado y se tomó como significación estadística los valores de $P < 0.05$.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos para cada parámetro estudiado fueron los siguientes:

I) Tamaño relativo de los pronúcleos:

Que los pronúcleos femenino y masculino tengan igual

tamaño influye al 95% de fiabilidad para que se desarrollen embriones de buena calidad.

	N	Em. Buena Cal.	Em. Mala Cal.	Signif.
PN igual tam.	174	127 (72,9%)	47 (27,1%)	P<0,05
PN dist. tam.	138	82 (59,4%)	56 (40,6%)	N.S.

II) Número de nucleolos del PN1 y del PN2:

Al analizar la correspondencia entre el número de nucleolos de cada pronúcleo con respecto a la calidad embrionaria, no encontramos ninguna correlación con lo que podemos decir que este parámetro no influye en la calidad embrionaria.

III) Corpúsculos polares juntos o separados:

	N	Em. Buena Cal.	Em. Mala Cal.	Signif.
CP. juntos	207	145 (70%)	62 (30%)	N.S.
CP. separados	105	62 (59,1%)	43 (40,9%)	N.S.

En el caso de que los corpúsculos polares estén juntos se aprecia una tendencia a obtener embriones de buena calidad con una fiabilidad del 92,9% que no llega a ser significativa (NS).

IV) Nucleolos Alineados (A), Semialineados (S) o No Alineados (NA):

Valoramos conjuntamente los cigotos con nucleolos alineados y semialineados como aquellos que presentan un mayor grado de organización, y los contrastamos con los cigotos de nucleolos no alineados:

	N	Em. Buena Cal.	Em. Mala Cal.	Signif.
A+S	112	82 (73,2%)	30 (26,8%)	P<0,05
NA	176	116 (65,9%)	60 (34,1%)	N.S.

Encontramos una diferencia significativa para los cigotos A+S (P<0.05) por lo que podemos afirmar

que el hecho de que los nucleolos estén alineados o semialineados está positivamente correlacionado con la obtención de embriones de buena calidad.

V) Halo Claro:

La valoración de una zona menos densa y mayor claridad citoplasmática en la periferia del cigoto nos da los siguientes datos:

	N	Em. Buena Cal.	Em. Mala Cal.	Signif.
HC	172	125 (73%)	47 (27%)	P<0,05

Podemos decir que la observación de halo claro en los cigotos está correlacionado positivamente con la obtención de una buena calidad embrionaria (P<0.05).

VI) Fecundación anómala:

De los 312 cigotos valorados observamos un total de 24 fertilizaciones anómalas (7,6%), de los que 18 fueron de 1 pronúcleo, 2 de 3 pronúcleos y 4 de 4 pronúcleos.

Tomando estos 24 cigotos como un grupo y valorando su desarrollo en el día +2 observamos que 11 dan lugar a embriones de buena calidad, y 13 desarrollan embriones de mala calidad o bloqueados. Aplicando el test de la chi-cuadrado da resultado no significativo.

VII) Embriones bloqueados:

Tomamos ahora todos los embriones bloqueados como un grupo para determinar parámetros con que se correlacionan.

Contamos un total de 27 cigotos bloqueados en 2PN (8,6%), de los que 16 (59,2%) proceden de cigotos con PN de distinto tamaño, y de ellos 6 correspondieron a fertilizaciones anómalas.

Del total de estos cigotos, el 92,5% tenían los nucleolos no alineados y el 74% no presentaban halo claro.

VIII) Resultados de embarazos:

De los 312 cigotos estudiados, 173 fueron transferidos en 54 ciclos, y se consiguieron un total de 12 gestaciones (22,2%), 3 de ellas terminaron en aborto (una de ellas ectópico), 2 gestaciones de gemelares y el resto gestaciones únicas, todas ellas ya a término.

DISCUSIÓN

Hay toda una serie de eventos que se suceden tras la penetración del espermatozoide en el ovocito. En un estudio realizado por Payne D y col.(2), estos describen una onda de granulación dentro del citoplasma que dura aproximadamente 20-53 min, que se produce en la región cortical del ovocito y que llega a completar de dos a diez rotaciones circulares. Durante este transcurso de eventos, el espermatozoide se descondensa y se activa la extrusión del segundo corpúsculo polar, que no siempre tiene lugar cerca del primero, y acto seguido se forma el pronúcleo femenino cerca de este segundo corpúsculo polar. Los pronúcleos aumentan de tamaño y se aproximan hasta que se unen en forma de 8 al tiempo que los nucleolos se mueven dentro de los pronúcleos para acabar alineándose en la zona de yuxtaposición pronuclear. Durante el crecimiento pronuclear los orgánulos citoplasmáticos migran hacia el centro del ovocito dando una apariencia granular y oscura en el centro y rodeando a los pronúcleos, al tiempo que queda una zona cortical clara fácilmente observable al microscopio. Es un hecho comprobado (2) que existe una correlación entre la duración de las ondas de granulación citoplasmática y la calidad embrionaria, de modo que los embriones de mejor calidad muestran una progresión uniforme y ondas de granulación mayores.

El pronúcleo masculino se forma cerca del punto de entrada del espermatozoide mientras que el pronúcleo femenino se origina en el polo ooplásmico del huso meiótico y suele aparecer simultáneamente o algo posterior al masculino. El pronúcleo masculino suele presentar un tamaño mayor o igual al del pronúcleo femenino (24,1 vs 22,4 μm) aunque a veces resulta difícil de discernir (2). También es observable un mayor número de nucleolos en el pronúcleo masculino que en el femenino (7,0 vs. 4,2).

Nuestros resultados con respecto al parámetro estudiado como tamaño relativo de los pronúcleos, está en perfecta concordancia con los obtenidos previamente por Scott y col. (3), que determinan una mayor tasa de formación de blastocistos cuando los PN son de igual tamaño comparado con los cigotos que mostraron PN de tamaños distintos (49,5% vs. 28%). Nosotros apuntamos también a una mejor calidad embrionaria en el día+2 cuando los cigotos tienen igual tamaño pronuclear.

Payne y col. observan que durante el período de crecimiento pronuclear, los orgánulos citoplasmáticos migran hacia el centro del ovocito, dejando una zona cortical clara en la periferia del ovocito. En la rutina

del laboratorio de reproducción asistida, se hace una primera y generalmente única observación de la fecundación a las 16-18 horas postinseminación para valorar la fertilización del ovocito. En esta observación puede determinarse si se aprecia de una manera cualitativa la presencia o no de una zona granular oscura en la zona central del ovocito, rodeando a los pronúcleos a la vez que se visualiza una zona cortical más clara y agranulada en la periferia.

Si observamos un cigoto con una distribución homogénea de los orgánulos citoplasmáticos sin mostrar la apariencia antes descrita, la posibilidad de obtener un embrión de buena calidad disminuye y además de ello, la probabilidad de que se produzca un bloqueo de la división aumenta.

Estas observaciones corroboran los resultados del trabajo realizado por Payne D y col, apuntando a la importancia que tiene en la secuencia de eventos que siguen a la fecundación, la secuencia de ondas de granulación y posterior reestructuración de los orgánulos celulares en el cigoto.



Figura 4: Cigoto con una zona más granulosa central y una zona periférica más clara (HC)

El fenómeno del bloqueo de la división pudiera estar relacionado con la organización de los husos cromáticos que determinan la primera división embrionaria, que como ya es sabido (4), viene determinada por el centrosoma del espermatozoide en la especie humana (5, 6).

Sin embargo, en nuestro estudio resulta difícil establecer una correlación entre este hecho de la no-di-

visión embrionaria y el problema del centrosoma espermático, puesto que en todos los casos se han presentado unas buenas características de morfología y movilidad espermática.

El bloqueo de la primera división embrionaria es un hecho que en la literatura se describe como poco frecuente y que se da en menos de un 5% de los ovocitos fecundados (7). Generalmente, errores en la síntesis del DNA suelen ser los responsables del bloqueo en la división en la fase pronuclear. Es posible que las membranas pronucleares requieran una señalización de la replicación del DNA antes de desorganizarse. Aproximadamente 20 horas después de la inseminación, las membranas pronucleares comienzan a desaparecer, y esto es seguido de la primera división mitótica. Generalmente, es la membrana del PN femenino la primera en desaparecer (8).

En nuestro estudio, observamos que este hecho del bloqueo de la división, sea por causa genética o por un fallo en la organización del centrosoma espermático, viene altamente correlacionado con la observación de una distribución homogénea de la granularidad citoplasmática a las 16-18 horas postinseminación, mientras que la observación más habitual de una zona granular central y una descondensación granular en la periferia del ovocito está más correlacionada con un normal desarrollo de la división embrionaria. De igual modo, encontramos un estrecho vínculo de los cigotos bloqueados con la observación de los nucleolos no alineados, de hecho un 92,5% de los cigotos bloqueados en 2PN presentaron esta distribución nucleolar, apuntando también la importancia que en el desarrollo embrionario tiene la polarización nucleolar.

Siguiendo con el parámetro nucleolar de los pronúcleos, se han realizado diversas clasificaciones atendiendo a la distribución, número y tamaño nucleolar (9, 3) que en alguna medida han correlacionado con la calidad embrionaria y tasa de embarazo. En el presente estudio, nosotros hemos establecido únicamente una clasificación simple de la organización de los nucleolos que no requiera de un elevado número de patrones de organización para que la valoración morfológica de los cigotos sea simple y pueda incorporarse cómodamente a la rutina de laboratorio. El mayor grado de organización de los nucleolos lo hemos clasificado como alineados, si la alineación se observa en uno solo de los pronúcleos los llamamos semialineados y si no hay organización nucleolar en ninguno de los pronúcleos lo clasificamos como no alineados. Según este simple criterio, observamos que los cigotos con nucleolos alineados y semialineados, es decir, los de mayor organización y polarización, muestran una correlación positiva con los embriones

de buena calidad. Es un hecho conocido (10), que la polarización de la cromatina y los nucleolos refleja la rotación de la cromatina en los pronúcleos en desarrollo y representa un paso importante en el establecimiento de los ejes embrionarios, que es fundamental para la posterior determinación celular en embriones preimplantacionales, de manera que apuntaríamos a la observación de la polarización nucleolar como un dato de relevante importancia en el desarrollo de estos acontecimientos.

No resulta infrecuente la observación de ovocitos con fertilización anómala, aunque estos procedan de una ICSI. En este estudio, de los 312 ovocitos observados, 18 (5,7%), presentaron en la primera observación 1PN, acompañada de la presencia de dos corpúsculos polares, con lo que puede afirmarse que los ovocitos habían sido activados por la microinyección. Al observarlos en el día +2, cinco de ellos (27,7%) sufrieron bloqueo de la división mientras que los 13 restantes (72,3%) se dividieron normalmente, siete de ellos (53,8%) dando embriones de buena calidad, con lo que no podemos concluir si se trataba de embriones partenogenéticos haploides o diploides (11, 12), si bien es cierto que muchos cigotos mononucleados pueden tener dos núcleos asincrónicos y en la primera observación escapársenos el pronúcleo activado con retraso (13). Asimismo, aunque en la ICSI se microinyecta un solo espermatozoide por cada óvulo, no resulta infrecuente observar la presencia de 3PN. Esta observación se debe a la retención del segundo corpúsculo polar del ovocito. Sin embargo, en los casos observados en nuestro estudio, los cigotos con 3 ó 4 pronúcleos mostraban otra naturaleza, pues en todos ellos se observó la presencia de los dos corpúsculos polares en el espacio perivitelino. Además de ello, se podían distinguir dos pronúcleos de tamaño mayor y uno o dos pronúcleos de menor tamaño próximos o unidos a estos primeros. Estas observaciones están más acordes con la idea de la fragmentación pronuclear, de modo que los pronúcleos de menor tamaño serían considerados subnúcleos que podrían haber sido originados por la fragmentación de alguno de los pronúcleos, o bien por la retención parcial de alguno de los CP (14). Nosotros observamos un total de 2 cigotos con 3PN (0,6%), y un total de 4 cigotos con 4PN (1,2%). De este total de seis cigotos, cuatro desarrollaron embriones de buena calidad (66,7%), de modo que este hecho justifica la necesidad de una adecuada primera observación de la fecundación cuando los pronúcleos son perfectamente visibles y valorables para evitar que embriones procedentes de estos cigotos de fertilización anómala puedan ser transferidos.

Por todo ello, apuntamos a la necesidad de realizar una correcta primera observación de la fecundación para establecer un criterio preliminar de la calidad embrionaria (1). En todos aquellos casos donde se observe una fecundación anómala, 1PN o bien 3 ó más PN, recomendamos la no transferencia para evitar los cigotos haploides partenogenéticos y aquellos donde se haya producido una fragmentación pronuclear. Sólo en caso de que no se disponga de embriones suficientes para seleccionar se podría transferir los procedentes de 1PN, pues ya en la literatura se describe nacimientos procedentes de cigotos monopronucleares (15).

En conclusión, de entre los cigotos fecundados normalmente con presencia de 2PN claramente definidos y 2CP en el espacio perivitelino, correlacionarán mejor con una buena calidad embrionaria aquellos que presenten una zona densa granular oscura en el centro del cigoto rodeando los PN, y una zona periférica clara, lo que denominamos "halo claro". Aquellos cigotos que en la primera observación no presenten esta apariencia, tendrán una mayor probabilidad de sufrir un bloqueo de la división en el día +2. Tendrán una mayor probabilidad de desarrollar embriones de buena calidad si además observamos que los dos pronúcleos son equivalentes en tamaño y que sus nucleolos muestran una organización polarizada, lo que clasificamos como nucleolos "alineados" o "semialineados".

BIBLIOGRAFÍA

1. **Shapiro BS, Dannesmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C and Thomas S.:** Embryo cryopreservation rescues cycles with premature luteinisation. *Fertil. Steril.* Doi:10.1016/j.fertnstert. 2009.01.134.
2. **Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews D.:** Preliminary observations on polar body extrusion in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum.Reprod.* 1997; 12(3): 532-41.
3. **Scott L, Alve ro R, Leondires M and Miller B.:** The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum. Reprod.* 2000; 15(11): 2394-2403.
4. **Sathananthan AH, Ratnam SS, Ng SC, Tarín JJ, Gianarolli L, Trounson A.:** The sperm centriole: its inheritance, replication and perpetuation in early human embryos. *Hum Reprod.* 1996; 11: 346-356.
5. **Sathananthan AH.:** Paternal centrosomal dynamics in early human development and infertility. *J Assist Reprod Genet.* 1998; 15(3): 129-39. Review.
6. **Palermo G, Munné S, Cohen J.:** The human zygote inherits its mitotic potential from the male gamete. *Hum Reprod.* 1994; 9(7): 1220-5.
7. **Van Blerkom J, Motta P, eds.:** Ultrastructure of Human Gametogenesis. Boston: Kluwer Academic Publishers: 125; 1989.
8. **Sathananthan AH, Trounson AO.:** The human pronuclear ovum: Fine structure of monospermic and polyspermic fertilization in vitro. *Gamete Res.* 1985; 12: 385.
9. **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(5): 1318-23.
10. **Edwards RG and Bear HK.:** Oocyte polarity and cell determination in early mammalian embryos. *Mol. Hum. Reprod.* 1997; 3: 863-905.
11. **Fulton BP, Whittingham DG.:** Activation of mammalian oocytes by intracellular injection of calcium. *Nature*, 1978; 273:149.
12. **Muechler EK, Graham MC, Huang KE et al.:** Parthenogenesis of Human Oocytes as a function of vacuum pssure. *J. In Vitro Fert. Embryo Transf.* 1989; 6: 335.
13. **Veeck L.L.:** An Atlas of Human Gamete and Conceptuses. Parthenon publishing Group. 1999; 57-65.
14. **Austin CR.:** The Mammalian Egg. Oxford: Blackwell Scientific Publications: 34(Subnuclei); 38(Single pronucleus); 46(Pronuclear size); 73(Polar body size), 1961.
15. **Gras L, Trounson A.O.:** Pregnancy and Birth Resulting from Transfer of Blastocyst Observed to have one Pronucleus at the time of Examination for Fertilization. *Hum.Reprod.* 1999; 14(7): 1869-71.