

# MUERTE CELULAR PROGRAMADA O APOPTOSIS: SIGNIFICADO BIOLÓGICO Y DIAGNÓSTICO DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO

Dr. Marco Celestinos A. (M. V. Z.)  
Dr. Alfonso Sánchez R. (M. V.; M.Sc.)

## Introducción

En los organismos superiores se reconocen dos formas de muerte celular: Necrosis y Apoptosis. La primera, tal vez la más conocida, es el resultado de daño tisular grave (trauma, toxinas, químicos) y afecta a grupos celulares, causando dilatación celular y ruptura de la membrana plasmática, condiciones que inducen una respuesta inflamatoria en las células sanas adyacentes. El mecanismo de la necrosis se gatilla sin intervención activa de las células.

Por otra parte, la muerte celular programada o apoptosis, también llamada "suicidio celular", afecta sólo a células individuales o aisladas y no se asocia a inflamación. La apoptosis juega un rol determinante en la eliminación de células dañadas o peligrosas para el organismo (células infectadas con virus, células del sistema inmune, células con daño en el ADN, células cancerígenas) y también es necesaria para un adecuado proceso de división celular (mitosis) en estructuras en desarrollo, ya que al remover células no deseadas permite un adecuado balance para la mantención de un número celular óptimo.

El objetivo del presente artículo es entregar una visión breve y actualizada a cerca de la muerte celular programada y su relación con el desarrollo embrionario, así como de las técnicas para el diagnóstico de apoptosis empleadas en la producción de embriones *in vitro*.

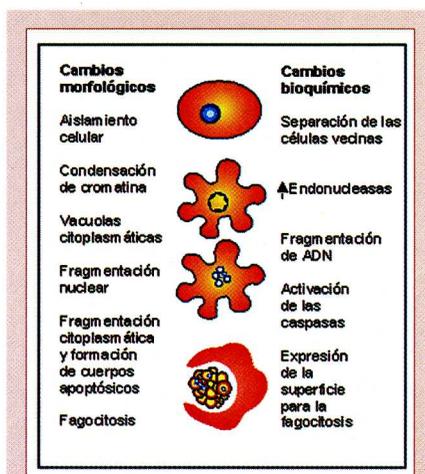


Figura 1

Diagrama de los cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren durante la apoptosis.

## Cambios celulares durante la apoptosis

Uno de los aspectos más estudiados y conocidos respecto de la apoptosis, se refiere a los cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren en la célula (Figura 1). Los primeros signos consisten en la separación de las células pre-apoptóticas de sus vecinas, con lo cual adquieren una forma más redondeada. En el núcleo, inicialmente la cromatina (ADN + proteínas) se agrupa o condensa en grandes masas, y luego el ADN se fragmenta debido a la acción de enzimas (endonucleasas).

A nivel citoplasmático se forman vacuolas y el citoplasma se fragmenta, manteniéndose la membrana plasmática intacta. Los fragmentos citoplasmáticos se denominan cuerpos apoptóticos y juegan un papel importante en la estimulación de la fagocitosis de estas células por parte de células vecinas y/o macrófagos. En estos casos no existe respuesta inflamatoria ya que la eliminación de los fragmentos celulares se realiza sin que haya liberación del contenido celular hacia la matriz extracelular.

## Control de la apoptosis

Los mecanismos de control de la apoptosis son complejos e involucran una serie de señales, tanto endógenas como exógenas, así como un fino equilibrio entre señales para que la célula continúe con vida o señales negativas para que muera. Actualmente se admite que existen una serie de elementos que pueden ser comunes en la apoptosis y se han señalado como: inductores, reguladores y efectores.

Los inductores son aquellas señales que inducen a la célula a entrar en apoptosis y pueden provenir desde dentro de la célula o desde el exterior. Algunos inductores poseen la capacidad de unirse a receptores en la membrana celular (proteínas o péptidos) y otros se unen a receptores en el citoplasma (esteroides). Factores externos como radiación ultravioleta o sustancias químicas pueden actuar como potentes inductores de apoptosis.

Dentro de los reguladores existen

genes que codifican para proteínas que pueden inhibir o promover la muerte celular. Los genes de la familia Bcl-2 son los que están mejor estudiados. Estos genes codifican para proteínas que pueden inhibir o permitir la apoptosis. La proporción en que se expresan unas proteínas respecto de otras puede determinar que la célula muera o no.

Los efectores son los responsables, en última instancia, de los cambios estructurales que conducen a la muerte celular programada. Estos cambios son bastante parecidos en los distintos tipos de células. Los efectores son principalmente enzimas (endonucleasas y proteasas). Se cree que la activación de endonucleasas dependientes de calcio y magnesio, son las responsables de la fragmentación del ADN y de los cambios que ocurren en el núcleo de la célula. Entre las proteasas más estudiadas se encuentran las caspasas, que son consideradas como las moléculas efectoras más importantes de la apoptosis. Cabe destacar que las caspasas están inactivas en las células sanas. En muchos casos la activación de un tipo de caspasa produce la activación de otras, generando una "cascada irreversible de caspasas" que amplifican notablemente la señal.

### **Apoptosis durante el desarrollo embrionario**

La formación de un embrión mamífero compatible con la vida, desde el estado unicelular (cigoto fertilizado) hasta estructura multicelular diferenciada, requiere la generación de una población celular, lo que involucra procesos de división, diferenciación y muerte celular, todos regulados por factores de crecimiento (péptidos).

La apoptosis juega un papel importante en los organismos, manteniendo un control sobre el número de células de los tejidos, tanto durante el desarrollo embrionario como en algunos

### **CUADRO 1**

#### **Ejemplos de muerte celular programada durante el desarrollo embrionario en vertebrados**

- Formación de la cavidad proamniótica
- Cierre del tubo neural
- Desarrollo del ojo
- Desarrollo del oído
- Cierre del paladar
- Desarrollo cardiovascular
- Desarrollo de miembros
- Regresión de tubulos pronéfricos renales
- Regresión de los conductos de Müller en el macho
- Regresión de los conductos de Wolff en la hembra

sistemas del adulto. De esta forma se pueden eliminar células que tienen funciones transitorias durante determinadas etapas del desarrollo. Algunos ejemplos notables de muerte celular programada durante el desarrollo embrionario se pueden ver en el Cuadro 1.

Como ha sido señalado, la muerte celular en el embrión ocurre por apoptosis y sirve para eliminar células no deseadas durante el desarrollo. La mayor cantidad de células apoptóticas se presentan en el macizo celular interno (MCI) del blastocisto en las diferentes especies. Además durante el desarrollo del embrión la apoptosis juega un papel crucial en la formación de la cavidad amniótica.

### **Diagnóstico de apoptosis en embriones mamíferos**

En los últimos años la reproducción ha evolucionado aceleradamente, caracterizándose por el desarrollo de una serie de técnicas que contribuyen a aumentar en forma rápida la capacidad reproductiva y el mejoramiento genético. Siendo una de ellas la pro-

ducción de embriones *in vitro*. Esta técnica hace posible que óvulos no fecundados puedan ser madurados, fertilizados y desarrollados bajo condiciones de laboratorio. Por este medio se producen grandes cantidades de embriones para programas de transferencia embrionaria.

Los embriones mamíferos se caracterizan por la gran variabilidad morfológica y diferente potencial de desarrollo, lo que podría verse reflejado en porcentajes variables de implantación y de preñez. Se ha observado que después de la fertilización *in vitro*, un significativo número de embriones presentan retraso del desarrollo. Embriones normales y embriones con atraso del desarrollo contienen diferente porcentaje de células con signos de apoptosis, aunque la presencia de estas también se presentan *in vivo*, lo que confirmaría la presencia de apoptosis en el desarrollo normal. La incidencia de la muerte celular aparentemente esta correlacionada con la calidad embrionaria. Por ejemplo del total de células en un blastocisto de buena calidad morfológica, el porcentaje de células muertas es menos de 10% y en uno de mala calidad es de 30% aproximadamente.

Desde mediados de la década de los setenta se han hecho descripciones estructurales de células muertas en embriones preimplantados de diferentes especies incluyendo ratón, vaca, mono y humano. Estas descripciones se han basado en tinciones celulares que usan marcadores fluorescentes específicos y se caracterizan por teñir la membrana nuclear, la cromatina condensada, vacuolas citoplasmáticas, núcleos y citoplasmas fragmentados.

### **Cambios en la membrana**

En el embrión, la integridad de la membrana celular se mantiene hasta las últimas fases de la apoptosis, sin embargo tempranamente durante este proceso ocurre aislamiento de las células apoptóticas de sus vecinas y redistribución de fosfolípidos en la membrana celular. En las células sanas los fosfolípidos (fosfatidilserina) están distribuidos asimétricamente y confinados en la capa interna de la membrana plasmática. En las células apoptóticas, la fosfatidilserina se transloca a la capa externa de la membrana donde la proteína anticoagulante Annexin V se puede fijar por su alta afinidad. Al teñir estas células presentan fluorescencia y también se puede determinar mediante citometría de flujo.

### **Vacuolas citoplasmáticas**

En las células apoptóticas se presentan vacuolas translúcidas, frecuentemente asociadas con condensación citoplasmática. Estas vacuolas pueden ser observadas con microscopía electrónica o con microscopía óptica.

### **Condensación de cromatina**

Uno de los primeros cambios morfológicos indicativos de la apoptosis es la condensación de cromatina dentro de la membrana nuclear. Este proceso ha sido detectado en embriones marcando el ADN con

un polinucleótido específico fluorocromado como es el propidio iodado (PI) o el 4,6 diamino-2-fenilano (DAPI). Por lo tanto embriones con cromatina condensada teñidos con PI o DAPI pueden ser observados usando microscopía de fluorescencia.

### **Fragmentación nuclear**

En embriones con retraso de crecimiento se pueden observar núcleos condensados o fragmentados con el mismo procedimiento de marcación de ADN, aunque también se ha encontrado que embriones sanos presentan 7-8% de núcleos fragmentados.

### **Fragmentación de ADN**

Otra característica de apoptosis es la degradación del ADN en fragmentos, teniendo un pequeño número de células en el embrión es imposible usar técnicas electroforéticas para observar el ADN fragmentado. El desarrollo de la técnica de TUNEL (dUTP-final TdT-mediada) posibilita evaluar la fragmentación nuclear *in situ*. Esta técnica se basa en la incorporación de un oligonucleotido marcado con fluorescencia, permitiendo la localización y cuantificación de núcleos fragmentados.

### **Fragmentación citoplasmática y formación de cuerpos apoptóticos**

Se han evidenciado grados diversos de fragmentación citoplasmática en embriones con retraso del desarrollo. La revisión de la estructura de embriones muestra cuerpos apoptóticos. La tinción de TUNEL y el uso de la microscopía fluorescente es una herramienta útil en la determinación de este tipo de fragmentación.

### **Fagocitosis**

La degeneración celular resulta en la formación de restos extracelulares y la presencia de mitocondrias y remanentes nucleares que confirman el

origen celular. Con microscopía focal se pueden observar blastómeros fagocitados por células adyacentes y vacuolas autofágicas a nivel estructural con microscopía electrónica.

### **Algunos factores asociados con apoptosis en embriones producidos *in vitro***

#### **Eliminación de células con inapropiado potencial de desarrollo**

Una de las funciones de la apoptosis durante el desarrollo es eliminar células que no serán requeridas. Células del MCI del blastocisto temprano pueden regenerarse en células del trofoectodermo, aunque estas mismas del blastocisto tardío no lo pueden realizar. La muerte celular es el mecanismo por el cual el blastocisto elimina células del MCI que aún tienen el potencial para formar trofoectodermo, esto podría reducir el riesgo de una inapropiada expresión ectópica del trofoectodermo durante la diferenciación de la capa germinal.

#### **Anormalidades cromosómicas y nucleares**

Los embriones mamíferos presentan una alta incidencia de anomalías nucleares y cromosómicas, además un gran porcentaje de embriones presentan células diploides mientras que otras tienen un complemento cromosómico anormal. Es posible que por medio del proceso de apoptosis se eliminen estas células anormales.

#### **Escasez de factores de crecimiento**

La falta de factores del crecimiento puede ser un factor en el inicio de la apoptosis. En el embrión los factores de crecimiento maternos y

embrionarios juegan un papel clave en el desarrollo. Esto se ha observado en embriones cultivados en medios suplementados con factores del crecimiento (TGF-a y IGF-I), mostrando una mejora en el desarrollo. Esto nos hace pensar que dicha suplementación incrementa el número celular y disminuye el número de células apoptóticas en el embrión.

### Cultivo subóptimo

La muerte celular embrionaria no es exclusiva de embriones producidos *in vitro*. Se ha encontrado que más del 80% de embriones normales, que han sido removidos del tracto reproductor presentan uno o más núcleos fragmentados, variando entre 1-3% en células del trofoctodermo y de 10-20% en el MCI.

### Manipulación

Cualquier embrión sometido a manipulación, bisección, biopsia, transferencia nuclear, inyección intracitoplasmática o cualquier otro manejo como transferencia, cultivo, refrigeración y congelación ha sufrido daño físico y muerte en algunas de sus células.

### Comentario final

La muerte celular programada o apoptosis resulta ser un fenómeno fisiológico fundamental durante el desarrollo embrionario, ya que permite un adecuado balance del número celular del organismo en crecimiento, así como la regresión de estructuras que han perdido función o que no son necesarias. El estudio de la apoptosis durante el desarrollo temprano de embriones producidos *in vitro* resulta una

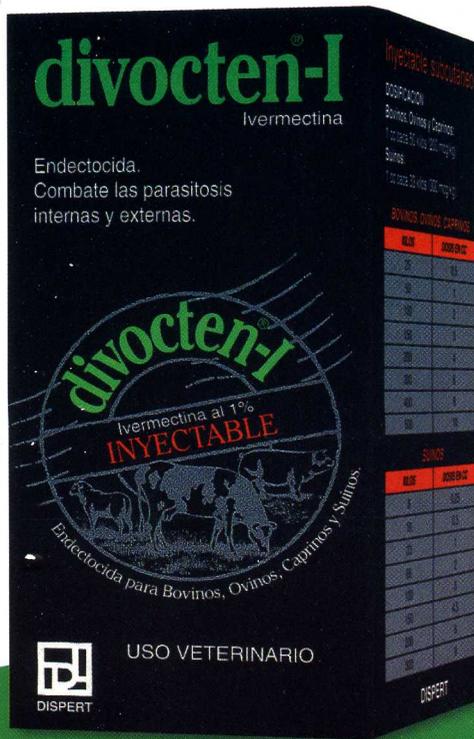
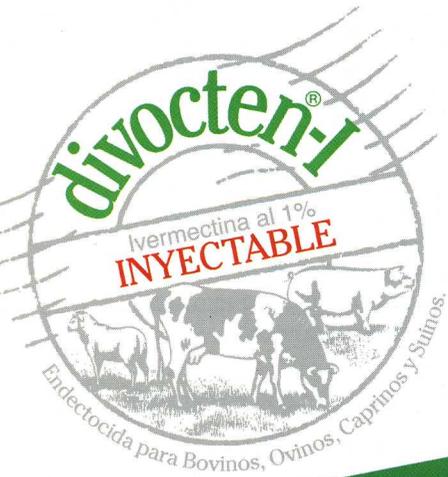
herramienta de gran proyección para evaluar la viabilidad de embriones potencialmente transferibles.

### Bibliografía

- MIRKES, P. 2002. 2001 Warkany Lecture: To die or no to die, the role of apoptosis in normal and abnormal mammalian development. *Teratology* 65: 228-231.
- HARDY, K. 1999. Apoptosis in the human embryo. *Reviews of Reproduction* 4: 124-134.
- MATWEE, C., D. BETTS, W. KING. 2000. Apoptosis in the early bovine embryo. *Zigote*, 8 (1): 57-68.

Dr. Marco Celestinos A. (M. V. Z.)  
Dr. Alfonso Sánchez R. (M. V.; M.Sc.)  
Escuela de Graduados  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad Austral de Chile

Combate las parasitosis internas y externas de Bovinos, Ovinos, Caprinos y Suínos, provocadas por nematodos adultos y muchas de sus formas larvianas, así como por ciertos artrópodos o sus larvas



“Los que conocen prefieren etiqueta negra”

Endectocida de amplio espectro y acción prolongada a base de Ivermectina. Con respaldo DISPERT.

**divocten-I**  
Ivermectina

CONTINUAMOS AMPLIANDO  
NUESTRA LINEA DE ANTIPARASITARIOS

Av. Italia 1898, - Fono 209 4085 - Ñuñoa - Santiago

