

# Significado clínico y fisiopatología de la multinucleación embrionaria en humanos

Carlos E Sueldo, Florencia Nodar, Mariano Lavolpe, Sergio Papier, Claudio Chillik, Vanesa Y Rawe

## Primer premio de Investigación Clínica

Centro de Estudios en Ginecología y Reproducción (CEGYR), Buenos Aires, Argentina - drsueldo@hotmail.com  
*Reproducción* 2007;22:46-58

## Introducción

Entre los múltiples cambios que han ocurrido durante la última década en Reproducción Asistida de Alta Complejidad (RAAC), uno de los más importantes ha sido el esfuerzo en reducir la incidencia de embarazos múltiples, ampliamente reconocida como una de las más serias complicaciones en RAAC. Varios países europeos y más recientemente Estados Unidos, han enfatizado la necesidad de disminuir el número de embriones transferidos con el propósito de reducir las tasas de embarazos múltiples de alto grado. Para alcanzar este objetivo en algunos países europeos se transfiere en forma electiva un solo embrión,<sup>1</sup> mientras que en otros países, incluyendo los Estados Unidos, transferir dos embriones ha sido la norma en pacientes de buen pronóstico en RAAC.<sup>2</sup>

Los especialistas en medicina reproductiva son concientes de que deben mantener un balance apropiado entre disminuir las tasas de embarazos múltiples pero con tasas de implantación embrionaria y embarazos clínicos razonables. Esto significa, aprender a identificar más claramente los embriones de mejor calidad con un potencial de implantación elevado.

El proceso de selección embrionaria ha sido siempre un gran objetivo entre los especialistas en reproducción y embriólogos. A comienzos de la RAAC los embriones eran seleccionados por su división celular adecuada luego de un tiempo determinado

en cultivo, como así también por el grado de fragmentación que presentaban.<sup>3</sup> Más recientemente, la identificación de un perfil de alineamiento de los nucléolos en los pre-embriones en día uno, en estadio pronuclear,<sup>4</sup> se ha convertido en otro parámetro morfológico útil de calidad embrionaria.

Al mismo tiempo, se reportó que aquellos embriones que mostraban división celular “temprana”, identificada por la presencia de embriones de dos células en cultivo a las 24-27 horas post-FIV o ICSI,<sup>5</sup> era un excelente marcador de calidad embrionaria. Pronto se convirtió en un parámetro morfológico de uso común, especialmente luego de haber sido reproducido por otros investigadores.<sup>6,7</sup>

Entre estos múltiples parámetros de evaluación morfológica, la multinucleación embrionaria (MNC) como signo de calidad ya ha sido identificada en varias publicaciones.<sup>8,9</sup> Sathananthan y col.<sup>10</sup> fueron quienes primero reportaron este hallazgo en 1982 y seguidamente otros investigadores también lo identificaron.<sup>11,12</sup> Recientemente, Morikawi y col.<sup>13</sup> reportaron que la MNC fue un mejor indicador de calidad embrionaria, comparándolo con el grado de fragmentación o simetría de las células embrionarias.

Hardy y col.,<sup>14</sup> publicaron un interesante trabajo sobre los posibles mecanismos fisiopatológicos de la multinucleación embrionaria y exploraron además otros aspectos que mejoraron los conocimientos sobre el verdadero significado de esta anomalía

dad embrionaria. Aún así, luego de todos estos años de conocer la MNC embrionaria, muchas preguntas no tienen respuesta y constituyen el foco de nuestro trabajo de investigación: ¿los mecanismos que generan la binucleación y micronucleación embrionaria son diferentes?, ¿con que frecuencia se observan anomalías cromosómicas en los embriones binucleados y micronucleados?, ¿tenemos una clasificación aceptable de embriones multinucleados que permita una buena comunicación entre embriólogos y clínicos?, ¿los embriones sin multinucleación en la misma cohorte están afectados?, ¿si se transfieren sólo embriones multinucleados se puede lograr un embarazo normal? Estos interrogantes constituyen la esencia de nuestro trabajo de investigación con el propósito de clarificar la fisiopatología y el significado clínico de la multinucleación embrionaria.

## **Materiales y métodos**

Con el propósito de llevar a cabo este proyecto de investigación hicimos un análisis detallado de todos los ciclos de RAAC en CEGyR durante el año 2005, tanto en pacientes que usaron sus propios oocitos, como también en receptoras de oocitos donados. Se hizo en forma prospectiva un listado de todos los casos con embriones multinucleados, así como los tipos y porcentaje de multinucleación presente.

Igualmente y también en forma prospectiva, se llevó a cabo el mismo tipo de análisis en todos los ciclos del año 2006, incluyendo donación de oocitos, hasta la mitad del año. Se hizo un seguimiento de aquellos embarazos que resultaron de la transferencia de solamente embriones multinucleados para determinar si llegaban a término y la salud de los recién nacidos de estos embarazos.

Se estudió la manera de generar una clasificación que pudiera servir para la comunicación entre médicos y embriólogos así como entre médicos y pacientes.

Finalmente, se hizo un estudio exhaustivo de embriones multinucleados para estudiar en ellos la estructura del citoesqueleto. Para este propósito utilizamos 50 embriones diagnosticados como MNC bajo microscopio de luz transmitida a las 48hs luego del ICSI. Todo el material fue aportado por el Laboratorio de Embriología del CEGyR bajo consentimiento escrito de los pacientes.

La metodología que se empleó para el estudio de estos embriones fue la de Inmunofluorescencia. La visualización de los resultados se realizó posteriormente mediante microscopía confocal (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA).

### **1. Obtención del material**

Los 50 embriones diagnosticados como MNC fueron transportados en microgotas cubiertas de aceite embrio-testeado hacia el laboratorio de investigaciones del CEGyR (LABINEE). A continuación el material fue procesado para su estudio por inmunocitoquímica.

### **2. Fijación y permeabilización del material**

La zona pelúcida de los embriones se remueve mediante el empleo de ácido tirodes (pH: 2,1-2,5). Luego se realizan 4 lavados en solución de bloqueo y se incuban en una placa de un hoyo conteniendo 1 ml de solución II (solución de fijación y permeabilización) durante 30 minutos a 37° C. El material se lava en gotas de solución de bloqueo y posteriormente es incubado en gotas de bloqueo cubiertas de aceite por 1 hora a 37° C con el fin de bloquear los sitios de unión inespecíficos (el material también puede ser bloqueado toda la noche a 4° C o bien quedar en la heladera hasta la realización de la inmunocitoquímica).

### **3. Inmunocitoquímica**

El material se incubaba toda la noche a 4° C ó 2 hs. a 37° C con el anticuerpo primario

de interés en gotas de 100 µl cubiertas de aceite y a continuación se realizan 4 lavados en gotas de solución de bloqueo. Luego, se incuban 1 hora a 37° C con el anticuerpo secundario junto con RNAsa (1/10) para que el ARN no interfiera en la identificación del DNA. Esto se lleva a cabo en gotas de 100 µl cubiertas de aceite y nuevamente se realizan 4 lavados en solución de bloqueo. Con el fin de visualizar el ADN, se incuban durante 25 minutos a 37° C con 10 µg/ml de un intercalante de ADN TOTO-3 (Catálogo T-3604, Molecular Probes) junto con RNAsa (1/10) en gotas de 100 µl cubiertas de aceite. Finalizado el tiempo de incubación se realizan los lavados en solución de bloqueo y los embriones se montan en portaobjetos de vidrio con medio de montaje Vectashield para retardar el fotoenvejecimiento de la muestra. Los resultados fueron visualizados mediante microscopio confocal Olympus (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales) equipado con rayos láser de longitud de onda 488, 543 y 633 nm. Todo el material fue procesado con Adobe Photoshop 7.0.

Los estudios de inmunocitoquímica utilizaron los siguientes anticuerpos primarios:

- **Anti F-actina:** detección de microfilamentos de actina filamentosa. Faloidina acoplada a fluorocromo 568.

- **Anti tubulina:** detección de microtúbulos. Dilución 1/200.

- **Anti complejo de poros nucleares:** detección de envoltura nuclear. Dilución 1/200.

- **Anti complejo Arp 2/3:** detección de proteína relacionada con Actina (reguladora de la dinámica de organización de microfilamentos). Dilución 1/100.

- **Anti Profilin:** Detección de proteína relacionada con Actina. Dilución 1/100.

Anticuerpos secundarios (Alexa Fluor, Molecular Probes) asociados a diferentes fluorocromos:

- **Anti-Ig 568 nm (rojo):** dilución 1/200.

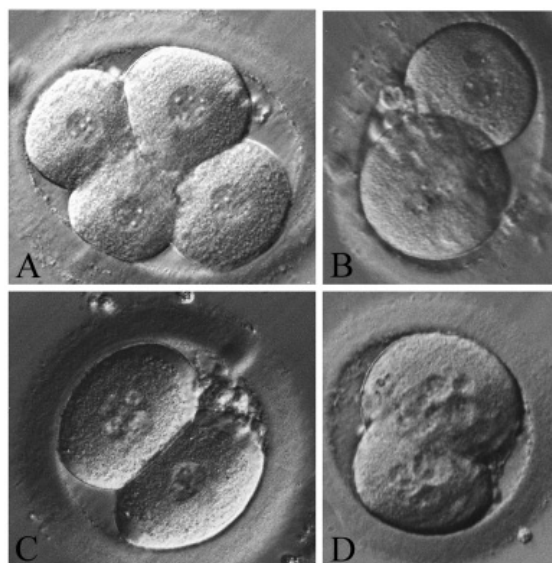
- **Anti-Ig 488 nm (verde):** dilución 1/200.

## Resultados

### Fisiopatología de la multinucleación embrionaria

La multinucleación embrionaria se puede definir como la presencia de dos o más núcleos en una célula embrionaria bajo cultivo *in vitro*. Lo normal es tener solamente un núcleo por célula como en un embrión normal mononucleado (figura 1A). Cuando están presentes dos núcleos lo denominamos célula o embrión binucleado (figura 1B). Mientras que si existen más de dos núcleos, hablamos de célula o embrión micronucleado (figura 1C y 1D). El significado de separar estos dos tipos de multinucleación se basa en que tienen un potencial diferente de llegar a blastocisto en cultivo *in vitro*, en sus tasas de anomalías cromosómicas, así como en su capacidad de lograr un embarazo si son transferidos durante un ciclo de RAAC.<sup>15, 16, 17</sup>

**Figura 1.** Embriones humanos bajo microscopía de contraste de fase (A) Embrión de cuatro células mononucleado. (B) Embrión de dos células binucleado. (C) Embrión de dos células micronucleado con perfil mixto (blastómera superior micronucleada y blastómera inferior binucleada). (D) Embrión de dos células micronucleado severamente afectado.



A pesar de los esfuerzos de los investigadores por descubrir cómo se desarrollan estas anomalías celulares en los embriones, los mecanismos que llevan a su formación son aún desconocidos.<sup>14,18</sup> Dado que las sucesivas divisiones celulares subdividen el citoplasma del embrión sin crecimiento celular, las células se vuelven proporcionalmente más pequeñas en los estadios más tardíos.<sup>14</sup> Estos hallazgos fueron recientemente confirmados por un análisis morfométrico de tamaño celular realizado por computación,<sup>19</sup> estudiando embriones mononucleares. Estos investigadores determinaron que el volumen promedio de una célula en un embrión de dos células fue de  $0,28 \times 106 \mu\text{m}^3$ , mientras que fue  $0,15 \times 106 \mu\text{m}^3$  en un embrión de 4 células ( $p < 0.01$ ). Contrariamente, las células multinucleadas fueron significativamente más grandes, tanto en estadio de dos células como de cuatro células, comparándolas con las células sin multinucleación del mismo embrión (51,5%-73,1% más pequeñas, respectivamente)  $p < 0,001$ .<sup>19</sup>

En relación con el volumen de células de embriones normales que uniformemente y regularmente han completado determinadas divisiones celulares, ha sido posible establecer cuántas divisiones ha realizado una célula embrionaria. Luego de comparar tamaños celulares monucleadas y binucleadas del mismo embrión, Hardy y col.<sup>14</sup> concluyeron que las células binucleadas se forman por una falla de la citokinesis en la segunda, tercera o cuarta división, y que la persistencia de algunas células binucleadas por uno o dos días luego de su formación inicial, sugieren que han llevado a cabo una detención en su división.

Mecanismos diferentes podrían explicar la micronucleación. Esta anomalía nuclear se puede formar por una continua cariokinesis y estos núcleos fragmentados pueden representar una forma de muerte celular similar a la apoptosis, donde una degradación posterior de estos fragmentos

produciría a veces una célula sin núcleo, otra variante de anomalía celular embrionaria. Cuáles son los detonantes de estos comportamientos celulares anormales es un tema controversial, pero condiciones de cultivo sub-óptimas, anomalías cromosómicas, propiedades de superficie celular defectuosas o una falta de componentes moleculares que favorecen la división celular son posibles causales, ya sea actuando por sí solas o en combinación.

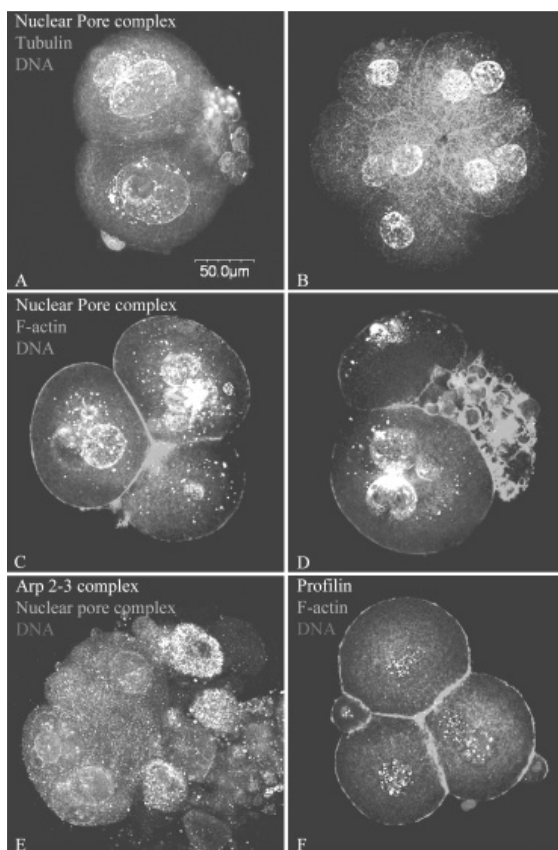
Una reestructuración celular, remodelamiento e *imprinting* son de fundamental importancia para el oocito en desarrollo y eventual embrión. Cualquier interrupción en estos delicados procesos podría causar errores durante la división celular, dando lugar a embriones anormales con potencial de expresar fenotipos multinucleados.<sup>18</sup>

Meriano y col.,<sup>18</sup> realizaron fotografías a intervalos secuenciales de embriones binucleados y micronucleados, y concluyeron que los diferentes núcleos en ambos tipos de multinucleación se disolvían independientemente con intervalos de varios minutos. Estos autores también observaron que los núcleos más grandes se disuelven más rápido que los más pequeños y que habría una tendencia hacia una desaparición más rápida de los micronúcleos en comparación con los binucleados. Dado que en este estudio se monitorearon pocos embriones, es difícil extraer conclusiones clínicas significativas en este momento.

Para tratar de dilucidar el posible mecanismo celular que opera durante la multinucleación en humanos, estudiamos diferentes estructuras del citoesqueleto bajo microscopía confocal (figura 2). En 50 embriones multinucleados estudiados (observación no publicada) analizamos la distribución de componentes cruciales como la F-actina, microtúbulos ( $\alpha$  y  $\beta$  tubulinas) y proteínas relacionadas con actina (Arps) como profilin que promueven la incorporación de los monómeros de actina en los filamentos y cuya

**Figura 2.** Microscopía confocal de diferentes componentes del citoesqueleto en embriones humanos multinucleados. Todos los embriones estudiados provienen de oocitos normalmente fertilizados y mostraron al menos una blastómera con más de dos núcleos en día 2. (A) Los microtúbulos (rojo) están uniformemente distribuidos a través del citoplasma. Observar que este embrión tiene blastómeras binucleadas asimétricas (dos núcleos en interfase de diferente tamaño) con envolturas nucleares desorganizadas (verde). (B) Este embrión binucleado tiene microtúbulos (rojo) uniformemente distribuidos a través del citoplasma. No se observan perfiles anormales. En este caso, se visualizan envolturas nucleares lisas y organizadas en cada núcleo de igual tamaño en interfase. (C) Se observa una distribución de F-actina en el citoplasma, más rica en la corteza, de un embrión multinucleado de tres células. Como se ve en A, las envolturas nucleares están desorganizadas, recordando las características de una célula apoptótica. (D) Embrión de dos células con distribución anormal y ausencia de filamentos de actina (rojo) homogéneos. La blastómera superior tiene sólo una pequeña cantidad de ADN rodeado de envolturas nucleares desorganizadas. En la blastómera inferior se puede ver la presencia de 4 núcleos. También se observan fragmentos anucleados ricos en actina. (E) El complejo Arp 2/3 (verde) está presente en el citoplasma y en el interior de cada núcleo, formando parte del “nucleoesqueleto”. En cada blastómera se observa una variable intensidad de la señal de fluorescencia. (F) Profilin (verde) se encuentra dispersa en el citoplasma y también dentro de cada núcleo en forma puntillada. Este perfil se asemeja a lo que se observa en embriones bovinos normales (ver Ref 20.). Los filamentos de actina aparecen normalmente distribuidos. Los embriones fueron examinados bajo un microscopio de espectro confocal (Olympus), usando de láser con longitud de onda de 488 nm, 568 nm y 633 nm (Facultad de Ciencias Exactas, UBA). Las imágenes fueron editadas con Adobe Photoshop 7.0.

nucleación está catalizada por el complejo Arp 2/3.<sup>20</sup> Los microtúbulos sirven como un andamio intracelular y su característica dinámica de polimerización, y son críticos para múltiples funciones celulares como la



división celular embrionaria. Si se encuentran defectos en la citokinesis durante la multinucleación embrionaria, uno esperaría encontrar anomalías en los componentes del citoesqueleto antes mencionados.

Nuestros datos preliminares muestran una desorganización de la F-actina (acumulación en distintas áreas o falta de distribución homogénea) en 46 % de los embriones estudiados (figura 2D), solamente cuando más de dos núcleos estaban presentes (embriones micronucleados). Contrariamente a lo que observamos en la mayoría de las células binucleadas (envolturas nucleares normalmente organizadas, figura 2B), las células micronucleadas mostraban una alta incidencia de características apoptóticas, como desorganización de la envoltura nuclear y falta o desorganización del ADN (figura 2A, 2C y 2D).

Tratando de dilucidar los posibles mecanismos que operan en la formación de células multinucleadas, nos preguntamos si este fenómeno estaría presente ya desde el estadio de pronúcleos (2pn). Con este propósito seleccionamos cigotos pronucleados supernumerarios (sobrantes) con aspecto normal bajo microscopía de luz y realizamos una visualización de su contenido de ADN. Nos sorprendimos al detectar que aproximadamente 30% de ellos mostraron la presencia de pequeñas acumulaciones de ADN fuera del área pronuclear (flechas, figura 3A).

Las figuras 3B y 3D muestran una representación esquemática de un mecanismo propuesto en la formación de micronúcleos; pequeños fragmentos de ADN están dispersos fuera del área pronuclear (figura 3B), permanecen allí sin ser monitoreados por controles deficientes y luego de la rotura de la envoltura nuclear (figura 3C), la primera división celular toma lugar (figura 3D) y el ADN desplazado es rodeado por una nueva envoltura nuclear formando micronúcleos visibles (con microscopía de luz transmitida) en el embrión recientemente formado.

En síntesis, puede haber más de un mecanismo para explicar la multinucleación embrionaria. Algunos investigadores opinan que la fisiopatología de la binucleación

y la micronucleación puede ser diferente.<sup>18</sup> Es posible que la cariokinesis sin citokinesis pueda ser la fuente de la binucleación, mientras que una continua cariokinesis o fragmentación de los núcleos pueden ser la fuente de la micronucleación. Los factores detonantes responsables del origen de estas anomalías nucleares pueden ser muy diversos, desde condiciones de cultivo subóptimas hasta anomalías cromosómicas propias del oocito relacionadas o no al tipo de respuesta ovárica a los protocolos de hiperestimulación ovárica controlada.

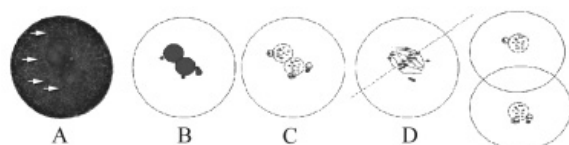
### Anomalías cromosómicas en embriones multinucleados

Los defectos cromosómicos durante los estadios tempranos del desarrollo embrionario humano son relativamente comunes y resultan en embriones con una capacidad de crecimiento limitado y una capacidad de implantación baja, si se los transfiere durante los procedimientos de RAAC.

En general, existe una correlación entre las anomalías cromosómicas y una morfología embriológica pobre. Sabemos que los embriones que presentan crecimiento lento, signos de fragmentación, células embrionarias asimétricas etc., son más factibles de tener cromosomas anormales.<sup>21</sup> La incidencia de anomalías cromosómicas en embriones multinucleados ha mostrado diferencias entre los embriones binucleados de los micronucleados. Kligman y col.<sup>16</sup> estudiaron la incidencia de anomalías cromosómicas en embriones multinucleados y hallaron que el 76,6% de los embriones eran anormales, mientras que solamente 32,3% de los mononucleados eran anormales,  $p < 0,05$ . Los tipos de anomalías fueron poliploidías, mosaicismo, monosomías o perfiles mixtos.

Las aneuploidías se pueden originar a través de dos mecanismos: pérdida de cromosoma o no disyunción. La pérdida de cromosoma ocurre por un retraso de los cromosomas durante la metafase, por ejem-

**Figura 3.** Imagen confocal y representación esquemática de un mecanismo propuesto para la formación de micronúcleos. (A) Presencia de pequeñas acumulaciones de ADN fuera del área pronuclear. (B-D) Los fragmentos de ADN están dispersos fuera del área pronuclear y luego de la rotura de la envoltura nuclear, toma lugar la división celular y el ADN desplazado es rodeado por nuevas y pequeñas envolturas nucleares, formando un embrión micronucleado.



plo por una falla de las fibras del huso de adherirse a un cromosoma. Si el cromosoma permanece retrasado en la placa metafásica, puede dar origen a micronúcleos. La no disyunción es la falla de dos cromátidas hermanas de segregarse normalmente, dando lugar a una célula que gana un cromosoma mientras que la otra pierde un cromosoma,<sup>22</sup> de allí que esta situación no dará origen a la formación de micronúcleos.

Un hecho relevante es que la acción de agentes genotóxicos, como los aneugenos (agentes que afectan la división celular y el huso mitótico, por lo tanto generando aneuploidía) pueden inducir micronúcleos embrionarios.

Meriano y col.<sup>18</sup> estudiaron un total de 69 células multinucleadas de 23 embriones con multinucleación en día dos y reportaron resultados en un total de 55 células analizadas por FISH; los embriones micronucleados mostraron una tasa de anormalidad del 96,3 %, mientras que los binucleados mostraron anomalías solamente en el 68% ( $p < 0,01$ ). Estos autores especulan que sus resultados explican la razón del porqué los embriones con células binucleadas llegan mas fácilmente a blastocisto,<sup>23</sup> así como también producen embarazos mas factiblemente si son transferidos.<sup>24</sup>

En síntesis, la tasa de anomalías cromosómicas en embriones multinucleados necesita ser mejor estudiada. Los datos disponibles parecen indicar que existe una alta incidencia de anomalías cromosómicas en embriones micronucleados, mientras que los embriones binucleados tienen una incidencia dentro del rango reportado para los embriones normales mononucleados.<sup>24</sup> Estos hallazgos son compatibles con la capacidad de estos embriones multinucleados de alcanzar el estadio de blastocisto bajo cultivo *in vitro*. Meriano y col.<sup>18</sup> han reportado recientemente que el 38 % de los embriones binucleados alcanzaron el estadio de blastocisto (38/102), mientras que solamente

lo hicieron un 8,6% (7/81,  $p < 0,05$ ) de los embriones micronucleados. También, Yakin y col.<sup>23</sup> reportaron sobre la capacidad de formar blastocistos *in vitro* en 5982 embriones. Los embriones multinucleados llegaron a blastocisto en solamente 11,4%, lo que fue significativamente menor que los embriones sin multinucleación, que lo lograron en el 51% ( $p < 0,05$ ) de los casos.

### **Clasificación de los embriones multinucleados**

Falta una clasificación satisfactoria de multinucleación embrionaria que permita a los embriólogos y clínicos interactuar apropiadamente usando un lenguaje que permita fácilmente determinar no solamente el significado de los hallazgos embriológicos en el laboratorio, sino que también le brinde al clínico un panorama claro para poder comunicarse con sus pacientes.

Pensamos que una clasificación útil debe considerar dos parámetros fundamentales: el tipo de multinucleación presente, ya sea binucleación o micronucleación, dado que clínicamente se comportan en forma diferente; y segundo, el número de células afectadas por la multinucleación en un embrión determinado, dado que una superficie mayor del embrión afectada parece tener un peor pronóstico que un embrión multinucleado con un menor número de células afectadas.<sup>18</sup>

Proponemos usar el número 1 para identificar la binucleación y el 2 para la micronucleación, luego usar un número que proporcionalmente defina el porcentaje del embrión comprometido con el defecto nuclear. Dado que en la mayoría de los casos de multinucleación se establece en día dos del cultivo embrionario, los embriones presentarán dos, tres o cuatro células.<sup>16</sup> Por ejemplo: un embrión de dos células con una célula binucleada será identificado como embrión multinucleado de dos células 1/50, el 1 identificando la binucleación y 50 el porcentaje de células comprometidas

con MNC. Un embrión de tres células con micronucleación en dos de sus células se definirá como un embrión multinucleado 2/66, 2 reflejando la micronucleación y 66 el porcentaje de células afectadas.

La descripta es una clasificación muy simple y no cubre todas las variables posibles de ser encontradas en embriología clínica. Por ejemplo, no considera la presencia de perfiles mixtos de MNC dentro del mismo embrión, aunque parece razonable identificar el embrión por el perfil de peor pronóstico.

Tampoco considera la presencia de variables dentro de un mismo perfil. Por ejemplo, los embriones binucleados pueden tener núcleos de igual o diferente tamaño. Parecería que la binucleación asimétrica tiene un peor pronóstico y como tal es apropiado diferenciarla, pero los datos no son concluyentes aún y hasta que más datos clínicos confirmen esta sospecha, ambos perfiles deben incluirse bajo el mismo grupo. En nuestro Centro corrientemente se usa una clasificación basada en numerar cada célula embrionaria: para la ausencia de MNC, 0 para binucleación simétrica, 1 para asimétrica y 3 o más dependiendo de los micronúcleos presentes. Por ejemplo: un embrión de dos células con una célula binucleada simétrica y una normal, sería 0/- y si fuera asimétrica sería 1/- y así sucesivamente.

En síntesis, necesitamos una clasificación amplia de multinucleación embrionaria para que ayude a comunicar embriólogos y clínicos, clínicos y pacientes, además de ser una herramienta para reportar hallazgos científicos. La clasificación propuesta en este trabajo es solo un paso inicial en la dirección correcta.

### **La multinucleación embrionaria en el laboratorio de FIV**

La multinucleación embrionaria es un hallazgo frecuente en el laboratorio de RA-AC. Si bien Hardy<sup>14</sup> reportó una tasa del 17,5% de binucleación, no se refirió a otras

anormalidades nucleares. Más tarde, Jackson y col.<sup>24</sup> mostraron una incidencia de 31% de multinucleación en todos los embriones estudiados y al menos un embrión multinucleado en el 74 % de todos los ciclos. Van Royen y col.<sup>25</sup> también mostraron multinucleación en 33,6% de todos los embriones y al menos un embrión multinucleado en el 79,6% de los ciclos.

Durante el año 2005 estudiamos un total de 1785 embriones en pacientes que usaron sus propios oocitos y encontramos embriones multinucleados en 33,5%, y la presencia de un embrión multinucleado en el 61,3% de los ciclos.<sup>26</sup> Sorprendentemente en el año 2006 la incidencia hasta ahora ha sido más baja, con multinucleación presente en el 19,5% de los embriones y en el 50% de todos los ciclos.

En relación al tipo de multinucleación presente, Meriano y col.<sup>18</sup> mostraron que entre los 183 embriones multinucleados evaluados, 55,7% (102/183) fueron binucleados y 44,3% micronucleados (81/183). Nuestros datos para el 2006 (total de 1569 embriones estudiados) mostraron un 35,6% de binucleación, 49,6% de micronucleación y un 14,7% de perfiles mixtos (siempre en pacientes con sus propios oocitos).

También evaluamos la incidencia de multinucleación en ciclos de donación de oocitos en el 2006 (total de 722 embriones) y encontramos una incidencia ligeramente más baja de MNC, (16,9%, 122/722); también los tipos individuales de multinucleación fueron diferentes, con un 46,8% de binucleación, 34,4% de micronucleación y 18,8% de mixtos. Es de interés que durante el año 2005 en todos los ciclos de donación de oocitos observamos que la presencia de multinucleación no incidía en la tasa de embarazo general (los ciclos con MNC o sin ella tuvieron la misma tasa de implantación y embarazo), sin embargo, si la tasa de MNC superaba el 50%, impactaba sobre la tasa de implantación =9,6% y de embarazo =10%,



que fueron significativamente más bajas que en los casos donde la MNC fue menor al 50%, donde la tasa de implantación llegó al 34,2% y la de embarazo al 52,1%. Sería importante analizar los diferentes tipos de MNC y su impacto sobre los parámetros señalados, dado que en los datos evaluados se agruparon todos los tipos de MNC juntos.

Es importante señalar que nuestro programa de donación de oocitos está basado en lo que denominamos *split cycle* o compartir oocitos,<sup>27</sup> donde los oocitos MII recuperados de una donante son distribuidos entre varias receptoras. Durante el año 2005 un promedio de 2,5 receptoras compartieron oocitos por donante y el número promedio de oocitos MII por receptora fue de 5,0.

Basándonos en la alta incidencia de anomalías cromosómicas, así como en la coexistencia de otras anomalías morfológicas del embrión como células embrionarias asimétricas,<sup>28</sup> y un alto grado de fragmentación o un pobre crecimiento de los embriones *in vitro*,<sup>25</sup> los embriones multinucleados generalmente son excluidos de las transferencias embrionarias.<sup>16</sup> Sin embargo, en ocasiones embriones multinucleados son todo lo que la paciente tiene para transferir y una decisión conjunta (pacientes y médicos) debe tomarse acerca de transferir este tipo de embriones.

De los casi 500 ciclos con transferencias en fresco, en pacientes que usaron sus propios oocitos durante el año 2005, separamos 22 casos donde sólo embriones multinucleados fueron transferidos. El promedio de edad en estas pacientes fue de 37,5 años y el promedio de embriones transferidos fue de 1,47 por paciente. Se consiguieron un total de 5 embarazos (22,7%), aunque uno abortó en el 1er trimestre.

De los cuatro embarazos evolutivos, todos llegaron a feliz término, dos casos con transferencia de embriones binucleados (50% de multinucleación), un caso no se documentó el tipo de MNC y finalmente el último caso fue lo que creemos es el 1er

caso reportado de embarazo a término con un recién nacido normal luego de transferir 2 embriones micronucleados.<sup>29</sup>

Durante la primera mitad del 2006 transferimos solamente embriones multinucleados en 8 casos (de 236 totales) y obtuvimos 3 embarazos, uno abortó en el 1er trimestre y los otros dos son evolutivos, un caso luego de transferir un embrión de 2 células binucleado y el otro luego de transferir 2 embriones micronucleados, resultando en un embarazo evolutivo con un saco único.

Otros embarazos reportados luego de transferir solamente embriones multinucleados fueron los de Jackson y col.<sup>24</sup> con una tasa de embarazo clínico de 8% y de nacidos vivos de 4% en 25 casos analizados. Balakier y col.<sup>30</sup> con un embarazo gemelar en 19 casos y Pelinck y col.<sup>31</sup> con un solo embarazo en 8 casos. Mientras Jackson<sup>24</sup> no reportó el tipo de multinucleación presente, los otros investigadores<sup>30,31</sup> transfirieron solamente embriones binucleados.

## Discusión

La multinucleación embrionaria en humanos es un evento común. Se ha visto que toma lugar *in vivo*,<sup>32</sup> pero claramente el cultivo *in vitro* de embriones humanos nos ha permitido identificar y estudiar diferentes aspectos de esta fascinante anomalía celular núcleo-citoplasmática.

Hemos acumulado suficiente datos clínicos para poder afirmar que ambos tipos de multinucleación, binucleación y micronucleación probablemente se originen a través de mecanismos diferentes (a pesar que los factores detonantes puedan o no ser los mismos) que tienen diferente capacidad de seguir dividiéndose y alcanzar el estadio de blastocisto *in vitro*, y que tienen pronósticos diferentes en términos de producir un embarazo si son transferidos como parte de un ciclo de RAAC.

Nuestra experiencia con embriones multinucleados muestra que la presencia de

multinucleación puede no estar relacionada con una respuesta ovárica exagerada a la estimulación ovárica como ha sido publicado por otros investigadores,<sup>24</sup> dado que donantes de oocitos jóvenes que mostraron niveles altos de estradiol el día que se administró HCG en nuestro programa no mostraron una mayor incidencia de multinucleación embrionaria cuando se comparó con pacientes de RAAC (de similar edad) que utilizaron sus propios oocitos.<sup>30</sup>

Queda por demostrar si en pacientes de RAAC jóvenes con disfunción ovárica y una respuesta exagerada a la estimulación ovárica (como en PCOS) existe una mayor incidencia de multinucleación embrionaria en comparación con donantes de oocitos jóvenes que tiene una función y una reserva ovárica normal.

Como fue mencionado, sospechamos que los mecanismos que llevan a la binucleación y a la micronucleación son diferentes y estas diferencias se reflejan en las tasas de anomalías cromosómicas observadas con cada tipo de multinucleación. Meriano y col.,<sup>18</sup> usando fotografía secuencial en el tiempo, observó que los núcleos desaparecen independientemente, confirmando que cada grupo de material cromosómico era distinto y adherido a husos mitóticos separados, resultando en el continuo desarrollo de células hijas anormales si había anomalías cromosómicas pre-existentes. Esto trae a colación otro aspecto clínico importante como el hecho de que los embriones binucleados parecen no afectar al resto de la cohorte embrionaria que no presenta multinucleación, mientras que parece que los embriones micronucleados sí la afectan.<sup>18</sup> Este hecho explicaría por qué las expectativas de embarazo son diferentes cuando se transfieren embriones sin multinucleación bajo estos dos tipos diferentes de circunstancias.

Como ya sugerimos, la presencia de multinucleación embrionaria puede ser la manifestación celular de condiciones de cultivo

sub-óptimas. Una observación interesante es que el incremento en la frecuencia de micronúcleos en una población de células somáticas (los micronúcleos son evidentes en los glóbulos rojos que no tienen ADN en el núcleo) es sugestivo de genotoxicidad. El llamado "test de micronucleación" fue desarrollado hace más de dos décadas<sup>22</sup> como un medio de establecer *in vivo* la presencia de daño cromosómico en células somáticas. El ensayo está basado en la observación de que la cromatina desplazada inducida por diferentes mutágenos (químicos o por radiación) puede resultar en pérdida o rotura cromosómica, dando lugar a la formación de un núcleo secundario (micronúcleo) fuera del núcleo principal de una célula en división luego de la telofase.

Creemos que es necesaria una clasificación de multinucleación embrionaria fundamentalmente para reportar en forma uniforme sobre estas anomalías núcleo-citoplásmicas, así como también para comparar diferentes eventos que toman lugar en los procedimientos de RAAC. También sería de utilidad para informar sobre estos hallazgos embriológicos a nuestras pacientes. En este sentido, no es lo mismo tener un número importante de embriones micronucleados con muchas células embrionarias comprometidas, versus unos pocos embriones binucleados con menos del 50% de compromiso celular.

Recientemente, Ciray y col.<sup>33</sup> postularon que en su opinión solamente embriones con tres o más núcleos calificaban para ser llamados multinucleados, ya que hay evidencias que los embriones binucleados pueden desarrollarse normalmente.<sup>34</sup> Sundstrom<sup>35</sup> contestó en desacuerdo, reportando que los embriones con dos o más núcleos deben ser considerados patológicos (desarreglo de los cromosomas) y que estos embriones deben ser evitados o no considerados para ser transferidos a causa de su baja tasa de implantación.

Consideramos la clasificación propuesta en este trabajo como un esfuerzo en la dirección correcta ya que toma en cuenta ambos tipos de multinucleación, así como el porcentaje del embrión comprometido con la anormalidad. Tiene deficiencias ya que no considera los perfiles mixtos o las diferencias en el tamaño de los núcleos que deberán ser corregidas en el futuro cuando incrementemos nuestros conocimientos y experiencia en esta área de la embriología clínica.

Existe consenso en que si existen embriones mononucleados para la transferencia, ellos deben ser seleccionados sobre aquellos que presentan multinucleación, más allá del perfil o tipo identificado. Como se ha dicho, la binucleación no parece afectar significativamente al resto de la cohorte embrionaria sin multinucleación, mientras que la presencia de micronucleación sí los afecta (y la propia reparación es remota), como se refleja en el bajo potencial de formar blastocistos, así como en la baja incidencia de embarazos evolutivos si estos embriones son transferidos.

Se nos presenta un dilema ético si la paciente sólo tiene embriones multinucleados para ser transferidos. Opinamos que en esta situación, si morfológicamente los embriones lucen normales y la binucleación fue el perfil identificado, parece razonable que se transfieran. Mientras que si la paciente sólo tiene para transferir embriones micronucleados con morfología aceptable, una amplia charla informativa con la pareja es obligatoria para compartir con ellos lo que sabemos sobre anomalías cromosómicas en embriones micronucleados, el hecho que lograr un embarazo es muy poco probable y que un aborto espontáneo puede ser el resultado final si se consiguió un embarazo luego de la transferencia. Un recién nacido normal puede ocurrir luego de transferir embriones micronucleados,<sup>29</sup> pero basándonos en lo que conocemos acerca de los defectos cromosómicos,<sup>18</sup> nos parece muy poco probable.

De nuestros datos preliminares sobre multinucleación embrionaria en ciclos de donación de oocitos, concluimos que si la multinucleación está presente en menos del 50% de la cohorte embrionaria, las tasas generales de implantación y embarazo no se ven afectadas. Pero si la multinucleación prevalece entre los embriones disponibles para ser transferidos, las tasas de implantación y embarazo se ven negativamente afectadas.<sup>28</sup>

En síntesis, la identificación y perfil de multinucleación embrionaria, debe continuar siendo parte de la evaluación morfológica de calidad embrionaria con el propósito de seleccionar los embriones con el mayor potencial de implantarse. Mantener los datos de binucleación y micronucleación en forma separada aparece como una medida prudente, dado el impacto diferente que cada tipo tiene sobre el resto de la cohorte embrionaria.

También parece prudente el excluir los embriones multinucleados de las transferencias en favor de aquéllos sin multinucleación, entendiendo que la presencia de micronucleación parece afectar al resto de los embriones, aún a aquellos sin multinucleación, en su potencial de implantarse.

Esperemos que en un futuro cercano la investigación nos ayude a entender mejor la etiología de la multinucleación embrionaria, sus mecanismos detonantes y cómo o por qué algunos embriones multinucleados se corrigen en forma espontánea y generan blastocistos con una alta capacidad de implantarse y generar embarazos normales. De allí que entender el mecanismo celular operativo en la multinucleación embrionaria, así como su completo significado biológico y clínico, es uno de los retos todavía presentes en biología reproductiva.

### Bibliografía

1. Gerris J y Van Royen E. Avoiding multiple pregnancies in ART. A plea for single embryo transfer. *Hum Reprod* 2000;15:1884-1888.

2. Gleicher N y Barad D. The relative myth of elective single embryo transfer. *Hum Reprod* 2006; 21:1337-1344.
3. Veeck L. An Atlas of Human gametes and conceptuses, Parthenon Publishing Group, New York, London pp. 178-183.
4. Nagy ZP, Dozortsev D, Diamond M y col. Pronuclear morphology evaluation with subsequent evaluation of embryo morphology significantly increases implantation rates. *Fertil Steril* 2003; 80:67-74.
5. Sakkas D, Shoukir Y, Chardonnens D y Col. Early cleavage of human embryos to the two cell stage after ICSI as an indicator of embryo viability. *Hum Reprod* 1998;13:182-187.
6. Salumets A, Hyden-Granskog C, Makinen S y col. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum Reprod* 2003;18:821-825.
7. Van Montfoort AP, Dumoulin JC, Keater AD y col. Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. *Hum Reprod* 2004;19: 2103-2108.
8. Morikawa T, Suganuma N, Hayakawa M y col. Embryo evaluation by analysing blastomere nuclei. *Hum Reprod* 2004;19:152-156.
9. Tesarik J, Kopečný V, Plachot M y col. Ultrastructural and autoradiographic observations on multinucleated blastomeres of human cleaving embryos obtained by IVF. *Hum Reprod* 1987; 2:127-136.
10. Sathananthan A, Wood C, Leeton J. Ultrastructural evaluation of 8-16 cell human embryos cultured *in vitro*. *Micron* 1982;13:193-203.
11. Lopata A, Kohlman D, Johnston I. The fine structure of normal and abnormal human embryos developed in culture. In: Beier HM and Lindner HR, eds. *Fertilization of the Human egg in vitro*, Springer-Verlag, Berlin 1983;211-221.
12. Trounson A, Sathananthan AH. The application of electron microscopy in the evaluation of two to four cell human embryos. *J of In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1984;1:153-165.
13. Morikawa T, Suganuma N, Hayakawa M y col. Embryo evaluation by analysing blastomere nuclei. *Hum Reprod* 2004;19:152-156.
14. Hardy K, Winston R, Handyside AH. Binucleated blastomeres in preimplantation human embryos *in vitro*: failure of cytokinesis during early cleavage. *J Reprod and Fertil* 1993;98:549-558.
15. Munné S, Cohen J. Unsuitability of multinucleated blastomeres for PGD. *Hum Reprod* 1993;7: 1120-1125.
16. Kligman I, Benadiva C, Alikani M y col. The presence of multinucleated blastomeres in human embryos is correlated with chromosomal abnormalities. *Hum Reprod* 1996;11:1492-1496.
17. Pelinck MJ, De Vos M, Dekens M y col. Embryos cultured *in vitro* with multinucleated blastomeres have poor implantation potential in human IVF-ET. *Hum Reprod* 1998;13:960-963.
18. Meriano J, Clark C, Cadesky K y col. Binucleated and micronucleated blastomeres in embryos derived from human assisted reproduction cycles. *Reprod Biomed Online* 2004;9:511-520.
19. 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;19:288-293.
20. Rawe VY, Payne C, Schatten G. Profilin and actin related proteins regulate microfilaments dynamics during early mammalian embryogenesis. *Hum Reprod* 2006;21:1143-1153.
21. Munné S, Alikani M, Tomkin G y col. Embryo morphology, developmental rates and maternal age are correlated with chromosomal abnormalities. *Fertil Steril* 1995;64:382-391.
22. Kirsch-Volders K, Vanhauwert A, De Boeck M y col. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutat Res*, 2002;504:137-148.
23. Yakin K, Balaban B y Urban 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; 83:243-245.
24. Jackson KV, Ginsburg E, Hornstein M y col. Multinucleation in normally fertilized embryos is associated with an accelerated ovulation induction response and lower implantation and pregnancy rates in IVF-ET cycles. *Fertile Steril* 1998; 70:60-66.
25. Park J, Kort J, Bodine R y col. Is blastomere

- multinucleation associated with poor growth and lower rates of blastocyst development? *Fertil Steril* 2005;84(Suppl 1)S234.
26. Van Royen E, Mangelschots K, Vercruyssen M y col. Multinucleation in cleavage stage embryos. *Hum Reprod* 2003;18:1062-1069.
  27. Glujovsky D, Fiszbajn G, Lipowicz R y col. Practice of sharing oocytes among several recipients, *Fertil Steril* 2006;86:1786-1788.
  28. Lavalpe M, Nodar F, Fiszbajn G y col. Significance of embryo multinucleation in oocyte donation cycles. *Fertil Steril* 2006;86(Suppl 3)S182.
  29. Lavalpe M, Nodar F, Rawe VY y col. The transfer of micronucleated embryos resulted in a term pregnancy and healthy newborn, *Reprod Biomed Online* (accepted for publication).
  30. Balakier H, Cadensky C. The frequency and developmental capability of human embryos containing multinucleated blastomeres. *Hum Reprod* 1997;12:800-804.
  31. Pelinck MJ, De Vos M, Dekens M y col. Embryos cultured *in vitro* with multinucleated blastomeres have poor implantation potential in human IVF and ICSI. *Hum Reprod* 1998;13:960-963.
  32. Hertig AT, Rock J, Adams EC. On the preimplantation stages of the human ovum: a description of four normal and four abnormal specimens ranging from the second to the fifth day of development. *Contrib Embryol*, 1953;35:201-220.
  33. Ciray HN, Karagenc L, Bener F y col. Early cleavage morphology affects the quality and implantation potential of day 3 embryos. *Fertil Steril* 2006;85:358-365.
  34. Staessen LA, Van Steirteghem A. The genetic constitution of multinuclear blastomeres and their derivative daughter blastomeres. *Hum Reprod* 1998;13:1625-1631.
  35. Sundstrom P. Interpretations of multinucleation- is it ever normal? *Fertil Steril* 2006;86:494.