

Desarrollo embrionario temprano de equinodermos, anfibios, pez teleósteo (pez cebra) y mamíferos.

Objetivo:

- Introducción al estudio de algunas etapas del desarrollo embrionario temprano y análisis comparado de tipos de ovocitos, patrones de segmentación y gastrulación en los distintos modelos.
- Integración de conceptos de estructura y dinámica celular utilizando como modelo el desarrollo.
- Introducción al análisis de problemas fundamentales de la biología del desarrollo.

Introducción:

Segmentación:

El desarrollo de un organismo multicelular, luego de la fecundación, ocurre mediante un proceso denominado **clivaje** o **segmentación** (serie de divisiones mitóticas que dividen al citoplasma del cigoto en numerosas células más pequeñas, las **blastómeras**). El patrón de segmentación embrionaria está determinado principalmente por 2 parámetros: 1) factores genéticos que establecen el ángulo y momento de formación del huso mitótico y 2) la cantidad y distribución del vitelo.

En general, el vitelo inhibe la segmentación; el **polo animal** del embrión se encuentra relativamente libre de vitelo y su opuesto, el **polo vegetal**, es rico en éste.

De acuerdo a la cantidad de vitelo que presentan, los ovocitos se clasifican en: **alecitos** (sin vitelo), **oligolecitos** (poca cantidad de vitelo, generalmente con distribución homogénea (isolecito)), **mesolecitos** (cantidad moderada de vitelo distribuido hacia el polo vegetal) y **telolecitos** (abundante cantidad de vitelo que ocupa prácticamente todo el volumen ovocitario). El patrón de segmentación en embriones provenientes de ovocitos isolecitos y mesolecitos es **holoblástico** o **total** y en embriones provenientes de ovocitos telolecitos es **meroblástico** o **parcial**.

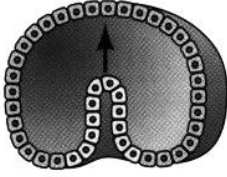
Hacia el final de esta primera etapa del desarrollo embrionario ocurre la formación de una cavidad dentro de la masa de blastómeras en división denominada **blastocoele**. El embrión resultante se conoce como **blástula**.

Gastrulación

Es un proceso de movimiento celular que involucra a todo el embrión y resulta en la organización de las 3 hojas embrionarias: **ectodermo** (capa celular externa), **mesodermo** (capa celular intermedia) y **endodermo** (capa celular interna).

Aunque el patrón de gastrulación es variable dependiendo de la especie, usualmente involucra una combinación de los siguientes tipos de movimientos básicos:

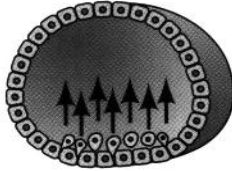
- **invaginación:** plegamiento de una capa de células hacia el interior del embrión.



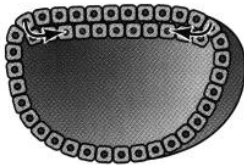
- **involución:** movimiento de una capa de células utilizando otra como sustrato hacia el interior del embrión.



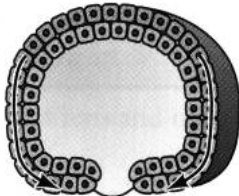
- **ingresión:** migración de células individuales hacia el interior del embrión.



- **delaminación:** generación de una capa de células que se desprende a partir de otra capa celular.



- **epibolia:** expansión de una capa celular sobre otras células o capas.



El comienzo de esta etapa del desarrollo se identifica por la aparición de ciertas estructuras características de cada grupo de organismos: **invaginación de la placa vegetal** (equinodermos), formación del **labio dorsal del blastoporo** (anfibios), **escudo embrionario (peces)** o **línea primitiva** (aves y mamíferos).

*Esquemas modificados de Developmental Biology. Gilbert. 6^{ta} Ed.

DESARROLLO TEMPRANO DEL EMBRIÓN DE ERIZO DE MAR

Los óvulos del erizo de mar son liberados tras haber completado ambas divisiones meióticas, y poseen una cantidad pequeña de vitelo (ya que los embriones darán lugar a una larva pelágica que es capaz de alimentarse por sí misma). Cada óvulo es fecundado en el mar por espermatozoides que también fueron liberados al exterior para dar lugar a un **cigoto** (fecundación externa).

El clivaje temprano es altamente estereotipado (es decir, ocurre de igual manera en diferentes embriones), y es de tipo **radial** y **holoblástico** (Figura 1). Las dos primeras divisiones son meridionales (atravesando el cigoto desde el polo animal al vegetal) y perpendiculares entre sí. La tercera división es ecuatorial, y perpendicular a los dos primeros planos de división, separando así los hemisferios animal y vegetal. La cuarta división es diferente: las cuatro células del hemisferio animal se dividen meridionalmente para dar lugar a ocho blastómeros con tamaños similares, denominados **mesómeros**; en cambio, las cuatro células del polo vegetal se dividen en forma ecuatorial desigual para dar lugar a cuatro células grandes (**macrómeros**) y cuatro células mucho más pequeñas en el polo vegetal (**micrómeros**). Las siguientes divisiones ya no son completamente sincrónicas, y dan lugar a capas apiladas de mesómeros en el hemisferio animal, de macrómeros en el hemisferio vegetal, y de micrómeros en el polo vegetal. En su primera división, los micrómeros se dividen nuevamente en forma desigual, dando lugar a **micrómeros pequeños** y **micrómeros grandes**. A partir de experimentos en los que se siguió el destino de estas células a lo largo del desarrollo embrionario, se conoce la contribución de las mismas a las diferentes capas germinales en el desarrollo. Las células del hemisferio animal (mesómeros) dan lugar al ectodermo y sus derivados. Los macrómeros dan lugar principalmente al **endodermo** y a una parte del **mesodermo** denominada "**mesénquima no esqueletogénico**" (también llamado mesénquima secundario), que generará células musculares, células pigmentarias, e inmunocitos de la larva. Finalmente, las dos poblaciones de micrómeros tienen diferentes destinos: los micrómeros mayores dan lugar al "**mesénquima esqueletogénico**" (también llamado mesénquima primario), que formará las estructuras esqueléticas de la larva, mientras que en cambio los micrómeros menores no tienen un rol en la embriogénesis temprana, sino que son incorporados al mesodermo de la larva y contribuyen más tarde a la formación de los órganos del adulto durante la **metamorfosis** larval.

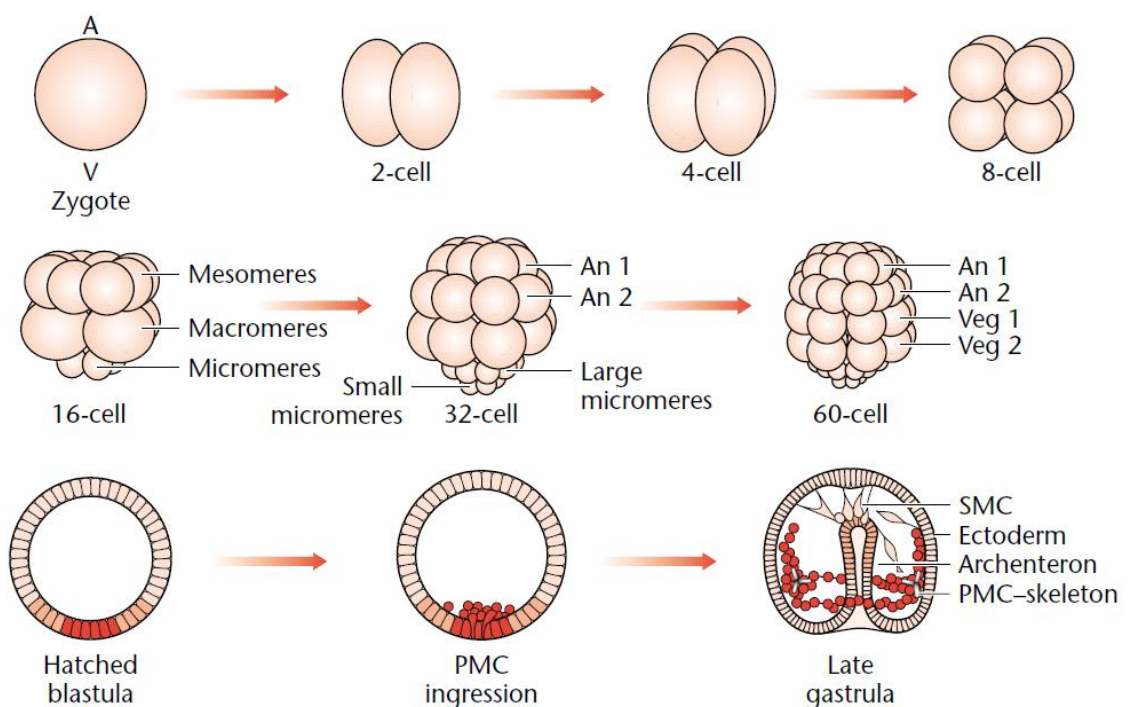


Figura 1. Clivaje y gastrulación en el embrión de erizo de mar. Tomada de McClay, 2009, Cleavage and Gastrulation in the Sea Urchin. Encyclopedia of Life Sciences, Wiley Online Library.

Los embriones de unas 120 células generan una cavidad interna, el **blastocoele**, y son denominados por lo tanto **blástulas** (Figura 1). El patrón de clivaje se va volviendo cada vez más irregular y menos sincrónico, y los micrómeros detienen sus divisiones. Todas las células del embrión se encuentran formando una monocapa epitelial rodeando el blastocoele, por lo que la blástula es una “pelota hueca” de células. Los **blastómeros** se vuelven ciliados en la región exterior de sus membranas, dando lugar a una blástula ciliada que es liberada de la membrana de fecundación para nadar libremente.

En la blástula, las células que están destinadas a formar el endodermo y mesodermo se encuentran aún en el exterior del embrión, y deben ser introducidas al interior durante el proceso de **gastrulación** (Figuras 1 y 2). En el embrión de erizo de mar, este proceso es iniciado por los descendientes de los micrómeros mayores, es decir, por el mesénquima esqueletogénico. Estas células llevan a cabo una **transición epitelio-mesenquimática**, perdiendo la adhesión con sus células vecinas en el epitelio embrionario, y migrando como células individuales hacia el interior del blastocoele. Dentro del blastocoele, estas células extienden filamentos delgados (**filopodios**) que dirigen su migración hacia la región ventro-lateral del blastocoele. Una vez en esta región, las células del mesénquima esqueletogénico se fusionan para dar lugar a cables sincitiales que formarán las espículas de carbonato de calcio de la larva.

Mientras las células del mesénquima esqueletogénico migran hacia el interior del blastocoele, también ocurren cambios importantes en sus células vecinas en la región vegetal. Estas células se mantienen unidas formando un epitelio, y se engrosan para formar una **placa vegetal**. La placa se invagina en el polo vegetal mediante un cambio de forma de las células que la componen, produciéndose la internalización de las células de la placa vegetal dentro del blastocoele. La región invaginada constituye el **arquenterón**, o **intestino primitivo**, y está compuesto por las células del endodermo y del mesodermo no esqueletogénico. La apertura del arquenterón en el polo vegetal es denominada **blastoporo**, y en el erizo de mar dará lugar al ano (desarrollo de tipo **deuterostomado**). El arquenterón continúa extendiéndose hacia el interior del blastocoele, transformándose en un tubo largo y delgado. La elongación del arquenterón depende de diferentes procesos, incluyendo la proliferación de las células del endodermo mientras entran al blastocoele, y el re-arreglo de las células del arquenterón para intercalarse entre sí, un fenómeno llamado “**extensión convergente**”. Eventualmente, el arquenterón contacta la región antero-ventral del blastocoele, y en esta región se formará la boca de la larva, dando así lugar a un tubo digestivo completo con aperturas en ambos extremos. Las células del mesénquima no esquelétogénico dejan entonces el arquenterón para migrar dentro del blastocoele y generar diversas estructuras mesodérmicas.

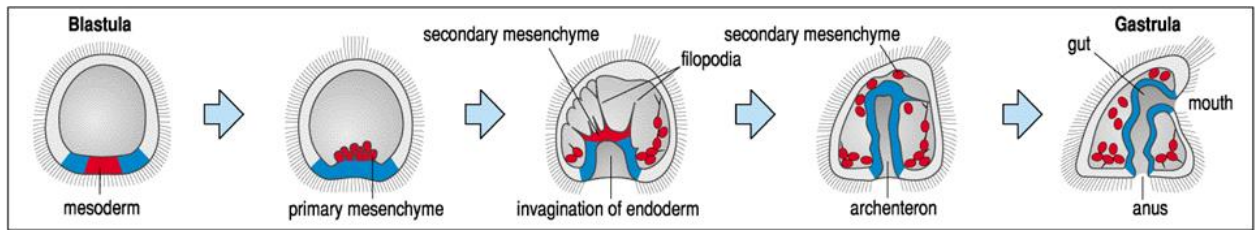


Figura 2. Gastrulación en el erizo de mar. Tomada de Encyclopedia of Life Sciences, 2009, Wiley Online Library.

DESARROLLO TEMPRANO DEL PEZ CEBRA (*DANIO RERIO*)

Los ovocitos del pez cebra, cuando son liberados al medio externo, se encuentran detenidos en la metafase de la segunda división meiótica. Si éstos son fecundados por un espermatozoide (fecundación externa), retoman y terminan la meiosis previamente a la fusión del material genético.

Los ovocitos de la mayoría de los peces teleósteos poseen gran cantidad de vitelo ubicado principalmente en el polo vegetal del ovocito: **telolecitos**. El clivaje es de tipo **discoidal** (solo ocurre en el **blastodisco**: región citoplásmica del polo animal libre de vitelo), y **meroblástico** (parcial) (Figura 1).

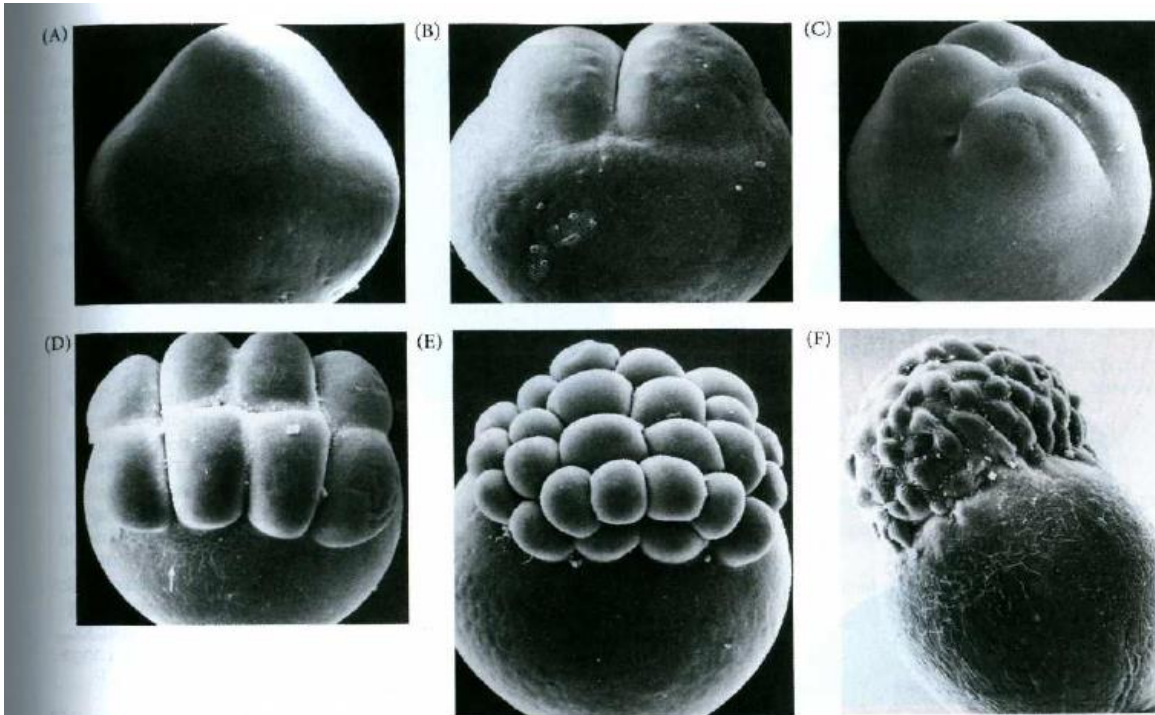


Figura 1. Desarrollo temprano del embrión de pez cebra. A) Embrión de 1 célula; B) embrión de 2 células; C) Embrión de 4 células, D) Embrión de 8 células, E) Embrión de 32 células F) Embrión de 64 células. Tomada de Gilbert, 2017.

Las primeras divisiones meridionales y ecuatoriales son rápidas (aproximadamente 15 minutos cada una) y siguen un patrón altamente reproducible. Las primeras 10 divisiones son sincrónicas y generan el **blastodermo**. Los peces experimentan la **transición de la blástula media** (pez cebra: décima división aproximadamente) en la que comienza la transcripción de genes cigóticos, la velocidad de las divisiones celulares disminuye y comienzan a evidenciarse movimientos celulares. En este momento es posible distinguir 3 poblaciones celulares: **1) capa sincitial vitelina** (“yolk syncitial layer”) no contribuye células al embrión pero es esencial en la generación del organizador, modelado del mesodermo y guiar la epibolia del ectodermo. Formada por la fusión de las células más vegetales del blastodermo con el vitelo subyacente. Esta fusión produce un anillo de núcleos inmediatamente por debajo del blastodermo; **2) capa envolvente** (“enveloping layer”) protectora, permite el desarrollo del embrión en un medio hipotónico. Formada por las células más superficiales del blastodermo que forman una capa epitelial de 1 célula de espesor; **3) blastómeras profundas** (“deep cells”) originan el embrión y se ubican entre las capas 1 y 2. El mapa de destino presuntivo de las blastómeras puede

conocerse poco antes del comienzo de la gastrulación. En este momento, células ubicadas en regiones específicas del embrión originarán ciertos tejidos de manera altamente predecible (Figura 2).

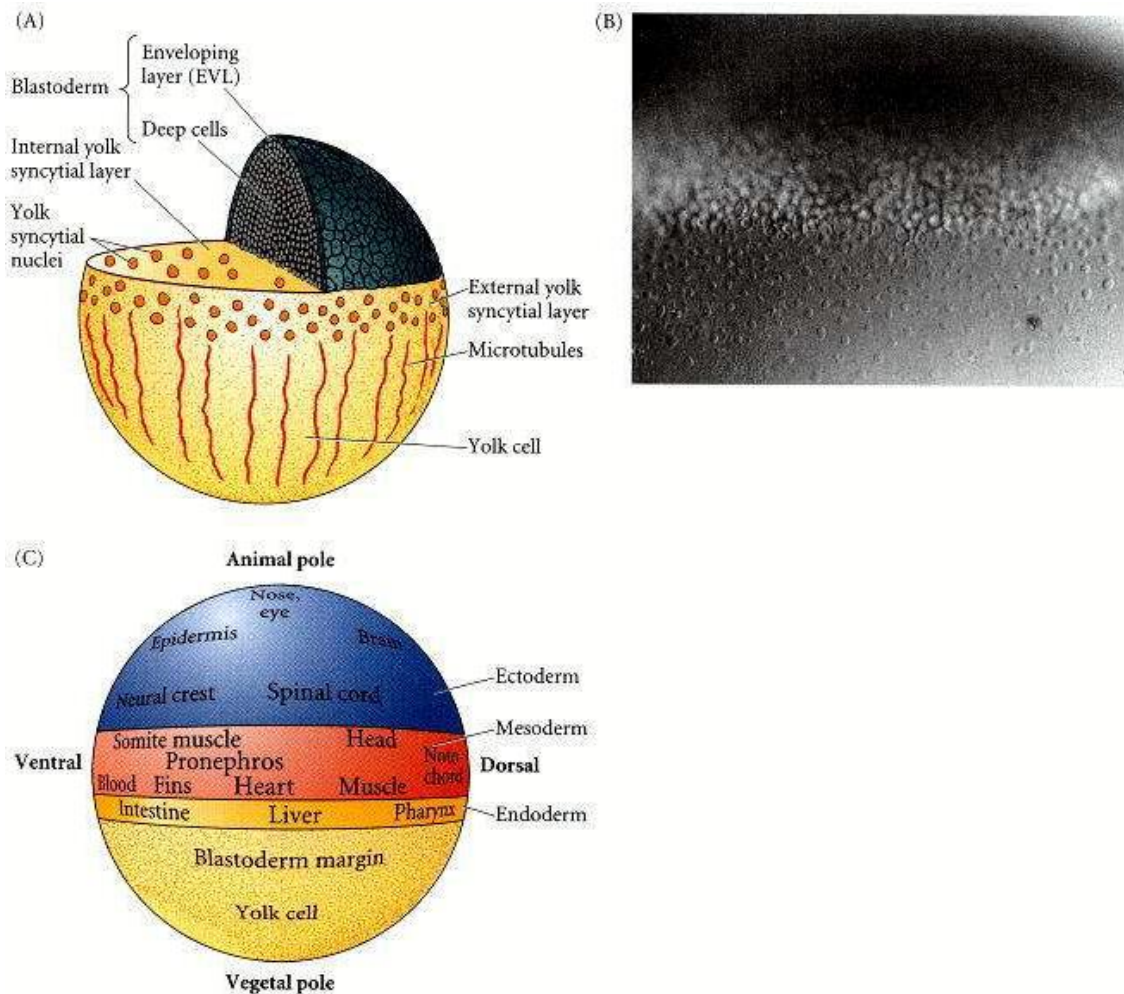


Figura 2. Blástula de pez. A) Previo a la gastrulación las células profundas están rodeadas por la capa celular envolvente. La superficie más animal del vitelo contiene los núcleos de la capa sincitial vitelina. B) Blastula tardía. C) Mapa de destino presuntivo de las células profundas. Tomada de Gilbert, 2017.

Las tres capas del blastomero experimentan **epibolia** (primer movimiento de gastrulación en peces) sobre el vitelo desde el polo animal hacia el vegetal. Cuando aproximadamente la mitad del vitelo está cubierto, se evidencia un engrosamiento en todo el margen de las blastómeras, **anillo germinal**, compuesto por una capa superficial denominada **epiblasto** (futuro ectodermo) y una capa interna denominada **hipoblasto** (futuro endodermo y mesodermo). El hipoblasto se internaliza de manera sincrónica presentando ciertas características de **ingresión** (especialmente en la región dorsal) e **involución** (especialmente en las regiones ventrales futuras) (Figura 3).

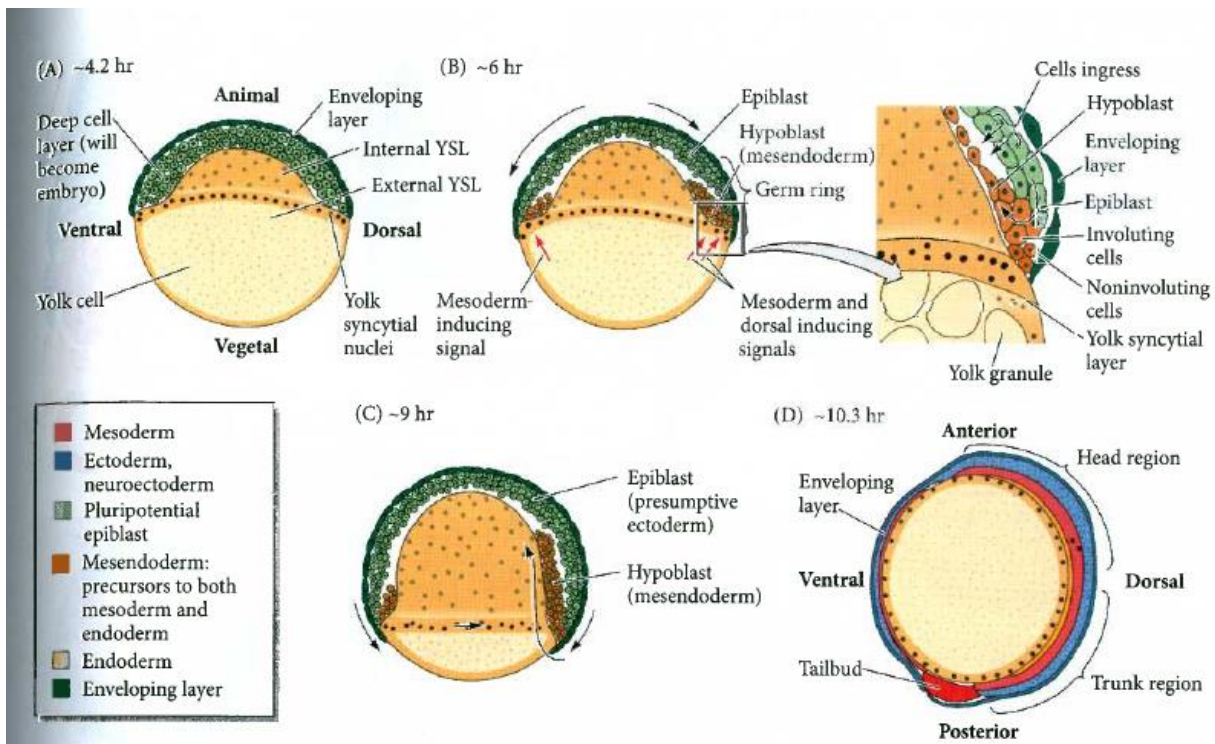


Figura 3. Movimientos celulares durante la gastrulación de pez cebra. A) Blastodermo 30% de epibolia. B) Formación del hipoblasto. C) Epibolia casi completa. D) Gastrulación completa: las 3 capas embrionarias están presentes. Tomada de Gilbert, 2017.

Una vez formado el hipoblasto, las células del epiblasto y el hipoblasto se intercalan en la futura región dorsal del embrión formando un engrosamiento localizado denominado **escudo embrionario**. En el escudo las células convergen y se extienden anteriormente a lo largo de la línea media dorsal. Este fenómeno de extensión convergente del hipoblasto forma el **cordamesodermo**, (precursor de la **notocorda**) y es similar al observado en *Xenopus*. El escudo embrionario es equivalente funcional al labio dorsal del blastoporo de anfibios ya que puede organizar (inducir) la formación de un eje embrionario secundario cuando se trasplanta a otro embrión. Las células adyacentes al cordamesodermo (mesodermo paraxial) son las precursoras de los somites.

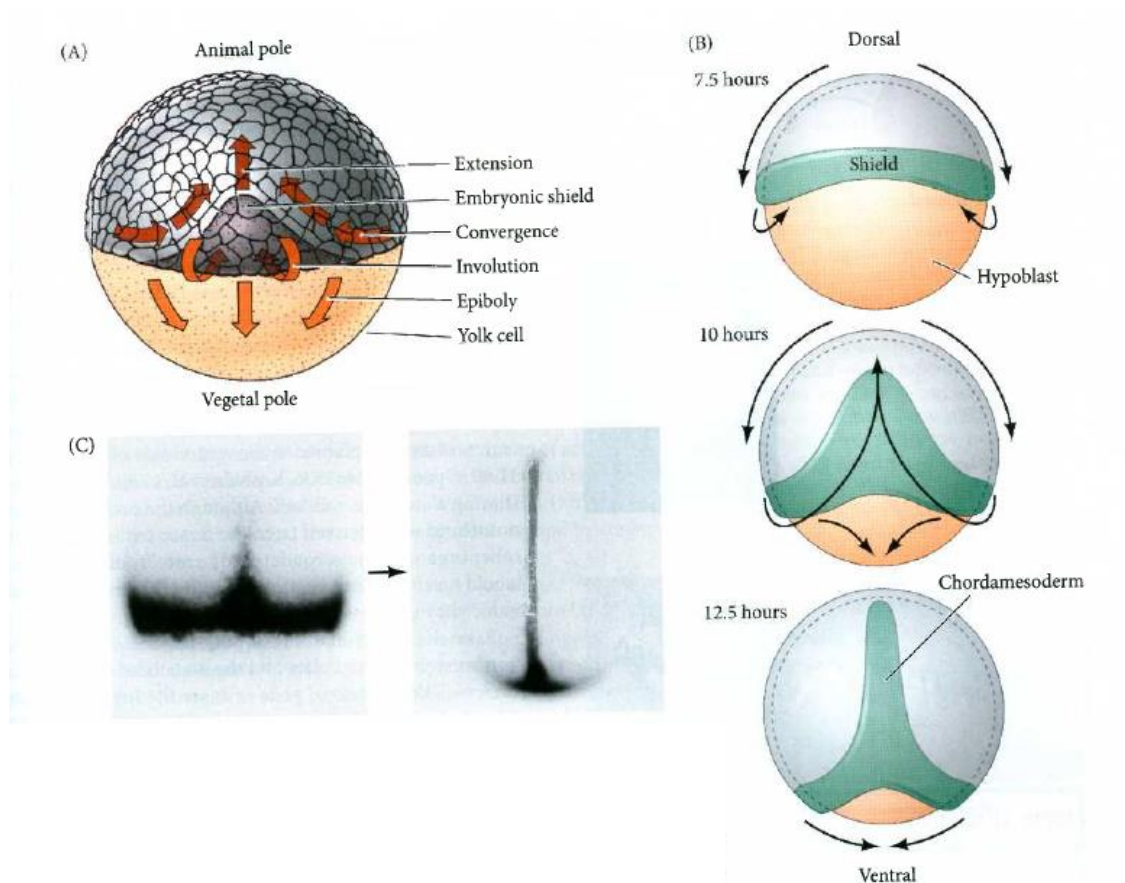


Figura 4. Fenómeno de extensión convergente. A) Vista dorsal. B) Modelo de formación del mesendodermo (hipoblasto). Los números indican horas post fecundación. C) Células del hipoblasto marcadas por la expresión del gen *no-tail* (área oscura) que codifica un factor de transcripción. Tomada de Gilbert, 2017.

A medida que el fenómeno de extensión convergente ubica a las células neurales presuntivas en la línea media dorsal del epiblasto, se forma la **quilla neural** que se extiende por el eje del mesodermo axial y paraxial. Posteriormente desarrollará una luz formándose el tubo neural en el interior del embrión.

Las células que permanecen en el epiblasto forman la epidermis. En el lado ventral, el anillo de hipoblasto se mueve hacia el polo vegetal migrando por debajo del epiblasto que está experimentando epibolia sobre el vitelo. El anillo se cierra en el polo vegetal completándose la internalización de aquellas células que formarán el mesodermo y el endodermo.

Al culminar la gastrulación el embrión multicelular de pez cebra consta de tres capas: ectodermo externo, endodermo interno y mesodermo entre ambos

Developmental Biology, Gilbert, S.F., Barresi, M.J.F. 11 ed. 2017

DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO EN *XENOPUS*

La oogenesis en *Xenopus* lleva varios meses, durante los cuales los ovocitos crecen y acumulan una gran cantidad de vitelo. Este vitelo se acumula en el **polo vegetal** del ovocito, mientras que el núcleo se encuentra en el **polo animal**. El polo vegetal tiene un color claro, mientras que el polo animal se torna de color gris debido a la acumulación de gránulos de pigmento (Figura 1).

En el momento de la ovulación, el ovocito tiene 1.2 mm de diámetro aproximadamente y se encuentra bloqueado en la segunda metafase meiótica. La hembra libera los ovocitos en el agua, y los mismos son fecundados en forma externa por el macho. Tras la fecundación, se completa la segunda división meiótica del ovocito, y ocurre la fusión de los pronúcleos masculino y femenino, dando lugar al cigoto (Figura 1). La entrada del espermatozoide en el polo animal del ovocito inicia además un re-arreglo del citoplasma llamado **rotación cortical**. Se trata de una rotación del citoplasma cortical del ovocito respecto al citoplasma interior, que lleva a una reducción de la pigmentación del hemisferio animal en lo que será luego la región dorsal del embrión (Figura 1). Estos movimientos citoplasmáticos son esenciales para la especificación de los ejes principales del embrión.

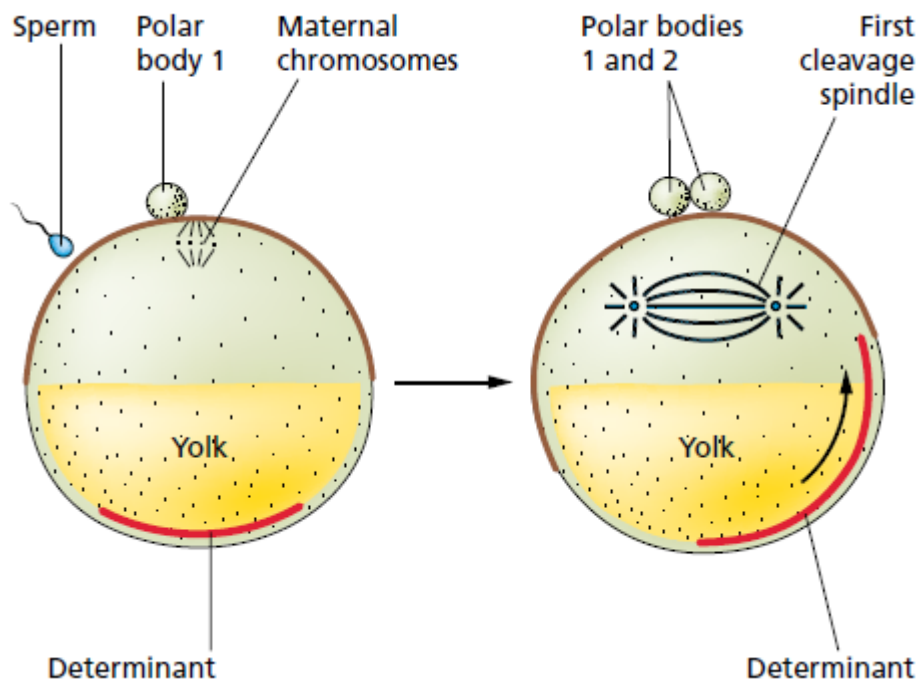


Figura 1. Fecundación y rotación cortical en *Xenopus*. Tomada de Slack, 2006, Essential Developmental Biology, Blackwell Publishing.

El desarrollo embrionario temprano puede dividirse en las etapas de clivaje, gastrulación y neurulación, que se describen a continuación.

Clivaje (Figura 2)

El clivaje en *Xenopus* es **radial, holoblástico y desigual**, ya que las células del polo vegetal, ricas en vitelo, son de mayor tamaño que las del polo animal. La primera división es vertical e iniciada en el polo animal, separando al cigoto en dos mitades, izquierda y derecha. La segunda división también es vertical, y perpendicular a la primera, separando la mitad dorsal de la ventral. El proceso de división es más lento en las regiones vegetales, ricas en vitelo, por lo que la segunda división es iniciada en el polo animal mientras la primera división aún no ha sido completada en el polo vegetal. La tercera división es ecuatorial pero desigual, separando las partes animal (más pequeña) y vegetal (más grande) del embrión. Las divisiones siguientes son algo variables, pero típicamente resultan en cuatro filas de ocho células en la etapa de 32 células. Como en otras especies, las células que resultan de estas divisiones tempranas son llamadas **blastómeros**, y el embrión temprano (entre 16 y 64 células) es denominado **mórula**. Durante el clivaje, se va formando una cavidad denominada **blastocoele** en el centro del hemisferio animal, que es visible a partir del estadio de 128 células. A partir de este momento, el embrión es denominado **blástula**. El clivaje continúa rápidamente durante las primeras 12 divisiones, tras las cuales ocurre la llamada **transición de la blástula media**. Tras esta transición, el ritmo de divisiones se vuelve más lento, y se pierde su sincronía. Además, se inicia la transcripción de los genes cigóticos.

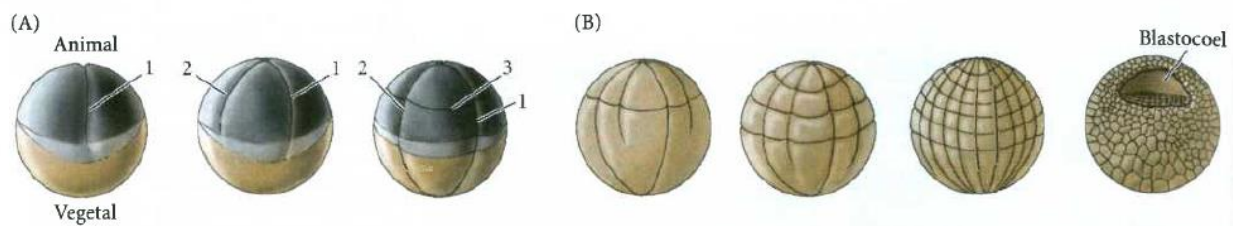


Figura 2. Clivaje en *Xenopus*. Tomada de Gilbert, 2006, *Developmental Biology*, Sinauer Associates, Inc.

Gastrulación (Figura 3)

Durante la gastrulación de *Xenopus*, un cinturón de tejido que rodea el ecuador del embrión (la **región marginal**) es internalizado inicialmente hacia el blastocele, seguido por la internalización de la región vegetal rica en vitelo. Esta internalización ocurre a través de un orificio llamado **blastoporo**. La gastrulación se produce a partir de varios tipos diferentes de movimientos celulares (**movimientos morfogenéticos**), y resulta en la formación de un embrión con tres **capas germinales**: el **ectodermo** en el exterior (formado a partir de las células no internalizadas del polo animal), el **endodermo** en el interior (formado principalmente a partir de las células ricas en vitelo del polo vegetal), y el **mesodermo** entre ambos (formado principalmente a partir de las células de la región marginal). El embrión en este estadio es denominado **gástrula**.

El inicio de la formación del blastoporo está marcado por la aparición de una depresión en la región vegetal dorsal. El blastoporo se elonga lateralmente para volverse un círculo, con una región dorsal y otra ventral (los labios dorsal y ventral, respectivamente). Existen células elongadas en forma de botella alrededor del blastoporo, que son necesarias para el inicio de la internalización de los tejidos en el blastocele.

Es posible distinguir varios componentes diferentes en los movimientos de gastrulación en *Xenopus*. A continuación se describen algunos de los principales movimientos morfogenéticos durante este proceso:

- La **invaginación** de las células de la zona marginal, para formar el blastoporo. La invaginación comienza en la zona dorsal del blastoporo y se continúa en las regiones laterales y ventrales del mismo. La cavidad formada por esta invaginación es denominada arquenterón o intestino primitivo, y se expande a expensas de la cavidad del blastocele.
- Mientras la invaginación va ocurriendo, el mesodermo se separa del endodermo e **involuta** sobre el techo del blastocele, formando una capa entre ectodermo y endodermo.
- Al mismo tiempo, el ectodermo se expande mediante **epibolia** desde el polo animal, cubriendo eventualmente toda la superficie del embrión.

Las capas germinales formadas durante la gastrulación darán lugar a los diferentes tejidos de la larva y del adulto. El ectodermo dará lugar principalmente a la epidermis y al sistema nervioso; el endodermo dará lugar al recubrimiento epitelial del sistema digestivo y sus derivados (hígado, páncreas, pulmones, etc.), y el mesodermo se divide en diferentes poblaciones que darán lugar a dermis, corazón, vasos sanguíneos, sangre, músculo, esqueleto, gónadas, riñones, etc. (los destinos del mesodermo se verán en más detalle en el próximo práctico, al estudiar el desarrollo del embrión de pollo).

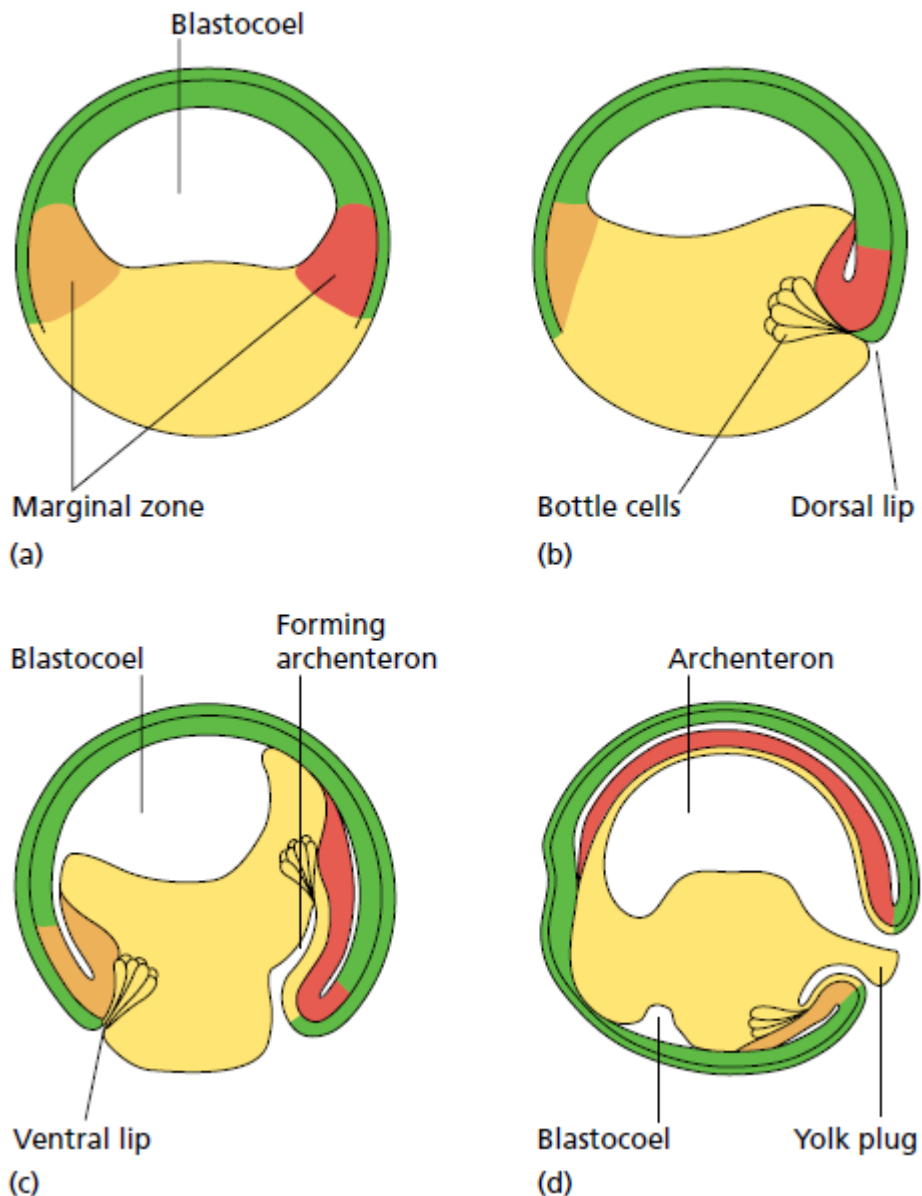


Figura 3. Gastrulación en *Xenopus*. A) Blástula. B) Gástrula temprana. C) Gástrula media. D) Gástrula tardía. Tomada de Slack, 2006, Essential Developmental Biology, Blackwell Publishing.

Neurulación (Figura 4)

En el siguiente estadio del desarrollo embrionario (llamado **néurula**), el ectodermo de la región dorsal da lugar al sistema nervioso central. Inicialmente, esta región se distingue como un engrosamiento del ectodermo (la **placa neural**), delimitada por **pliegues neurales**. Rápidamente, estos pliegues se elevan y se fusionan para formar un **tubo neural**, que es internalizado y cubierto por el resto del ectodermo. Este tubo neural dará lugar al sistema nervioso central. El proceso de neurulación se verá en mayor detalle en el próximo práctico, al estudiar el desarrollo del embrión de pollo.

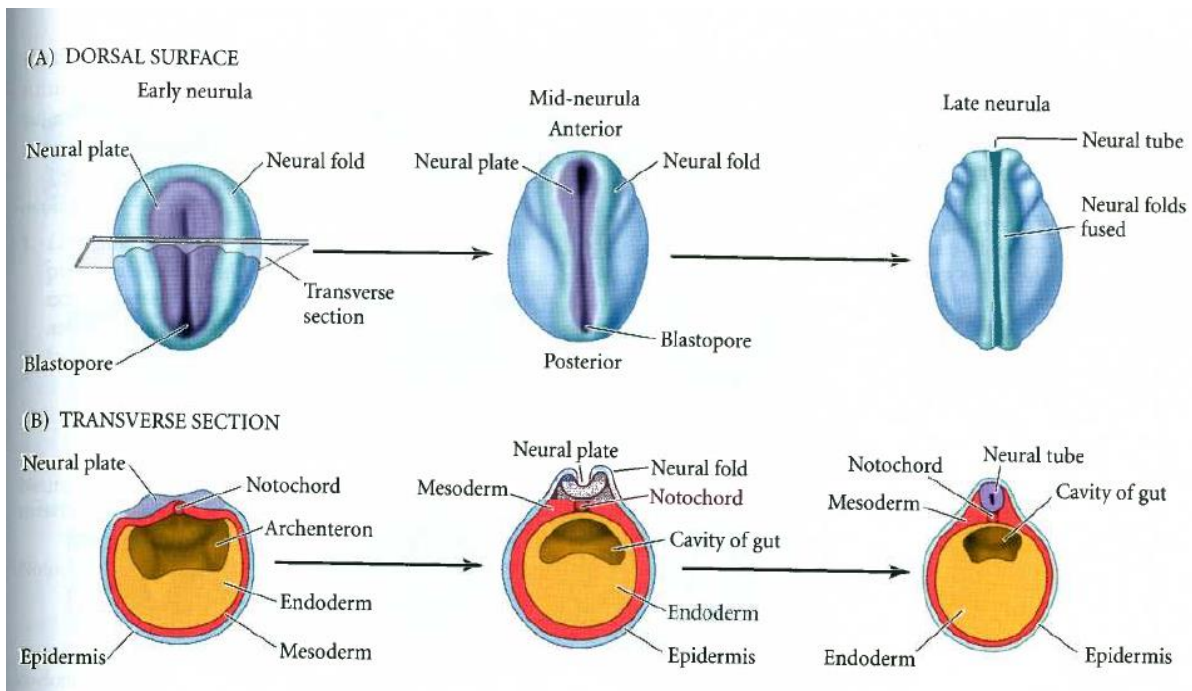


Figura 4. Neurulación en *Xenopus*. A) Vistas dorsales, y B) Cortes transversales, de embriones de néurula temprana, media y tardía (izquierda, centro y derecha, respectivamente). Tomada de Gilbert, 2006, *Developmental Biology*, Sinauer Associates, Inc.

DESARROLLO TEMPRANO EN RATÓN (*MUS MUSCULUS*)

El apareamiento de los ratones ocurre por la noche, y la ovulación sucede unas pocas horas tras el apareamiento. La fecundación ocurre en el extremo superior del oviducto. Los ratones, como casi todos los mamíferos, son vivíparos, y los embriones deben implantarse en el útero de la madre. Por lo tanto, el desarrollo se divide en etapas de pre-implantación y de post-implantación. En este práctico, sólo cubriremos las primeras etapas del desarrollo previo a la implantación.

Tras la fecundación, las primeras divisiones transcurren lentamente. La primera división ocurre tras unas 24 horas, y las segundas y terceras divisiones, que no son completamente sincrónicas, ocurren a intervalos de unas 12 horas. A diferencia de *Xenopus* y pez zebra, la expresión del genoma cigótico comienza tempranamente, desde la etapa de dos células. En la etapa de ocho células, ocurre el proceso de **compactación**, en el que los blastómeros estrechan los contactos intercelulares entre sí, dando lugar a una masa compacta de células. Estos contactos estrechos dependen de la interacción de los blastómeros a través de la Cadherina E.

Entre la etapa de compactación (8 células) y la etapa de 32 células, el embrión es denominado **mórula**. En esta etapa, las células se polarizan radialmente, y aparecen microvilli en la superficie externa. Además, se forman uniones comunicantes (gap) entre los blastómeros, y se forman desmosomas y uniones estrechas entre las células, generando una barrera de permeabilidad entre el interior y el exterior del embrión. Una vez establecida esta barrera, se empieza a formar una cavidad llena de líquido en el interior del embrión, denominada **blastocoele**. Esto ocurre aproximadamente tres días tras la fecundación, mientras el embrión es desplazado desde el oviducto hacia el útero. La cavidad interna continúa expandiéndose, y el embrión pasa a denominarse **blastocisto**, en el cual ya existen dos poblaciones celulares diferentes: por un lado, una capa epitelial exterior denominada **trofoectodermo o trofoblasto**, y por el otro, una acumulación interior de células denominada el **macizo celular interno**. El trofoectodermo dará lugar al corion, una envoltura extraembrionaria que junto a contribuciones del tejido uterino formará la placenta, mientras que el macizo celular interno dará lugar al embrión en sí mismo, y a los demás anexos embrionarios.

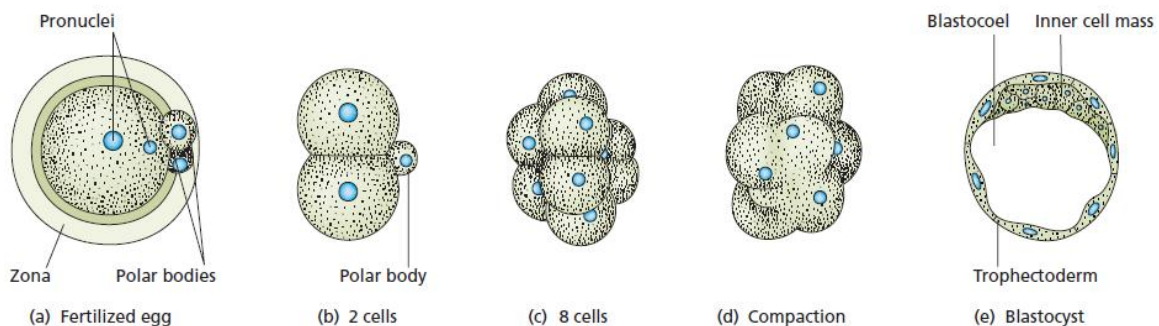


Figura 1. Desarrollo temprano (pre-implantación) en el ratón. Tomada de Slack, 2006, Essential Developmental Biology, Blackwell Publishing.