

# ***TRABAJO FIN DE MÁSTER***

***en***

## ***Biología y Tecnología Aplicada a la Reproducción Humana Asistida***

# **Influencia de la multinucleación en el desarrollo embrionario**

**Alumno: Manuel Francisco Granell Martínez  
Tutoras: Irene Rubio Palacios  
Irene Cuevas Saiz**

**Alcobendas, curso 2021 - 2022**



# Índice

<b>1. Introducción</b> .....	7
1.1 La evaluación embrionaria.....	7
1.2 La multinucleación.....	9
1.3 Factores y características morfológicas relacionadas con la aparición de la multinucleación.....	11
1.3.1 Influencia de la estimulación sobre la multinucleación.....	12
1.3.2 Consecuencia de la maduración incompleta de ovocitos.....	13
1.3.3 Correlación entre las condiciones de cultivo y la multinucleación.....	13
1.3.4 Influencia de la fragmentación celular.....	15
1.3.5 Correlación con el patrón pronuclear.....	15
1.4 Viabilidad de embriones multinucleados y efectos sobre los resultados clínicos.....	17
<b>2. Objetivos</b> .....	18
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	19
3.1 Población de estudio.....	19
3.2 Incubadora de <i>time-lapse</i> MIRI® TL6.....	19
3.3 Uso de la incubadora <i>time-lapse</i> MIRI® TL6 en el proyecto de investigación.....	21
<b>4. Resultados</b> .....	23
4.1 Resultados de los embriones no fecundados y fecundados.....	23
4.2 Resultados de las multinucleaciones en B1, B2, B1a, B1b, B2a y B2b.....	23
4.3 Resultados de la formación y no formación de blastocisto con las multinucleaciones.....	25
4.4 Resultados de la incidencia de la multinucleación en los tiempos de división T2-T8.....	26
4.5 Correlación entre la multinucleación, los tiempos de división y viabilidad embrionaria.....	26
4.6 Estudio de las autocorrecciones en el desarrollo embrionario.....	31
<b>5. Discusión</b> .....	32
<b>6. Conclusiones</b> .....	34
<b>7. Bibliografía</b> .....	35

## **Índice de figuras**

Figura 1: Incubador de *time-lapse* MIRI

Figura 2: Embrión multinucleado con fragmentación

Figura 3: Incubadora de *time-lapse* MIRI® TL6

Figura 4: Registro de datos en la incubadora de *time-lapse* MIRI® TL6

Figura 5: Elección del destino de embriones en la incubadora de *time-lapse* MIRI® TL6

Figura 6: Evolución del embrión con sus respectivas blastómeras. Figura creada en BioRender

Figura 7: Viabilidad de embriones con multinucleación en B1.

Figura 8: Viabilidad de embriones con multinucleación en B2.

Figura 9: Viabilidad de embriones con multinucleación en B1b.

Figura 10: Correlación entre la formación de blastocistos y las multinucleaciones (%).

Figura 11: Correlación entre tiempo de división y multinucleación (horas).

Figura 12: Correlación entre la multinucleación, tiempo de división en T2 y viabilidad embrionaria (horas).

Figura 13: Correlación entre la multinucleación, tiempo de división en T3 y viabilidad embrionaria (horas).

Figura 14: Correlación entre la multinucleación, tiempo de división en T4 y viabilidad embrionaria (horas).

Figura 15: Correlación entre la multinucleación, tiempo de división en T5 y viabilidad embrionaria (horas).

Figura 16: Correlación entre la multinucleación, tiempo de división en T6 y viabilidad embrionaria (horas).

Figura 17: Correlación entre la multinucleación, tiempo de división en T7 y viabilidad embrionaria (horas).

Figura 18: Correlación entre la multinucleación, tiempo de división en T8 y viabilidad embrionaria (horas).

Figura 19: Determinación del número de embriones con autocorrecciones en las blastómeras B1 y B2 en día 2.

## **Índice de tablas**

Tabla 1: Parámetros morfocinéticos en el desarrollo embrionario.

Tabla 2: posibles destinos del embrión observados en la incubadora *time-lapse* MIRI® TL6.

Tabla 3: Tiempos de división embrionaria (con y sin multinucleación).

## **Índice de abreviaturas**

CEIm: Comité de Ética e Investigación con medicamentos

FIV: Fecundación In Vitro

GnRH: Gonadotropina

MNB: Multinucleated bodies

NPB: nuclear polar bodies

RNV: Recién Nacido Vivo

TLT: Tecnología *Time-lapse*

TRA: Técnica de Reproducción Asistida

## Resumen

**Introducción:** En las técnicas de Reproducción Asistida, es importante reducir el número de embriones a transferir y que éstos presenten el máximo potencial de implantación; este objetivo se ha podido conseguir con la implementación de la tecnología *time-lapse* (TLT).

**Objetivos:** El objetivo principal ha sido determinar si la multinucleación en estadios tempranos tiene algún efecto sobre el desarrollo embrionario. Los objetivos secundarios han sido estudiar las consecuencias de la multinucleación en la etapa de dos y de cuatro células y analizar los parámetros morfocinéticos de dos células.

**Diseño:** Es un estudio multicéntrico, retrospectivo observacional en el cual se estudiaron con la incubadora de *time-lapse* muestras de pacientes que presentaban diagnósticos que influían en la calidad ovárica, tratadas con ciclos de estimulación ovárica.

**Población:** Se estudiaron 28 pacientes.

**Recogida de datos y Plan de análisis:** Se creó una base de datos con 195 embriones de pacientes del Hospital General Universitario de Valencia desde 2017 hasta 2021 para estudiar el desarrollo embrionario.

**Resultados:** Se estudiaron 108 muestras fecundadas, de las cuales el 78,7% si que llegó a formar blastocisto; el 50% de estos blastocistos no presentaban multinucleación y el 28,7% si que la presentaban. El análisis demostró que las células multinucleadas presentaban una prolongación del tiempo de división. Se obtuvo embarazo solamente en el 5% y 9% de los embriones con multinucleación en B1 y B2, respectivamente. Finalmente, el análisis de las autocorrecciones en día 2, demostró que se produjeron éstas en el 60% y 40% de las blastómeras B1 y B2, respectivamente.

**Conclusiones:** La mitad de los blastocistos formados no presentaron multinucleaciones durante su desarrollo embrionario. La tasa de transferencia positiva fue muy reducida cuando las blastómera B1 y B2 presentaban multinucleación. Se demostró una prolongación de los tiempos de división en las células multinucleadas.

**Palabras clave:** Reproducción Asistida, blastocisto, multinucleación, *time-lapse*, autocorrección.

## **Abstract**

**Introduction:** In Assisted Reproduction techniques, it is important to reduce the number of embryos to be transferred and that these present the maximum implantation potential; this objective has been achieved with the implementation of time-lapse technology (TLT).

**Objectives:** The main objective has been to determine if multinucleation in early stages has any effect on embryo development. The secondary objectives have been to study the consequences of multinucleation at the two-cell and four-cell stage and to analyze the morphokinetic parameters of two cells.

**Design:** It is a multicenter, retrospective observational study in which samples of patients with diagnoses influencing ovarian quality, treated with ovarian stimulation cycles, were studied with the time-lapse incubator.

**Population:** 28 patients were studied.

**Data collection and analysis plan:** A database was created with 195 patient's embryos of the Hospital General Universitario de Valencia from 2017 to 2021 to study embryonic development.

**Results:** 108 fertilized samples were studied, 78.7% of them did develop blastocyst formation; 50% of these blastocysts did not show multinucleation and 28.7% did. The analysis indicated that multinucleated cells showed a prolongation of the division time. Pregnancy was obtained in only 5% and 9% of the embryos with multinucleation in B1 and B2, respectively. Finally, analysis of autocorrections on day 2 showed that these occurred in 60% and 40% of B1 and B2 blastomeres, respectively.

**Conclusions:** Half of the blastocysts formed did not present multinucleations during their embryonic development. The rate of positive transfer was very low when B1 and B2 blastomeres showed multinucleation. A prolongation of division times was demonstrated in multinucleated cells.

**Key words:** Assisted Reproduction, blastocyst, multinucleation, time-lapse, self-correction.

# **1. Introducción**

## **1.1 La evaluación embrionaria**

El tratamiento de la infertilidad ha cambiado radicalmente nuestra comprensión de los mecanismos reproductivos. Desde la década de 1960, el desarrollo de las técnicas de reproducción asistida (TRA) ha proporcionado una gran cantidad de oportunidades sin precedentes con el fin de observar y estudiar el desarrollo preimplantacional del embrión (1).

La evolución en las técnicas y protocolos de Reproducción Asistida siempre ha ido encaminada a conseguir como fin último un embarazo que culmine en el nacimiento de un bebé sano. En la última década, gracias a las mejoras obtenidas, se ha ido poniendo el foco en el objetivo de lograr este embarazo, pero tratando de evitar los embarazos múltiples, por el riesgo que suponen tanto para la madre como para el bebé. Ahora bien, si es cierto que es importante reducir el número de embriones a transferir, al mismo tiempo no han de disminuir las tasas de embarazo e implantación. Por lo tanto, la clave está en la selección de embriones con alto potencial de implantación. Aunque se han desarrollado muchas técnicas no invasivas para la selección de embriones por su estado metabólico, como la proteómica y la metabolómica, nunca han pasado de la fase experimental y tampoco se han utilizado para aplicaciones clínicas estándar. Por este motivo, la clave parece seguir estando en la observación de características propias del embrión(1).

Durante al menos tres décadas, el embrión humano ha sido examinado visualmente mientras se desarrolla *in vitro*. Esta observación se ha llevado a cabo mediante microscopía de contraste y se considera un tipo de observación estática, ya que ocurre en momentos temporales limitados y concretos. Este paradigma, aunque contempla cierto grado de imperfección como, por ejemplo, la multinucleación de blastómeras o la fragmentación celular moderada, ha superado la prueba de años de observación microscópica estática y sigue siendo válido en la actualidad(1).

Sin embargo, hace aproximadamente una década, la tecnología *time-lapse* (TLT) se introdujo en el laboratorio de Fecundación In Vitro (FIV) e inmediatamente supuso un cambio en el paradigma (1).

En general, los embriones se eligen para la transferencia en función de sus propiedades morfológicas. En las transferencias de día 2 y 3, los embriones se puntúan según parámetros como la división temprana, la tasa de fragmentación y el número de blastómeros. Dicha puntuación se utiliza como representación de la calidad de los embriones desarrollados. Para las transferencias de los días 5 y 6, la puntuación de los blastocistos se realiza basándose en los criterios de puntuación de blastocistos de Gardner (1).

El uso del *time-lapse* ha facilitado en gran medida la evaluación del desarrollo dinámico de los embriones. Durante la obtención de imágenes de *time-lapse*, el desarrollo de los embriones se supervisa durante 24 horas sin que los embriones se saquen de su entorno estable. Con esta tecnología, es posible analizar y observar el momento preciso de las divisiones de los blastómeros y seleccionar embriones con varios marcadores dinámicos durante la evaluación de los embriones. Además, esta evaluación morfológica en intervalos de tiempos permite la repetición de las imágenes (1).

La tecnología *time-lapse* ha mejorado desde entonces de forma efectiva la monitorización del desarrollo embrionario, haciendo que la evaluación visual sea continua y el cultivo de embriones ininterrumpido (Fig.1). Esta nueva tecnología no sólo ha permitido un seguimiento más preciso de hitos del desarrollo previamente conocidos (por ejemplo, la primera división celular), sino que también ha desvelado una gran cantidad de fenómenos que hasta hace poco eran totalmente desconocidos o simplemente imprevistos (1).



Figura 1: Incubador de *time-lapse* MIRI. Figura extraída de Esco Medical (2)

Además, el uso de TLT ha permitido desarrollar nuevas estrategias de selección basadas en el uso de nuevas variables de selección embrionaria, llamadas variables morfocinéticas, y la creación de algoritmos en función del peso de cada una de ellas sobre la variable clínica de

elección (tasa de implantación, tasa de RNV, etc), las cuales permiten una selección muy específica del embrión que presente mayor potencial de éxito (1).

Del mismo modo que el uso de TLT nos ha permitido conocer nuevos fenómenos que tienen lugar durante el desarrollo de los embriones, nos ha ayudado a comprender un poco más a fondo aquellos eventos que, desde los inicios de la investigación en reproducción asistida, se sabe que tienen un efecto negativo sobre la viabilidad del embrión. Sabemos que existen factores propios de la mujer, como son la reserva ovárica, la respuesta a la estimulación hormonal, el índice de masa corporal, su edad, el hábito de fumar, que afectan a su capacidad reproductiva. Al igual que estos, hay, otros externos a ella, como pueden ser los medios de cultivo de los embriones o la atmósfera de incubación que tienen un efecto sobre la viabilidad de los embriones obtenidos en el tratamiento. Y, por último, hay una serie de factores intrínsecos al embrión que hacen que el tratamiento acabe o no en éxito porque condicionan la viabilidad embrionaria, como pueden ser el número de células según el día de desarrollo y su simetría, el grado de fragmentación, la presencia o no de vacuolas o, la presencia de multinucleación en las células. Es este fenómeno el que centra el interés de este trabajo y por ello se explicará de forma detallada a continuación (3).

## **1.2 La multinucleación**

Como norma, los embriones humanos, tienen un solo núcleo por blastómera; sin embargo, en ocasiones las blastómeras presentan más de un núcleo por célula, fenómeno que conocemos como multinucleación. La multinucleación es una anomalía descrita en los embriones desde casi los comienzos de esta área de investigación, tanto *in vivo* como *in vitro*. La presencia de blastómeros multinucleados (MNB) en el embrión que se escinde se ha relacionado a un mal desarrollo embrionario y a resultados adversos de la fecundación *in vitro* (FIV). Según Dr. Jesús Aguilar, Dra. Irene Rubio y más colaboradores (3), se ha informado que la incidencia de MNB varía entre el 15 y el 40% o incidencias un poco mayores que oscilan entre 17 % y 69%.

Muchos investigadores han centrado sus esfuerzos en estudiar cómo y por qué se produce, y se han propuesto varias hipótesis, como por ejemplo el efecto de los reactivos o las condiciones de cultivo, los regímenes de estimulación ovárica subóptimos o la cariocinesis sin citocinesis, como explicaciones a dicha anomalía embrionaria. La multinucleación se ha relacionado con una menor tasa de formación de blastocistos, un aumento de las tasas de aneuploidía y de

anomalías cromosómicas, lo que conduce al caos cromosómico y a una disminución en la tasa de implantación y detención del desarrollo embrionario (3).

Se han llevado a cabo muchos estudios acerca del estado de nucleación de los embriones humanos *in vitro* de dos y cuatro células, con diferentes abordajes: estudio del efecto de la multinucleación en los estadios de dos y cuatro células sobre la tasa de implantación del embrión, la reversibilidad del estado de multinucleación cuando los embriones de dos células multinucleadas alcanzan el estadio de cuatro células, la dinámica de aparición y desaparición de núcleos en los blastómeros y su relación con la implantación del embrión. Además, se ha comparado la duración de la fase S en los dos primeros ciclos celulares del embrión y su correlación con la implantación, mediante el uso de un incubador provisto de un sistema TLM (3). Es evidente, que pese a ser un fenómeno conocido en los laboratorios desde los comienzos del estudio de la Embriología, hoy en día su estudio sigue vigente y los mecanismos que lo rigen permanecen sin ser del todo claros. Es en este aspecto donde el uso de la tecnología *time-lapse* nos puede ayudar a conocer un poco más este evento (4).

Estos datos sugieren que los embriones de dos células multinucleados podrían ser capaces de autocorregir las anomalías nucleares, aunque aún no sabemos cómo lo consiguen. Como apunte, dicho mecanismo de autocorrección se ha visto en embriones tanto euploides como aneuploides, por lo que no sería útil como indicador de normalidad cromosómica (4).

Con anterioridad a la aparición de las técnicas de *time-lapse*, la multinucleación se evaluaba únicamente cuando se detectaba durante el control del embrión al microscopio en un intervalo de tiempo bastante limitado, y también se desconocía si se producía en cualquier otro momento del desarrollo embrionario. Sin embargo, gracias a los sistemas TL hemos visto que la multinucleación puede producirse en distintos momentos del periodo de desarrollo y puede desaparecer en muy poco tiempo. Es por ello por lo que, el *time-lapse* puede considerarse como la técnica óptima y muy eficaz para visualizar la multinucleación en cualquier momento (4).

En los últimos años, con la aplicación de los sistemas de monitorización de *time-lapse*, se han podido identificar más embriones MNB. Sin embargo, la mayoría de estos informes no identificaban embriones en los tiempos de evaluación embrionaria consensuados por ESHRE/ALPHA, lo que indica que la incidencia real puede ser mayor (5).

Actualmente, el mecanismo que origina la multinucleación no está claro. Hay investigadores que encontraron mayores tasas de multinucleación en los ciclos con niveles de E2 más altos y un mayor número de ovocitos recuperados y concluyeron que la multinucleación en embriones fecundados correctamente está relacionada con una respuesta acelerada de inducción de la ovulación (5).

Otros investigadores descubrieron que las tasas de multinucleación embrionaria aumentan cuando se emplean ovocitos madurados *in vitro* en lugar de ovocitos madurados *in vivo*. También se ha descubierto una mayor incidencia de embriones MNB con el uso de agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina, la infertilidad por factor masculino y en ciclos con mayor número de ovocitos recuperados (5).

Los polimorfismos cromosómicos son las variantes en la región de la heterocromatina cromosómica, se producen en la heterocromatina paracéntrica de los brazos largos de los cromosomas 1, 9 y 16, las regiones de los brazos cortos de los cromosomas del grupo D y G, y la heterocromatina distal del cromosoma Y. Dichos polimorfismos se consideran generalmente cariotipos normales. Por otra parte, cada vez hay más estudios que afirman que los polimorfismos cromosómicos pueden estar asociados a ciertos problemas clínicos, como la infertilidad, la espermatogénesis anormal y los abortos espontáneos recurrentes. Varios estudios recientes han descubierto que las variantes polimórficas cromosómicas se asocian a un incremento de la tasa de anomalías cromosómicas entre los blastómeros en la fase de división. Por lo tanto, existen hipótesis de que las parejas con polimorfismos cromosómicos podrían experimentar una mayor tasa de multinucleación embrionaria (5).

Hoy en día, además de estudiar en qué consiste la multinucleación, también se han llevado a cabo varios estudios con el fin de conocer cuales son los factores internos y externos que podrían llevar a cabo la aparición de estas anomalías cromosómicas.

### **1.3 Factores y características morfológicas relacionadas con la aparición de la multinucleación**

De entre los posibles factores que puedan causar o contribuir en la aparición de células multinucleadas, se barajan diferentes grupos (6):

- Factores relacionados con la estimulación y recuperación ovocitaria:
  - Protocolos de estimulación ovárica
  - Maduración ovocitaria
- Factores relacionados con el cultivo embrionario
  - Medios de cultivo
  - Temperatura
- Factores intrínsecos de los gametos/embriones
  - Fragmentación
  - Patrón pronuclear

En este apartado vamos a tratar de profundizar un poco más sobre cada uno de ellos para ver el peso que pueden tener sobre la aparición de este fenómeno.

### 1.3.1 Influencia de la estimulación sobre la multinucleación

Actualmente, según las investigadoras Laura Hortal y Maria José de los Santos (6), varios trabajos han mostrado que el tipo de estimulación ovárica podría influir en la aparición de blastómeras multinucleadas en los embriones. Su aparición parece estar asociada con ciclos de estimulación ovárica en los cuales los ovarios responden de manera masiva por una alta sensibilidad a la terapia con gonadotropinas. Según estas autoras, en un estudio de carácter retrospectivo llevado a cabo por Van Royen y publicado en el 2003 (7), se analizaron diferentes parámetros dentro de la estimulación que podrían estar influyendo en la aparición de la MN.

Tras el análisis de los resultados se comprobó que la dosis de gonadotropina utilizada y el número de ovocitos recuperados estaban correlacionados con la aparición de multinucleación. Concretamente, los ciclos en los que se obtuvieron 9 ovocitos o menos, presentaron embriones con menor número de multinucleaciones que cuando se obtuvieron 10 o más ovocitos por punción (29,7% vs 34,5%). Las estimulaciones que necesitaron una gran dosis de gonadotropinas también estuvieron relacionadas con un incremento en la multinucleación ( $\geq$  2400 UI, 34,6%;  $<$  2400 UI, 32,0) (6).

En otro estudio retrospectivo, teniendo en cuenta sólo la dosis de FSH utilizada, no pareció observarse una mayor presencia de multinucleación. Sin embargo, sí que se pudo detectar un aumento de la incidencia de este fenómeno en aquellos ciclos con dosis de FSH por encima de 2400 UI y en los que se recuperaban más de 10 ovocitos (6).

Según estas autoras (6), existen otras de las variables asociadas a la estimulación, como por ejemplo el tipo de supresión hipofisaria, también se ha comprobado que podría tener repercusión en la multinucleación. En un estudio realizado por De Cassia Savio y publicado en el año 2010 (8), se encontraron diferencias que podrían influir en el aumento de la multinucleación. Los resultados mostraron cómo la supresión con agonistas de la GnRH daba lugar a embriones con mayores tasas de multinucleación, en comparación con el uso de antagonistas (33,6% vs 28,3%,  $p=0,046$ ). Los autores de esta investigación consideraron que la selección de folículos con agonistas era menos exigente, derivando en una mayor recuperación de ovocitos, pero en la obtención de menores tasas de embarazo a partir de embriones con multinucleación (6).

### 1.3.2 Consecuencia de la maduración incompleta de ovocitos

Los estudios basados en el análisis de ovocitos madurados *in vitro* han aportado datos relevantes acerca de la influencia que tiene este proceso a la hora de inducir un alto grado de anomalías pronucleares y en la aparición de embriones multinucleados. En uno de los estudios realizados por Balakier y más investigadores, los ovocitos que se recuperaron en la tapa madurativa de metafase II (MII) formaron el grupo control, mientras que el otro grupo lo constituyeron ovocitos en metafase I (MI) sometidos a cultivo hasta alcanzar la fase de MII. Todos los ovocitos fueron fecundados mediante ICSI y analizados posteriormente. En la obtención de los resultados, se pudieron observar diferencias significativas con respecto a la presencia de multinucleaciones en ambos grupos, siendo casi el doble en los embriones derivados de ovocitos madurados *in vitro* de MI a MII que en el grupo control (23% vs 13%;  $P < 0,0001$ ) (6).

Los autores explicaron como posible razón la falta de maduración del citoplasma y cómo esta deficiencia podría no ser solucionada por el espermatozoide, lo que daría lugar a defectos en el huso mitótico durante la división. Esto afectaría al óptimo desarrollo embrionario y también podría explicar la baja tasa de implantación de estos embriones (6).

### 1.3.3 Correlación entre las condiciones de cultivo y la multinucleación

Mantener una viabilidad embrionaria óptima durante el cultivo *in vitro* humano es de importancia clave con el fin de conseguir el éxito de los tratamientos de reproducción asistida. A pesar de que los medios de cultivo constituyen sólo uno de los componentes de las

condiciones *in vitro*, su interacción con el entorno tiene un gran impacto en el rendimiento total del ciclo (9).

Se ha comprobado en distintos estudios que los embriones humanos están expuestos a un estrés constante en condiciones *in vitro*, debido a que ninguno de los medios de cultivo imita totalmente el entorno *in vivo*. Aún así, hoy en día la formulación de los medios de cultivo ha alcanzado unos niveles de calidad muy altos. Con el objetivo de establecer un entorno de cultivo *in vitro* con un efecto mínimo de daño o alteración en el desarrollo del embrión, existen dos opiniones sobre cómo ha de ser la composición ideal de los medios (9).

Según la opción de "vuelta a la naturaleza", el sistema de cultivo necesita satisfacer las exigencias de los embriones con el fin de simular su paso de las trompas de Falopio al útero. Durante este proceso, la fisiología del embrión cambia antes y después de la compactación, es por ello, por lo que los ingredientes de los medios difieren en un sistema secuencial (9).

La otra opción "dejar que el embrión elija", se utiliza el uso simultáneo de toda la concentración en una mezcla (medio de cultivo único) con la suposición de que el embrión utilizará lo que realmente necesite (9).

La predicción de la eficacia de los sistemas de cultivo requiere análisis comparativos en los que se haya minimizado el impacto de las variables de confusión, como las características de la paciente, los gametos y el ciclo en el desarrollo embrionario. También se recomienda emplear una sola marca de medios de cultivo, especialmente durante un cultivo prolongado, debido a que, en condiciones similares, la reacción de los distintos medios con el entorno *in vitro* es diferente en función de sus diversos ingredientes, lo que provoca un estrés homeostático, principalmente en el momento de la fecundación y un impacto posterior en los embriones que puede interferir con el resultado final del embarazo y la salud del feto (9).

Otro factor asociado con la formación de la multinucleación son las posibles variaciones de temperatura o condiciones subóptimas que se puedan producir durante el cultivo embrionario, así como la falta de componentes moleculares que darán lugar a la división citoplasmática. Esto podría tener un grave efecto en las funciones del citoesqueleto, provocando divisiones celulares anómalas.

Además de los factores externos, que hemos mencionado también existen otros factores internos que podrían ser desencadenantes de la aparición de multinucleación durante el desarrollo embrionario.

#### 1.3.4 Influencia de la fragmentación celular

Al parecer, la presencia de multinucleación presenta cierta asociación con otras variables de carácter morfológico; en este sentido se ha estudiado una mayor incidencia de multinucleaciones en embriones con una alta fragmentación, por ejemplo (Fig.2). En un estudio se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grados de fragmentación y el empeoramiento de la multinucleación. Los grados de fragmentación fueron definidos dependiendo del porcentaje de fragmentos anucleados existentes en cada embrión (F1:  $\leq 10\%$ ; F2: 10-20%; F3: 20-30%). Pues bien, los embriones con un menor grado de fragmentación (F1) presentaban menor porcentaje de multinucleación que los embriones con fragmentaciones tipo 2 (F2) o tipo 3 (F3). Esto podría explicarse por una dificultad de observación debida a la existencia de gran cantidad de fragmentos (6).

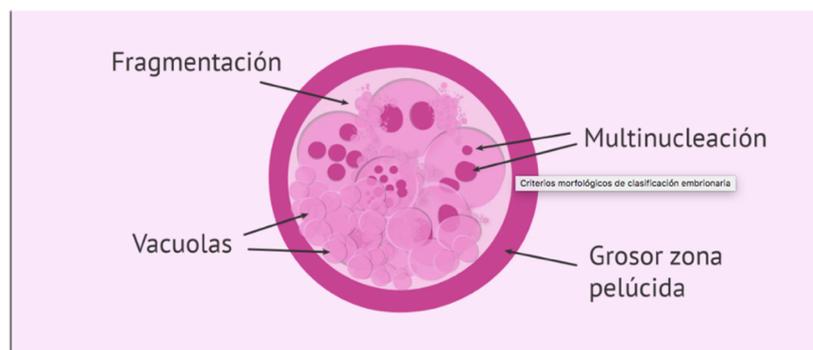


Figura 2: Embrión multinucleado con fragmentación. Figura extraída de Babygest (10).

En otro estudio realizado acerca de la fragmentación, se pudo comprobar que la tasa de implantación para embriones con un porcentaje de fragmentación mayor o igual al 20%, y que además presentaban multinucleación, fue menor o igual al 3% (6).

#### 1.3.5 Correlación con el patrón pronuclear

Otro parámetro relacionado con la multinucleación es el llamado *score pronuclear*. Consiste en el análisis de la morfología pronuclear del cigoto y también la determinación del número y distribución de los cuerpos precursores nucleolares (del inglés, nuclear polar bodies: NPB). Es empleado en la valoración de la calidad embrionaria. Su relación con la multinucleación fue

evaluada en un estudio realizado por Pilar Gámiz, Carmen Rubio y más colaboradores con embriones de día 2 y día 3. En este estudio se registró la morfología de la PN en un total de 888 cigotos y se clasificaron según el tamaño de la PN similar/diferentes grupos, grupo A (n= 816) y B (n=72) y el número, distribución y sincronía de los cuerpos precursores nucleolares (NPB)(6).

En pacientes inferiores o iguales a 37 años, los cigotos con PN de tamaño similar y NPB polarizado presentan el mejor pronóstico en función del desarrollo embrionario y la incidencia de anomalías cromosómicas, mientras que, en pacientes mayores de 37 años, esta correlación no está presente (11).

Las tasas de multinucleación obtenidas fueron similares en embriones de día 2. Sin embargo, su porcentaje se duplicó cuando se observaron en embriones de día 3 procedentes de cigotos con diferente tamaño pronuclear frente a embriones con el mismo tamaño de pronúcleos, pasando del 5,4% al 10,9% (11).

Los tamaños desiguales en los pronúcleos, y que presenten grandes distancias entre ellos, están relacionados con elevadas incidencias en la multinucleación y con bajas tasas de desarrollo embrionario (6).

Como se ha podido comprobar en los estudios citados anteriormente, existen muchos factores como por ejemplo el patrón nuclear, el grado de fragmentación celular, las condiciones de cultivo, la maduración ovocitaria incompleta y el tipo de estimulación, los cuales pueden afectar directamente a la calidad del desarrollo embrionario y por tanto pueden influir sobre la viabilidad de los embriones y también reducir el potencial de implantación embrionaria.

#### **1.4 Viabilidad de embriones multinucleados e influencia en la capacidad de implantación**

Comprobada la asociación de la multinucleación con anomalías cromosómicas, así como su asociación con los tiempos de división o la elevada tasa de fragmentación y la asimetría, es de esperar que los embriones multinucleados presenten un menor potencial biológico (6).

Existen diversos estudios que indican la obtención de tasas de implantación más altas realizando transferencias de embriones sin multinucleación (15% vs 5%;  $P=0,042$ ). Otros autores han encontrado una mejora en las tasas de implantación cuando las transferencias son realizadas sólo con embriones mononucleados a cuando éstas son mixtas (mononucleadas y multinucleadas), (11,3% - 6%;  $P= 0.003$ ). Aunque la tasa de implantación fue mayor en las transferencias mononucleadas (19%) que en las mixtas (15,8%), las diferencias no fueron estadísticamente significativas (6).

A pesar de la influencia que tiene la multinucleación sobre la implantación, hay otros parámetros, como el número de blastómeras que conforma un embrión, que influyen en mayor medida que la presencia de multinucleaciones (6).

Conociendo la repercusión que la multinucleación produce sobre el patrón de división, la aparición de aneuploidías y las tasas de implantación, es lógico que dichos embriones no se empleen para realizar transferencias, a no ser que no haya otros embriones para elegir (6).

Con el ánimo de conocer un poco más la influencia de la multinucleación en los estadios más tempranos de desarrollo, su aparición y desaparición e influencia, es por lo que hemos decidido realizar este estudio con el fin de estudiar hasta que punto la multinucleación puede influenciar en el desarrollo de los embriones y en qué estadio celular aparecen las multinucleaciones con mayor frecuencia.

## **2. Objetivos**

Objetivo principal: determinar si la multinucleación en estadios tempranos tiene algún efecto sobre el desarrollo embrionario, en concreto, la posibilidad de alcanzar la etapa de blastocisto. Encontrar una relación entre el tipo de multinucleación y esa posibilidad.

Objetivos secundarios:

- Encontrar una relación entre el tipo de multinucleación en la etapa de dos y de cuatro células.
- Determinar si algún patrón de multinucleación normalmente se restablece en la etapa de cuatro células.
- Determinar si algún patrón de multinucleación nunca se restaura en la etapa de cuatro células.
- Encontrar una relación entre el tipo de multinucleación y los parámetros morfocinéticos de dos células.

### **3. Materiales y métodos**

#### 3.1 Población de estudio

Se realizó un estudio multicéntrico retrospectivo observacional del periodo 2017-2021, en el cual se estudiaron pacientes que presentaban diagnósticos que influían en la calidad ovárica, tales como baja reserva ovárica, obstrucción tubárica bilateral, síndrome de ovario poliquístico, edad. Este estudio titulado “Multinucleación en estadio de dos células ¿hay algún patrón de corrección?” fue aprobado el 29 de noviembre del 2018 por el CEIm del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia y fue aprobado por la Universidad Europea de Madrid con código CIPI/22.225 el 22 de junio de 2022.

A estas pacientes se les realizaron ciclos de estimulación ovárica con protocolos de antagonistas de la gonadotropina (GnRH) para controlar su función ovárica. Estos antagonistas de la GnRH son fármacos pertenecientes al grupo de los análogos de la hormona liberadora de GnRH, los cuales se utilizan en la estimulación ovárica de los tratamientos de reproducción asistida (inseminación artificial, fecundación in vitro e ICSI). Se emplearon distintas dosis de FSH y LH para las pacientes. En este proyecto se incluyeron 28 pacientes, con un total de 195 embriones analizados.

#### 3.2 Incubadora de *time-lapse* MIRI® TL6

El estudio de estos embriones se llevó a cabo en la incubadora de *time-lapse* MIRI® TL6 que hay en el laboratorio de embriología del Hospital General Universitario de Valencia. La incubadora de *time-lapse* MIRI® TL6 es una incubadora con múltiples compartimentos que presenta una cámara y un microscopio integrados (Fig.3). Dicha incubadora proporciona imágenes de *time-lapse* de alta calidad de embriones que se desarrollan en "tiempo real" sin tener que retirar los embriones de la seguridad de la cámara de incubación para inspección manual.



Figura 3: Incubadora de *time-lapse* MIRI® TL6. Imagen extraída de Esco Medical (2)

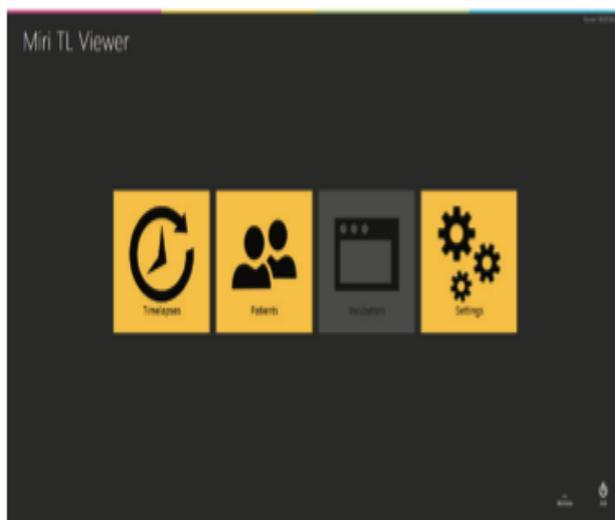
La monitorización de embriones con *time-lapse* proporciona una gran cantidad de información acerca de procesos morfocinéticos que tienen lugar a lo largo del desarrollo embrionario. Dichos acontecimientos morfocinéticos no se pueden visualizar en la evaluación microscópica puntual de rutina.

Esta nueva tecnología permite observar todos los eventos que se producen durante el desarrollo embrionario, ayudando a identificar embriones sanos con mayor probabilidad para implantar con el fin de conseguir mayores tasas de embarazo. Las sesiones de *time-lapse* se ejecutan hasta 199 horas y un video se puede generar como imágenes y se almacena digitalmente en múltiples planos focales. Además, el análisis retrospectivo de datos se puede utilizar como referencia, intercambio de conocimientos y capacitación para los embriólogos.

Con relación al ambiente de incubación superior, existen un total de 12 sondas completamente separadas que aseguran la estabilidad de la temperatura constante. También hay una recuperación rápida de temperatura y gas con el fin de garantizar la estabilidad óptima del medio ambiente. Además, no se requiere gas premezclado y el consumo total de gas es muy bajo.

Respecto al registro de datos (Fig.4):

La vista principal muestra cuatro botones:



- Lapsos de tiempo: una lista de sesiones de *time-lapse* pendientes, en curso y pasadas.
- Pacientes: base de datos de los pacientes.
- Incubadoras: ver incubadoras Miri ® TL6 conectadas
- Configuración: cualquier anotación y parámetros ideales de sincronización personalizados.

Figura 4: Registro de datos en la incubadora de *time-lapse* MIRI® TL6. Imagen extraída de Esco Medical (12).

Cuando la evaluación embrionaria y la comparación hayan sido completadas, los embriones pueden asignarse con colores distintos destinos, como, por ejemplo: transferencia, congelación, mantener embrión en observación y no viable para transferir (Fig.5).

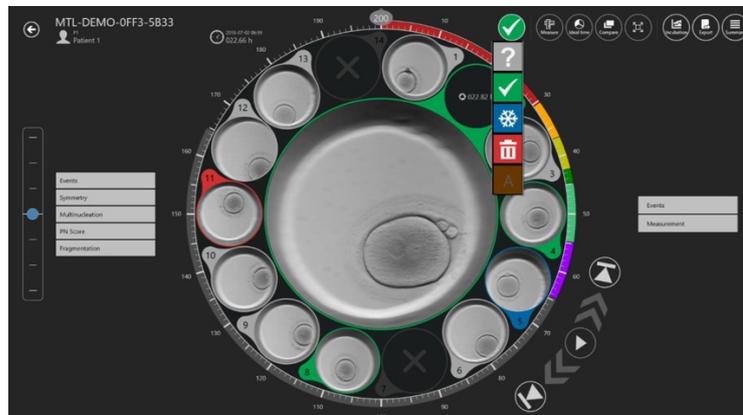


Figura 5: Elección del destino de embriones en la incubadora de *time-lapse* MIRI® TL6. Imagen modificada de Esco Medical (12).

### 3.3 Uso de la incubadora *time-lapse* MIRI® TL6 en el proyecto de investigación

Durante este estudio, creamos una base de datos con los embriones obtenidos por las pacientes sometidas a tratamientos de fecundación *in vitro* en el Hospital General Universitario de Valencia, y durante la visualización de los distintos desarrollos embrionarios, se fue incluyendo en la base de datos la información detalla acerca de los distintos los parámetros morfocinéticos como (Tabla 1), por ejemplo:

Tabla 1: Parámetros morfocinéticos en el desarrollo embrionario.

<b>Parámetros morfocinéticos</b>
Aparición y desaparición de los pronúcleos ( <i>fading</i> ).
Tiempos de división en el desarrollo embrionario desde T2 hasta T8.
Número y forma de los núcleos que presentan las blastómeras.
Aparición y <i>fading</i> de los núcleos de las blastómeras.
Número de células en día 2 y 3.
Estadio específico en día 2 y 3.
Grado de fragmentación en día 2 y 3 (0-50%).
<i>Embryo rolling</i> en día 2 y día 3.
Tipo de división irregular en día 2 o 3 en el caso en el que la haya: tricotómica, planar, rápida y fusión.
Tiempo en el que comienza a formarse el blastocisto (tsB).
Tiempo en el que se forma el blastocisto (tB)
Grado de expansión del blastocisto
Calidad del trofoectodermo y de la masa celular interna

También se indicó el destino final de dichos embriones (Tabla 2):

Tabla 2: Posibles destinos del embrión observados en la incubadora *time-lapse* MIRI® TL6.

Destino del embrión
Transferido
Congelado
No viable
Descartado

En el proyecto de investigación, con el fin de analizar las multinucleaciones durante el desarrollo embrionario, se analizaron en primer lugar los acontecimientos morfocinéticos que ocurrían en las dos blastómeras después de la división celular. A una de las blastómeras se le denominó como B1 y a la otra B2 (Fig.6).

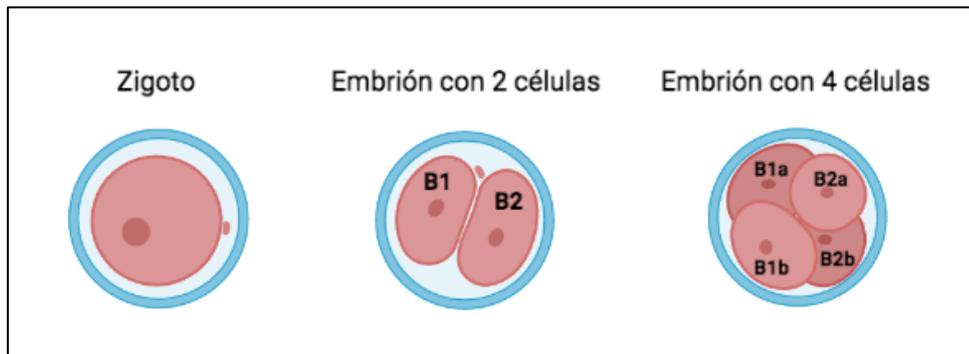


Figura 6: Evolución del embrión con sus respectivas blastómeras. Figura creada en BioRender.

En segundo lugar, cuando se producían la tercera y la cuarta división celular, se analizaron también los acontecimientos morfocinéticos que ocurrían en las cuatro blastómeras después de dichas divisiones celulares. A las blastómeras procedentes de B1 se les denominaron B1a y B1b; y a las blastómeras procedentes de B2 se les denominaron B2a y B2b respectivamente (Fig.6).

Cuando aparecían los núcleos de cada una de las blastómeras se anotaban tanto el número de núcleos como su tamaño (*even*/parecidos de tamaño o *uneven*/distintos tamaños). En el caso en el que dicha blastómera presentase más de dos núcleos se indicaría como multinucleación.

## 4. Resultados

### 4.1 Resultados de los embriones no fecundados y fecundados

De los 195 ovocitos incluidos en el estudio, se obtuvieron un total de 67 ovocitos no fecundados y 128 ovocitos fecundados (tasa de fecundación global del 65,6%); finalmente, se analizaron los 108 ovocitos fecundados que presentaron desarrollo embrionario, excluyéndose del estudio 20 ovocitos fecundados que no progresaron. Del total de ovocitos fecundados, fueron 85 los que llegaron a formar blastocisto (66,4%).

Cabe destacar que, del total de embriones analizados en este estudio, 10 embriones fueron transferidos positivamente y 36 embriones fueron congelados.

### 4.2 Resultados de las multinucleaciones en B1, B2, B1a, B1b, B2a y B2b

En relación con las multinucleaciones que se analizaron en B1, se encontraron un total de 23 embriones con multinucleación en B1, de los cuales el 9% de ellos se transfirieron con éxito (transferencia positiva o embarazo), otro 9% se transfirieron sin éxito (transferencia negativa o ausencia de embarazo), el 56% fueron inviábiles para transferir y el 26% de los embriones con esta multinucleación se congelaron (Fig.7).

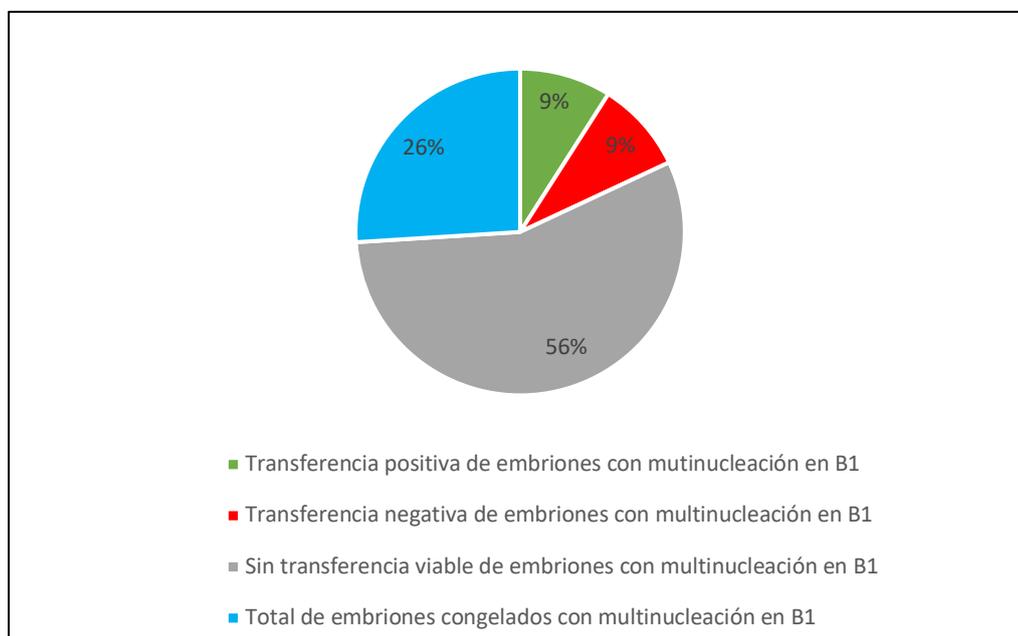


Figura 7: Viabilidad de embriones con multinucleación en B1.

En relación con las multinucleaciones que se analizaron en B2, se obtuvieron un total de 19 embriones con multinucleación, de los cuales el 5% se transfirieron con éxito, otro 16% se transfirieron sin éxito, el 47% fueron inviábiles para transferir y el 32% de los embriones restantes con esta multinucleación se congelaron (Fig.8).

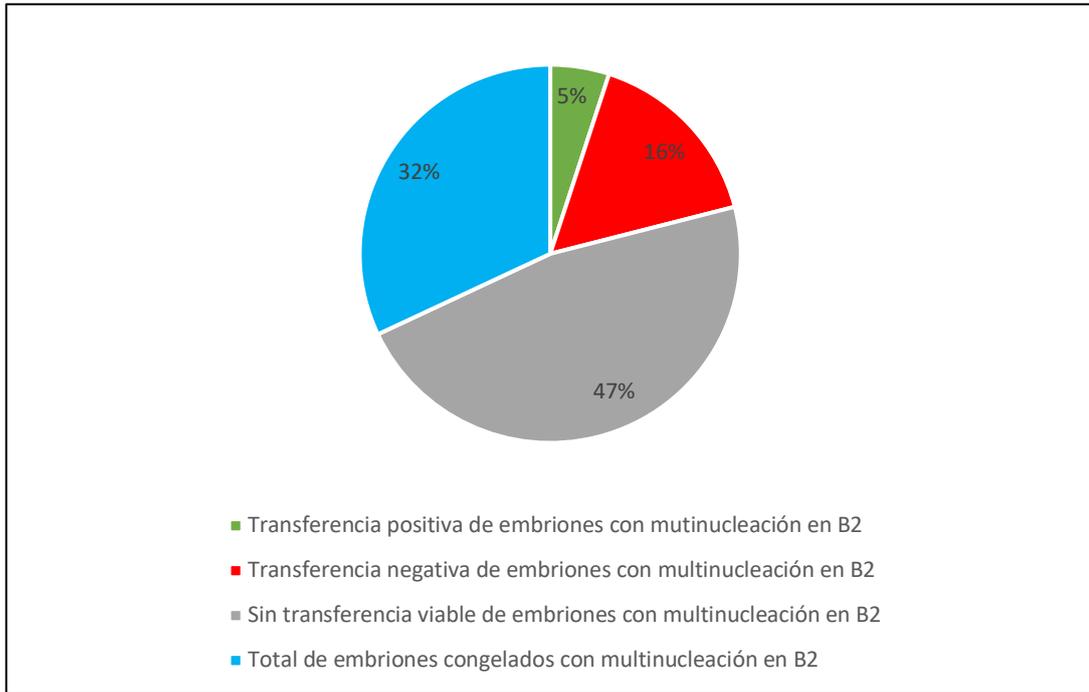


Figura 8: Viabilidad de embriones con multinucleación en B2.

En relación con las células multinucleadas que se analizaron en B1a, se obtuvieron un total de 2 embriones con multinucleación, de los cuales 1 embrión fue transferido positivamente (50%) y el otro no fue viable (50%).

En cuanto a la multinucleación en B1b, se obtuvieron un total de 5 embriones, de los cuales el 20% de ellos se transfirieron con éxito, el 60% fueron inviables para transferir y el 20% de los embriones restantes se congelaron (Fig.9).

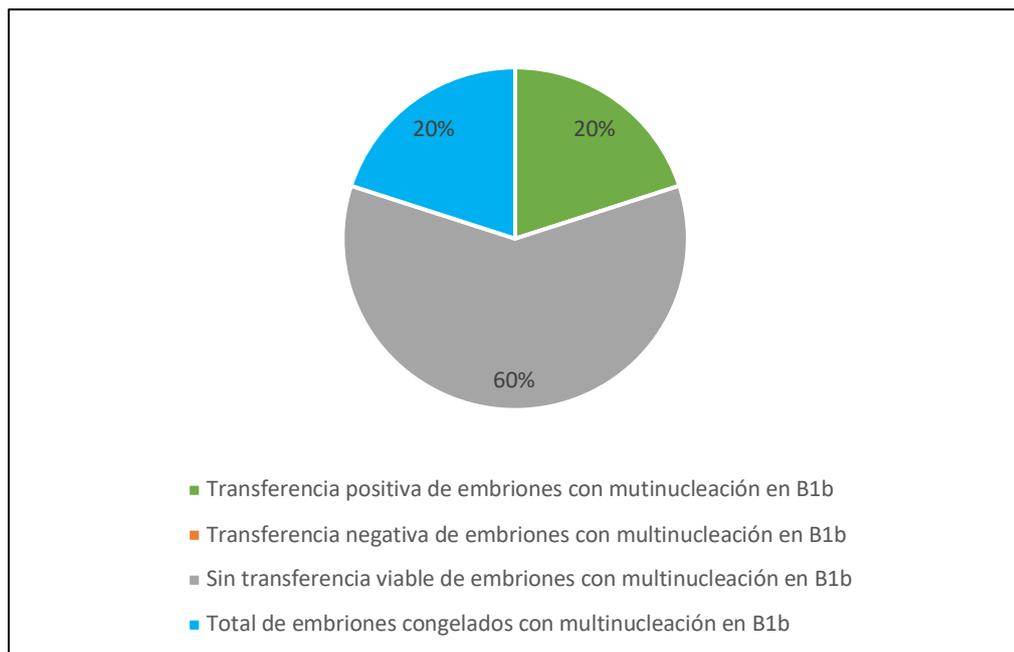


Figura 9: Viabilidad de embriones con multinucleación en B1b.

En relación con las multinucleaciones que se analizaron en B2a, se obtuvo un total de 5 embriones con multinucleaciones en B2a, el 100% de estos embriones fueron inviábiles para transferir.

Respecto a las multinucleaciones que se analizaron en B2b, se obtuvo un total de 1 embrión con multinucleaciones en B2b, el cual se trasfirió positivamente (100%).

#### 4.3 Resultados de la formación y no formación de blastocisto con las multinucleaciones

En el estudio realizado acerca de la formación de blastocisto y la presencia de multinucleación, se obtuvo un total de 108 muestras fecundadas, de las cuales 85 embriones si que llegaron a formar blastocisto (78,7%) y un total de 23 embriones no llegaron a formar blastocisto (21,3%) (Fig.10).

En relación con las muestras que formaron blastocistos (78,7%), el 50% no presentaban multinucleación y el 28,7% si que la presentaban (Fig.10).

Por otra parte, el 21,3% de las muestras no dieron lugar a la formación de blastocisto, de las cuales el 12% no presentaban multinucleación y el 9,3% si que la presentaban (Fig.10).

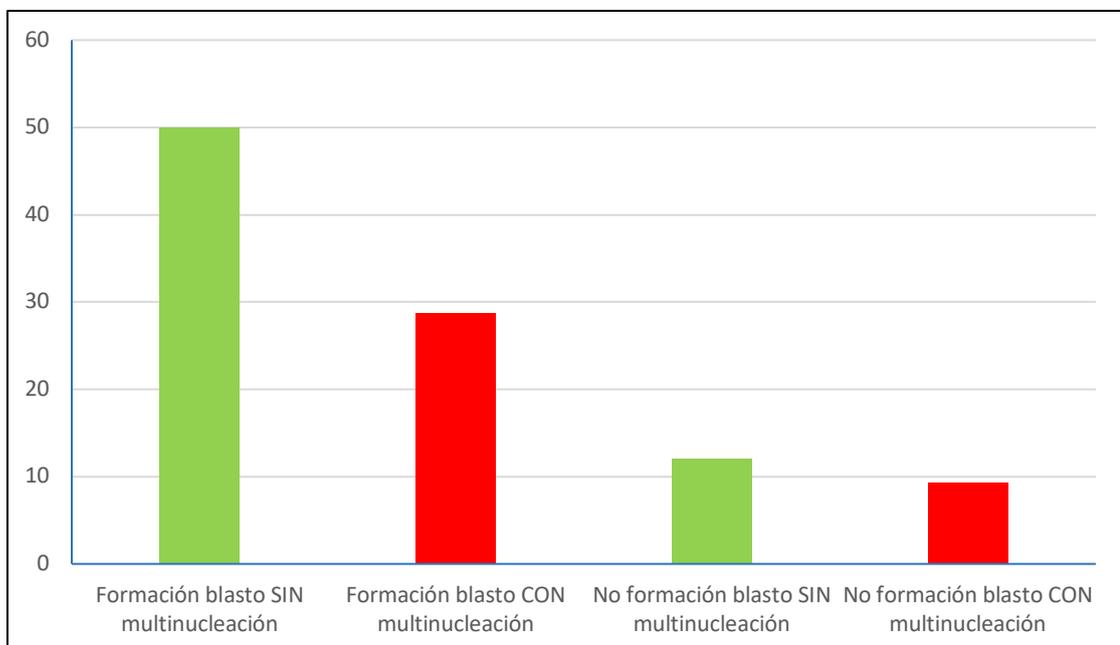


Figura 10: Correlación entre la formación de blastocistos y las multinucleaciones (%).

#### 4.4 Resultados de la incidencia de la multinucleación en los tiempos de división T2-T8

Además, se realizó las medias de los distintos tiempos de división embrionaria con respecto a los embriones que presentaban o no multinucleaciones (Fig.11 y tabla 3). En la siguiente tabla se puede observar las diferencias en los tiempos de división:

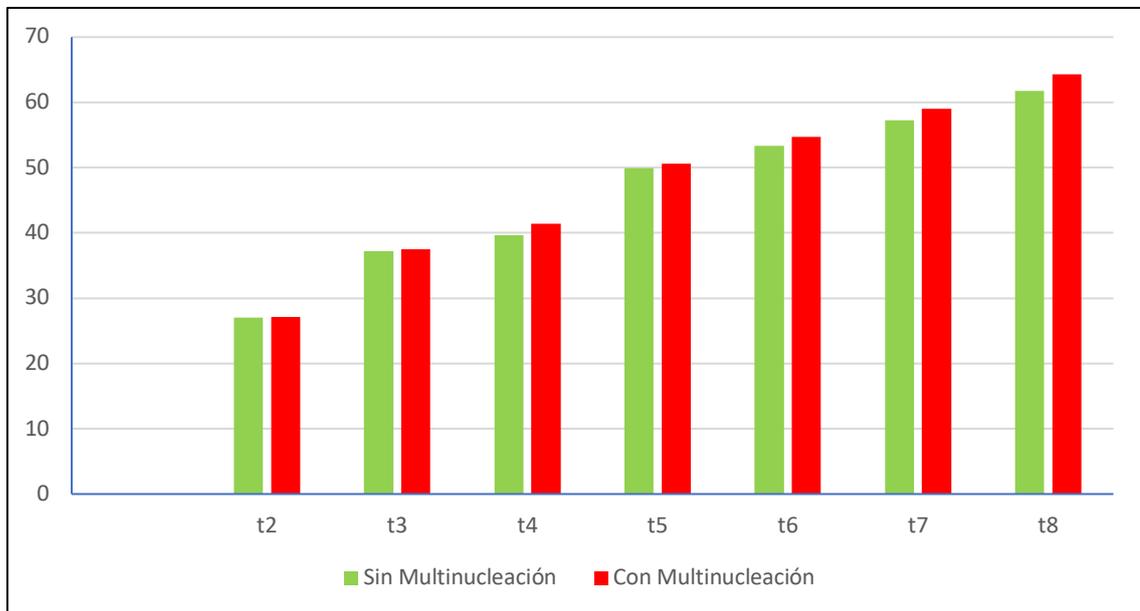


Figura 11: Correlación entre tiempo de división y multinucleación (horas).

Tabla 3: Tiempos de división embrionaria (con y sin multinucleación).

	t2	t3	t4	t5	t6	t7	t8
Sin Multinucleación	27h	37h 23'	40h 08'	50h 34'	53h 3'	57h 28'	62h 11'
Con Multinucleación	27h 13'	37h 47'	41h 38'	51h 02'	55h 13'	59h 03'	64h 34'

#### 4.5 Correlación entre la multinucleación, los tiempos de división y viabilidad embrionaria

En este estudio se comparó la diferencia en los tiempos de división en función de la presencia o ausencia de multinucleaciones y la viabilidad embrionaria.

En relación con los tiempos de división en T2 (Fig.12), se obtuvo una media de los tiempos de división en los embriones sin multinucleación y con transferencia positiva de 27h, una media de los tiempos de división en los embriones sin multinucleación y con transferencia negativa de 27h 32'.

Respecto a los embriones con multinucleación, se obtuvo una media de los tiempos de división en los embriones con multinucleación y transferencia positiva de 27h 38' y una media de los tiempos de división en los embriones con multinucleación y transferencia negativa de 29h 15'.

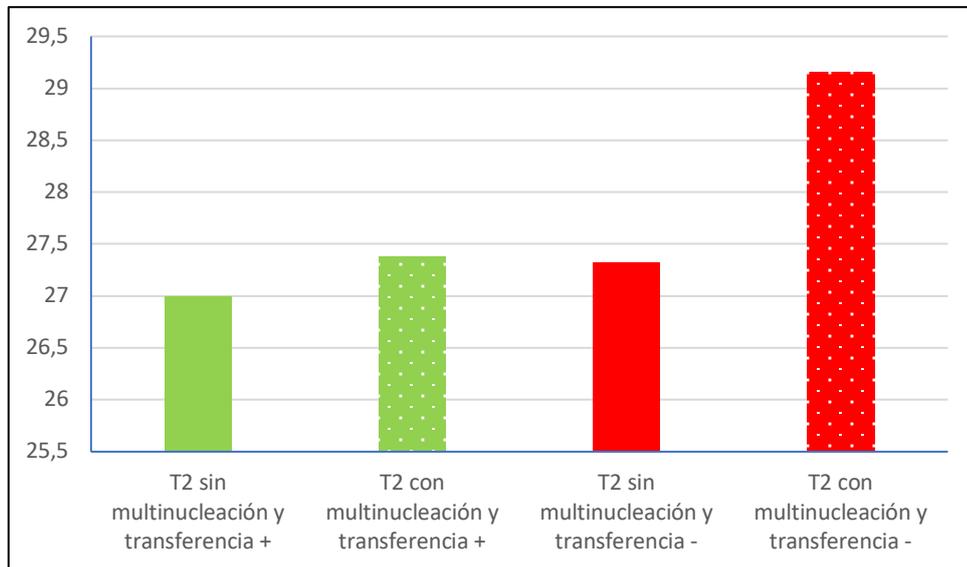


Figura 12: Correlación entre la multinucleación, tiempo de división en T2 y viabilidad embrionaria (horas).

En relación con los tiempos de división en T3 (Fig.13), se obtuvo una media de los tiempos de división en los embriones sin multinucleación y con transferencia positiva de 39h 21', una media de los tiempos de división en los embriones sin multinucleación y con transferencia negativa de 39h 24'. Respecto a los embriones con multinucleación, se obtuvo una media de los tiempos de división en los embriones con multinucleación y transferencia positiva de 36h 50' y una media de los tiempos de división en los embriones con multinucleación y transferencia negativa de 37h 03'.

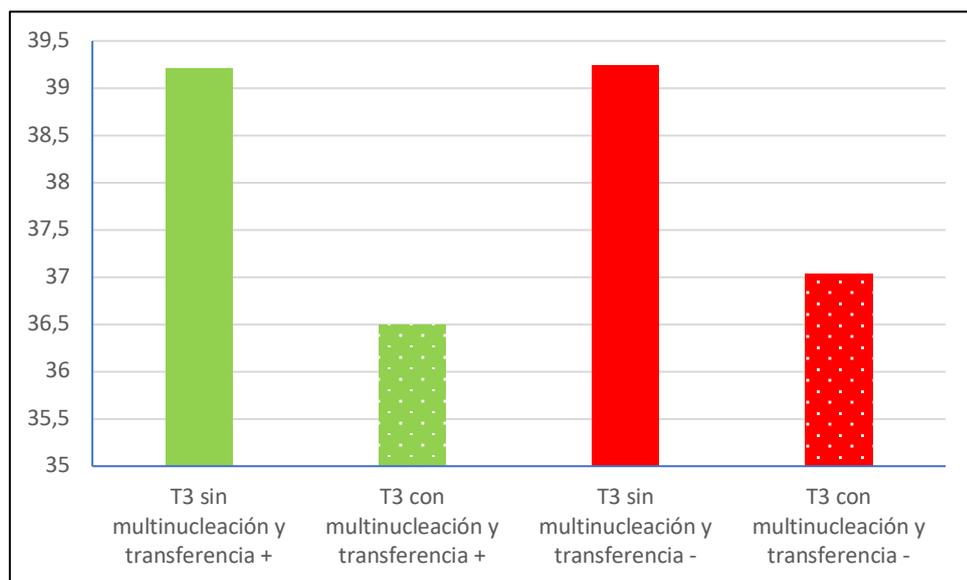


Figura 13: Correlación entre la multinucleación, tiempo de división en T3 y viabilidad embrionaria (horas).

En relación con los tiempos de división en T4 (Fig.14), se obtuvo una media de los tiempos de división en los embriones sin multinucleación y con transferencia positiva de 39h 45', una media de los tiempos de división en los embriones sin multinucleación y con transferencia negativa de 40h 09'. Respecto a los embriones con multinucleación, se obtuvo una media de los tiempos de división en los embriones con multinucleación y transferencia positiva de 39h 41' y una media de los tiempos de división en los embriones con multinucleación y transferencia negativa de 40h 38'.

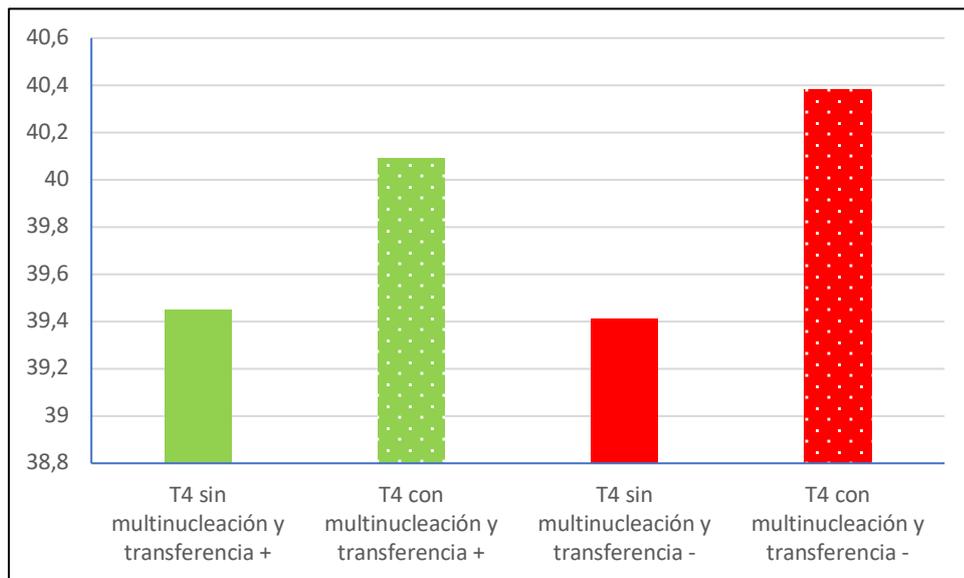


Figura 14: Correlación entre la multinucleación, tiempo de división en T4 y viabilidad embrionaria (horas).

En relación con los tiempos de división en T5 (Fig.15), se obtuvo una media de los tiempos de división en los embriones sin multinucleación y con transferencia positiva de 51h, una media de los tiempos de división en los embriones sin multinucleación y con transferencia negativa de 52h 56'. Respecto a los embriones con multinucleación, se obtuvo una media de los tiempos de división en los embriones con multinucleación y transferencia positiva de 51h 34' y una media de los tiempos de división en los embriones con multinucleación y transferencia negativa de 49h 20'.

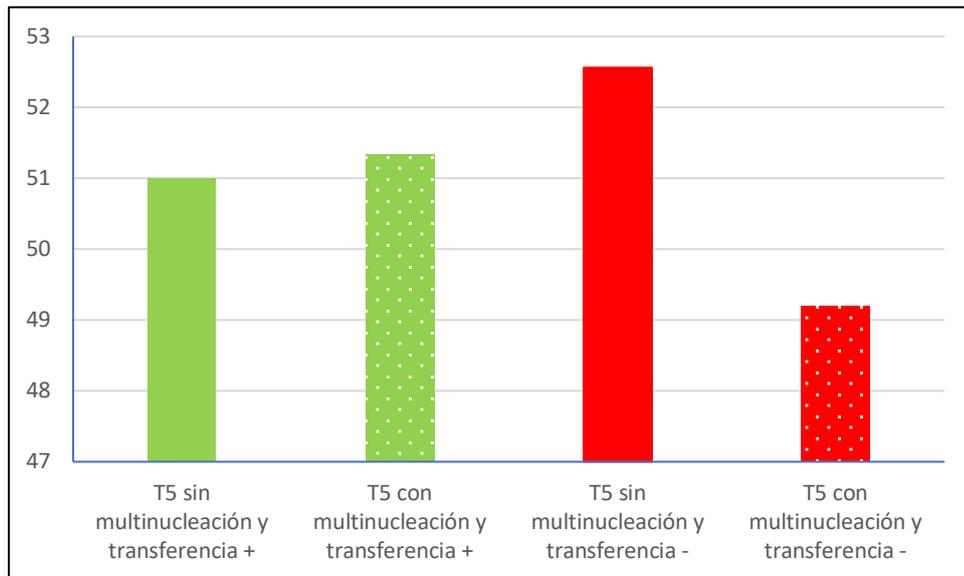


Figura 15: Correlación entre la multinucleación, tiempo de división en T5 y viabilidad embrionaria (horas).

En relación con los tiempos de división en T6 (Fig.16), se obtuvo una media de los tiempos de división en los embriones sin multinucleación y con transferencia positiva de 55h 08', una media de los tiempos de división en los embriones sin multinucleación y con transferencia negativa de 54h 13'. Respecto a los embriones con multinucleación, se obtuvo una media de los tiempos de división en los embriones con multinucleación y transferencia positiva de 52h 52' y una media de los tiempos de división en los embriones con multinucleación y transferencia negativa de 54h 45'.

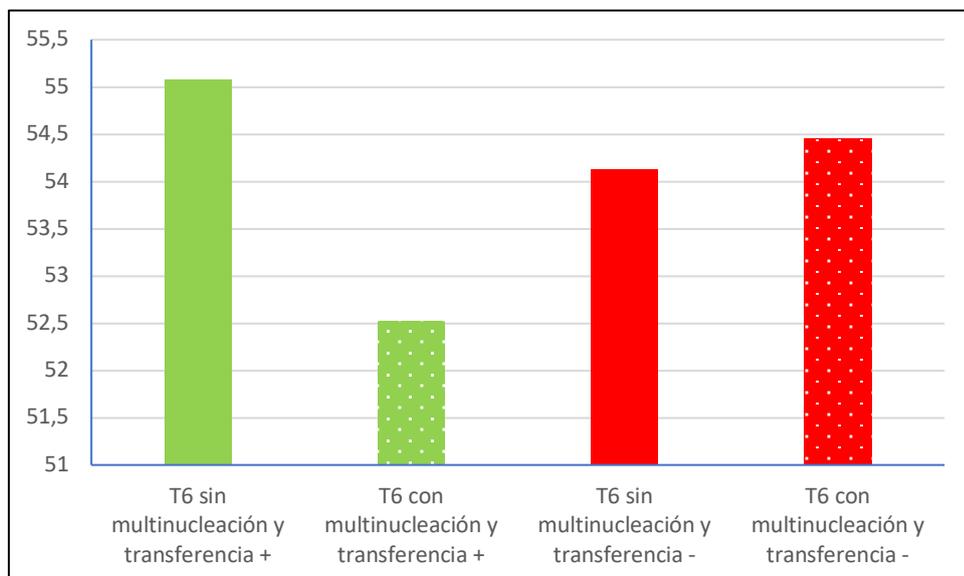


Figura 16: Correlación entre la multinucleación, tiempo de división en T6 y viabilidad embrionaria (horas).

En relación con los tiempos de división en T7 (Fig.17), se obtuvo una media de los tiempos de división en los embriones sin multinucleación y con transferencia positiva de 56h 48', una media de los tiempos de división en los embriones sin multinucleación y con transferencia negativa de 56h 33'. Respecto a los embriones con multinucleación, se obtuvo una media de los tiempos de división en los embriones con multinucleación y transferencia positiva de 57h 32' y una media de los tiempos de división en los embriones con multinucleación y transferencia negativa de 66h 32'.

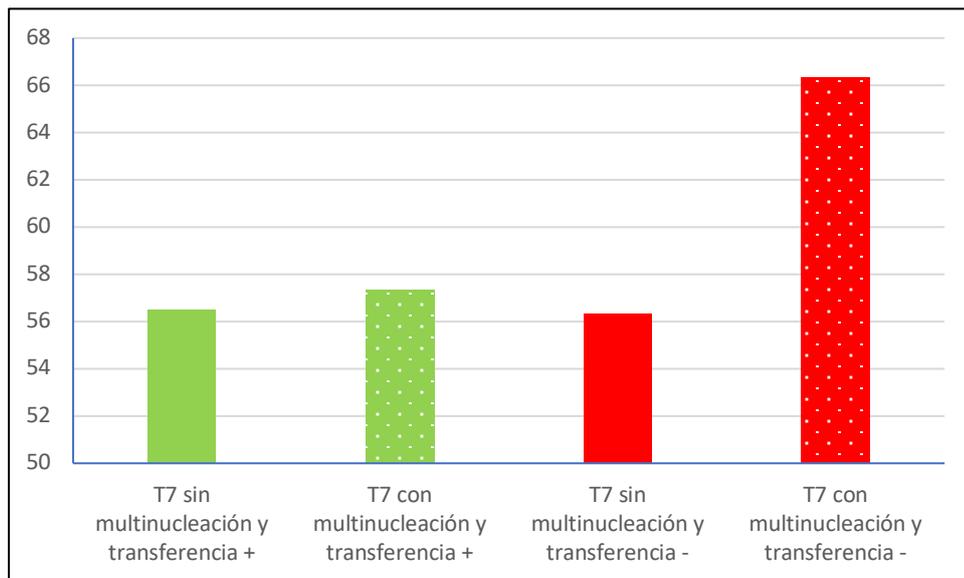


Figura 17: Correlación entre la multinucleación, tiempo de división en T7 y viabilidad embrionaria (horas).

En relación con los tiempos de división en T8 (Fig.18), se obtuvo una media de los tiempos de división en los embriones sin multinucleación y con transferencia positiva de 60h 18', una media de los tiempos de división en los embriones sin multinucleación y con transferencia negativa de 61h 45'. Respecto a los embriones con multinucleación, se obtuvo una media de los tiempos de división en los embriones con multinucleación y transferencia positiva de 62h 46' y una media de los tiempos de división en los embriones con multinucleación y transferencia negativa de 68h 36'.

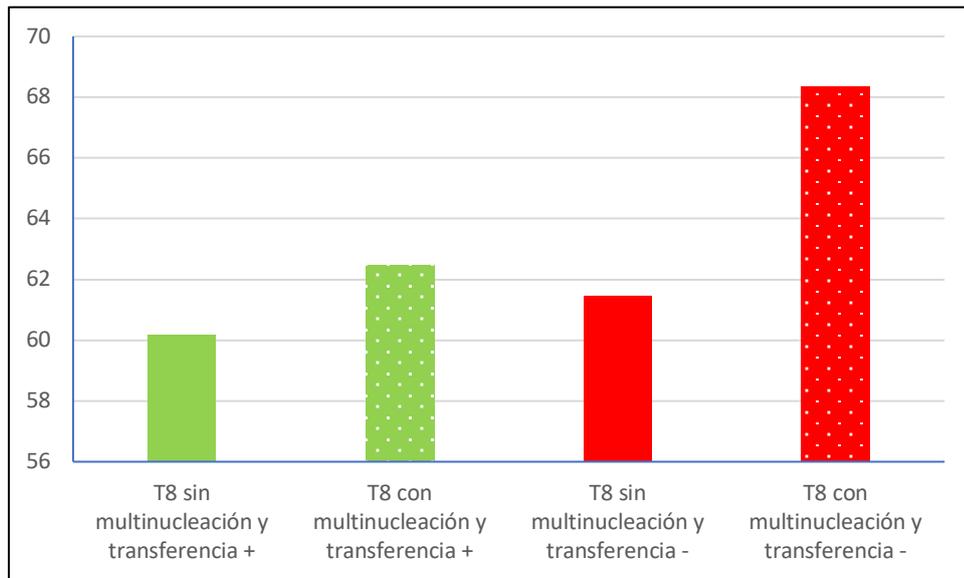


Figura 18: Correlación entre la multinucleación, tiempo de división en T8 y viabilidad embrionaria (horas).

#### 4.6 Estudio de las autocorrecciones en el desarrollo embrionario

En el estudio acerca de las autocorrecciones se observó que de los 35 embriones que presentaban multinucleaciones en día 2, se observaron autocorrecciones en 21 de ellos en la blastómera B1 (60%) y en 14 de ellos en la blastómera B2 (40%) (Fig.19). En este estudio no se encontraron multinucleaciones en día 3.

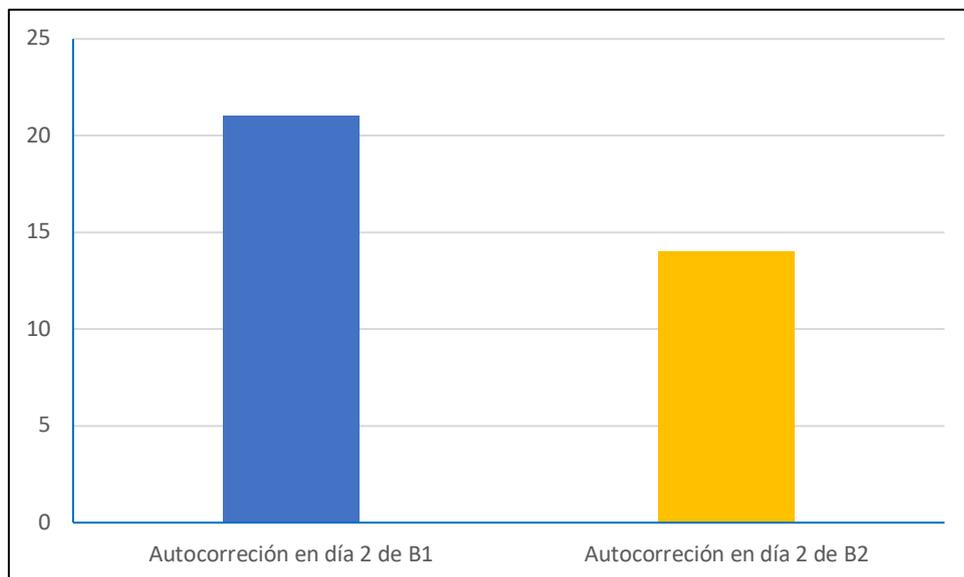


Figura 19: Determinación del número de embriones con autocorrecciones en las blastómeras B1 y B2 en día 2.

## **5. Discusión**

En relación con la formación de blastocistos, se observó que el 50% de blastocistos formados no presentaron multinucleaciones durante su desarrollo (Fig.10). Además, la formación de blastocistos con multinucleación fue mucho menos frecuente (28,7%), lo cual coincide con lo hallado por otros autores (13).

Por otra parte, en los casos en los que no se formó blastocisto (21,3%), no hubo apenas diferencia entre los que presentaban multinucleación y los que no la presentaban.

En nuestro estudio sobre la influencia de la multinucleación en la viabilidad embrionaria, observamos que solamente en el 9% de los embriones con multinucleación en B1 (Fig.7) y el 5% de los que presentaban multinucleación en B2 (Fig.8) se obtuvo transferencia positiva, lo cual demuestra un bajo rendimiento en estas técnicas de fecundación cuando hay presencia de esta anomalía. Estos resultados serían coincidentes con los de otro estudio retrospectivo realizado acerca de la influencia de la multinucleación en la formación de blastocistos, se estudiaron 5,982 embriones en 619 ciclos de transferencia de embriones en estadio de blastocisto y se observó que la detección de blastómeras multinucleadas en día 2 o 3 indicaba un mal pronóstico para el desarrollo embrionario. Es por ello, por lo que se puede considerar blastocisto de peor calidad aquellos que tengan una blastómera multinucleada (13).

En nuestro estudio se observó que el destino de los embriones que presentaban multinucleaciones fue el siguiente en orden decreciente: embriones no viables (descartados), embriones congelados y, en último lugar, transferencia de embriones multinucleados (Fig.7-9). Así pues, en una investigación llevada a cabo por la Dra. Nina Desai y más colaboradores en el año 2014 (14), se estudió también la influencia de la presencia de multinucleaciones en el desarrollo embrionario mediante la incubadora *Time-lapse* y sus resultados fueron similares a los de este proyecto de investigación en cuanto destino de los embriones. Además, estos autores informaron que el porcentaje de embriones congelados con multinucleación fue superior a los embriones congelados que no la presentaban.

En relación con las divisiones celulares de las muestras que presentaban o no multinucleaciones, hemos observado una clara diferencia en los tiempos de división celular (t2-t8) (Fig. 11 y Tabla 3). Se ha podido observar que a medida que se iban produciendo las divisiones celulares, se

producía una prolongación del tiempo necesario para la división de las células con multinucleación en comparación con las muestras sin multinucleación. Por ejemplo, respecto a los resultados obtenidos, la diferencia de media de los tiempos de división en t2 era de 13 minutos (Fig. 12), mientras que esta diferencia temporal en la octava división era de 143 minutos (Fig.18).

En otro estudio realizado por Balakier y más investigadores (15), se realizaron evaluaciones morfocinéticas de embriones con o sin multinucleaciones con el fin de estudiar sus diferencias durante el desarrollo embrionario. En ese estudio también se pudo observar que las diferencias que existían entre las medias de división de los embriones sin multinucleación comparadas con las de los embriones con multinucleación iban aumentando en el tiempo a medida que se producían las divisiones del desarrollo embrionario. Por ejemplo, la diferencia de media en ese estudio de los embriones en t2 era de 78 minutos, mientras que la diferencia en t3 era de 141 minutos. Como se ha podido comprobar tanto en el presente proyecto de investigación como en este artículo, las evaluaciones morfocinéticas nos muestran el patrón de aumento en los tiempos de división de las muestras que presentan multinucleaciones comparadas con las que no presentan multinucleaciones.

Respecto a las autocorrecciones en las blastómeras B1 y B2, cabe destacar que en este proyecto de investigación se observó en día 2 un mayor número de autocorrecciones en la blastómera B1(60%) que en la blastómera B2 (40%) (Fig.19). En otra investigación acerca de las autocorrecciones realizada por el Dr. Raoul Orvieto y más colaboradores (16), se estudió mediante *Embryoscope (Time-lapse)* ocho pacientes que fueron sometidas a un ciclo FIV/ICSI para PGT-M. Se obtuvieron 11 blastocistos de alta calidad, que se encontraron afectados tras la biopsia de blastómeros del día 3. Del total de blastocistos obtenidos, siete pares de blastocistos (63,6%) expulsaron restos celulares con reordenamientos cromosómicos adicionales. Además, 9 de los 11 blastocistos eran euploides, pues de estos nueve, 5 de ellos expulsaron restos de aneuploidía.

## **6. Conclusiones**

- La mitad de los blastocistos formados no presentaron multinucleaciones durante su desarrollo embrionario.
- En los casos en los que no se formó blastocisto (21,3%), no hubo apenas diferencia entre los que presentaban multinucleación y los que no la presentaban.
- En el 5% de los embriones con multinucleación en B1 y el 9% de los que presentaban multinucleación en B2 se obtuvo transferencia positiva.
- El destino de los embriones que presentaban multinucleaciones fue el siguiente en orden decreciente: embriones no viables (descartados), embriones congelados y, en último lugar, transferencia de embriones multinucleados.
- Se ha demostrado una notable diferencia en los tiempos de división celular entre las células con o sin multinucleación.
- Se ha observado en día 2 un porcentaje de autocorrecciones en el 60% y 40% de las blastómeras B1 y B2, respectivamente.

## **7. Bibliografía**

1. Coticchio G, Barrie A, Lagalla C, Borini A, Fishel S, Griffin D et al. Plasticidad del embrión humano previo a la implantación: dogmas de desarrollo, variaciones de temas y autocorrección. 2022.
2. Ltd E. MIRI Time-lapse IVF incubator | Esco Médico [Internet]. Esco-medical.com. 2022 [citado el 12 de julio de 2022]. Disponible en: <https://www.esco-medical.com/products/time-lapse-embryo-incubator>
3. Aguilar J, Rubio I, Muñoz E, Pellicer A, Meseguer M. Study of nucleation status in the second cell cycle of human embryo and its impact on implantation rate. 2022.
4. Ergin E, Çalişkan E, Yalçinkaya E, Öztel Z, Çökelez K, Özay A et al. Frequency of embryo multinucleation detected by time-lapse system and its impact on pregnancy outcome. 2022.
5. Sun L, Chen Z, Yang L, Yi C, Liu J, Ou C. Chromosomal polymorphisms are independently associated with multinucleated embryo formation. 2022.
6. Hortal L and De los Santos Mj. Multinucleation and embryonic development. Rev Asoc Est Biol Rep, 2012; 17(2): 23-28.
7. Royen E. Multinucleation in cleavage stage embryos. Human Reproduction. 2003;18(5):1062-1069.
8. De Cássia Savio Figueira R, Souza Setti A, Paes De Almeida Ferreira Braga D, Iaconelli A, Borges E. Blastomere multinucleation: Contributing factors and effects on embryo development and clinical outcome. Human Fertility. 2010;13(3):143-150.
9. Ciray, H., Aksoy, T., Goktas, C., Ozturk, B. y Bahceci, M., 2022. *Evaluación de time-lapse del desarrollo del embrión humano en medios de cultivo únicos versus secuenciales: un estudio de ovocitos hermanos.*
10. Rodrigo A, Gómez M. Criterios de clasificación y categorías según la calidad embrionaria [Internet]. Babygest. 2022 [citado el 12 de julio de 2022]. Disponible <https://babygest.com/es/criterios-de-clasificacion-y-categorias-segun-la-calidad-embriionaria/#zigoto>
11. Gamiz P. The effect of pronuclear morphology on early development and chromosomal abnormalities in cleavage-stage embryos. Human Reproduction. 2003;18(11):2413-2419.
12. Software del Visor de la familia de incubadoras multicámara FIV MIRI® TL Manual de usuario Rev. 2.1 [Internet]. Esco-medical.com. 2022 [cited 4 September 2022]. Disponible en: [https://www.esco-medical.com/pdf/User\\_manual\\_of\\_MIRI\\_TL\\_family%60s\\_multiroom\\_IVF\\_incubators\\_Viewer\\_Software\\_v2.1\\_ES.pdf](https://www.esco-medical.com/pdf/User_manual_of_MIRI_TL_family%60s_multiroom_IVF_incubators_Viewer_Software_v2.1_ES.pdf)
13. Yakin K, Balaban B, Urman B. Impact of the presence of one or more multinucleated blastomeres on the developmental potential of the embryo to the blastocyst stage. Fertility and Sterility. 2005;83(1):243-245.
14. Desai N, Ploskonka S, Goodman L, Austin C, Goldberg J, Falcone T. Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles. Reproductive Biology and Endocrinology. 2014;12(1):54.
15. Balakier H, Sojecki A, Motamedi G, Librach C. Impact of multinucleated blastomeres on embryo developmental competence, morphokinetics, and aneuploidy. Fertility and Sterility. 2016;106(3):608-614.e2.
16. Orvieto R, Shimon C, Rienstein S, Jonish-Grossman A, Shani H, Aizer A. Do human embryos have the ability of self-correction?. Reproductive Biology and Endocrinology. 2020;18(1).