

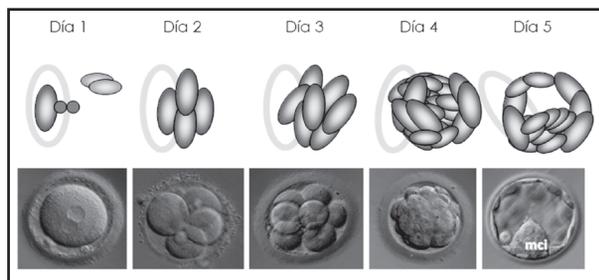
## Desarrollo hasta blastocisto y diagnóstico genético preimplantación

Blga. Soledad Sepúlveda

### DESARROLLO HASTA BLASTOCISTO

El desarrollo inicial de los mamíferos se extiende desde la fecundación hasta la implantación del embrión en el endometrio del útero materno. Esta etapa culmina con la formación del blastocisto, en el cual se distinguen por primera vez dos tipos celulares, la masa celular interna y el trofoblasto (*figura 1*).

El desarrollo preimplantacional comprende divisiones celulares, compactación y la diferenciación celular del blastocisto. Durante este periodo se mantiene el tamaño del embrión, que mide aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de diámetro en el humano. La fecundación ocurre en la porción ampular de las trompas y desde allí el embrión es impulsado hacia el útero. Este tránsito dura entre 5 y 6 días y durante el cual, ocurren las divisiones celulares. Cuando el embrión se ha segmentado en 8 células se inicia el proceso de compactación. Hasta ese estado los blastómeros son esféricos, presentan solo contactos puntuales entre ellos. En la compactación los blastómeros adyacentes se aplanan unos contra otros, extendiéndose así las áreas de contacto intercelular (Sepúlveda et al, 1985).



**Figura 1.** Desarrollo preimplantacional en humanos. Día 1: cigoto con dos pronúcleos centrales y dos corpúsculos polares en el espacio perivitelino. Día 2: cuatro células. Día 3: ocho células. Día 4: mórula. Día 5: blastocisto. Obsérvese la masa celular interna (mci), rodeada por el trofoblasto.

Al finalizar el paso por la trompa, el embrión es una mórula. En los blastómeros periféricos se establecen *tight junctions* zonulares sellando así los espacios entre las células externas, que constituirán el trofoblasto. Desde estados más tempranos, ya en algunos blastómeros de la mórula se observa la acumulación de material en el citoplasma que luego se vacía a los espacios interblastoméricos. El sellamiento impide la difusión del material intercelular hacia el espacio extraembrionario, formándose así la cavidad blastocélica.

De esta manera, la mórula compuesta de un solo tipo de células se transforma en un blastocisto, en el cual puede reconocerse la diferenciación de los blastómeros en dos tipos celulares. Los blastómeros periféricos constituyen un epitelio aplanado, denominado trofoblasto y los blastómeros centrales, constituyen la masa celular interna que queda desplazada hacia un polo (*figura 1*). La masa celular interna, dará origen al embrión propiamente tal y parte de los anexos embrionarios. El trofoblasto dará origen a la mayor parte de los anexos.

Tratando de maximizar los resultados en los programas de Reproducción Asistida, se buscan herramientas para poder seleccionar el mejor embrión para transferir, el cual nos de origen a un embarazo y finalmente a un bebe saludable. Las estrategias de selección embrionaria incluyen el análisis del clivaje temprano, el grado de fragmentación y la multinucleación. También, se utilizan métodos más invasivos, como el diagnóstico genético preimplantacional (PGD), que permite descartar embriones aneuploides.

El desarrollo temprano del humano es poco eficiente y sólo unos pocos cigotos van a llegar a blastular e implantarse. Por lo tanto, el cultivo extendido hasta blastocisto es una forma sencilla de selección embrionaria, donde los embriones llegan a alcanzar diferentes grados de blastulación o se quedan detenidos en etapas previas del desarrollo. Un embrión que se desarrolla hasta el estadio de blastocisto, tiene mejores chances de implantar. Las primeras divisiones del embrión están controladas por los RNA-mensajeros maternos que hay en el citoplasma del ovocito. La expresión génica propia del embrión comienza en el paso del estadio de 4 a 8 células y es frecuente observar bloqueo del clivaje por falla en la activación del genoma propio del embrión (Braude et al., 1988).

En la mayoría de los laboratorios de Reproducción Asistida, los embriones que serán transferidos, son elegidos de acuerdo a su apariencia morfológica, puesto que se ha sugerido que los embriones de buen aspecto tienen mayores chances de implantar que los que poseen fragmentos o están dañados. Sin embargo, solo el 40 % de los blastocistos son cromosómicamente normales (Munné et al. 2007).

### **DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL**

El diagnóstico genético pre-implantacional (PGD) es una técnica que permite diagnosticar el estatus cromosómico de cada embrión aumentando la probabilidad de embarazo al transferir un embrión cromosómicamente normal. Es un nuevo método de diagnóstico prenatal que se realiza en el embrión antes de su transferencia al útero. En las parejas con riesgo de transmitir a la descendencia alteraciones cromosómicas o genéticas, el PGD informa sobre el estado de cada uno de los embriones y permite seleccionar embriones sanos, en los cromosomas que se realizó el análisis, para su transferencia al útero. Está indicado cuando existe riesgo de que

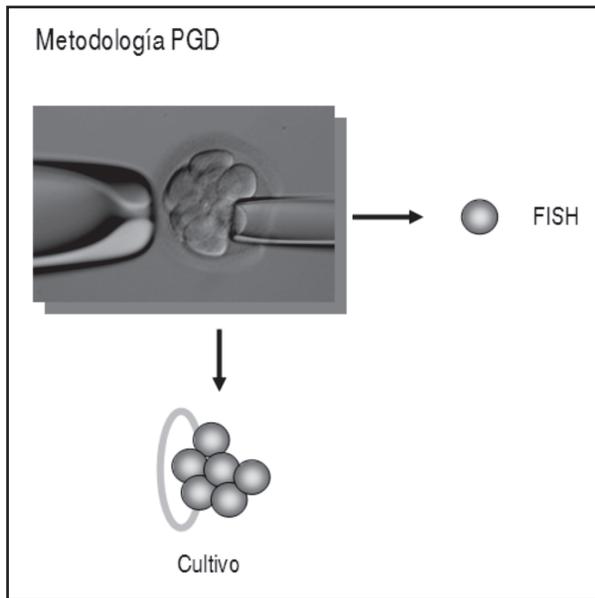
los embriones presenten alteraciones graves del número o la constitución de los cromosomas o una alteración en el gen causante de la enfermedad monogénica reseñada como indicación.

Actualmente los cromosomas que son analizados por medio de sondas para detectar aneuploidías son: X, Y, 8, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21 y 22, la razón está centrada en el potencial de detección del 90% de abortos espontáneos que poseen estos cromosomas implicados (Bahce et al., 2000), sin embargo, también se realizan análisis de 5 cromosomas: X, Y, 13, 18 y 21, y la variante más común de 9 cromosomas: X, Y, 13, 15, 16, 17, 18, 21 y 22. Todo el análisis por PGD está basado en la extracción de cuerpos polares del ovocito o de una blastómera del estadio de 6 – 8 células (Munné et al., 1993; Munné et al., 1995) o de una biopsia al blastocisto.

### **METODOLOGIA DEL PGD**

Durante el estadio de 6-8 células (día 3) los embriones se colocan en un medio libre de calcio y magnesio, lo que reduce la adhesión intercelular. Bajo microscopio invertido y utilizando micromanipuladores, se realiza una apertura de aproximadamente 30 µm en la zona pelúcida utilizando una solución de tyrode ácido. Luego, se extrae una blastómera para realizar el PGD. La blastómera es fijada mediante metanol y ácido acético 3:1. Una vez realizada la biopsia, los embriones se colocan de nuevo en el incubador, donde se mantienen en cultivo hasta que se obtiene el resultado del diagnóstico y se valora su posible transferencia (Figura 2). La lámina con las células fijadas se somete a análisis por hibridación fluorescente in situ (FISH).

Estudios prospectivos al azar reportan un incremento en la tasa de nacidos vivos, después de la transferencia de embriones seleccionados, como cromosómicamente normales por PGD (Schoolcraft et al. 2009).



**Figura 2.** Metodología del PGD. Mediante el uso de micromanipuladores y micropipetas se realiza la extracción de un blastómero, el cual se fija y se realiza diagnóstico mediante hibridación fluorescente in situ (FISH). El embrión es devuelto a la incubadora y prosigue su cultivo.

## REFERENCIAS

Bahçe M, Escudero T, Sandalinas M, Morrison L, Legator M, Munné S. (2000) Improvements of preimplantation diagnosis of aneuploidy by using microwave hybridization,

cell recycling and monoclonal labelling of probes. *Mol Hum Reprod.* 6: 849-854.

Braude, P.; Bolton, V. & Moore, S. (1988). Human gene expression first occurs between the four and eight cell stage of preimplantation development. *Nature* 332: 458-461.

Munné S, Tomkin G, Cohen J. (2009). Selection of embryos by morphology is less effective than by a combination of aneuploidy testing and morphology observations. *Fertil Steril.* 91: 943-945.

Munné S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J. (1993). Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod.* 8: 2185-2191.

Munné S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. (1995). Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril.* 64: 382-391.

Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG, Stevens J, Rawlins M, Munné S. (2009). Preimplantation aneuploidy testing for infertile patients of advanced maternal age: a randomized prospective trial. *Fertil Steril.* 92: 157-162.

Sepúlveda S, Doggenweiler C, Izquierdo L. (1985). Scanning microscopy of disaggregated and aggregated preimplantation mouse embryos. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 194: 445-452.