



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

# MULTINUCLEACIÓ EN EMBRIONS HUMANS PREIMPLANTACIONALS

Memòria presentada per Mònica Parriego Beltran per optar al grau de Doctor per la  
Universitat Autònoma de Barcelona

Mònica Parriego Beltran

Barcelona, desembre de 2015



La Dra. Francesca Vidal Domínguez, Catedràtica de Biologia Cel·lular del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, i la Dra. Anna Veiga Lluch, Directora Científica del Servei de Medicina de la Reproducció del Departament d'Obstetrícia, Ginecologia i Reproducció de l'Hospital Universitari Quirón Dexeus.

CERTIFIQUEN que Mònica Parriego Beltran ha realitzat sota la seva direcció el treball de Tesi Doctoral titulat "Multinucleació en embrions humans preimplantacionals".

Aquest treball s'ha dut a terme a la Unitat de Biologia Cel·lular de la Universitat Autònoma de Barcelona i al Servei de Medicina de la Reproducció de l'Hospital Universitari Quirón Dexeus.

Barcelona, desembre de 2015

Dra. Francesca Vidal Domínguez

Dra. Anna Veiga Lluch



## Índex

1. INTRODUCCIÓ.....	7
1.1. Multinucleació en embrions humans.....	9
1.1.1. Causes de la multinucleació.....	10
1.1.2. Mecanismes implicats en la generació de multinucleació.....	11
1.1.3. Patrons de multinucleació.....	11
1.1.4. Multinucleació i morfologia embrionària.....	13
1.1.5. Multinucleació i anomalies cromosòmiques.....	13
1.1.6. Repercussió clínica de la multinucleació i criteris de selecció embrionària.....	14
1.2. Diagnòstic Genètic Preimplantacional.....	15
1.2.1. <i>Screening</i> Genètic Preimplantacional (PGS).....	16
1.2.2. PGS d'embrions multinucleats.....	20
1.3. Avaluació morfocinètica d'embrions.....	20
1.3.1. Paràmetres morfocinètics.....	21
1.3.2. Morfocinètica com a eina predictiva del desenvolupament i la implantació de l'embrió.....	22
1.3.3. Morfocinètica i anomalies cromosòmiques.....	23
1.3.4. Morfocinètica i multinucleació.....	24
2. HIPÒTESI I OBJECTIUS.....	27
3. MATERIAL I MÈTODES.....	29
3.1. Població i disseny de l'estudi.....	31
3.1.1. Anàlisi de les característiques de les pacients i dels cicles de FIV-ICSI en els que es produeix multinucleació.....	31
3.1.2. Anàlisi de les característiques dels embrions multinucleats de FIV-ICSI en sistema de monitorització dinàmica.....	31
3.1.3. Anàlisi de la constitució cromosòmica dels embrions multinucleats.....	32

3.2. Metodologia.....	33
3.2.1. Fecundació <i>in vitro</i> .....	33
3.2.2. <i>Screening</i> Genètic Preimplantacional (PGS).....	36
3.2.3. Anàlisi estadística.....	38
4. RESULTATS.....	39
4.1. Característiques de les pacients i els cicles amb i sense embrions multinucleats.....	41
4.2. Característiques morfofocinètiques i capacitat de desenvolupament dels embrions multinucleats.....	47
4.3. PGS d'embrions amb i sense multinucleació.....	49
5. DISCUSSIÓ.....	53
5.1. Multinucleació en cicles de FIV.....	55
5.2. Morfofocinètica i desenvolupament d'embrions multinucleats.....	58
5.2.1. Morfofocinètica dels embrions multinucleats.....	58
5.2.2. Capacitat de desenvolupament dels embrions multinucleats.....	59
5.2.3. Resultats clínics de la transferència d'embrions multinucleats.....	61
5.3. Constitució cromosòmica dels embrions multinucleats.....	61
6. CONCLUSIONS.....	67
7. BIBLIOGRAFIA.....	69
8. GLOSSARI.....	87
9. AGRAÏMENTS.....	89

## 1. Introducció

---





## 1.1. Multinucleació en embrions humans

La presència de dos o més nuclis en una cèl·lula embrionària es defineix com a multinucleació i va ser descrita per primera vegada en embrions humans cultivats *in vitro* per Tesarik i col.laboradors al 1987 (Tesarik et al., 1987). Es considera que un embrió és multinucleat quan s'ha observat més d'un nucli en alguna de les seves cèl·lules en qualsevol moment del seu desenvolupament. Aquesta característica embrionària sol considera-se patològica i s'associa a mal pronòstic reproductiu.

La incidència d'aquest fenomen en embrions humans obtinguts *in vitro* s'estima d'entre un 17% i un 48% (Balakier and Cadesky 1997; Jackson et al., 1998; Van Royen et al., 2003; Hnida et al., 2004; Meriano et al., 2004; Ergin et al., 2014). El percentatge de cicles de Fecundació *in vitro* (FIV) que presenten almenys un embrió multinucleat a la seva cohort mostra molta variabilitat entre les diverses publicacions (14%-79%)(Balakier and Cadesky 1997; Jackson et al., 1998; Van Royen et al., 2003; Meriano et al., 2004). El fet de que la multinucleació pugui ser pacient específica (Van Royen et al., 2003) i que el perfil de pacients difereixi entre grups podria explicar aquesta variabilitat.

La multinucleació es pot observar en qualsevol etapa del desenvolupament embrionari entre l'estadi de 2 cèl·lules i el de blastocist (Munné and Cohen 1993), malgrat la seva detecció és més freqüent en D+2 (Balakier and Cadesky 1997). Aproximadament dos terços de la multinucleació es detecta en D+2, un terç en D+3 i no hi ha dades publicades d'etapes posteriors (Van Royen et al., 2003). A partir de les dades actuals no s'ha pogut establir si aquest fenomen es dona amb més freqüència en etapes més primerenques o si hi ha una major detecció en aquestes etapes degut a la facilitat que suposa la seva observació quan els embrions tenen poques cèl·lules i, per tant, hi ha poca superposició.

### 1.1.1. Causes de la multinucleació

S'han descrit diverses causes que poden generar la multinucleació, tant intrínseques com extrínseques. Les causes intrínseques són les relacionades amb alteracions dels gàmetes i les extrínseques serien conseqüència de condicions adverses de cultiu.

Pel que fa a les causes intrínseques, s'ha descrit que la incorrecta maduració citoplasmàtica dels oòcits pot originar multinucleació. Diversos autors han descrit un augment del percentatge d'embrions multinucleats en cicles de FIV on s'observa una resposta a l'estimulació ovàrica elevada i ràpida: molts oòcits recuperats i pocs dies d'estimulació (Jackson et al., 1998; Van Royen et al., 2003; de Cássia Savio Figueira et al., 2010). Es postula que el ràpid creixement fol·licular no permet una correcta maduració dels oòcits donant lloc a multinucleació en els embrions resultants. En aquest sentit hi ha grups que suggereixen que la presència d'embrions multinucleats seria un signe de maduració oocitària subòptima i per tant repercutiria negativament sobre tota la cohort d'embrions (Jackson et al., 1998). Altres autors també observen un elevat percentatge de multinucleació en embrions procedents d'oòcits madurats *in vitro* a partir de vesícula germinal, atribuïnt-ho també a una maduració inadequada del citoplasma (Nogueira et al., 2000).

Per altra banda, defectes intrínsecs en l'espermatozoide també poden causar multinucleació. El centrosoma és un component heretat per via paterna i responsable de l'assemblatge de l'àster. Aquesta estructura cel·lular és important per una correcta migració pronuclear i per la formació del fus mitòtic (Schatten, 1994; Manadhar et al., 2005). Defectes en l'assemblatge de l'àster poden produir alteracions en la divisió embrionària, amb la formació de fusos multipolars i un repartiment erroni de cromosomes en les cèl·lules filles (Asch et al., 1995; Rout et al., 1997). Tot i que els resultats entre els autors no són coincidents, hi ha treballs que descriuen percentatges incrementats de multinucleació en pacients amb infertilitat d'origen masculí (de Cássia Savio Figueira et al., 2010).

Les principals causes extrínseques que poden donar lloc a multinucleació són unes condicions subòptimes de cultiu, amb canvis en la temperatura i/o el pH o bé per una composició inadequada dels medis de cultiu que tindrien un efecte negatiu sobre el citoesquelet (Winston et al, 1991; Pickering et al., 1990 i 1995).

#### 1.1.2. Mecanismes implicats en la generació de multinucleació

La multinucleació pot generar-se mitjançant mecanismes diferents: per errors en el procés de divisió mitòtica o per fragmentació del nucli (Tesarik et al., 1987; Winston et al, 1991; Hardy et al., 1993; Pickering et al., 1995). Els errors mitòtics inclouen la cariocinesi en absència de citocinesi, les divisions asimètriques, la incorrecta segregació dels cromosomes durant el procés de divisió, els errors en l'empaquetament dels cromosomes i la formació de fusos multipolars (Figura 1).

#### 1.1.3. Patrons de multinucleació

S'han descrit dos patrons bàsics de multinucleació: la binucleació i la multi/micronucleació (Meriano et al.,2004; ASEBIR 2015).

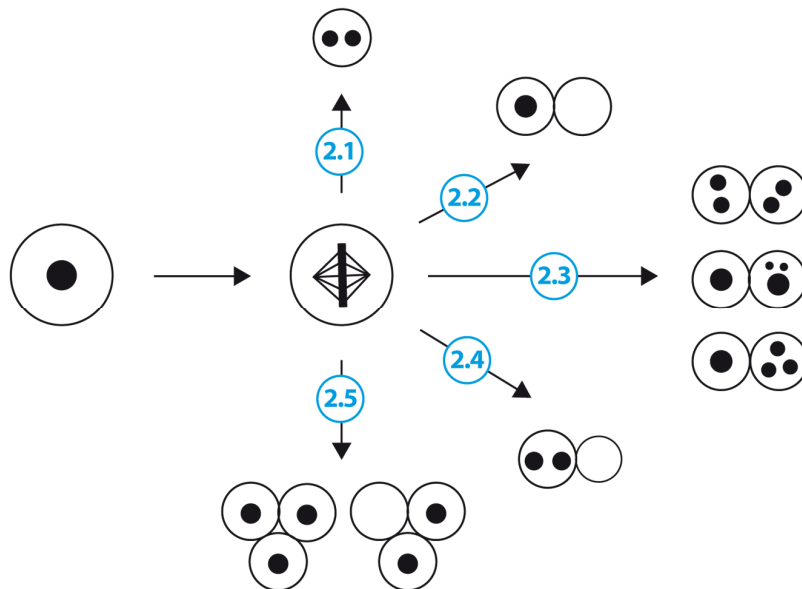
La binucleació està descrita com la presència en un mateix blastòmer de dos nuclis de mida similar i equivalent a la del nucli de les cèl·lules mononucleades del mateix embrió. Les cèl·lules binucleades s'haurien originat per cariocinesi en absència de citocinesi (Figura 1) i serien, per tant, tetraploides. Resultats publicats per diversos autors mostren una mida superior dels blastòmers multinucleats respecte als no multinucleats i recolzen aquesta teoria (Hardy et al., 1993; Hnida et al., 2004). No obstant, s'ha observat que en certa freqüència el contingut d'aquests nuclis també pot ser haploide (Xanthopoulou et al., 2011; Yilmaz et al., 2013). Els mecanismes mitjançant els quals s'haurien originat no han pogut ser dilucidats .

### 1- Divisió mitòtica normal



### 2- Errors en la divisió mitòtica

- 2.1 - Acitocinesi
- 2.2 - Separació incorrecta dels cromosomes
- 2.3 - Errors en l'empaquetament dels cromosomes
- 2.4 - Divisió mitòtica asimètrica
- 2.5 - Fus mitòtic tripolar / anormal



### 3- Fragmentació del nucli



**Figura 1.** Esquema dels possibles mecanismes que poden donar lloc a la formació de blastòmers multinucleats (adaptat de Pickering et al., 1995)

En la multi/micronucleació, els nuclis dels blastòmers són de mida i nombre variable però més petits que els de les seves cèl·lules germanes mononucleades i poden tenir mides semblants o diferents entre ells. Alguns autors descriuen que el fenomen de multi/micronucleació es dóna en menys freqüència que el de binucleació (Kligman et al., 1996; Meriano et al., 2004; Desai et al., 2014) i podria estar originat tant per errors en la divisió mitòtica com per fragmentació nuclear (Figura 1).

#### 1.1.4. Multinucleació i morfologia embrionària

Diversos autors han descrit una associació entre multinucleació i morfologia embrionària. Hardarson i col·laboradors (2001) van descriure un percentatge de multinucleació superior en embrions amb blastòmers de mida diferent en comparació a l'observada en embrions amb blastòmers de dimensions similars. Per altra banda, Van Royen i col·laboradors (2003) van trobar una correlació positiva entre multinucleació i percentatge de fragmentació i entre multinucleació i alteracions en el ritme de divisió. La qualitat embrionària compromesa dels embrions multinucleats es tradueix en una menor capacitat de desenvolupament quan es cultiven fins a l'estadi de blastocist (Alikani et al., 2000; Yakin et al., 2005).

#### 1.1.5. Multinucleació i anomalies cromosòmiques

Diversos estudis han demostrat que la constitució cromosòmica dels blastòmers multinucleats és majoritàriament anormal (Kligman et al., 1996; Staessen and Van Steirteghem, 1998; Hardarson et al., 2001). No obstant, amb les dades actuals no queda clar si l'anomalia cromosòmica es limita als blastòmers multinucleats o bé és compartida per la resta de blastòmers de l'embrió, ni tampoc si les cèl·lules filles d'un blastòmer multinucleat poden ser cromosòmicament normals. Mentre que la majoria d'autors suggereixen que la incidència d'anomalies cromosòmiques en embrions multinucleats és superior a la d'embrions mononucleats (Ambroggio et al., 2011), d'altres (Staessen and Van Steirteghem, 1998) proposen que la multinucleació podria

ser un fenomen temporal que es corregiria o bé es limitaria a una única cèl·lula que entraria en apoptosi i no participaria en el desenvolupament embrionari posterior.

#### 1.1.6. Repercussió clínica de la multinucleació i criteris de selecció embrionària

La selecció dels embrions a transferir és una etapa clau que condiciona l'èxit en el procés de FIV. Resulta doncs necessari l'establiment d'uns criteris d'avaluació embrionària adequats que permetin seleccionar per a la transferència aquells embrions amb millor pronòstic.

A més de la correlació entre multinucleació i qualitat embrionària i multinucleació i constitució cromosòmica, també s'ha trobat correlació entre multinucleació i taxa d'implantació quan aquests embrions són transferits (Balakier and Cadesky, 1997; Jackson et al., 1998; Van Royen et al., 2003).

El pronòstic reproductiu desfavorable dels embrions multinucleats ha portat als grups d'experts en embriologia de diverses societats científiques (ESHRE, ALPHA, ASEBIR) a consensuar la necessitat d'incloure l'avaluació de la multinucleació durant les observacions rutinàries dels embrions en D+2 i en D+3. Tot i que diversos autors han suggerit un millor pronòstic dels embrions binucleats respecte dels multi/micronucleats, i un millor pronòstic dels embrions amb un únic blastòmer multinucleat (Yakin et al., 2005; Meriano et al., 2004), la majoria de recomanacions estableixen que l'esquema de gradació per la multinucleació ha de ser binari, posant de manifest únicament la seva presència o absència.

En el document de consens elaborat conjuntament per ALPHA i ESHRE (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011) els embrions amb presència de multinucleació queden classificats dins la pitjor categoria embrionària de manera que generalment només són transferits en el cas que no n'hi hagi d'altres disponibles. S'ha descrit que la transferència d'embrions

multinucleats pot donar lloc al naixement de nens sans (Balakier and Cadesky, 1997; Pelinck et al., 1998; Parriego et al., 2013).

## 1.2. Diagnòstic Genètic Preimplantacional

El Diagnòstic Genètic Preimplantacional (PGD) permet caracteritzar genèticament els embrions en etapes preimplantacionals. Va ser desenvolupat inicialment per a prevenir la transmissió de malalties monogèniques i anomalies cromosòmiques en parelles amb alt risc genètic (portadores/afectes de malalties monogèniques o amb alteracions del cariotip) com a alternativa al diagnòstic prenatal. Posteriorment, les seves indicacions s'han anat ampliant. El primer naixement després de la transferència d'un embrió caracteritzat genèticament va ser descrit l'any 1990 per Handyside i col·laboradors (1990).

Hi ha diverses fonts de material biològic que poden emprar-se per a la caracterització genètica en els cicles de DGP: corpuscles polars (CP), blastòmers d'embrions primerencs i cèl·lules del trofoblast de blastocists. A la Taula 1 es resumeixen les avantatges i els inconvenients de cadascuna d'elles.



	Avantatges	Inconvenients
Corpuscles polars	Manteniment intacte de la massa embrionària Elevat temps per l'anàlisi	Detecció exclusiva d'anomalies d'origen matern
Blastòmers	Detecció d'anomalies d'origen matern, patern i post-zigòtic	Moderat impacte sobre la viabilitat embrionària deguda a la retirada del/s blastòmer/s biopsiat/s Menor representativitat de la cèl·lula biopsiada (mosaicisme)
Cèl·lules del trofòderma	Més cèl·lules per l'anàlisi (3-8) Detecció d'anomalies d'origen matern, patern i post-zigòtic Baix impacte sobre la viabilitat embrionària per la retirada del material biopsiat Detecció de certs graus de mosaicisme	Poc temps per l'anàlisi en transferències dins el mateix cicle Criopreservació dels embrions en transferències diferides Múltiples biòpsies degut a l'asincronia en assolir l'estadi de blastocist

**Taula 1.** Avantatges i inconvenients de l'anàlisi cromosòmic de CPs, blastòmers i biòpsies de trofòderma

### 1.2.1. *Screening* Genètic Preimplantacional (PGS)

Diversos estudis han determinat que el percentatge d'anormalitat cromosòmica en embrions preimplantacionals humans obtinguts *in vitro* oscil·la entre el 50-70%, variant en funció de l'edat de la dona i del moment del desenvolupament en que es realitza l'anàlisi, i resulta molt superior a l'observat en gestacions clínicament reconegudes. El relatiu baix rendiment de les tècniques de reproducció assistida podria explicar-se per la transferència d'embrions cromosòmicament anormals que,

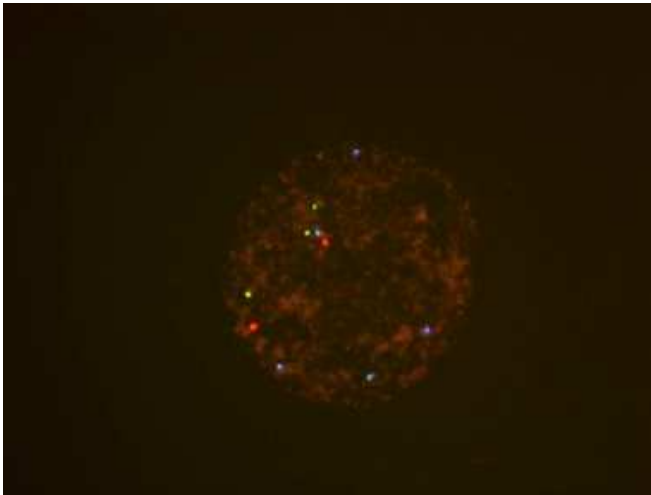
majoritàriament, serien eliminats abans de que es produís la implantació (Munné et al., 1995 i 2007; Marquez et al., 2000; Harton et al., 2013).

Amb la intenció de millorar els resultats dels cicles de FIV, als anys 90 va aparèixer el concepte de Diagnòstic Genètic Preimplantacional amb Screening d'Aneuploïdies o Screening Genètic Preimplantacional (PGS). El PGS permet inferir la dotació cromosòmica d'un embrió a partir de l'anàlisi d'una o poques cèl·lules. La hipòtesi suggerida és que mitjançant l'aplicació del PGS i la transferència d'embrions euploides s'hauria d'aconseguir una millora en les taxes d'implantació, una reducció en la taxa d'avortament de primer trimestre (associat majoritàriament a aneuploïdia) alhora que s'evitarien concepcions afectes de cromosomopaties. En definitiva, s'augmentaria la taxa de nen nascut a casa (Munné et al., 1993).

Es van proposar potencials parelles candidates a PGS que, per les seves característiques intrínseques, podien produir un elevat percentatge d'embrions cromosòmicament anormals: parelles on la dona té una edat avançada (>37 anys), parelles amb fallades repetides d'implantació (transferència de >3 embrions de bona qualitat sense aconseguir gestació), parelles amb avortaments de repetició ( $\geq 3$  avortaments de primer trimestre) i parelles on l'home presenta una alteració dels paràmetres espermàtics de causa genètica (estudi meiòtic en biòpsia testicular alterat o anomalies citogenètiques en espermatozoides) (Munné et al., 1995; Gianaroli et al., 1999; Rubio et al., 2001; Munné et al., 2003; Rubio et al., 2013; Aran et al., 2004; Rodrigo et al., 2010).

Fins fa pocs anys, la metodologia més àmpliament emprada per a la detecció de les aneuploïdies en les cèl·lules embrionàries (PGS) ha estat la tècnica d'hibridació in situ fluorescent (FISH). Aquesta tècnica utilitza sondes de DNA específiques marcades amb molècules fluorescentes. La selecció dels cromosomes a analitzar sol incloure els involucrats en avortaments espontanis i naixements aneuploides (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X i Y). La utilitat del PGS per millorar el pronòstic reproductiu en grups

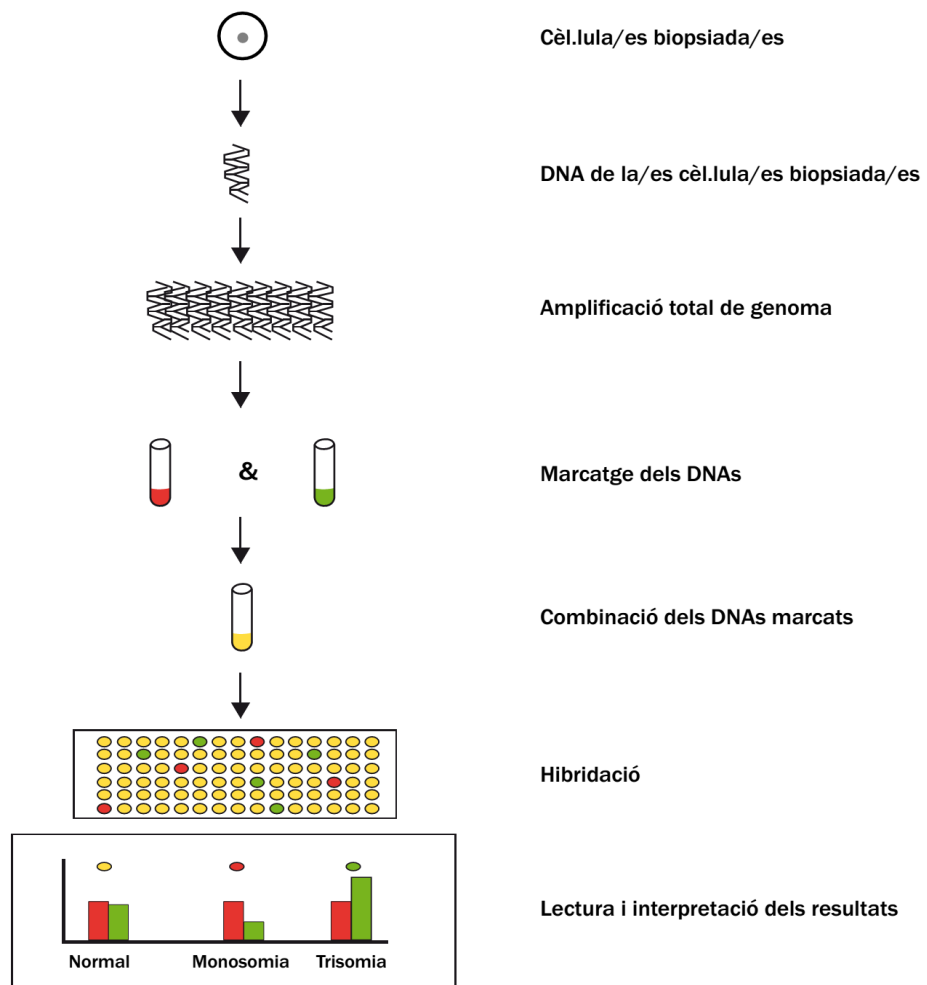
seleccionats de pacients no ha estat demostrada i és motiu de controvèrsia (Staessen et al., 2004 i 2008; Mastenbroek et al., 2007; Hardarson et al., 2008; Schoolcraft et al, 2010). Les limitacions intrínseques d'aquesta tècnica quan s'aplica a una única cèl·lula i el nombre de cromosomes analitzats podrien explicar els resultats obtinguts.



**Figura 2.** FISH de 5 cromosomes (13, 16, 18, 21 i 22) en un nucli de blastòmer .

Amb la intenció de superar les limitacions relatives al nombre de cromosomes analitzats mitjançant FISH, s'han desenvolupat recentment diverses metodologies diagnòstiques agrupades sota la denominació general d'Anàlisi Cromosòmic Complet (CCS, de l'anglès *Complex Chromosome Screening*). Aquestes tècniques permeten detectar guanys i/o pèrdues de tots els cromosomes i han estat optimitzades per tal de poder obtenir resultats fiables en poc temps i a partir d'una o poques cèl·lula/es (revisat per Wells et al., 2008). Entre elles s'inclouen la Hibridació Genòmica Comparada clàssica (m-CGH), els *arrays* d'Hibridació Genòmica Comparada (a-CGH) i de Polimorfismes d'un sol Nucleòtid (a-SNP), la reacció en cadena de la polimerasa quantitativa (q-PCR) i la seqüenciació massiva (NGS). D'entre elles a dia d'avui destaca, per la seva combinació de fiabilitat diagnòstica i fàcil aplicabilitat a la clínica assistencial, els a-CGH (Simpson et al., 2012).

La tècnica d'a-CGH consisteix en la hibridació competitiva de dos DNAs marcats amb diferents fluorocroms sobre seqüències específiques (adherides ordenadament sobre un suport sòlid) que cobreixen tot el genoma (Figura 3). Els a-CGH permeten l'anàlisi cromosòmic de CPs, blastòmers o cèl·lules del trofèctoderma.



**Figura 3.** Metodologia mitjançant arrays de CGH (Adaptat de Harper et al, 2010)

### 1.2.2. PGS d'embrions multinucleats

Donat que un nombre significatiu dels embrions primerencs presenten multinucleació, és relativament freqüent haver de dur a terme una biòpsia en aquest tipus d'embrions en els cicles de PGS.

La majoria d'embrions multinucleats contenen tant cèl·lules mononucleades com multinucleades. Munné i col.laboradors (1993) van suggerir evitar la biòpsia de cèl·lules multinucleades ja que la seva constitució cromosòmica pot resultar no ser representativa de la resta de cèl·lules de l'embrió . En aquest mateix sentint, les guies de bona praxis en biòpsia embrionària publicades posteriorment per la ESHRE (Harton et al., 2010) també van incloure la recomanació de seleccionar per a la biòpsia una cèl·lula mononucleada en els casos de DGP o PGS en D+3.

En quant a la constitució cromosòmica d'aquests embrions, en una sèrie publicada recentment es va observar un baix percentatge d'embrions multinucleats cromosòmicament normals que en ser transferits van mostrar una nul·la capacitat d'implantació (Ambroggio et al., 2011). No obstant, altres grups han descrit una certa capacitat d'implantació dels embrions multinucleats diagnosticats com a euploides (Parriego et al., 2013; Yilmaz et al., 2014).

### 1.3. Avaluació morfocinètica d'embrions

Des dels inicis de la FIV, l'estratègia que s'ha utilitzat a l'hora de seleccionar els embrions a transferir ha estat la seva valoració morfològica en moments puntuals del desenvolupament. En embrions primerencs, els paràmetres morfològics més importants per a la classificació embrionària són el nombre i la simetria de les seves cèl·lules, el percentatge de fragmentació i la presència de multinucleació. En estadis més avançats, s'incorpora l'avaluació del grau de compactació i, en estadi de blastocist, es considera el grau d'expansió i el nombre i característiques de les cèl·lules

del trofectoria i de la massa cel·lular interna (The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting 2011; Cuaderno de Asebir 2015). Tot i que la majoria de grups incorporen altres paràmetres en l'avaluació morfològica (presència de vacuoles en les cèl·lules, divisió primerenca,...) els citats anteriorment són els que ofereixen millor valor predictiu de la capacitat d'implantació. Així, la observació puntual representa una bona eina per a la selecció dels embrions amb millor pronòstic reproductiu malgrat les seves limitacions. El fet de que les observacions es facin de manera puntual, tot i realitzar-se en els moments en que la obtenció d'informació és màxima, comporta la limitació de desconèixer-se els fenòmens que tenen lloc entre dues observacions. A més, per realitzar les observacions cal exposar els embrions a variacions de pH i temperatura que poden comprometre la seva viabilitat.

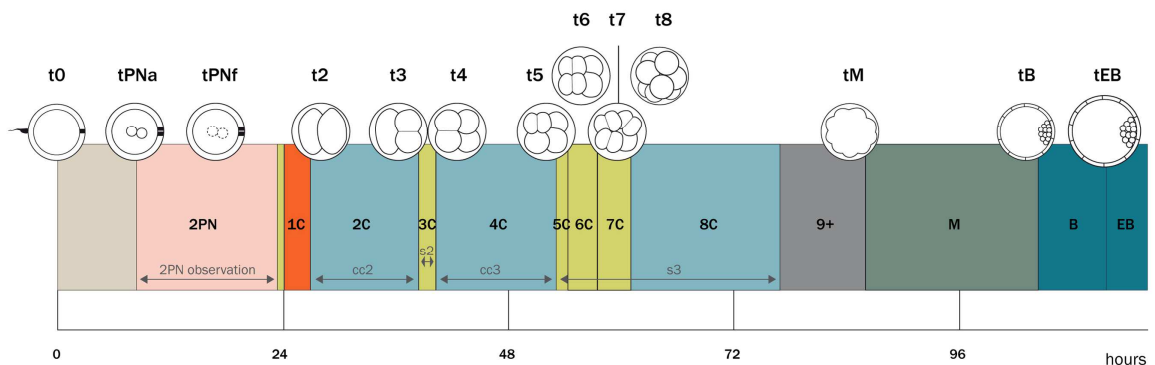
Recentment, s'ha introduït en el laboratori de FIV la tecnologia "time-lapse" (TL) que permet la monitorització dinàmica i contínua dels embrions. Els sistemes de cultiu TL consisteixen en incubadors que incorporen una càmera fotogràfica en el seu interior i capturen imatges dels embrions a temps establerts sense necessitat d'extreure els embrions del sistema per dur a terme les observacions. La projecció accelerada de les imatges capturades permet una avaluació contínua del desenvolupament embrionari. El benefici d'aquest sistema pot tenir l'origen tant en una avaluació més acurada de la morfologia embrionària com en el manteniment d'unes condicions de cultiu molt estables. Les primeres publicacions emprant sistemes de monitorització TL en humans daten de l'any 1996 (Capmany et al., 1996; Gonzales et al., 1996) però les primeres publicacions amb aplicació clínica i certa casuística són força posteriors (Lemmen et al., 2008; Wong et al., 2010; Meseguer et al., 2011).

### 1.3.1. Paràmetres morfocinètics

Els sistemes TL permeten la visualització dels esdeveniments nuclears i citoplasmàtics durant tot el cultiu *in vitro*.

Els paràmetres morfocinètics són els moments puntuals o la durada dels esdeveniments relacionats amb la fecundació i el desenvolupament embrionari. En els cicles d'ICSI, sol establir-se com a temps zero el moment en que es realitza la microinjecció espermàtica.

Els paràmetres morfocinètics relacionats amb la fecundació inclouen: l'extrusió del segon corpuscle polar, l'aparició dels pronuclis i el desmantellament de les seves membranes. Posteriorment es registren els temps en els quals tenen lloc les successives divisions cel·lulars (t2, t3, t4, t5, t6, t7, t8 i t9), i si s'escau, l'inici de la compactació (tM), la blastulació (tB), l'expansió del blastocist (tEB), l'herniació (tHB) i l'eclosió (tFHB)(Figura 4). També sol anotar-se la presència d'esdeveniments anòmals com la divisió directa d'una a tres cèl·lules, les fusions cel·lulars i la multinucleació.



**Figura 4.** Esdeveniments embrionaris i paràmetres morfocinètics (Adaptada de Chamayou et al., 2015).

### 1.3.2. Morfocinètica com a eina predictiva del desenvolupament i la implantació

Els valors dels paràmetres morfocinètics varien en funció de les característiques dels pacients, del tipus de tractaments i de les condicions de cultiu, però evidentment també en funció de les característiques dels propis gàmetes i embrions (Muñoz et al., 2012 i 2013; Ciray et al., 2012; Basile et al., 2013; Fréour et al., 2013; Knez et al., 2013).

Diversos estudis han avaluat la correlació entre els paràmetres morfocinètics i la capacitat per assolir l'estadi de blastocist o la implantació, i els resultats obtinguts fins ara són poc concloents (revisat per Kaser and Racowsky ,2014 i Chamayou et al., 2015). Si bé queda clar que valors molt allunyats de la mitjana solen associar-se a mal pronòstic, ni els paràmetres morfocinètics aïllats, ni el rang de temps de cada paràmetre mostren consens entre els diferents grups.

El primer model per a la selecció embrionària basat en paràmetres morfocinètics va ser publicat per Meseguer i col.laboradors l'any 2011. A partir d'una anàlisi retrospectiva de 522 embrions transferits amb implantació coneguda van establir una classificació hieràrquica, combinant paràmetres morfològics clàssics i paràmetres morfocinètics, que distribuïa els embrions en sis categories segons la seva capacitat d'implantació. Tot i tractar-se d'una publicació rellevant, la validesa de l'aplicació del seu model no s'ha confirmat per altres autors (Best et al., 2015), fent palès que cada grup ha d'establir els paràmetres morfocinètics propis. Així, a partir de la comparació de paràmetres morfocinètics observats en embrions amb i sense implantació, cada laboratori hauria de determinar els paràmetres morfocinètics i els rangs que resulten informatius de viabilitat embrionària i implantació en les seves poblacions i amb les pròpies condicions de treball (Carrasco et al., 2015).

### 1.3.3. Morfocinètica i anomalies cromosòmiques

A dia d'avui, l'única metodologia disponible que permet evitar la transferència d'embrions aneuploides és el PGS, que és una tècnica invasiva. Des de la incorporació de la tecnologia TL, diversos grups han investigat la possible correlació entre morfocinètica i euploidia per tal d'identificar els embrions euploides evitant la seva manipulació.

Campbell i col.laboradors (2013) van descriure que els temps d'inici de la compactació i de la blastulació diferien entre embrions euploides i aneuploides. A partir d'aquests



dos paràmetres morfocinètics, els autors van elaborar un model a partir del qual els embrions quedaven classificats en tres grups: embrions amb alt risc d'aneuploïdia, embrions amb risc d'aneuploïdia mitjà i embrions amb baix risc. Els autors proposaven emprar aquesta classificació com a alternativa al PGS. Aquestes dades, però, no han estat confirmades per altres grups que, aplicant el mateix model predictiu, no discriminaven embrions euploides d'aneuploides. (Ottolini et al., 2013; Kramer et al., 2014). Altres estudis també han mostrat resultats discordants. Mentre que alguns grups troben correlació entre alguns paràmetres morfocinètics primerencs i euploïdia (Basile et al., 2014; Desai et al., 2014), altres autors (Yang et al., 2014; Rienzi et al., 2015) no han detectat cap paràmetre morfocinètic alterat en embrions aneuploides respecte els euploides.

Recentment s'ha proposat que el cultiu en condicions estables (en incubadors amb monitorització dinàmica TL) combinat amb la selecció embrionària mitjançant PGS-CCS seria l'aproximació que oferiria una millor eficiència reproductiva (Yang et al., 2014).

#### 1.3.4. Morfocinètica i multinucleació

Donat que l'aparició de multinucleació pot tenir lloc en qualsevol moment del desenvolupament embrionari i pot desaparèixer al cap de poc temps, la utilització del TL ha permès detectar millor la multinucleació que les observacions puntuals (Desai et al., 2014; Ergin et al., 2014). Tot i que els estudis disponibles fins al moment són limitats, els resultats publicats han mostrat correlació entre multinucleació i variació de determinats paràmetres morfocinètics. Ergin i col.laboradors (2014) van trobar valors incrementats de  $t_2$ ,  $t_4$  i  $t_6$  en embrions multinucleats respecte no multinucleats. Aquests i altres paràmetres morfocinètics (desaparició PN,  $t_3$ ,  $t_7$ ,  $t_8$ ,  $s_2$ ,  $s_3$ ,  $cc_2$ ,  $cc_3$ ) també van veure's augmentats en els embrions multinucleats d'una sèrie analitzada pel nostre grup (Carrasco et al., 2014).

## 2. Hipòtesi i Objectius

---



## Hipòtesi

Els embrions multinucleats tenen una capacitat de desenvolupament i una taxa de normalitat cromosòmica reduïdes però poden tenir utilitat clínica.

## Objectius

1. Analitzar les característiques de les pacients i dels cicles amb i sense embrions multinucleats.
2. Analitzar les característiques dels embrions multinucleats:
  - a) Determinar la incidència, els temps d'aparició i els patrons de multinucleació observats.
  - b) Analitzar els paràmetres morfocinètics dels embrions multinucleats i comparar-los amb els d'embrions sense signes de multinucleació.
  - c) Avaluar la capacitat de desenvolupament fins a blastocist dels embrions multinucleats.
  - d) Avaluar l'evolució dels embrions multinucleats quan són transferits.
3. Conèixer la constitució cromosòmica dels embrions multinucleats i comparar-la amb la observada en embrions sense multinucleació.



### 3. Material i Mètodes

---



### 3.1. Població i disseny de l'estudi

#### 3.1.1. Anàlisi de les característiques de les pacients i dels cicles de FIV-ICSI en els que es produeix multinucleació

La població d'estudi del primer objectiu inclou 763 cicles de FIV-ICSI realitzats durant el període 2012-2014 amb embrions cultivats en un incubador amb sistema de monitorització dinàmica (TL) (EmbryoScope, UnisenseFertiteliTec™). Van excloure's els cicles amb inseminació amb espermatozoides d'origen testicular o epididimari, els cicles de donació d'òocits, els pautats per cultiu fins a dia +5 i els cicles amb DGP o PGS.

Els embrions que havien mostrat >1 nucli en algun dels seus blastòmers en qualsevol moment del desenvolupament *in vitro* van ser considerats multinucleats.

Es va analitzar l'existència de correlació entre les característiques de les parelles (edat materna, nivells hormonals, índex de massa corporal, reserva fol·licular antral, factor d'esterilitat), les característiques dels cicles (protocol d'estimulació emprat, nivell sèric d'estradiol el dia de la descàrrega ovulatòria), els resultats obtinguts (nombre d'òocits recuperats, taxa de fecundació, percentatge d'embrions evolutius i de bona qualitat, taxes d'embaràs i implantació) i la presència d'algun embrió multinucleat en la cohort d'embrions.

#### 3.1.2. Anàlisi de les característiques dels embrions multinucleats de FIV-ICSI en sistema de monitorització dinàmica.

La població d'estudi del segon objectiu inclou els embrions dels cicles de l'apartat anterior que havien mostrat multinucleació. Es van excloure de l'anàlisi aquells embrions dels que mancava alguna de les dades a avaluar. En total es van analitzar 4192 embrions, que van classificar-se en dos grups segons la presència o no de multinucleació.



Es van comparar els paràmetres morfofocinètics dels embrions multinucleats amb els observats en embrions no multinucleats de les mateixes cohorts. Va analitzar-se el moment d'aparició de la multinucleació, l'estadi del desenvolupament dels embrions en aquell moment, el patró de multinucleació observat (binucleació i multi/micronucleació) i el percentatge de cèl·lules multinucleades ( $\leq 50\%$  de cèl·lules multinucleades/ $> 50\%$ ). Va avaluar-se la capacitat d'assolir l'estadi de blastocist dels embrions multinucleats, i es va analitzar la possible correlació entre el patró de multinucleació i la capacitat de desenvolupament per una banda i entre el percentatge de cèl·lules multinucleades i la capacitat de desenvolupament per l'altra. Es va calcular la taxa d'embaràs i d'implantació dels embrions multinucleats i no multinucleats a partir de transferències en fresc. Es van avaluar els resultats clínics dels cicles de criotransferència de blastocists resultants d'embrions primerencs multinucleats.

### 3.1.3. Anàlisi de la constitució cromosòmica dels embrions multinucleats

La població d'estudi del tercer objectiu inclou 1908 embrions procedents de 199 cicles de PGS. Les indicacions per a la realització del cicle de PGS van ser: 62 cicles per edat materna avançada, 46 cicles per factor masculí d'origen genètic, 50 cicles per fallada repetida d'implantació, 31 cicles per avortaments de repetició i 10 cicles per haver tingut concepcions trisòmiques prèvies. En tots els casos els cariotips dels progenitors era normal. Es va comparar la taxa i el tipus d'aneuploïdia dels embrions multinucleats amb la dels no multinucleats. Van analitzar-se els resultats de constitució cromosòmica en funció del patró de multinucleació observat i del percentatge de cèl·lules multinucleades. Es van analitzar els resultats clínics dels cicles (taxa d'embaràs i implantació).

## 3.2. Metodologia

### 3.2.1. Fecundació *in vitro*

#### *Estimulació ovàrica i recuperació d'òocits*

Les pacients van ser sotmeses a un tractament farmacològic inductor de la ovulació amb agonistes o antagonistes de la GnRH. Tant els protocols per l'estimulació ovàrica com la monitorització del creixement fol·licular mitjançant ecografia i nivells hormonals d'estradiol en sang perifèrica van ser els emprats habitualment al nostre centre i han estat descrits prèviament (Barri et al., 2002). La descàrrega ovulatòria es va realitzar mitjançant l'administració subcutània d' HCG i 36 hores després es va dur a terme la punció fol·licular. La punció fol·licular i la recuperació dels òocits en el laboratori de FIV es van realitzar seguint els procediments estandarditzats en el nostre centre.

#### *Manipulació de gàmetes i embrions, microinjecció espermàtica i cultiu embrionari*

Per a la manipulació i el cultiu de gàmetes i embrions es van utilitzar els medis de cultiu de la sèrie G Plus Vitrolife™ seguint estrictament les instruccions d'ús recomanades. Breument, els òocits recuperats es van deixar en cultiu en medi de fecundació entre 2 i 3 hores a 37°C i 6% de CO<sub>2</sub>. A continuació es va realitzar la denudació dels complexos cúmulo-òocit mitjançant el pipeteig mecànic en una solució de 80 UI/ml de hialuronidasa. La microinjecció dels òocits en metafase II (MII) es va realitzar 3-4 hores post-punció seguint protocols estandarditzats al nostre centre (Arroyo et al., 2007). Els òocits microinjectats van cultivar-se en medi de cultiu G1 PLUS (Vitrolife™) en plaques de cultiu específiques per a l'incubador EmbryoScope (EmbryoSlides™) que havien estat preequilibrades un mínim de 4 hores. Cada EmbryoSlide™ conté 12 pouets i permet fer el seguiment de cada embrió de manera individualitzada. Les condicions de cultiu en EmbryoScope™ estaven fixades a 37°C de

temperatura i concentracions de CO<sub>2</sub> i O<sub>2</sub> del 6% i 5% respectivament. La captura de les imatges es va realitzar en 5 plans focals diferents a intervals de 15 minuts. Les avaluacions de les imatges capturades per l'EmbryoScope™ es van realitzar mitjançant el software d'anàlisi d'imatges EmbryoWiewer (UnisenseFertiteliTec™). Els embrions es van mantenir en cultiu fins al moment de la seva transferència i/o congelació.

#### *Avaluació de la fecundació i dels paràmetres morfològics i morfocinètics*

El moment en que es va produir cada esdeveniment embrionari es va calcular prenent com a temps 0 l'hora que s'havia dut a terme l'ICSI. Es van registrar els moments en que s'havien produït els diferents successos: aparició i desaparició dels pronuclis, divisió a 2 (t<sub>2</sub>), 3 (t<sub>3</sub>), 4 (t<sub>4</sub>), 5 (t<sub>5</sub>), 6 (t<sub>6</sub>), 7 (t<sub>7</sub>), i 8 (t<sub>8</sub>) cèl·lules i moment d'aparició de la multinucleació. A partir d'aquests valors es va calcular la durada del segon i tercer cicle cel·lular (cc2: t<sub>3</sub>-t<sub>2</sub>, cc3: t<sub>5</sub>-t<sub>3</sub>) i la sincronia entre les divisions cel·lulars dins d'un mateix cicle (s<sub>2</sub>=t<sub>4</sub>-t<sub>3</sub>, s<sub>3</sub>= t<sub>8</sub>-t<sub>5</sub>).

Es va realitzar el control de fecundació a partir de les imatges adquirides a les 18±2 hores. La morfologia embrionària es va avaluar a les 44±2 hores i 66±2 hores.

La selecció dels embrions a transferir es va realitzar a partir de l'observació a les 66±2 hores i seguint els criteris d'avaluació morfològica habituals del nostre centre. A cadascun dels embrions disponibles li va ser assignada una puntuació de 0 a 10 tenint en compte el nombre i simetria dels blastòmers, el percentatge de fragmentació i la presència de multinucleació (Taula 2). Van ser considerats de qualitat òptima els embrions amb puntuació 8, 9 i 10

Es van seleccionar per la transferència els embrions amb millor puntuació . En el cas d'embrions amb la mateixa puntuació, es van tenir en compte criteris morfocinètics. Els embrions amb presència de multinucleació es van descartar per a la transferència excepte en aquells casos en que no n'hi havia d'altres disponibles. El nombre

d'embrions a transferir es va determinar tenint en compte les característiques de les pacients i els embrions seguint criteris propis prèviament establerts (Tur et al., 2006) (Taula 3).

	D+2	D+3	Score
Nombre de blastòmers	≥ 4	≥ 6	6
	< 4	< 6	2
Mida i forma dels blastòmers	Iguals / Semblants		1
	Diferents		0
	Molt Diferents		-1
% Fragmentació	< 10%		3
	≥ 10% - < 20%		2
	≥ 20% - < 30%		1
	≥ 30% - < 50%		0
	≥ 50%		-1
Multinucleació	Presència		2

Taula 2. Criteris d'avaluació morfològica d'embrions primerencs emprats al nostre centre.

		Nombre d'embrions evolutius	Nombre d'embrions òptims	Nombre d'embrions a transferir	Nombre d'embrions a criopreservar
Edat	<35	1	-	1	0
		2	-	2	0
		≥3	0	2	≥1
			≥1	1	≥2
	35-37	1	-	1	0
		2	-	2	0
		3	-	2	1
		≥4	≥1	1	≥3
	38-42	-	-	2	-
	≥43	-	-	2/3	-

Taula 3. Criteris emprats per decidir el nombre d'embrions primerencs a transferir.

Els embrions multinucleats no transferits van cultivar-se fins l'estadi de blastocist (D+5/D+6/D+7) i en cas de que l'assolissin es van vitrificar seguint els procediments habituals (Solé et al., 2013).

### *Transferència embrionària i embaràs*

La transferència embrionària dels cicles en fresc es va realitzar en D+3 i amb seguiment ecogràfic (Coroleu et al., 2006). El primer control d'embaràs es va dur a terme mesurant el nivell de  $\beta$ HCG en sang 15 dies després de la punció fol·licular. La confirmació de gestació clínica es va realitzar mitjançant la visualització ecogràfica de sac fetal amb batec cardíac positiu, 3-5 setmanes després de la transferència. La taxa d'implantació es va calcular a partir del quocient entre els embrions implantats i els embrions transferits. La taxa d'avortament resulta del quocient entre el nombre d'avortaments i el total de gestacions clíniques.

La preparació endometrial i els procediments de laboratori en els cicles de criotransferència van ser els emprats habitualment en el nostre centre i han estat descrits prèviament (Parriego et al., 2007). El procediment de transferència no va diferir de l'emprat en els cicles en fresc. El primer control d'embaràs va realitzar-se 10 dies post-transferència.

### 3.2.2. Diagnòstic Genètic Preimplantacional amb Screening d'Aneuploidies

Els gàmetes i embrions dels cicles de PGS van ser cultivats en medis LifeGlobal™ seguint les instruccions del fabricant. Els procediments bàsics del laboratori de FIV i l'avaluació dels paràmetres morfològics i morfocinètics va realitzar-se de la mateixa manera que per als embrions no sotmesos a PGS i han estat descrits en apartats anteriors.

Els embrions que presentaven un mínim de 5 cèl·lules i < 30% de fragmentació a les 66±2 hores van ser considerats aptes per a la biòpsia. La biòpsia dels embrions va realitzar-se en D+3. El procediment es va dur a terme utilitzant medi sense Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> (LifeGlobal™). L'obertura de la zona pel·lúcida es va realitzar mitjançant termòlisi amb làser (Boada et al., 1998). La biòpsia embrionària es va dur a terme per aspiració i es va retirar un únic blastòmer per embrió. Els blastòmers obtinguts es van traslladar a una solució de PBS (*Phosphate buffered saline*) al 0.1% de PVA (*Polyvinyl alcohol*). Posteriorment es van dipositar en condicions estèrils en tubs de PCR en 1.5 µl de PBS i es van mantenir en fred (4°C) fins al moment de ser processats.

Els embrions biopsiats van ser traslladats a una EmbryoSlide™ amb medi de cultiu fresc preequilibrat i retornats a l'Embryoscope™.

Les mostres van ser processades per amplificar tot el genoma (Whole Genome Amplification, WGA). Es va utilitzar el kit comercial SurePlex™ DNA Amplification System (Illumina™) seguint les instruccions d'ús facilitades pel fabricant. La verificació de la presència de DNA amplificat i l'absència de contaminació es va dur a terme mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa. Les mostres de DNA amplificades van processar-se per la seva anàlisi mitjançant *arrays* de CGH (a-CGH) emprant el kit comercial 24Sure™ Micorarray Pack (Illumina™) utilitzant el protocol facilitat pel fabricant. Per l'anàlisi dels *arrays* es va utilitzar un escàner Innopsys 70 i les imatges van ser interpretades emprant el software facilitat per la casa comercial (BlueFuse™, Illumina™). Els embrions van ser classificats com a normals, anormals o sense diagnòstic conclouent si no s'havia produït amplificació o els perfils obtinguts no eren interpretables. Els embrions anormals que presentaven aneuploidies per a un o dos cromosomes van categoritzar-se com a "aneuploides simples", i els embrions amb aneuploidies per a tres o més cromosomes van classificar-se com a "aneuploides complexos". Els embrions evolutius i diagnosticats com a euploides van ser transferits en D+5 o congelats en D+5/+6/+7. La confirmació de gestació 10 dies després de la

transferència va realitzar-se seguint els protocols habituals ja descrits en l'apartat anterior.

### 3.2.3. Anàlisi estadística

Les variables contínues es van descriure mitjançant la seva mitjana i desviació típica. Per a les variables nominals o categòriques es van emprar taules de freqüències. Per a la comparació de variables contínues es va utilitzar la prova de Mann-Whitney. L'associació entre variables categòriques va ser avaluada mitjançant la prova de Khi quadrat.

La relació entre la probabilitat de multinucleació en un cicle i diversos factors es va analitzar mitjançant un model de regressió logística. Amb tots els factors que es va trobar una associació significativa, es va ajustar un model de regressió logística multivariant.

La comparació entre variables descrites amb el seu interval de confiança al 95% es va realitzar per estimació per intervals. Si els intervals no se solapaven, es van assumir diferències significatives.

Les variables morfocinètiques es van descriure mitjançant la seva mediana i els seus màxim i mínim. Les comparacions es van realitzar també mitjançant el test de Mann-Whitney. Tots els tests van ser bilaterals i amb un nivell de significació del 5% .

Tota l'anàlisi estadística es va realitzar utilitzant el software IBM<sup>®</sup> SPSS<sup>®</sup> Statistics v22.

## 4. Resultats

---





#### 4.1 Característiques de les pacients i els cicles amb i sense embrions multinucleats

Es van analitzar 763 cicles de FIV-ICSI (5540 embrions). En 540 cicles (70.8%) va observar-se la presència de com a mínim un embrió multinucleat a la cohort (rang 1-10). El total d'embrions multinucleats va ser de 1312 (23.6%) i la mitja d'embrions multinucleats observats en els cicles amb presència de multinucleació va ser de 2.43.

A la taula 4 es comparen les característiques de les pacients sense i amb embrions multinucleats a la seva cohort (a partir d'ara grup A i B respectivament). Les pacients del grup B van resultar ser significativament més joves i amb un recompte fol·licular antral superior.

	Embrions multinucleats a la cohort		<i>P valor</i>
	NO (Grup A)	SI (Grup B)	
<b>Edat</b>	<b>37.98±3.72</b>	<b>37.31±4.03</b>	<b>0.046</b>
<b>IMC</b>	<b>23.14±3.75</b>	<b>22.75±3.61</b>	<b>NS</b>
<b>RFA</b>	<b>9.59±5.29</b>	<b>11.33±5.92</b>	<b>0.001</b>
<b>AMH</b>	<b>1.12±1.24</b>	<b>1.37±1.57</b>	<b>NS</b>

**Taula 4.** Característiques de les pacients sense i amb embrions multinucleats a la seva cohort (IMC: Índex de massa corporal, RFA: Recompte de fol·licles antrals, AMH: Nivells d'hormona antimulleriana en ng/ml). Els valors es presenten com la mitjana (X) ± la desviació estàndard (DS).

No van observar-se diferències en el percentatge de cicles amb multinucleació en funció de l'origen de l'esterilitat (masculí, femení, mixt o idiopàtic)(Taula 5). Tampoc van trobar-se'n en relació amb el protocol d'estimulació ovàrica emprat (amb agonistes o amb antagonistes de la GnRH)(Taula 6). La dosi total de gonadotropines administrada va ser inferior en els cicles del grup B. El dia de la descàrrega ovulatòria van registrar-se nivells d'estradiol en sang més alts en les pacients del grup B, respecte de les del grup A (Taula 7).

	<b>% Cicles amb embrions multinucleats a la cohort</b>
<b>Masculí</b>	<b>75.7</b>
<b>Femení</b>	<b>65.8</b>
<b>Mixt</b>	<b>65.7</b>
<b>Idiopàtic</b>	<b>73.2</b>
<b>P valor</b>	<b>NS</b>

**Taula 5.** Percentatge de cicles amb multinucleació en funció de l'origen de l'esterilitat.

	<b>% Cicles amb embrions multinucleats a la cohort</b>
<b>Agonistes de la GnRH</b>	<b>62.6</b>
<b>Antagonistes de la GnRH</b>	<b>71.8</b>
<b>P valor</b>	<b>NS</b>

**Taula 6.** Percentatge de cicles amb multinucleació en funció del protocol d'estimulació ovàrica.

	<b>Embrions multinucleats a la cohort</b>		<b>P valor</b>
	<b>NO (Grup A)</b>	<b>SI (Grup B)</b>	
<b>Dies d'estimulació ovàrica</b>	<b>9.96±1.85</b>	<b>9.92±1.57</b>	<b>NS</b>
<b>Dosi total de Gonadotropines</b>	<b>2824±1150</b>	<b>2500±956</b>	<b>0.001</b>
<b>E<sub>2</sub> el dia de descàrrega ovulatòria</b>	<b>1842±722</b>	<b>2139±826</b>	<b>0.000</b>

**Taula 7.** Característiques dels cicles amb i sense embrions multinucleats a la seva cohort (Dosi total de gonadotropines en UI/ml, E<sub>2</sub> el dia de descàrrega ovulatòria: estradiol el dia de descàrrega ovulatòria en pg/ml). Els valors es presenten com la mitjana (X) ± la desviació estàndard (DS).

En les pacients del grup B es van recuperar més oòcits, es va observar una millor taxa de fecundació, es van obtenir més embrions evolutius i es van transferir més embrions però de pitjor qualitat (Taula 8).

En les pacients del grup A es van observar unes taxes d'embrions evolutius i d'embrions òptims superiors (Taula 8).

	Embrions multinucleats a la cohort		<i>P valor</i>
	NO (Grup A)	SI (Grup B)	
Oòcits recuperats	6.85±3.83	9.45±4.03	0.000
Oòcits MII	5.55±3.11	7.55±3.32	0.000
Oòcits MII	81.3 [78.7-83.9]	80.2 [78.7-81.6]	NS
Oòcits fecundats	3.55±2.14	5.39±2.68	0.000
% de fecundació	63.9 [60.8-67.1]	71.3 [69.6-73.1]	<0.05
Embrions evolutius	2.78±1.50	3.39±1.86	0.000
% d'embrions evolutius	78.4 [74.7-82.1]	62.9 [60.9-64.9]	<0.05
Embrions de qualitat òptima	1.91±1.52	1.81±1.69	NS
% d'embrions de qualitat òptima	68.9 [64.7-73.0]	53.4 [50.7-56.2]	<0.05
Qualitat mitja dels embrions evolutius	7.6±1.62	6.1±2.15	0.000
Embrions transferits	1.78±0.51	1.91±0.43	0.000
Qualitat mitja dels embrions transferits	7.8±1.76	6.9±2.46	0.000
Embrions congelats	1±1.44	1.48±1.92	0.002

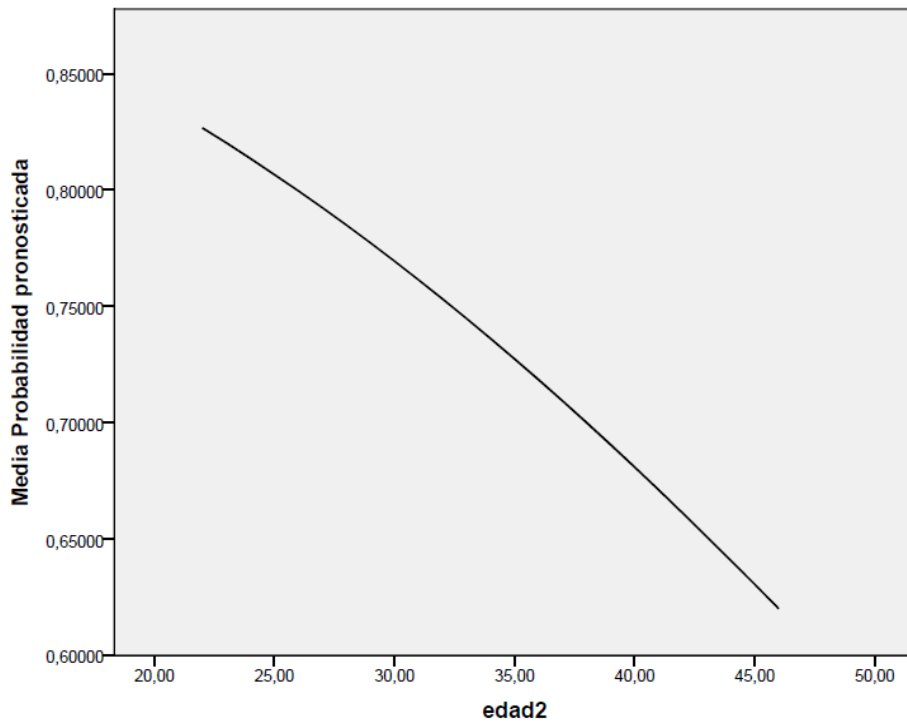
**Taula 8.** Detalls embriològics dels cicles amb i sense embrions multinucleats a la seva cohort . Els valors es presenten com la mitjana ± la desviació estàndard o bé com a percentatge mig i interval de confiança del 95% entre claudàtors

Les taxes d'embaràs i d'implantació van ser comparables en els dos grups. Ni la taxa d'avortament ni el percentatge de nascuts vius va mostrar diferències significatives entre grups (Taula 9).

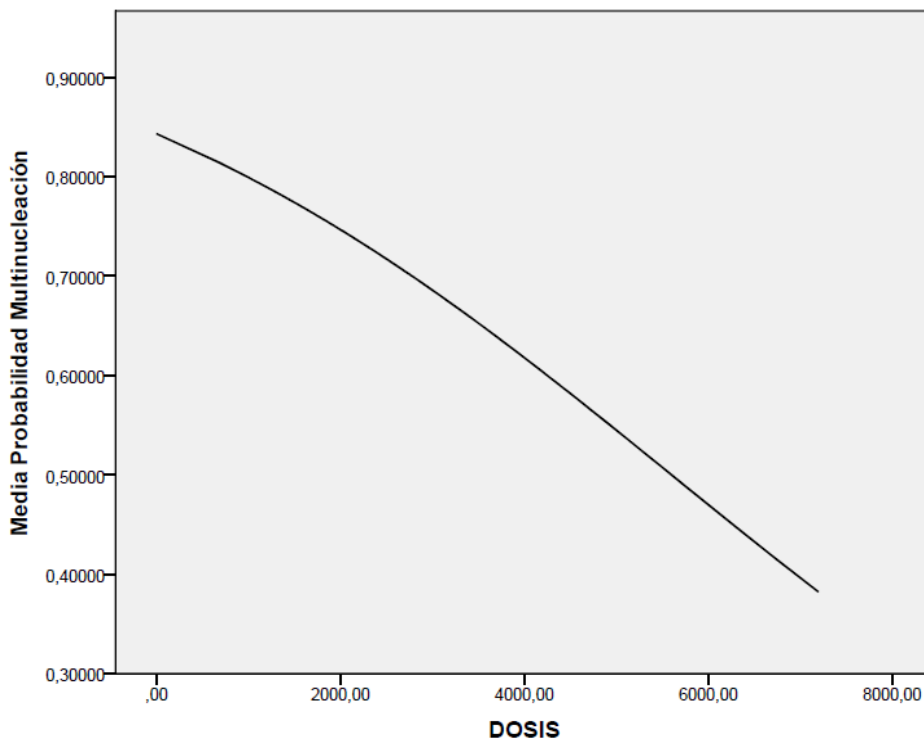
	Embrions multinucleats a la cohort		<i>P valor</i>
	NO (Grup A)	SI (Grup B)	
<b>Gestacions clíniques (%)</b>	<b>89/223 (39.9)</b>	<b>215/540 (39.8)</b>	<b>NS</b>
<b>Taxa d'implantació</b>	<b>29.2 [23.9-34.5]</b>	<b>25.6 [22.7-28.5]</b>	<b>NS</b>
<b>Avortaments (%)</b>	<b>27/89 (30.3)</b>	<b>58/215 (27.0)</b>	<b>NS</b>
<b>Nascuts vius (%)</b>	<b>62/223 (27.8)</b>	<b>157/540 (29.1)</b>	<b>NS</b>

**Taula 9.** Resultats clínics dels cicles amb i sense embrions multinucleats a la seva cohort.

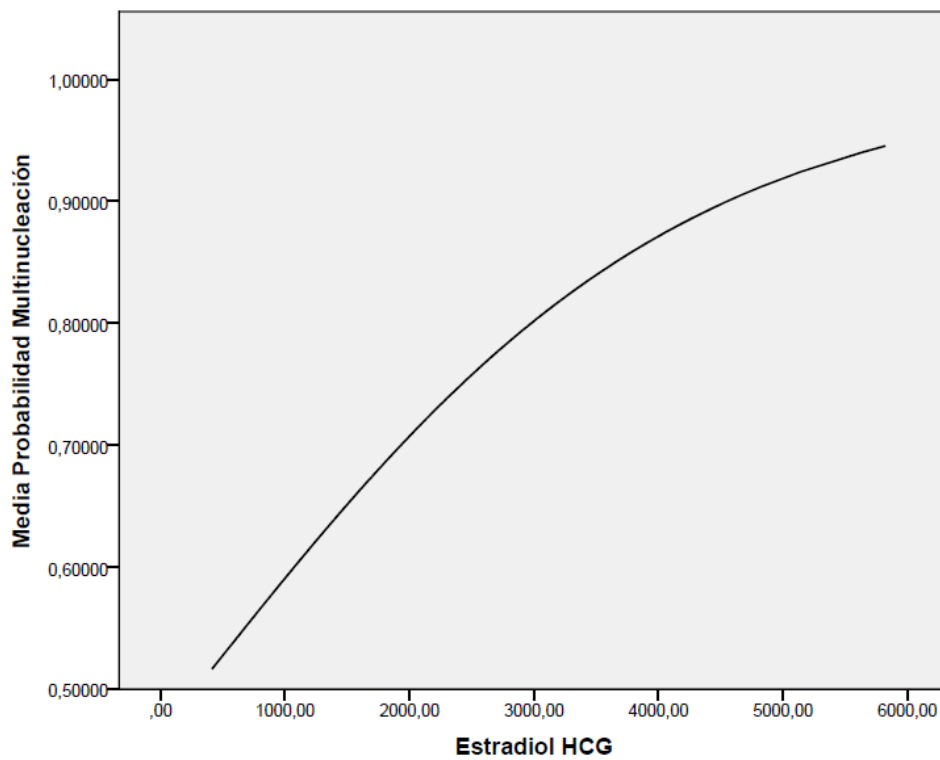
L'anàlisi de l'associació entre les variables contínues i la presència de multinucleació en una cohort d'embrions es va realitzar mitjançant un model de regressió logística. Es va observar una correlació lineal negativa entre l'edat i la presència de multinucleació (Figura 5) i entre la dosi total de gonadotropines administrada i la presència de multinucleació (Figura 6). La relació lineal entre el nivell sèric d'estradiol el dia de la descàrrega ovulatòria i la presència de multinucleació va resultar positiva (Figura 7), així com la relació entre el nombre d'oòcits recuperats i la multinucleació (Figura 8).



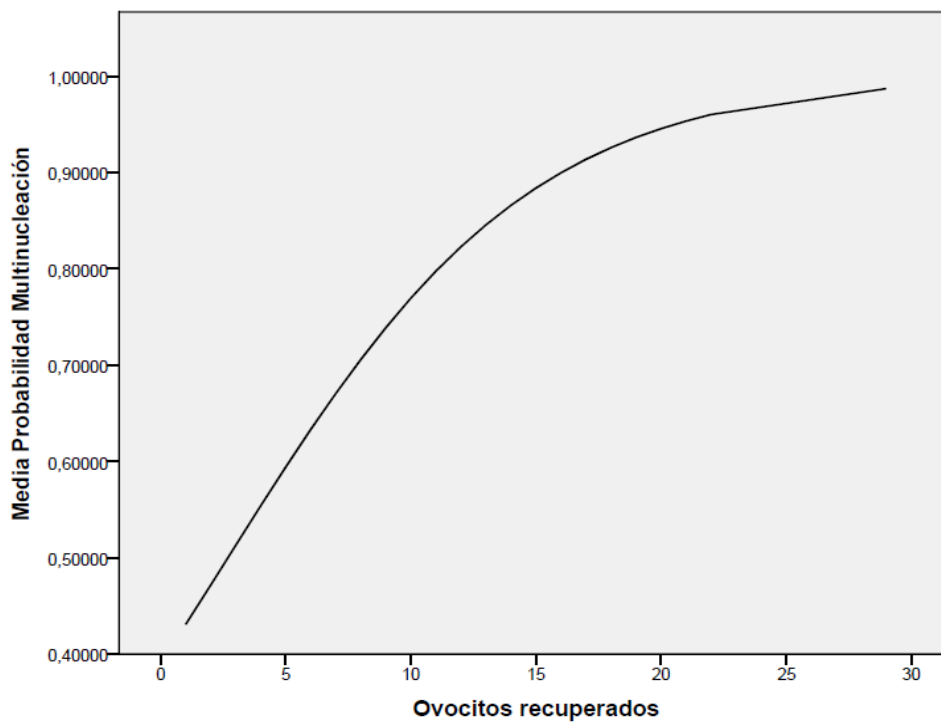
**Figura 5.** Associació entre l'edat i la probabilitat de tenir algun embrió multinucleat a la cohort.



**Figura 6.** Associació entre la dosi total de gonadotropines administrada i la probabilitat de tenir algun embrió multinucleat a la cohort.



**Figura 7.** Associació entre el nivell sèric d'estradiol el dia de la descàrrega ovulatòria i la probabilitat de tenir algun embrió multinucleat a la cohort.



**Figura 8.** Associació entre el nombre d'òocits recuperats i la probabilitat de tenir algun embrió multinucleat a la cohort.

Donat que les variables que mostraven correlació amb presència de multinucleació també estan interrelacionades entre elles, es va ajustar un model de regressió logística multivariant amb tots aquells factors que havien mostrat associació. El nombre d'òocits recuperats va resultar ser la variable amb una major influència sobre la presència de multinucleació en la cohort d'embrions OR:4.53[1.05-19.6].

#### 4.2. Característiques morfocinètiques i capacitat de desenvolupament dels embrions multinucleats

Van incloure's 4192 embrions multinucleats i no multinucleats procedents dels 540 cicles que havien mostrat algun embrió multinucleat a la seva cohort. Van comparar-se les medianes dels diferents paràmetres morfocinètics dels embrions no multinucleats respecte dels multinucleats (Taula 10) .

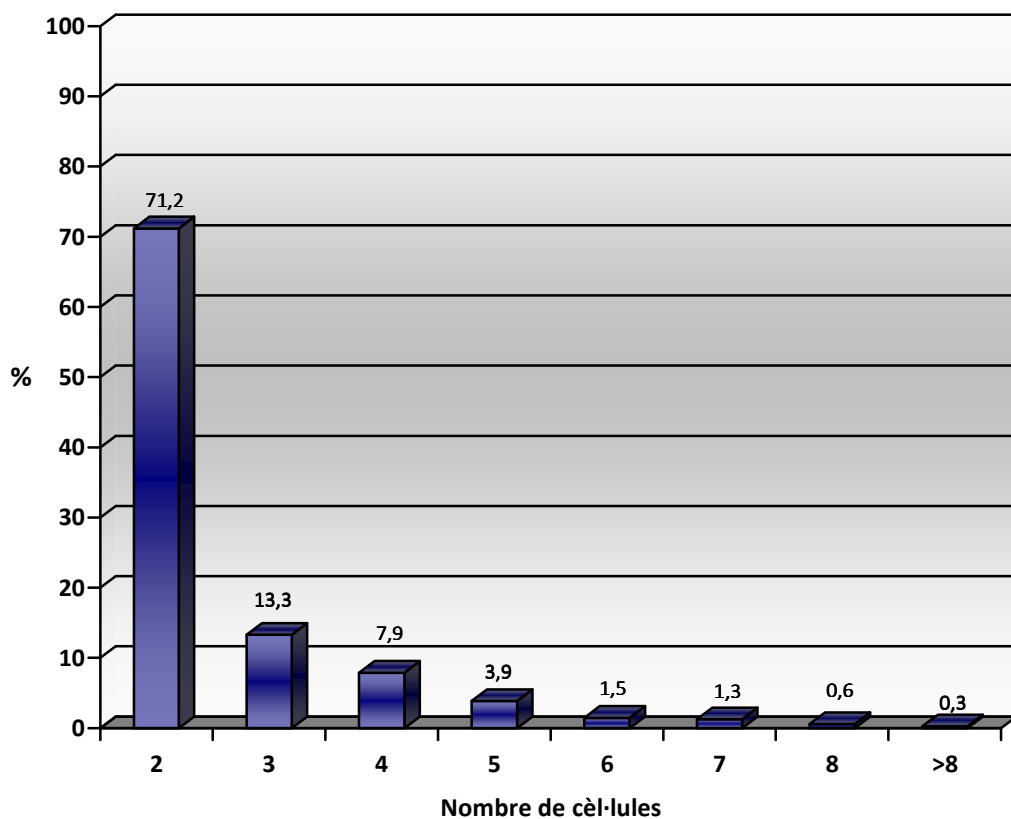
	Embrions no multinucleats				Embrions multinucleats				<i>P</i> <i>valor</i>
	Mediana	Mín.	Màx.	DS	Mediana	Mín.	Màx.	DS	
Aparició PN	8.69	4.65	45.82	3.40	8.28	4.38	27.65	1.94	0.00
Desaparició PN	24.38	9.35	65.47	4.30	24.92	17.17	51.13	3.77	0.00
t2	27.11	5.97	74.46	6.12	27.65	19.66	67.61	4.65	0.00
t3	37.92	8.47	74.46	6.51	38.32	22.31	69.84	6.72	0.01
t4	39.71	22.85	74.46	6.21	40.69	25.18	68.91	7.13	0.00
t5	49.93	22.85	90.91	7.53	50.29	28.00	92.97	8.62	NS
t6	52.33	22.85	116.06	7.67	53.42	28.00	115.04	9.51	0.00
t7	54.66	22.85	115.84	8.19	56.33	35.48	115.04	10.35	0.00
t8	56.75	28.92	117.62	9.00	59.59	36.48	108.79	11.38	0.00
s2 (t4-t3)	1.00	0.00	38.22	4.10	1.00	0.00	32.68	5.17	0.01
s3 (t8-t5)	5.51	0.00	61.92	7.92	10.26	0.00	59.88	9.62	0.00
cc2 (t3-t2)	11.26	0.00	44.22	4.87	11.50	0.00	37.88	5.33	0.02
cc3 (t5-t3)	12.71	0.00	46.48	5.52	12.94	0.00	37.45	6.39	NS

**Taula 10.** Valors dels paràmetres morfocinètics d'embrions multinucleats i no multinucleats.



Els pronuclis van aparèixer abans i van desaparèixer després en els embrions que posteriorment van mostrar multinucleació. Tots els temps de divisió, a excepció de t5, van resultar endarrerits en aquests embrions i les divisions cel·lulars es van realitzar de manera més asincrònica. La durada del segon cicle cel·lular (cc2) va ser superior i no van observar-se diferències significatives en la durada del tercer cicle cel·lular (cc3).

Es va detectar multinucleació en tots els estadis del desenvolupament però l'estadi cel·lular en que es va detectar amb més freqüència va ser a 2 cèl·lules (Figura 9). La mediana del primer moment d'observació de multinucleació va ser a les 33.96 [2.60-83.21] hores post-ICSI.



**Figura 9.** Freqüència de la detecció de multinucleació per primera vegada en cada estadi cel·lular

Va observar-se més freqüentment multi/micronucleació que binucleació (58.8% i 41.2% del total de multinucleació respectivament) i més embrions amb  $\leq 50\%$  de cèl·lules multinucleades en comparació a  $>50\%$  (74.7% i 25.3% respectivament).

En 166 cicles es van transferir embrions multinucleats per no disposar-se'n d'altres d'evolutius sense multinucleació. En 104 casos, les transferències van ser mixtes, transferint-se també algun embrió sense multinucleació. Es van realitzar 62 transferències d'exclusivament embrions multinucleats. La taxa d'embaràs per transferència global va ser del 35.5%. No van detectar-se diferències estadísticament significatives entre les taxes d'embaràs assolides després de transferències homogènies d'embrions no multinucleats, transferències mixtes i transferències homogènies d'embrions multinucleats (Taula 11). No obstant, es va observar una diferència de 11.7 punts percentuals entre transferències homogènies d'embrions no multinucleats i multinucleats. És molt possible que el baix nombre de transferències homogènies d'embrions multinucleats no hagi permès la detecció de diferències estadísticament significatives.

	Embaràs
Transferències homogènies d'embrions no multinucleats	150/355 (42.3%)
Transferències mixtes	40/104 (38.5%)
Transferències homogènies d'embrions multinucleats	19/62 (30.6%)
<i>P valor</i>	<i>NS</i>

**Taula 11.** Taxes d'embaràs obtingudes a partir de la transferència d'embrions multinucleats i no multinucleats.

Cent trenta-tres d'aquestes transferències (80.1%) van ser d'implantació coneguda (KID, Known Implantation Data). Les taxes d'implantació dels embrions multinucleats i no multinucleats obtingudes a partir d'aquestes transferències va ser 16.6% i del 18.4%, sense diferències estadísticament significatives.

Els embrions multinucleats no transferits van deixar-se en cultiu fins l'estadi de blastocist i, en cas d'assolir-lo, es van congelar (18.0%). No van observar-se diferències en la capacitat de desenvolupament fins l'estadi de blastocist ni en funció del patró de multinucleació (binucleació respecte multi/micronucleació) ni en funció del percentatge de cèl.lules multinucleades ( $\leq 50\%$  respecte  $> 50\%$ ) (Taules 12 i 13).

	Taxa de blastocist
<b>Embrions binucleats</b>	<b>18.0%</b>
<b>Embrions multi/micronucleats</b>	<b>17.9%</b>
<b><i>P valor</i></b>	<b><i>NS</i></b>

**Taula 12.** Taxa de blastocist en funció del patró de multinucleació.

	Taxa de blastocist
<b>Embrions <math>\leq 50\%</math> de cèl.lules multinucleades</b>	<b>18.8%</b>
<b>Embrions <math>&gt; 50\%</math> de cèl.lules multinucleades</b>	<b>15.5%</b>
<b><i>P valor</i></b>	<b><i>NS</i></b>

**Taula 13.** Taxa de blastocist en funció del percentatge de cèl.lules multinucleades.

Fins el moment de l'anàlisi de les dades s'havien realitzat 98 cicles de criotransferència que incloïen blastocists procedents d'embrions multinucleats de la cohort d'estudi. La taxa de supervivència va ser del 84.6%. Es van dur a terme 87 transferències. En 56 casos només van transferir-se blastocists procedents d'embrions multinucleats (64.4%) i en la resta van realitzar-se transferències mixtes. La taxa d'embaràs obtinguda a partir de transfències mixtes i de transferències homogènies de blastocists procedents d'embrions multinucleats no van mostrar diferències estadísticament significatives (54.8% vs 48.2% respectivament, *NS*).

Van realitzar-se 75 criotransferències KID. La taxa d'implantació embrionària dels embrions multinucleats va ser del 39.1%.

#### 4.3. PGS d'embrions amb i sense multinucleació

Van incloure's en aquest apartat 1908 embrions cultivats en el sistema TL procedents de 199 cicles de FIV-ICSI-PGS. El 93.7% dels embrions van evolucionar correctament fins a D+3 i es van biopsiar. Es va observar presència de multinucleació en 640 embrions (33.5%). El percentatge d'embrions biopsiats no va ser diferent entre embrions sense multinucleació i embrions multinucleats (93.1% i 95.0% respectivament). Va obtenir-se un diagnòstic concloent en 1583 embrions (88.5%), sense diferències en funció de si els embrions havien mostrat o no multinucleació. Els embrions multinucleats van mostrar un percentatge de normalitat cromosòmica inferior (14.0%) (Taula 14).

	Embrions biopsiats (%)			Total
	Normals	Anormals	No concloents	
<b>No multinucleats</b>	<b>251 (21.3%)</b>	<b>795 (67.4%)</b>	<b>134 (11.3%)</b>	<b>1180 (100%)</b>
<b>Multinucleats</b>	<b>85 (14.0%)</b>	<b>452 (74.3%)</b>	<b>71 (11.7%)</b>	<b>608 (100%)</b>
<b>P valor</b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>NS</b>	<b>-</b>

**Taula 14.** Resultats de l'anàlisi cromosòmic d'embrions sense i amb multinucleació.

Els embrions multinucleats, van mostrar més aneuploidia complexa que els embrions no multinucleats (Taula 15).

	Simple	Complexa	Total
<b>No multinucleats</b>	<b>434 (54.6%)</b>	<b>361 (45.4%)</b>	<b>795 (100%)</b>
<b>Multinucleats</b>	<b>189 (41.8%)</b>	<b>263 (58.2%)</b>	<b>452 (100%)</b>
<b>P valor</b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>-</b>

**Taula 15.** Tipus d'anomalia observada en embrions aneuploides sense i amb multinucleació.

No van detectar-se diferències significatives en el percentatge d'anormalitat cromosòmica en funció del patró de multinucleació (81.1% d'aneuploïdia en embrions binucleats, 85.5% d'aneuploïdia en embrions multi/micronucleats). Tampoc van observar-se diferències en la constitució cromosòmica dels embrions multinucleats en funció de si presentaven  $\leq 50\%$  de cèl·lules multinucleades o  $> 50\%$  (82.7% i 86.9% respectivament). El percentatge d'embrions diagnosticats com a euploides que van ser transferits i/o congelats va ser del 86.0%, sense mostrar diferències en funció de la presència o no de multinucleació (82.3 i 87.2% respectivament).

Van transferir-se 196 embrions euploides en 135 transferències ( $X=1.45$ ). En 64 cicles (32.2%) no va realitzar-se transferència per no disposar-se de cap embrió euploide evolutiu en D+5. La taxa d'embaràs per cicle i per transferència va ser del 41.7% i del 60.1% respectivament. Es van transferir 56 embrions euploides en els que s'havia observat prèviament multinucleació. Van transferir-se 109 embrions en 75 transferències KID. La capacitat d'implantació dels embrions euploides no va mostrar diferències en funció de la presència o no de multinucleació (73.0% i 77.8% respectivament).

## 5. Discussió

---



### 5.1. Multinucleació en els cicles de FIV

La multinucleació és un fenomen freqüent en els embrions humans obtinguts *in vitro*, tot i que les dades tant pel que fa a la seva incidència com pel que fa a percentatge de cicles amb algun embrió multinucleat difereixen entre publicacions.

El percentatge de cicles amb algun embrió multinucleat de la nostra sèrie (70%) es troba en el rang alt del descrit en la literatura (14.3-74%) (Kligman et al., 1996; Balakier et al., 1997; Jackson et al., 1998; Van Royen et al., 2003; Pelinck et al., 2010; de Cassia Savio Figueira et al., 2010) i concorda amb l'observat per alguns autors (Jackson et al., 1998; Van Royen et al., 2003).

El percentatge d'embrions multinucleats de la nostra sèrie (23.6%) són comparables als descrits en l'única publicació on s'analitza la multinucleació mitjançant monitorització contínua (Ergin et al., 2014) i, sorprenentment, no són superiors als descrits en treballs on es realitzen observacions puntuals (17-48%)(Balakier and Cadesky 1997; Jackson et al., 1998; Van Royen et al., 2003; Hnida et al., 2004; Meriano et al., 2004; Ergin et al., 2014). En el nostre estudi, en el supòsit d'haver realitzat observacions puntuals a les 44 i 66 hores, únicament el 35% dels embrions multinucleats hagués estat classificat com a tal, de manera que la taxa de multinucleació hauria estat molt inferior (9.0%) a la detectada mitjançant monitorització contínua. Altres autors mostren resultats en la línia dels nostres (Yilmaz et al., 2014; Desai et al., 2014). Millores en els sistemes de cultiu introduïdes en la metodologia del laboratori haurien contribuït a una reducció de la multinucleació per causes extrínseques i explicarien la disminució de la seva incidència en els darrers temps.

L'única característica dels cicles i de les pacients que es correlaciona de manera independent amb la presència de multinucleació en els embrions d'una cohort és el nombre d'oòcits recuperats. Aquesta variable va associada a una edat de les pacients i una dosi total de gonadotropines inferiors i a uns nivells d'estradiol en sang més elevats



el dia de la descàrrega ovulatòria. Aquestes variables, però, no es correlacionen amb presència de multinucleació de manera independent. Els cicles amb embrions multinucleats corresponen, doncs, a pacients amb una alta resposta a l'estimulació ovàrica i que mostren un creixement fol·licular superior resultant en un nombre d'oòcits recuperat més elevat.

Els nostres resultats han mostrat que l'estadi maduratiu nuclear dels oòcits dels que procedeixen els embrions amb i sense multinucleació són equivalents. Seria possible, però, que una certa proporció dels oòcits en MII de les pacients amb alta resposta, tot i ser madurs a nivell nuclear, no ho fossin a nivell citoplasmàtic i aquest fet pogués donar lloc a multinucleació en les cèl·lules de l'embrió. S'ha descrit que en pacients amb ovaris poliquístics o amb respostes elevades, una certa proporció dels fol·licles destinats a l'atrèsia són rescatats pels alts nivells de FSH durant l'estimulació i també inicien el creixement (Wood JR et al., 2007; Baerwald et al., 2013). Els oòcits resultants tindrien una baixa competència citoplasmàtica donant lloc a embrions amb morfologia compromesa i/o multinucleació. La relació entre una incorrecta maduració citoplasmàtica i multinucleació també ha estat descrita a partir de dades obtingudes d'oòcits madurats *in vitro* i es suggereix que un fus defectuós podria donar lloc a multinucleació (Nogueira et al., 2000).

La taxa de fecundació observada en el grup de multinucleació resulta superior a la observada en les cohorts sense multinucleació. L'extrusió del segon corpuscle polar i la formació dels pronuclis poden ser fenòmens independents de la maduresa citoplasmàtica i per tant podria mantenir-se una taxa de fecundació normal en oòcits immadurs a nivell del citoplasma. De tota manera, la major taxa de fecundació detectada en aquestes cohorts d'embrions en les nostres dades podria ser artefactual.

El percentatge d'embrions evolutius ha resultat superior en les pacients sense embrions multinucleats en la cohort. Cal tenir en compte que la determinació del percentatge d'embrions evolutius en el grup d'embrions multinucleats i no

multinucleats es fa de manera diferent. Mentre que en grup d'embrions no multinucleats els embrions evolutius es corresponen a embrions transferits i congelats en D+3, en el grup d'embrions multinucleats, els embrions evolutius es corresponen als embrions transferits en D+3 i congelats en estadi de blastocist. De la mateixa manera, tampoc resulta informativa la comparació de les qualitats dels embrions ja que per defecte, als embrions multinucleats se'ls hi assigna un *score* embrionari de 2 (score embrionari propi amb escala de 1 a 10, descrit a material i mètodes), penalitzant sobre la mitja de la puntuació embrionària. Així doncs, a partir d'aquestes dades no ha estat possible concloure que els embrions de les cohorts amb multinucleació evolucionen pitjor.

Les taxes d'embaràs i implantació assolides i l'evolució posterior de la gestació han resultat totalment comparables entre pacients amb i sense embrions multinucleats a la cohort. Cal destacar que només s'han transferit embrions multinucleats en casos esporàdics quan no es disposava d'altres embrions sense signes de multinucleació. Així, a partir de les nostres dades i en concordança amb una publicació recent (Yilmaz et al., 2014), semblaria que la presència d'embrions multinucleats no té un efecte negatiu sobre la cohort, tal i com havia estat suggerit (Jackson et al., 1998).

A partir de les nostres dades no hem trobat correlació entre presència de multinucleació i origen de l'esterilitat (masculí o femení), resultats equiparables als d'altres autors (Van Royen et al., 2003). Alguns treballs havien descrit una incidència de multinucleació superior quan la infertilitat és d'origen masculí (De Cassia Savio Figueira et al., 2010). Aquests autors van hipotetitzar que els espermatozoides d'aquest pacients presentarien un major grau d'alteracions a nivell centrossòmic, que causaria un mal assemblatge de l'aster, generant divisions cel·lulars anormals i multinucleació. Caldria veure si, acotant més el diagnòstic del factor masculí, seria possible trobar algun tipus de correlació.

## 5.2. Morfocinètica i desenvolupament d'embrions multinucleats

### 5.2.1. Morfocinètica dels embrions multinucleats

A partir de les dades analitzades en el nostre treball s'ha vist que la morfocinètica dels embrions multinucleats mostra diferències respecte de la dels embrions no multinucleats. Aquestes diferències es fan evidents des de l'estadi de pronuclis amb una durada superior d'aquesta fase del desenvolupament, evidenciant que aquests embrions mostren un comportament diferent ja en etapes molt primerenques. Altres paràmetres morfocinètics també estan alterats, mostrant endarreriments (t2, t3, t4, t6, t7, t8) i/o una durada superior (cc2, s2 i s3).

S'han publicat diversos estudis on s'avalua l'efecte de variacions en els moments d'aparició i desaparició dels pronuclis, en la durada de l'estadi de pronuclis i en el temps des de la desaparició dels pronuclis fins a la divisió a dues cèl·lules. L'impacte d'aquestes variacions sobre la capacitat de desenvolupament i implantació embrionària no ha estat conclouent. Alguns autors correlacionen una desaparició primerenca dels pronuclis amb un ritme de desenvolupament adequat dels embrions (Lemmen et al., 2008). No obstant, d'altres observen una millor capacitat d'implantació dels embrions procedents de zigots amb temps de desaparició de pronuclis endarrerits (Azzarello et al., 2012). El moment d'aparició i desaparició dels pronuclis, en altres treballs, no ha mostrat correlació amb la capacitat d'implantació (Chamayou et al., 2013; Kirkegaard et al., 2013) o bé només s'ha detectat correlació quan els valors dels paràmetres morfocinètics estan molt allunyats dels rangs habituals (Aguilar et al., 2014). Els mateixos autors (Aguilar et al., 2014) descriuen l'existència d'associació entre la durada de l'estadi de pronuclis i la capacitat d'implantació, conclouent que els zigots amb una fase S més curta esdevindrien embrions amb capacitat d'implantació superior. La durada anormalment llarga de la fase de pronuclis i per tant de la fase S observada en els embrions multinucleats podria estar indicant dificultats en el procés de replicació del DNA.

Les nostres dades confirmen que la multinucleació pot observar-se en qualsevol estadi del desenvolupament entre 2 cèl·lules i blastocist, essent màxima a l'estadi de 2 cèl·lules. Alguns estudis descriuen percentatges de multinucleació superiors en D+2 que en D+3 (Van Royen et al., 2003; Yakin et al., 2004). S'ha descrit que la dificultat per detectar multinucleació creix en augmentar el nombre de cèl·lules i amb l'aparició de fragments (Munné et al., 2006). A partir de la observació contínua dels embrions mitjançant TL s'ha demostrat una correlació inversa entre nombre de cèl·lules i detecció de multinucleació (dades pròpies, Ergin et al., 2014). Així, doncs, caldria determinar si existeix un percentatge superior de multinucleació a l'estadi de 2 cèl·lules o simplement aquesta es detecta més en aquest moment.

En l'única publicació on s'avalua la morfocinètica dels embrions multinucleats s'observen, tal i com succeeix en el nostre estudi, endarreriments en els moments en que aquests embrions assoleixen determinades fites (Desai et al, 2014). El temps necessari per a duplicar el DNA dels diversos nuclis, per a la formació dels cromosomes, per al desmantellament de les membranes nuclears i per al posicionament centralitzat dels cromosomes per donar lloc a les dues cèl·lules filles podria ser superior quan la cèl·lula presenta més d'un nucli. El fet que s'observi un augment de la durada de cc2 ( $t_3-t_2$ ) en embrions multinucleats recolza la hipòtesi d'una major incidència de la multinucleació a l'estadi de dues cèl·lules i no tan sols a una millor detecció d'aquest fenomen en aquest estadi. L'asincronia observada en els embrions multinucleats es podria explicar per les diferències entre els ritmes de divisió de cèl·lules multinucleades i no multinucleades en un mateix embrió.

### 5.2.2. Capacitat de desenvolupament dels embrions multinucleats

S'ha observat una baixa capacitat dels embrions multinucleats per assolir l'estadi de blastocist (18%). Aquesta taxa, significativament inferior a la observada en embrions no multinucleats (dades pròpies, 39.6%), confirma les observacions prèvies d'una

reducció important de la capacitat de desenvolupament d'aquests embrions (Alikani et al, 2000; Yakin et al, 2004).

El patró de multinucleació detectat amb més freqüència en la nostra cohort ha estat la multi/micronucleació. Malgrat estudis previs realitzats mitjançant observacions puntuals en els *timings* habituals havien descrit una major incidència de binucleació respecte multi/micronucleació (Meriano et al., 2004), considerem que l'observació contínua dels embrions ha permès detectar un percentatge superior de multi/micronucleació. Aquests resultats no són contradictoris, ja que la monitorització dinàmica permet observacions de les quals no es tenen dades en realitzar observacions puntuals i el patró de multinucleació pot variar al llarg del temps. No obstant, altres autors mitjançant monitorització dinàmica no descriuen els mateixos resultats (Desai et., 2014).

Les nostres dades no mostren diferències en la taxa de blastocist entre embrions binucleats i multi/micronucleats. Meriano i col.laboradors (2004) van reportar que la capacitat de desenvolupament dels embrions amb binucleació era comparable a la observada en embrions sense multinucleació i molt superior a la que mostraven els embrions amb multi/micronucleació. Dades procedents de pacients de bon pronòstic i de cicles de donació d'òcits descriuen una taxa elevada de blastocist tant en embrions binucleats com en multi/micronucleats (Desai et., 2014). Altres autors no han observat correlació entre el patró de multinucleació i la qualitat embrionària (de Cássia Savio Figueira et al., 2010) o la capacitat d'implantació (Ergin et al., 2014).

La majoria dels embrions multinucleats de la nostra cohort presenten multinucleació en  $\leq 50\%$  de les seves cèl·lules. El percentatge de cèl·lules multinucleades tampoc ha resultat predictiu de la capacitat de desenvolupament fins a blastocist. Si bé alguns estudis havien observat una millor evolució dels embrions amb un únic blastòmer multinucleat (de Cássia Savio Figueira et al., 2010), altres autors tampoc observen diferències en la capacitat d'implantació dels embrions en funció del percentatge de

cèl·lules multinucleades (Ergin et al., 2014), fet que estaria en la línia de les nostres observacions.

Caldria determinar si la persistència de la multinucleació en diversos estadis de desenvolupament pot tenir un efecte sobre la viabilitat de l'embrió i la seva capacitat d'implantació ja que la necessitat de més processos de reparació podria dificultar la seva correcta evolució.

### 5.2.3. Resultats clínics de la transferència d'embrions multinucleats

Les nostres dades de transferència en fresc i D+3 d'embrions multinucleats no han confirmat una capacitat disminuïda per donar lloc a embaràs respecte dels embrions no multinucleats (30% i 41% respectivament), a diferència del descrit per altres autors (Jackson et al., 1998; Pelinck et al, 1998; Van Royen et al, 2001; Ergin et al., 2014). El fet de que únicament s'hagin realitzat 62 transferències homogènies d'embrions multinucleats fa que malgrat detectar-se diferències, aquestes no assoleixin significació estadística.

La capacitat d'implantació dels blastocists procedents d'embrions multinucleats transferits en un cicle de criotransferència ofereix resultats molt satisfactoris (39.9%) i sense diferències respecte als obtinguts a partir de la transferència de blastocists sense multinucleació (dades pròpies, 40.7 %). D'aquesta manera podem afirmar que el cultiu fins a blastocist dels embrions multinucleats permet la selecció dels embrions amb un alt potencial reproductiu.

### 5.3. Constitució cromosòmica dels embrions multinucleats

A partir de les dades del nostre treball, s'observa que el percentatge de multinucleació detectat en els embrions dels cicles de PGS és superior al dels cicles de FIV-ICSI. Aquesta dada resulta difícil d'explicar. La principal diferència observada entre els cicles

inclosos en els dos apartats del nostre treball és que part dels embrions dels cicles de PGS (35.8%) provenien d'oòcits vitrificats-desvitrificats. L'estratègia d'acumular oòcits procedents de cicles d'estimulació diferents amb la finalitat d'incrementar la cohort d'embrions s'ha realitzat amb freqüència en el nostre centre en les pacients de DGP i PGS amb la intenció de millorar el pronòstic del tractament (Parriego et al., 2013). Tot i que no hi ha dades publicades al respecte, seria possible que els embrions procedents d'oòcits vitrificats-desvitrificats fossin més propensos a presentar multinucleació.

Diversos treballs han descrit una associació entre presència de multinucleació i baixa qualitat embrionària en etapes primerenques (Van Royen et al., 2001 i 2003; Hardarson et al., 2001). No obstant, les nostres dades no van mostrar diferències en el percentatge d'embrions multinucleats i no multinucleats que podien ser considerats aptes per a la biòpsia. El fet de que el material genètic d'una cèl·lula mononucleada biopsiada d'un embrió multinucleat mostri la mateixa eficiència d'amplificació que el de les cèl·lules procedents d'embrions sense multinucleació demostra que la qualitat del DNA blastomèric no està compromesa quan en la cèl·lula biopsiada s'ha observat un únic nucli.

Les nostres dades confirmen un percentatge superior d'aneuploïdia dels embrions que han mostrat multinucleació en algun moment del desenvolupament. Altres autors ja havien observat un risc incrementat d'aneuploïdia en embrions multinucleats en D+2 analitzats mitjançant FISH (Ambroggio et al., 2011). Sorprenentment, tot i la capacitat superior de detecció d'aneuploïdia de la tècnica d'*arrays* de CGH respecte de la FISH, no s'han observat diferències en els percentatges d'anormalitat cromosòmica d'embrions multinucleats i no multinucleats entre ambdós treballs. No es pot descartar que la capacitat superior de detecció de les aneuploïdies dels a-CGH es veiés compensada per la impossibilitat per detectar haploïdia i poliploïdies homogènies (triploïdia 69,XXX; tetraploïdies 92,XXXX o 92,XXYY). Generalment, s'estima que aquestes dotacions cromosòmiques són poc freqüents en embrions correctament fecundats, però no es pot descartar una major incidència en embrions multinucleats.

A partir de les nostres dades s'ha pogut determinar una major incidència d'aneuploïdia complexa en embrions multinucleats respecte dels no multinucleats. Es postula que les anomalies complexes vindrien originades més per errors en les divisions mitòtiques que per causa de gàmetes amb múltiples aneuploïdies. Els error mitòtics implicarien una incidència de mosaïcisme superior en els embrions multinucleats respecte dels no multinucleats. De fet, en aquest sentit, hi ha un treball publicat on s'analitza el contingut cromosòmic cèl·lula a cèl·lula d'embrions multinucleats donats per recerca (Kligman et al., 1996), on els autors suggereixen que l'increment de les anomalies no estaria relacionat amb un augment de l'aneuploïdia sinó amb un increment en la incidència de mosaïcisme. Cal tenir en compte que aquest fenomen resulta impossible de valorar a partir de les nostres dades, obtingudes de cicles de PGS amb biòpsia en D+3, on es biòpsia una única cèl·lula.

Els nostres resultats no mostren diferències en el percentatge d'anormalitat cromosòmica ni en funció del patró de multinucleació ni en funció del percentatge de cèl·lules multinucleades. Els estudis previs realitzats mitjançant FISH havien mostrat resultats contradictoris. Mentre que alguns autors (Kligman et al., 1996; Stessen and Van Steirteghem, 1998) van trobar resultats en la mateixa direcció que els nostres, Meriano i col·laboradors (2004) observaven un percentatge incrementat d'euploïdia en embrions binucleats respecte multi/micronucleats.

A partir de les nostres dades no s'han observat diferències en la constitució cromosòmica dels embrions en funció del percentatge de cèl·lules multinucleades que presentaven. El fet de que embrions primerencs amb elevats percentatges de multinucleació puguin esdevenir blastocists euploides que donin lloc al naixement de nens sans, estaria en la línia de les observacions prèvies realitzades per Staessen i Van Steirteghem (1998), confirmant que, en alguns casos, la multinucleació pot ser un fenomen temporal i reversible.



Segons les nostres dades, el desenvolupament embrionari post-biòpsia és similar en embrions multinucleats i no multinucleats diagnosticats com a euploides. El mateix succeeix amb la seva capacitat d'implantació tot i que a la literatura hi ha una certa controvèrsia. Determinats autors van descriure que no s'obtenien gestacions a partir de la transferència d'aquests embrions, conclouent amb la recomanació que aquests embrions no fossin ni tan sols considerats per la anàlisi genètica, evitant així costos innecessaris (Ambroggio et al., 2011). Altres autors van descriure el naixement de nens sans a partir de la transferència d'embrions multinucleats diagnosticats com a euploides (Yilmaz et al., 2014) tot i que no detallen les taxes d'implantació i embaràs a partir de la transferència d'aquests embrions, ni les comparen amb la d'embrions euploides sense multinucleació.

Darrerament, la majoria de grups que ofereixen DGP i/o PGS han realitzat un canvi d'estratègia respecte el moment de la biòpsia, passant de la biòpsia d'un únic blastòmer en D+3 a la biòpsia de 3-10 cèl·lules del trofèctoderma de blastocists. Aquesta estratègia permet millorar l'eficiència del diagnòstic i els resultats clínics (Yang et al., 2012; Schoolcraft et al., 2012; Forman et al., 2012; Scott et al., 2013). Un elevat percentatge d'embrions en estadis primerencs són diagnosticats com aneuploides complexos mentre que el percentatge de blastocists diagnosticats com a tals és molt inferior (49.2% d'aneuploïdia complexa observada en embrions en D+3 vs 14.6 % d'aneuploïdia complexa detectada en blastocists, dades pròpies). Això confirmaria la limitació de la majoria d'embrions amb múltiples anomalies per a continuar amb un desenvolupament correcte un cop s'ha produït l'activació del genoma. En els cicles amb embrions multinucleats, la biòpsia de blastocist resultaria especialment útil ja que evitaria biopsiar embrions amb múltiples anomalies que no assolirien l'estadi de blastocist, millorant l'eficiència i reduint els costos del procediment.

Hi ha una certa controvèrsia respecte de la possible correlació entre la morfocinètica i la presència d'anomalies cromosòmiques en els embrions. Alguns grups han trobat correlació entre paràmetres morfocinètics primerencs i euploïdia (Basile et al., 2014;

Desai et al., 2014), d'altres han trobat correlació entre paràmetres morfocinètics tardans i euploida (Campbell et al., 2013), i d'altres no han detectat diferències en cap paràmetre morfocinètic entre embrions aneuploides i euploides (Yang et al., 2014; Rienzi et al, 2015). Caldria determinar si els embrions anormals exhibeixen sempre paràmetres morfocinètics alterats i si diferents tipus d'anomalies cromosòmiques afecten de forma diferent a la morfocinètica embrionària. Malgrat que no disposem de resultats respecte de la relació entre morfocinètica i anomalies cromosòmiques, les nostres dades de morfocinètica i multinucleació juntament amb les dades d'altres autors indiquen que, a dia d'avui, la morfocinètica embrionària no pot substituir el PGS com a eina per seleccionar els embrions euploides per a la transferència.



## 6. Conclusions

---

## Conclusions

1. Tot i les millores recents del cultiu *in vitro*, la multinucleació embrionària segueix essent un fenomen freqüent en els cicles de FIV.
2. Els sistemes de monitorització dinàmica de la morfologia embrionària possibiliten una millor detecció de la multinucleació.
3. En un cicle de FIV, l'única variable que s'associa a presència de multinucleació és el nombre d'oòcits recuperats en la punció fol·licular.
4. La presència d'embrions multinucleats en una cohort no té un efecte negatiu en el pronòstic del cicle.
5. Els embrions multinucleats mostren una morfocinètica alterada respecte els no multinucleats.
6. Els embrions multinucleats mostren una menor capacitat per assolir l'estadi de blastocist i una major incidència d'anomalies cromosòmiques en D+3.
7. El patró de multinucleació i el percentatge de cèl·lules multinucleades no es relacionen amb la capacitat de l'embrió per assolir l'estadi de blastocist ni amb la seva constitució cromosòmica.
8. Els embrions multinucleats euploides que assoleixen l'estadi de blastocist tenen la mateixa capacitat d'implantació que els blastocists procedents d'embrions euploides no multinucleats.
9. El cultiu dels embrions multinucleats fins a l'estadi de blastocist permet la selecció dels potencialment viables.

## 7. Bibliografia

---



A

Aguilar J, Motato Y, Escribá MJ, Ojeda M, Muñoz E, Meseguer M. The human first cell cycle: impact on implantation. *Reprod Biomed Online*. 2014 Apr;28(4):475-84

Alikani M, Calderon G, Tomkin G, Garrisi J, Kokot M, Cohen J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Hum Reprod*. 2000 Dec;15(12):2634-43.

Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum reprod* 2011; 26: 1270-83

Ambroggio J, Gindoff PR, Dayal MB, Khaldi R, Peak D, Frankfurter D, Dubey AK. Multinucleation of a sibling blastomere on day 2 suggests unsuitability for embryo transfer in IVF-preimplantation genetic screening cycles. *Fertil Steril*. 2011 Oct;96(4):856-9.

Arroyo G, Veiga A, Santaló J, Barri PN. Developmental prognosis for zygotes based on pronuclear pattern: usefulness of pronuclear scoring. *J Assist Reprod Genet*. 2007 May;24(5):173-81.

Aran B, Veiga A, Vidal F, Parriego M, Vendrell JM, Santaló J, Egozcue J, Barri PN. Preimplantation genetic diagnosis in patients with male meiotic abnormalities. *Reprod Biomed Online*. 2004 Apr;8(4):470-6.

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 Jul;10(7):1897-906.



ASEBIR. Cuadernos de embriología Clínica II. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de ovocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. 2a ed. Madrid: Gobalo; 2008.

Azzarello A, Hoest T, Mikkelsen AL. The impact of pronuclei morphology and dynamicity on live birth outcome after time-lapse culture. Hum Reprod. 2012 Sep;27(9):2649-57.

B

Balakier H, Cadesky K. The frequency and developmental capability of human embryos containing multinucleated blastomeres. Hum Reprod. 1997 Apr;12(4):800-4.

Baerwald A, Adams GP, Pierson RA. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. Hum Reprod Update 2011 Nov ;18(1):73-91

Basile N, Morbeck D, García-Velasco J, Bronet F, Meseguer M. Type of culture media does not affect embryo kinetics: a time-lapse analysis of sibling oocytes. Hum Reprod. 2013 Mar;28(3):634-41.

Basile N, Nogales Mdel C, Bronet F, Florensa M, Riqueiros M, Rodrigo L, García-Velasco J, Meseguer M. Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis. Fertil Steril. 2014 Mar;101(3):699-704.

Barri PN, Martinez F, Coroleu B, Tur R. The role of GnRH antagonists in assisted reproduction. Reprod Biomed Online. 2002;5 Suppl 1:14-9

Best L, Campbell A, Duffy S, Montgomery S, Fishel S. Does one model fit all? Testing a published embryo selection algorithm on independent time-lapse data. Hum Reprod. 2015 June (30)(Suppl 1): O-214.

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 May;15(5):302-7.

C

Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Hickman CF. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reprod Biomed Online.* 2013 May;26(5):477-85.

Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Thornton S. Retrospective analysis of outcomes after IVF using an aneuploidy risk model derived from time-lapse imaging without PGS. *Reprod Biomed Online.* 2013 Aug;27(2):140-6.

Capmany G, Taylor A, Braude PR, Bolton VN. The timing of pronuclear formation, DNA synthesis and cleavage in the human 1-cell embryo. *Mol Hum Reprod.* 1996 May;2(5):299-306.

De Cássia Savio Figueira R, Souza Setti A, Paes De Almeida Ferreira Braga D, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Blastomere multinucleation: Contributing factors and effects on embryo development and clinical outcome. *Hum Fertil (Camb).* 2010 Sep;13(3):143-50.

Chamayou S, Guglielmino A. The power and the limits of morphokinetic parameters in selecting embryos with full capacity to implant. *Current Trends in Clinical Embriology.* 2015 2(2):47-55.

Chamayou S, Patrizio P, Storaci G, Tomaselli V, Alecci C, Ragolia C, Crescenzo C, Guglielmino A. The use of morphokinetic parameters to select all embryos with full capacity to implant. *J Assist Reprod Genet.* 2013 Jun;30(5):703-10.

Carrasco B, Parriego M, Arroyo G, Gil Y, Coroleu B, Veiga A, Boada M. Viabilidad y análisis morfocinético del desarrollo de embriones multinucleados. XXX Congreso Nacional Sociedad Española de Fertilidad; 2014 Mayo 29-31; Barcelona, España.

Carrasco B, Arroyo G, Gil Y, Gómez F, Rodríguez N, Barri PN, Veiga A, Boada M. Indicadores morfocinéticos para la selección embrionaria en en D+3. VIII Congreso Asebir; 2015 Nov 18-20; San Sebastián, España.

Ciray HN, Aksoy T, Goktas C, Ozturk B, Bahceci M. Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media--a sibling oocyte study. J Assist Reprod Genet. 2012 Sep;29(9):891-900.

Coroleu B, Barri PN, Carreras O, Belil I, Buxaderas R, Veiga A, Balasch J. Effect of using an echogenic catheter for ultrasound-guided embryo transfer in an IVF programme: a prospective, randomized, controlled study. Hum Reprod. 2006 Jul;21(7):1809-15.

## D

Desai N, Ploskonka S, Goodman LR, Austin C, Goldberg J, Falcone T. Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles. Reprod Biol Endocrinol. 2014 Jun 20;12:54.

## E

Ergin EG, Calışkan E, Yalçinkaya E, Oztel Z, Cökelez K, Ozay A, Ozörnek HM. Frequency of embryo multinucleation detected by time-lapse system and its impact on pregnancy outcome. Fertil Steril. 2014 Oct;102(4):1029-1033.

## F

Forman EJ, Tao X, Ferry KM, Taylor D, Treff NR, Scott RT Jr. Single embryo transfer with comprehensive chromosome screening results in improved ongoing pregnancy rates and decreased miscarriage rates. *Hum Reprod.* 2012 Apr;27(4):1217-22.

Fréour T, Dessolle L, Lammers J, Lattes S, Barrière P. Comparison of embryo morphokinetics after in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection in smoking and nonsmoking women. *Fertil Steril.* 2013 Jun;99(7):1944-50.

## G

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munné S. Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. *Fertil Steril.*

1999 Nov;72(5):837-44. Gonzales DS, Jones JM, Pinyopummintr T, Carnevale EM, Ginther OJ, Shapiro SS, Bavister BD. Trophectoderm projections: a potential means for locomotion, attachment and implantation of bovine, equine and human blastocysts. *Hum Reprod.* 1996 Dec;11(12):2739-45.

## H

Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature.* 1990 Apr 19;344(6268):768-70.

Hardarson T, Hanson C, Sjögren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod.* 2001 Feb;16(2):313-8.

Hardarson T, Hanson C, Lundin K, Hillensjö T, Nilsson L, Stevic J, Reismer E, Borg K, Wikland M, Bergh C. Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2008 Dec;23(12):2806-12.

Hardy K, Winston RM, Handyside AH. Binucleate blastomeres in preimplantation human embryos in vitro: failure of cytokinesis during early cleavage. *J Reprod Fertil.* 1993 Jul;98(2):549-58.

Harper JC, Harton G. The use of arrays in preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertil Steril.* 2010 Sep;94(4):1173-7.

Harton GL, Magli MC, Lundin K, Montag M, Lemmen J, Harper JC; European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) PGD Consortium/Embryology Special Interest Group. ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group—best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS). *Hum Reprod.* 2011 Jan;26(1):41-6.

Harton GL, Munné S, Surrey M, Grifo J, Kaplan B, McCulloh DH, Griffin DK, Wells D; PGD Practitioners Group. Diminished effect of maternal age on implantation after preimplantation genetic diagnosis with array comparative genomic hybridization. *Fertil Steril.* 2013 Dec;100(6):1695-703.

Hnida C, Engenheiro E, Ziebe S. Computer-controlled, multilevel, morphometric analysis of blastomere size as biomarker of fragmentation and multinuclearity in human embryos. *Hum Reprod.* 2004 Feb;19(2):288-93.

## J

Jackson KV, Ginsburg ES, Hornstein MD, Rein MS, Clarke RN. Multinucleation in normally fertilized embryos is associated with an accelerated ovulation induction response and lower implantation and pregnancy rates in in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertil Steril*. 1998 Jul;70(1):60-6.

## K

Kaser DJ, Racowsky C. Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review. *Hum Reprod Update*. 2014 Sep-Oct;20(5):617-31.

Kirkegaard K, Kesmodel US, Hindkjær JJ, Ingerslev HJ. Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: a prospective cohort study. *Hum Reprod*. 2013 Oct;28(10):2643-51.

Kligman I, Benadiva C, Alikani M, Munne S. The presence of multinucleated blastomeres in human embryos is correlated with chromosomal abnormalities. *Hum Reprod*. 1996 Jul;11(7):1492-8.

Knez K, Tomazevic T, Vrtacnik-Bokal E, Virant-Klun I. Developmental Dynamics of IMSI-derived embryos: a time-lapse prospective study. *Reprod Biomed Online*. 2013 Aug;27(2):161-71.

Kramer YG, Kofinas JD, Melzer K, Noyes N, McCaffrey C, Buldo-Licciardi J, McCulloh DH, Grifo JA. Assessing morphokinetic parameters via time lapse microscopy (TLM) to predict euploidy: are aneuploidy risk classification models universal? *J Assist Reprod Genet*. 2014 Sep;31(9):1231-42.

## L

Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2008 Sep;17(3):385-91.

## M

Manandhar G, Schatten H, Sutovsky P. Centrosome reduction during gametogenesis and its significance. *Biol Reprod*. 2005 Jan;72(1):2-13.

Márquez C, Sandalinas M, Bahçe M, Alikani M, Munné S. Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reprod Biomed Online*. 2000;1(1):17-26.

Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, Vogel NE, Arts EG, de Vries JW, Bossuyt PM, Buys CH, Heineman MJ, Repping S, van der Veen F. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med*. 2007 Jul 5;357(1):9-17.

Meriano J, Clark C, Cadesky K, Laskin CA. Binucleated and micronucleated blastomeres in embryos derived from human assisted reproduction cycles. *Reprod Biomed Online*. 2004 Nov;9(5):511-20.

Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, Ramsing NB, Remohí J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod*. 2011 Oct;26(10):2658-71.

Munné S, Cohen J. Unsuitability of multinucleated human blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod*. 1993 Jul;8(7):1120-5.

Munné S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J. Diagnosis of major chromosomeaneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod*. 1993 Dec;8(12):2185-91.

Munné S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril*. 1995 Aug;64(2):382-91.

Munné S, Sultan KM, Weier HU, Grifo JA, Cohen J, Rosenwaks Z. Assessment of numeric abnormalities of X, Y, 18, and 16 chromosomes in preimplantation human embryos before transfer. *Am J Obstet Gynecol*. 1995 Apr;172:1191-9;

Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Velilla E, Walmsley R, Sadowy S, Cohen J, Sable D. Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online*. 2003 Jul-Aug;7(1):91-7.

Munné S, Tomkin G, Cohen J. Selection of embryos by morphology is less effective than by a combination of aneuploidy testing and morphology observations. *Fertil Steril*. 2009 Mar;91(3):943-5.

Muñoz M, Cruz M, Humaidan P, Garrido N, Pérez-Cano I, Meseguer M. Dose of recombinant FSH and oestradiol concentration on day of HCG affect embryo development kinetics. *Reprod Biomed Online*. 2012 Oct;25(4):382-9.

Muñoz M, Cruz M, Humaidan P, Garrido N, Pérez-Cano I, Meseguer M. The type of GnRH analogue used during controlled ovarian stimulation influences early embryo developmental kinetics: a time-lapse study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013 Jun;168(2):167-72.



## N

Nogueira D, Staessen C, Van de Velde H, Van Steirteghem A. Nuclear status and cytogenetics of embryos derived from in vitro-matured oocytes. *Fertil Steril*. 2000 Aug;74(2):295-8.

## O

Ottolini C, Rienzi L, Capalbo A. A cautionary note against embryo aneuploidy risk assessment using time-lapse imaging. *Reprod Biomed Online*. 2014 Mar;28(3):273-5.

## P

Parriego M, Solé M, Aurell R, Barri PN, Veiga A. Birth after transfer of frozen-thawed vitrified biopsied blastocysts. *J Assist Reprod Genet*. 2007 Feb;24:147-149

Parriego M, Solé M, Boada M, Vidal F, Coroleu C, Veiga A. Oocyte accumulation strategy for Preimplantation Genetic Diagnosis in cases of low response. *Hum Reprod*. 2013 June; 28 (Suppl 1):i1-i370

Parriego M, Nadal S, Boada M, Tuñón D, Mateo S, Coroleu B, Veiga A. Evolución y análisis cromosómico de embriones multinucleados. VII Congreso ASEBIR; 2013 Noviembre 20-22; Sevilla, España.

Pelinck MJ, De Vos M, Dekens M, Van der Elst J, De Sutter P, Dhont M. Embryos cultured in vitro with multinucleated blastomeres have poor implantation potential in human in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1998 Apr;13(4):960-3.

Pelinck MJ, Hoek A, Simons AH, Heineman MJ, van Echten-Arends J, Arts EG. Embryo quality and impact of specific embryo characteristics on ongoing implantation in unselected embryos derived from modified natural cycle in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2010 Jul;94(2):527-34.

Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril*. 1990 Jul;54(1):102-8.

Pickering SJ, Taylor A, Johnson MH, Braude PR. An analysis of multinucleated blastomere formation in human embryos. *Hum Reprod*. 1995 Jul;10(7):1912-22.

R

Rienzi L, Capalbo A, Stoppa M, Romano S, Maggiulli R, Albricci L, Scarica C, Farcomeni A, Vajta G, Ubaldi FM. No evidence of association between blastocist aneuploidy and morphokinetic assessment in a selected population of poor-prognosis patients: a longitudinal cohort study. *Reprod Biomed Online*. 2015 Jan;30(1):57-66.

Rodrigo L, Peinado V, Mateu E, Remohí J, Pellicer A, Simón C, Gil-Salom M, Rubio C. Impact of different patterns of sperm chromosomal abnormalities on the chromosomal constitution of preimplantation embryos. *Fertil Steril*. 2010 Sep;94(4):1380-6.

Rout UK, Krawetz SA, Armant DR. Ethanol-induced intracellular calcium mobilization rapidly alters gene expression in the mouse blastocyst. *Cell Calcium*. 1997 Dec;22(6):463-74.

Rubio C, Gil-Salom M, Simón C, Vidal F, Rodrigo L, Mínguez Y, Remohí J, Pellicer A. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod.* 2001 Oct;16(10):2084-92.

Rubio C, Bellver J, Rodrigo L, Bosch E, Mercader A, Vidal C, De los Santos MJ, Giles J, Labarta E, Domingo J, Crespo J, Remohí J, Pellicer A, Simón C. Preimplantation genetic screening using fluorescence in situ hybridization in patients with repetitive implantation failure and advanced maternal age: two randomized trials. *Fertil Steril.* 2013 Apr;99(5):1400-7.

S

Schatten G. The centrosome and its mode of inheritance: the reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. *Dev Biol.* 1994 Oct;165(2):299-335.

Scott RT Jr, Upham KM, Forman EJ, Hong KH, Scott KL, Taylor D, Tao X, Treff NR. Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: a randomized controlled trial. *Fertil Steril.* 2013 Sep;100(3):697-703.

Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Comprehensive chromosome screening of trophectoderm with vitrification facilitates elective single-embryo transfer for infertile women with advanced maternal age. *Fertil Steril.* 2013 Sep;100(3):615-9. Simpson JL. Preimplantation genetic diagnosis to improve pregnancy outcomes in subfertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2012 Dec;26(6):805-15.

Solé M, Santaló J, Boada M, Clua E, Rodríguez I, Martínez F, Coroleu B, Barri PN, Veiga A. How does vitrification affect oocyte viability in oocyte donation cycles? A

prospective study to compare outcomes achieved with fresh versus vitrified sibling oocytes. *Hum Reprod.* 2013 Aug;28(8):2087-92.

Staessen C, Van Steirteghem A. The genetic constitution of multinuclear blastomeres and their derivative daughter blastomeres. *Hum Reprod.* 1998 Jun;13(6):1625-31.

Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2004 Dec;19(12):2849-58.

Staessen C, Verpoest W, Donoso P, Haentjens P, Van der Elst J, Liebaers I, Devroey P. Preimplantation genetic screening does not improve delivery rate in women under the age of 36 following single-embryo transfer. *Hum Reprod.* 2008 Dec;23(12):2818-25.

T

Tesarík J, Kopecný V, Plachot M, Mandelbaum J. Ultrastructural and autoradiographic observations on multinucleated blastomeres of human cleaving embryos obtained by in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1987 Feb;2(2):127-36.

Tur R, Coroleu B, Torelló MJ, Boada M, Veiga A, Barri PN. Prevention of multiple pregnancy following IVF in Spain. *Reprod Biomed Online.* 2006 Dec;13(6):856-63.

V

Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Laureys I, Ryckaert G, Gerris J. Calculating the implantation potential of day 3 embryos in women younger than 38 years of age: a new model. *Hum Reprod.* 2001 Feb;16(2):326-32.

Van Royen E, Mangelschots K, Vercruyssen M, De Neubourg D, Valkenburg M, Ryckaert G, Gerris J. Multinucleation in cleavage stage embryos. *Hum Reprod.* 2003 May;18(5):1062-9.

## W

Wells D, Alfarawati S, Fragouli E. Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: microarrays and CGH. *Mol Hum Reprod.* 2008 Dec;14(12):703-10.

Winston NJ, Braude PR, Pickering SJ, George MA, Cant A, Currie J, Johnson MH. The incidence of abnormal morphology and nucleocytoplasmic ratios in 2-, 3- and 5-day human pre-embryos. *Hum Reprod.* 1991 Jan;6(1):17-24.

Wood JR, Dumesic DA, Abbott DH, Straus JF 3rd. Molecular abnormalities in oocytes from women with polycystic ovary syndrome revealed by microarray analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:705-13

Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM, Reijo Pera RA. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol.* 2010 Oct;28(10):1115-21.

## X

Xanthopoulou L, Delhanty JD, Mania A, Mamas T, Serhal P, Sengupta SB, Mantzouratou A. The nature and origin of binucleate cells in human preimplantation embryos: relevance to placental mesenchymal dysplasia. *Reprod Biomed Online.* 2011 Apr;22(4):362-70.

## Y

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. *Fertil Steril*. 2005 Jan;83(1):243-5.

Yang Z, Liu J, Collins GS, Salem SA, Liu X, Lyle SS, Peck AC, Sills ES, Salem RD. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Mol Cytogenet*. 2012 May 2;5(1):24..

Yang Z, Zhang J, Salem SA, Liu X, Kuang Y, Salem RD, Liu J. Selection of competent blastocysts for transfer by combining time-lapse monitoring and array CGH testing for patients undergoing preimplantation genetic screening: a prospective study with sibling oocytes. *BMC Med Genomics*. 2014 Jun 22;7:38.

Yilmaz A, Zhang L, Zhang XY, Son WY, Holzer H, Ao A. Chromosomal complement and clinical relevance of multinucleated embryos in PGD and PGS cycles. *Reprod Biomed Online*. 2014 Mar;28(3):380-7.



## 8. Glossari

---



a-CGH: *array-comparative genomic hybridisation*

ASEBIR: Asociación para el estudio de la Biología de la Reproducción

ALPHA: *Alpha Scientists in Reproductive Medicine*

CP: corpuscle polar

DNA: *desoxiribonucleic Acid*

ESHRE: *European Society of Human Reproduction and Embryology*

FISH: *fluorescent in situ hybridization*

FIV: fecundació *in vitro*

ICSI: microinjecció intracitoplasmàtica

KID: *kown implantation data*

m-CGH: *metaphase-comparative genomic hybridisation*

NGS: *next generation sequencing*

PBS: *phosphate buffered saline*

PGD: *preimplantation genetic diagnosis*

PGS: screening genetic screening

PVA: *polyvinyl alcohol*

SNP: *single nucleotide polimorfism*

TL: tecnologia de monitorització dinàmica *time-lapse*

## 9. Agraïments

---

A les meves directores, l'Anna i la Fanny, per tot el que m'han ensenyat, per seva paciència, dedicació i ànims, per la facilitat del seu tracte.

Al Dr. Barri, per integrar-me en el seu equip pioner.

Al Ventura, per la seva confiança i proximitat.

A la Montse, pel seu suport. Per trobar sempre que ho he necessitat un moment en la seva complicada agenda.

Al CC (la Zaida, l'Ester i en Joan), el grup de recerca de l'Autònoma on tot va començar. No hauria pogut tenir millors companys! A la resta de "matxaques" de la Unitat d'aquella època alguns avui grans amics: la Laia i la Laura, la Marta, l'Assumpta, la Cris, en Pep, l'Aurora, la Naima...

Als meus companys del laboratori de DGP: la Sílvia, la Marta i en Lluç. Gràcies per posar-me les coses tan fàcils.

Als companys dels laboratoris de FIV i andro: La Fina (per les matinades compartides), la Yolanda, la Gemma (pel camí fet des de que érem la *guardia civil...*), la Cris, la Bea (gracias mil por compartir tu bibliografía!), la Clara (per les teràpies zen) i la Marta B.

A l'Eli per la seva amistat.

Als diversos màsters que han col.laborat en aquest projecte: El Dr. Solé (d'això ja en fa uns anys...), i darrerament la Mar, el Sergio, la Miriam i l'Adrián.

Al Nacho pel seu ajut. Per realitzar tots els càlculs que no vaig demanar des del principi.

A la resta del SMR. Sou un gran equip!

Als meus pares, pel seu suport incondicional en totes les decisions que he anat prenent a la vida.

A la meva germana per tot l'ajut "per ahir" de les figures, gràfics i edició de la Tesi.

Al meu equip: l'Uri i el Martí. Per la seva paciència i suport, i per fer que les coses valguin la pena.