



Jaime Pereda  
Escuela de Medicina  
Unidad de Embrio-Fetología  
Facultad de Ciencias Médicas  
Universidad de Santiago de Chile  
jaime.pereda@usach.cl

# Sobrevivencia del embrión humano durante el periodo de organogénesis

Human embryo survival during the organogenetic period

## Resumen

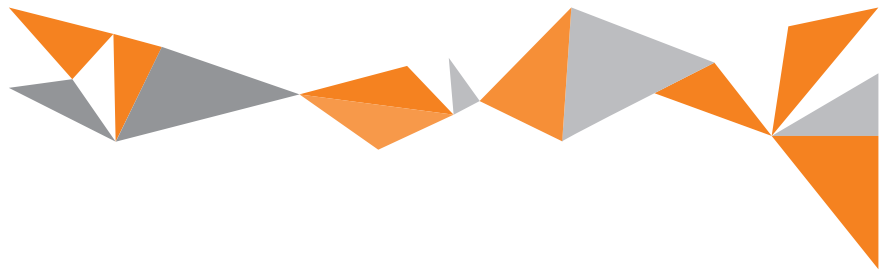
En este artículo se aborda el tema de establecer cómo el embrión humano crece y sobrevive durante el periodo de organogénesis que se extiende entre la semana 4 y 8 del desarrollo. En esta fase del desarrollo el embrión está generando sus futuros órganos y tejidos a pesar de no tener aún órganos funcionales ni hematopoyéticos. Basados en nuestras propias investigaciones y en los pocos datos existentes en la literatura referentes a la sobrevivencia del embrión humano podemos afirmar que los suministros necesarios para la sobrevivencia del embrión en este periodo provienen del saco vitelino, un anexo embrionario de fundamental importancia en el crecimiento embrionario. Se analiza el potencial del saco vitelino en la generación de la primera sangre (eritroblastos primitivos), en la generación de los eritrocitos no nucleados (ENN) y proteínas séricas. Se discute el rol de los ENN en el transporte de oxígeno, en la producción del Hierro necesario para la síntesis de hemoglobina y en la función hematopoyética embrionaria.

**Palabras claves:** Embrión humano; Nutrición embrionaria; Saco vitelino; Eritropoyesis embrionaria; Eritrocitos no nucleados.

## Abstract

In this article the question on how the human embryo grows and survives during the organogenetic period that extends from week 4 to week 8 of embryonic age is undertaken. During this embryonic phase the embryo is in a process of organ and tissue generation despite the fact that organs are not yet functional and hematopoietic activity is not initiated. Based on our own research and on the few data available in the literature concerning human embryo survival, we can state that all the needs for embryo growth and survival are served by the extraembryonic yolk sac, an annex that is of fundamental importance in the growth of the embryo. In this paper we analyze the potential of the yolk sac in the generation of primitive erythroblasts, in the generation of non-nucleated erythrocytes (NNE), and in the production of serum proteins. We discuss the role of NNE in oxygen transport, in the production of iron that is necessary for the synthesis of hemoglobin, and the hematopoietic embryonic functions.

**Keywords:** Human embryo; Embryo nutrition; Yolk sac; Embryonic erythropoiesis; Non-nucleated erythrocytes.



# Introducción

Una de las incógnitas existentes en el curso del desarrollo del embrión humano temprano es llegar a conocer cómo este embrión crece y sobrevive durante el periodo de organogénesis, que se extiende entre la semana 4 y 7 post fecundación (pf) (Figura N° 1). Durante estas 4 semanas el embrión crece y se van generando los primordios de los futuros órganos y tejidos, hacién-

dolo ordenadamente en respuesta a diversos factores que gobiernan, espacial y temporalmente, la emergencia de las diferentes estructuras.

El crecimiento del embrión se caracteriza por la deposición de tejido, lo cual requiere de la disposición de energía y nutrientes, que en el caso del embrión varían constantemente. Sorprende constatar que el embrión,

durante este periodo, no cuenta con órganos funcionales ni órganos hematopoyéticos y tampoco recibe aportes nutricionales que provengan de la placenta, ya que esta estructura está igualmente en formación no siendo, por lo tanto, funcional. Aun así, mientras dura este periodo se ha formado prácticamente el 97% de todos los esbozos del futuro individuo (Figura N°1).

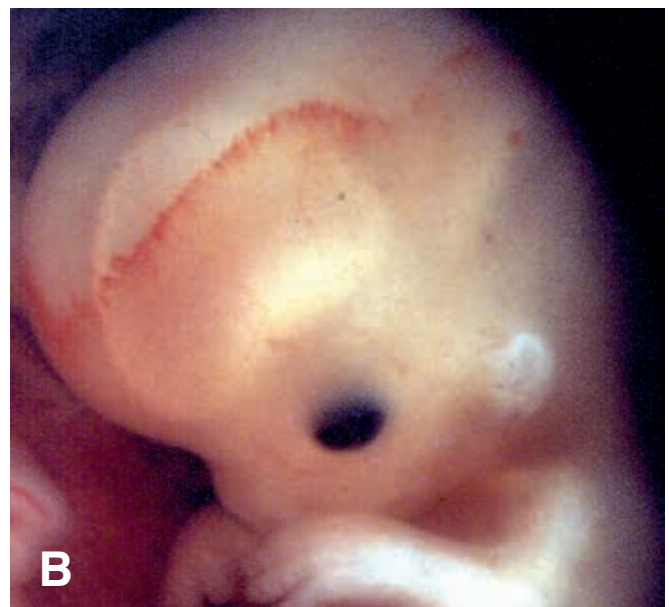
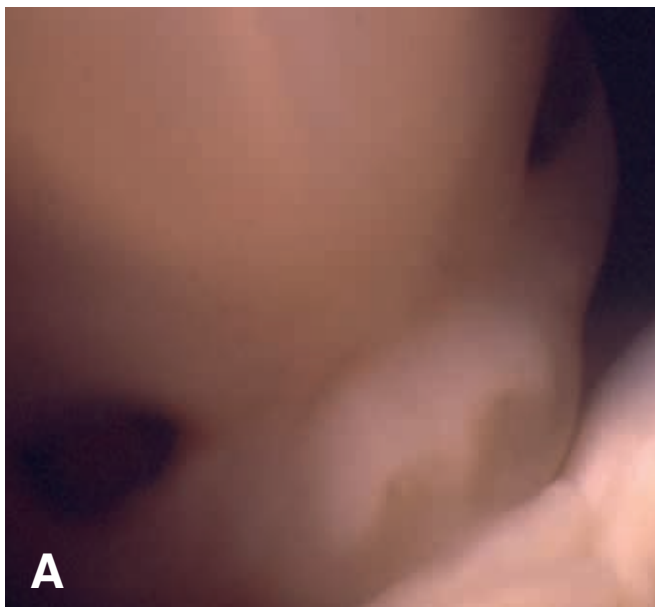


Figura N° 1. Fotografías de embriones humanos. En "A" embrión humano de 5 semanas de desarrollo y en "B" polo cefálico de un embrión humano de 7 semanas de edad. Hacia el final de esta semana se han formado aproximadamente el 97% de los primordios de los futuros órganos. Los ojos están abiertos, ya que los párpados aún están en crecimiento.

### Entonces, ¿Cómo crece y sobrevive el embrión en estas condiciones tan adversas?

De los órganos en formación, muy pocos entran en función tempranamente. El primer órgano en funcionar es el corazón, que inicia su actividad contráctil en la cuarta semana pf, entre el día 24 y 25 del desarrollo (Figura N° 2). Sin embargo, el corazón no pulsa sangre propiamente tal, consistente en plasma y células sanguíneas (glóbulos rojos), sino que inicialmente pulsa un líquido tipo plasma cuya función es morfogénica, es decir, contribuir (por medio del flujo) a la instalación de una red vascular en el cuerpo del embrión, por donde la sangre circulará más adelante (Pardanaud et al., 2009).

El embrión antes de la semana 7 pf, no presenta órganos hematopoyéticos, órganos que produzcan células sanguíneas. La generación de sangre en el embrión es un proceso tardío, que se inicia en el transcurso de la semana 7 pf, cuando el hígado entra en actividad (Figura N° 3), siendo el primer órgano hematopoyético del embrión (Moore et al., 2016). Esto significa que el embrión antes de esta semana no produce sangre. El proceso de generación de glóbulos rojos, la eritropoyesis, es esencial para el desarrollo embrionario, siendo las células sanguíneas las responsables de proveer el oxígeno y los nutrientes necesarios al embrión que aseguren su crecimiento y sobrevivencia.

Sin embargo, células sanguíneas en la circulación embrionaria son vistas por primera vez, a partir del día 27 pf (cuarta semana), dos días después de que el corazón empieza a latir. Estudios de esta primera sangre han demostrado que se trata de un tipo especial de célula sanguínea, denominado eritoblastos primitivos (EP) inmaduros (Figura N° 4) que son células voluminosas, nucleadas y capaces de acumular rápidamente hemoglobina (Palis and Yoder, 2001). Estas células primitivas se reconocen por ser diferentes a los eritrocitos maduros producidos por el hígado (a partir de la semana 7 pf), ya que estas últimas células son más pequeñas (7  $\mu\text{m}$  de diámetro) y no tienen núcleo.

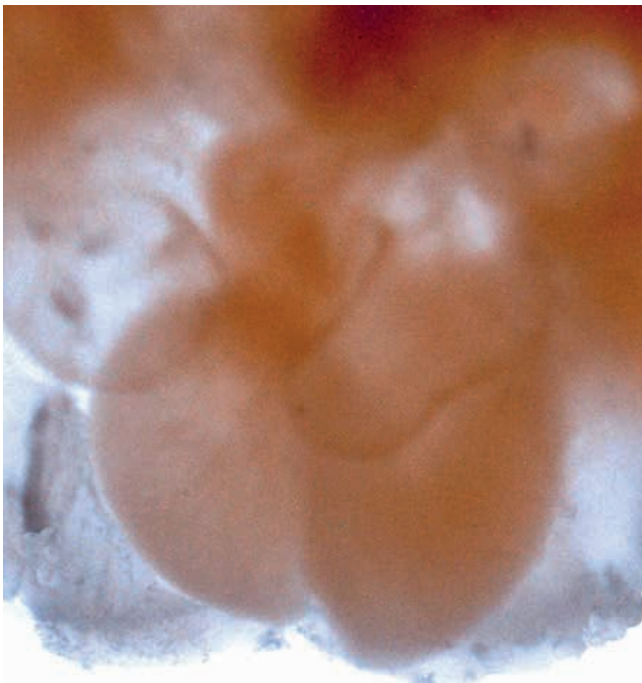


Figura N° 2. Estereofotografía del corazón de un embrión humano de 28 días de edad, en la fase inicial de su actividad funcional.

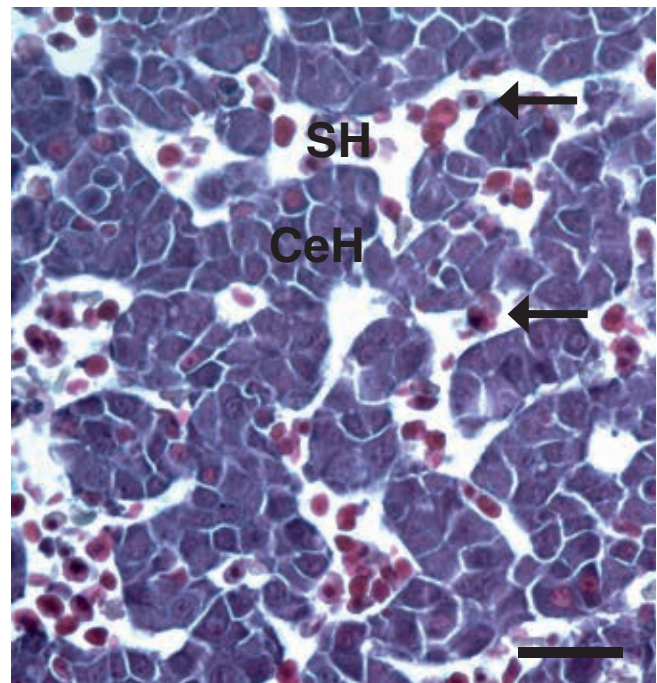


Figura N° 3. Fotografía que muestra un corte histológico de hígado de un embrión humano de 5 semanas de edad pf, teñido con tricrómico de Masson. Se observan: los cordones endodérmicos hepáticos (CeH) que dan forma a un intrincado laberinto. Estos cordones se encuentran separados por sinusoides hepáticos (SH), los que contienen eritoblastos primitivos (flechas). Bar: 50  $\mu\text{m}$ .



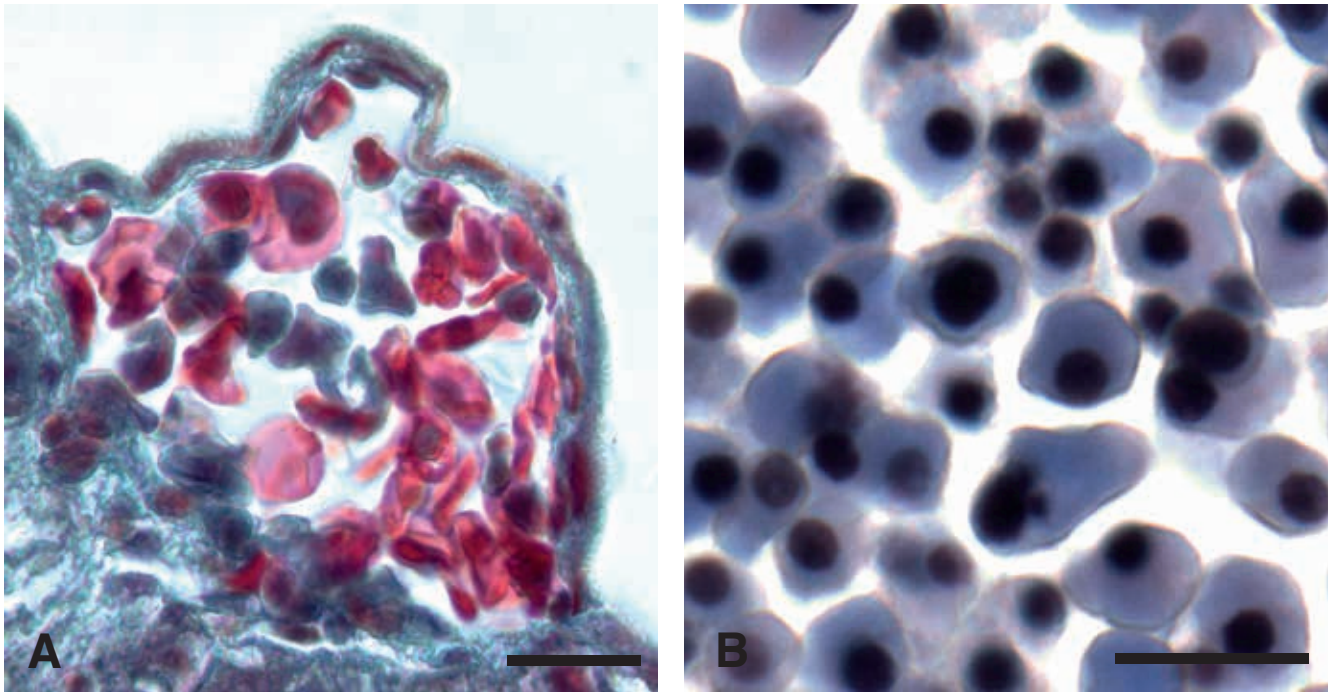


Figura N° 4. Microfotografías de EPs observados en embriones de 5 semanas pf. En "A" se muestran EPs nucleados en capilar del saco vitelino y en "B", eritroblastos primitivos en la circulación embrionaria. Bars: 30 µm.

**¿De dónde provienen las células sanguíneas existentes en el embrión en desarrollo que le permiten sobrevivir durante estas 4 semanas?**

Estudios conducidos en embriones humanos por diferentes autores

(Palis and Yoder, 2001; Oberlin et al., 2002) como en investigaciones realizadas en nuestro Laboratorio (Pereda et al., 2015), han permitido demostrar que los EPs observados en el embrión se originan fuera del cuerpo del embrión, en un anexo extraembrionario conocido como

Saco Vitelino (SV) (Figura N° 5) durante un periodo de tiempo muy restringido. Aunque esta estructura no se encuentra al interior del embrión, es considerado su primer órgano hematopoyético.

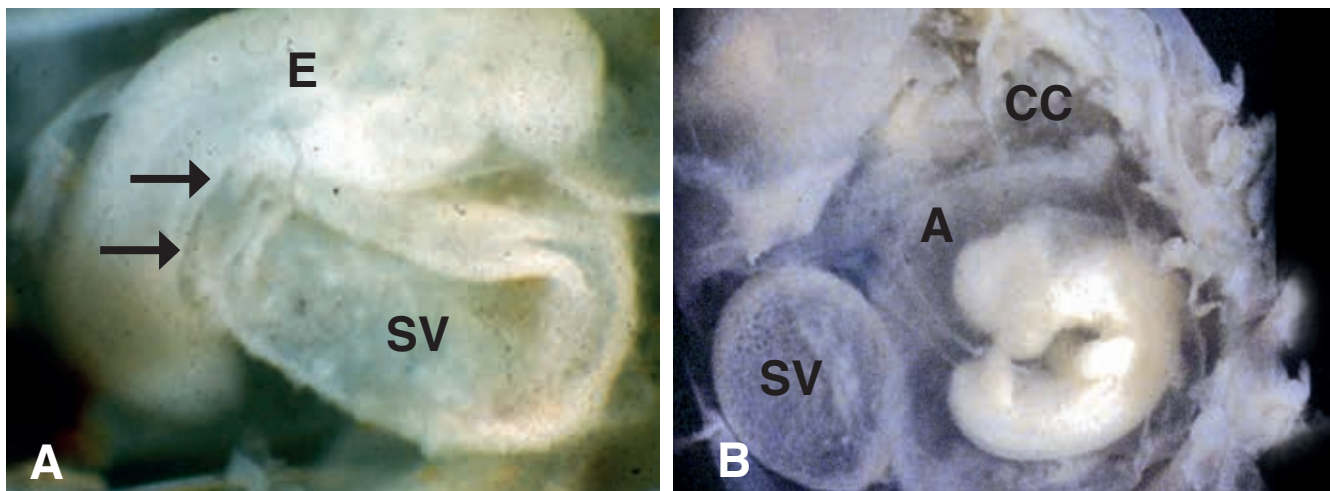


Figura N° 5. Fotografías de embriones humanos con sus anexos extraembrionarios. En "A", se muestra embrión de 4 semanas pf, donde se observa la estrecha relación existente entre el embrión (E) y su saco vitelino (SV), anexado a la pared ventral del cuerpo embrionario (flechas). En "B", se muestra embrión de 5 semanas pf rodeado por el amnios (A). Observe que el saco vitelino (SV) a esta edad se encuentra alojado en la cavidad coriónica (CC) manteniéndose unido al embrión por medio del tallo vitelino. Note cómo en el transcurso de una semana se producen cambios notables en la relación SV-embrión.

Es en relación a este embrión y su SV que co-actúan durante este periodo de cuatro semanas a los cuales nos referiremos en este estudio. Muchas son las interrogantes existentes respecto al desarrollo del embrión durante este corto periodo, como muchas son las incógnitas referentes al rol que el SV juega en la sobrevivencia del embrión durante su transitoria vida. Incógnitas que se generan fundamentalmente por la gran dificultad que ha existido para poder acceder y estudiar este temprano periodo de la vida del Ser humano.

Hay que considerar que un embrión entre la 4ta y 5ta semana de vida mide entre 2 y 8 milímetros de longitud, se aloja en un saco coriónico que recién se está formando, que los nutrientes que requiere para la formación de sus tejidos cambian y varían en la medida de que el embrión temprano transita para llegar a ser un feto. La madre durante este período no evidencia aún ningún signo de estar embarazada. La existencia del embrión, por lo tanto, es silen-

ciosa y generalmente desconocida por la madre. Esto determina que acceder a un embrión humano normal de cuatro o cinco semanas de edad para estudio sea una tarea difícil, y más aún es obtenerlo con sus anexos embrionarios intactos, particularmente el SV, que como hemos mencionado, es un anexo extraembrionario, transitorio, y de fundamental importancia para la sobrevivencia del embrión (Figura N° 5).

En nuestro trabajo que se inició hace más de 25 años en el Hospital Barros Luco Trudeau, tuvimos la oportunidad de coleccionar un número importante de embriones tempranos intactos y morfológicamente normales desde embarazos ectópicos tubarios. Estos embriones, fueron conservados y posteriormente estudiados. Los resultados de los diversos estudios llevados adelante, han sido publicados en diversos medios y en esta oportunidad presentamos una revisión en relación a la nutrición y sobrevivencia del embrión entre las semanas 4 a 7 pf.

### ¿Cuál es el nicho de origen de los eritoblastos primitivos presentes en la circulación del embrión?

Los eritrocitos, por su contenido de hemoglobina son los transportadores fundamentales de oxígeno, molécula esencial para mantener la respiración celular y el metabolismo. Se ha demostrado que la primera sangre o linaje eritroideo primitivo se origina en los islotes sanguíneos presentes en la capa mesodérmica de la pared del SV durante la semana 3 pf (Figura N° 6) (Hesseldahl and Larsen, 1969; Hoyes, 1969; Takashina, 1993; Pereda et al., 2010). Estas observaciones demuestran que el SV es el primer órgano hematopoyético del embrión humano (Lockett, 1978), función que cumple transitoriamente durante un periodo muy restringido del desarrollo, ya que en el curso de la semana 7 pf el SV inicia su proceso de regresión degenerativa.

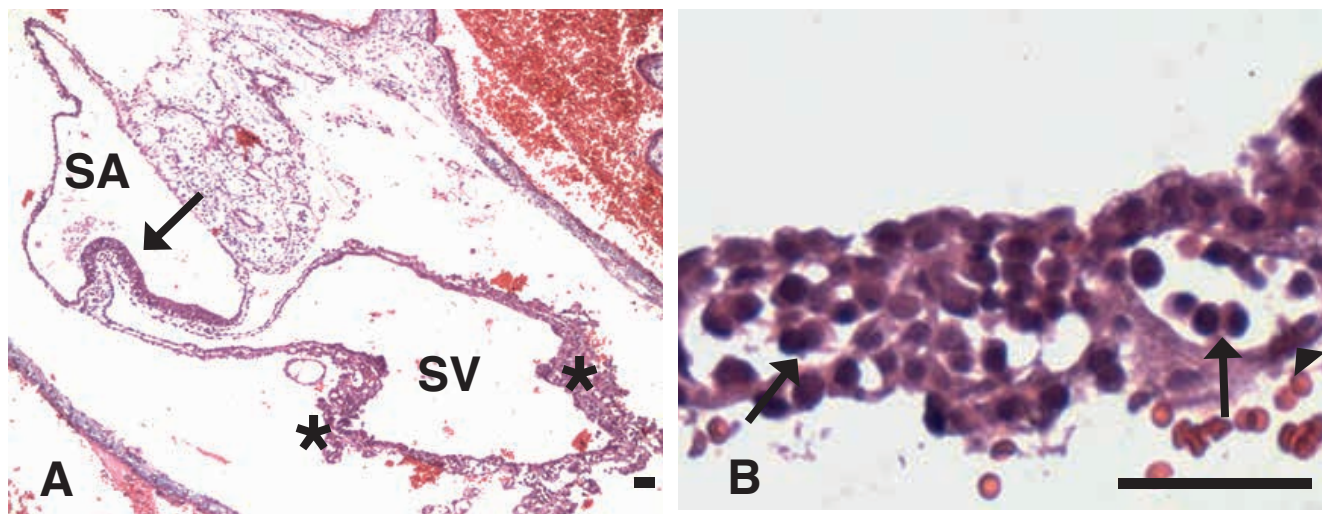


Figura N° 6. En "A" se muestra embrión humano de 17 días de edad (flecha) teñido con hematoxilina y eosina (H-E). El embrión tiene forma discoidea. Ventralmente cuelga el saco vitelino primitivo (SV) y en su pared se observan los Islotes sanguíneos (asteriscos). Dorsalmente se reconoce el saco amniótico (SA). En "B", se muestra parte de la pared del saco vitelino donde se aprecian los islotes sanguíneos. Observe en su interior las células sanguíneas (flechas) y periféricamente las células endoteliales (cabeza de flecha) Nota: Los eritrocitos observados en esta imagen corresponden a sangre materna extravasada. Bars: 200  $\mu$ m.



Se ha señalado que los islotes sanguíneos estarían involucrados en la génesis del sistema vascular (células endoteliales) y en la hematopoyesis extra embrionaria (EP), siendo la célula progenitora de ambos linajes, el hemangioblasto. Ambos linajes en conjunto generan pequeños vasos sanguíneos (Figura N° 6 b),

los cuales, a medida que aumentan en número, van dando forma in situ a una rica red de finos capilares en la pared del SV (Figura N° 7), proceso denominado vasculogénesis.

Estos capilares, al ser observados al microscopio óptico, al inicio de la semana 4 pf se encuentran llenos

de sangre (Figura N° 7 b), conformada por EPs inmaduros, que son células nucleadas que miden aproximadamente 12-14  $\mu\text{m}$  (Palis and Yoder, 2001) (Figura N° 7 c). Esta observación de sangre se logra dos semanas antes de que se observe sangre en la circulación embrionaria. Se ha podido establecer que esta

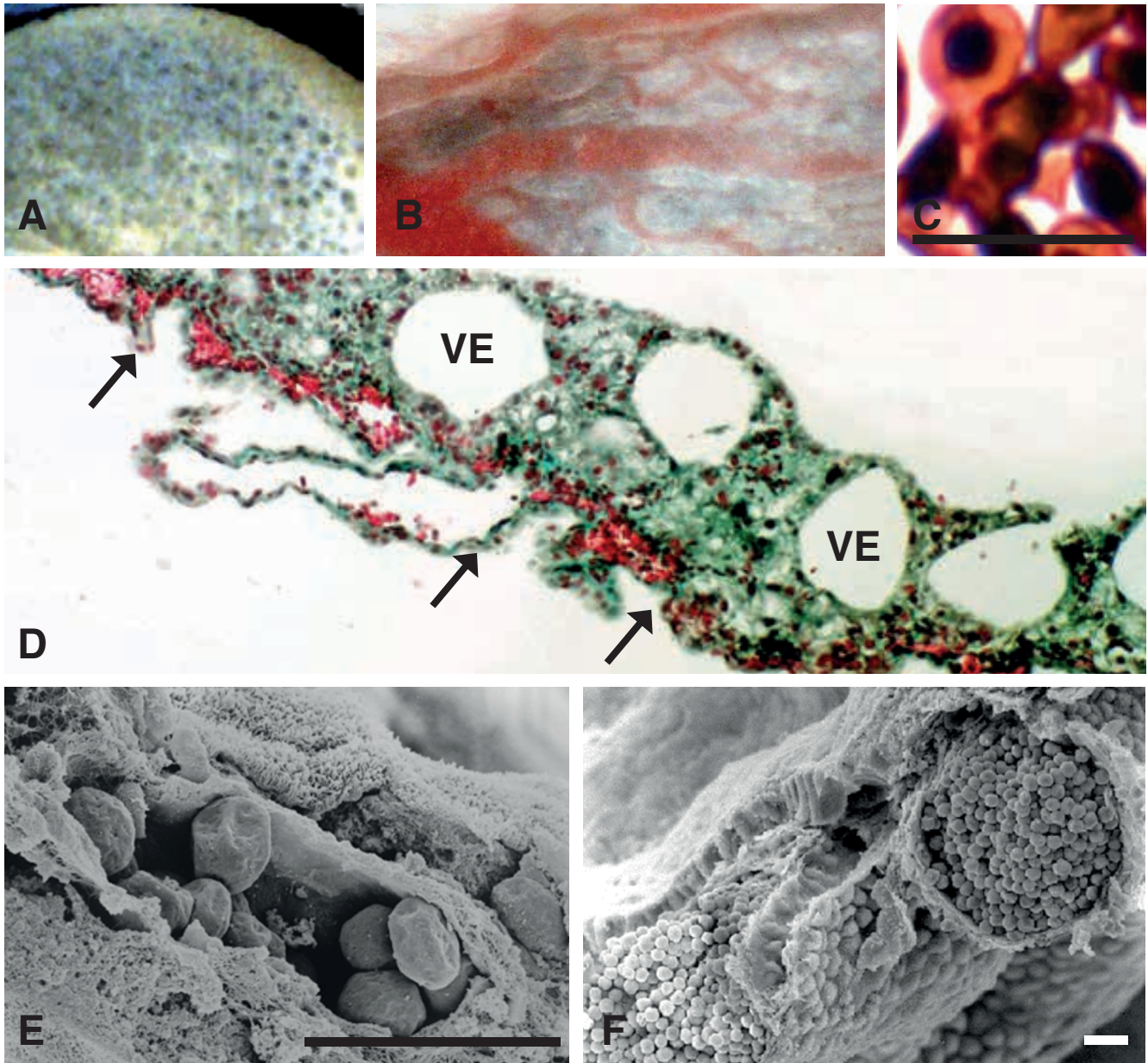


Figura N° 7. En "A", vista de la pared del SV de un embrión a inicios de la semana 4 pf. Observe la estructura tipo panal de abeja que adquiere la red capilar. En "B" se muestra en un SV al final de esta semana el plexo vascular lleno de sangre. Observe que se han formado capilares de distintos calibres. En "C" se muestran los EP presentes en la red vascular. En "D", vista panorámica de corte histológico teñido con Tricrómico de Masson que muestra la pared del saco vitelino. Se observa que la red vascular (color rojo) se extiende próxima a la pared mesotelial (flechas). Vesículas endodérmicas: VE. "E" y "F" corresponden a microfotografías de microscopía electrónica de barrido (MEB) que muestran EP tanto en un capilar como en un vaso de gran calibre, respectivamente, en la pared del saco vitelino. Observe la gran cantidad de EPs presentes en cada vaso. Bar 30  $\mu\text{m}$ .

sangre pasa del SV al cuerpo del embrión unidireccionalmente por la vena vitelina, único vaso que se conecta con la red vascular embriónica formada algunas horas después de que el corazón empieza a bombear el día 24 pf (Figura N° 8).

El estudio de embriones entre la 4ta y 6ta semana pf, nos ha permitido constatar que el único tipo de sangre presente en la red vascular del embrión corresponde a EPs, producidos durante la primera onda hematopoyética en el SV.

### Hematopoyesis

El sistema hematopoyético durante el periodo embrionario cumple dos importantes funciones: 1. la rápida generación de células sanguíneas diferenciadas necesarias para la sobrevivencia y crecimiento del embrión y 2. el establecimiento de

un pool de células troncales hematopoyéticas indiferenciadas (hematopoietic stem cells: HSC) para la vida fetal y postnatal.

Para cumplir su función metabólica, la hematopoyesis embrionaria tiene lugar en dos ondas generacionales, que ocurren en distintos tiempos y lugares. Durante la primera onda hematopoyética (semana 3 pf) se generan tanto EPs como macrófagos, los cuales transportan oxígeno al embrión y contribuyen a la remodelación tisular y defensa inmune, respectivamente (Barminko et al., 2016). En humanos, la segunda onda hematopoyética, llamada hematopoyesis definitiva, al parecer, tendría lugar en el cuerpo del embrión durante la semana 5 pf, generando progenitores eritromieloides, los cuales tendrían una función importante en la hematopoyesis hepática (fetal), ya que estas células se dife-

rencian rápidamente en células sanguíneas maduras (eritrocitos) y células mieloides.

Esta observación de sangre primitiva en la circulación del embrión durante la semana 4-5 pf, estaría indicando que la sobrevivencia del embrión durante el periodo inicial de la organogénesis depende del potencial del SV para proporcionarle células sanguíneas (necesarias para el transporte de oxígeno), pero además otros insumos producidos en su pared endodérmica. Se ha demostrado que el SV sintetiza alfafetoproteína (AFP) (Pereda et al., 2015), alfa 1-antitripsina, albúmina, pre-albúmina, transferrina y ferritina (Gitlin and Perriceli, 1970; Shi et al., 1985; Pereda et al., 2010). De esta manera, y una vez que se establece la circulación vitelo-embriónica, el embrión recibe nutrientes desde el SV por vía sistémica, a través de

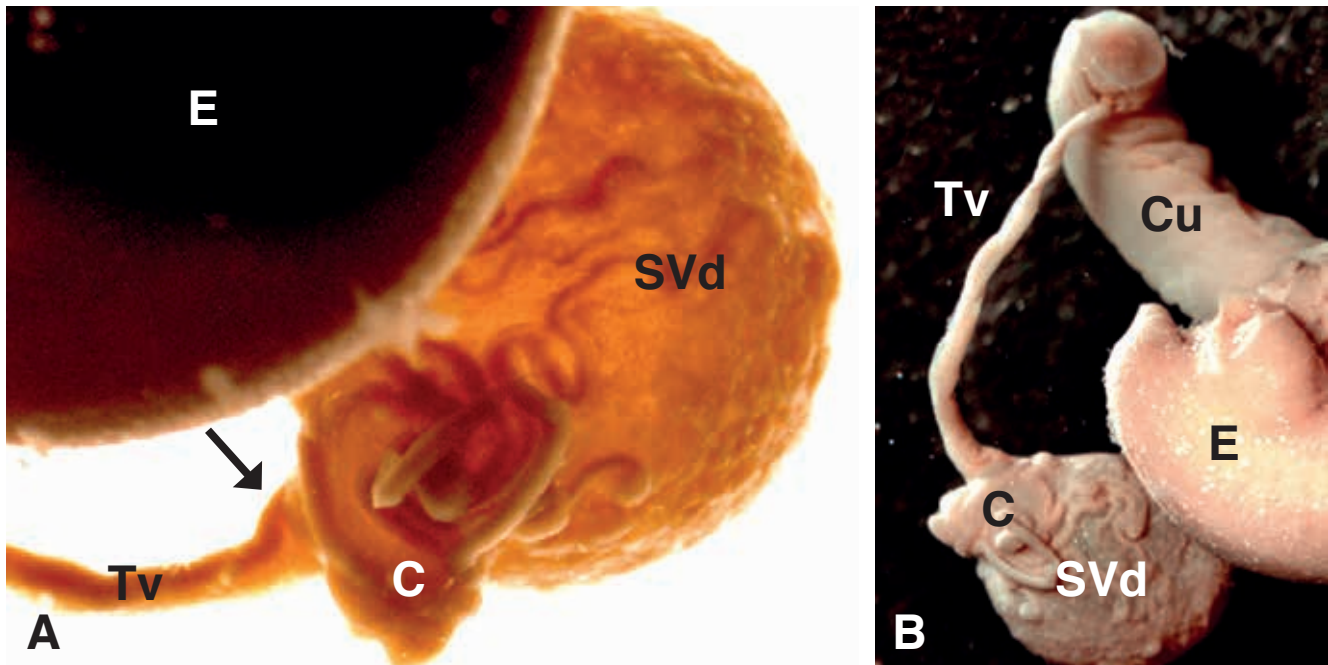


Figura N° 8. Saco vitelino definitivo. Después del proceso de plegamiento embrionario que transforma al embrión discoideo en un embrión tubular (E) al final de la semana 4 pf, se instala el saco vitelino definitivo formado por tres componentes: Saco vitelino propiamente tal o definitivo (SVd), la región del cuello (C) y el tallo vitelino (TV) (Pereda et al., 2005). Observe en "A y B" que la red vascular del SVd confluye en la región del cuello generando grandes vasos que por anastomosis sucesivas dan origen a una vena vitelina (flecha) que conduce, vía tallo vitelino, la sangre al cuerpo del embrión. Estas imágenes muestran la red vascular del saco vitelino definitivo de un embrión de 5 semanas pf. Cerdón Umbilical: Cu.



la vena vitelina, en una nutrición de tipo hemotrófica (Figura N° 9), pero también mediante una vía no vascular (nutrición histiotrófica), en la cual el conducto vitelino (Figura N° 9 b) lleva nutrientes al embrión desde la cavidad del SV al intestino primitivo, siendo almacenados en el estómago desde donde son absorbidos por las células epiteliales endodérmicas (Pereda et al., 2010; 2015). Por medio de estas dos vías, el SV estaría asegurando tanto la respiración y nutrición del embrión, como también su crecimiento y desarrollo durante gran parte del periodo embrionario.

Las células sanguíneas (eritoblastos primitivos) producidas en la primera onda hematopoyética son de vida transitoria y van desapareciendo de la circulación embrionaria a partir de la semana 6 pf, para ser reemplazadas por nuevos eritoblastos maduros generados en la segunda onda hematopoyética, desde los cuales se originarían las células sanguíneas definitivas o eritrocitos, que son células pequeñas que miden 7  $\mu\text{m}$  de diámetro y que no tienen núcleo, ya que lo pierden por enucleación en el torrente sanguíneo.

La presencia simultánea de células sanguíneas primitivas y definitivas en la circulación embrionaria ocurre durante un periodo muy breve, observándose en humanos en el curso de la semana 7 pf, coincidente con el inicio de la eritropoyesis hepática y el término de la función del SV al final del periodo embrionario. Durante la semana 8 pf, y una vez producida la transición eritoblastos/eritrocitos, solo se observan eritrocitos maduros en circulación generados en el hígado. Después del periodo embrionario, a partir de la semana 9, la fuente de nutrientes al alcance del feto cambia cuando se instala la vía placentaria. De esta forma, la sangre placentaria llega al feto, asegurando su supervivencia con una nutrición hemotrófica, proveniente de la circulación feto-placentaria.

### ¿Dónde comienza la segunda onda de hematopoyesis en el embrión humano?

En el caso de ratones, este proceso comienza en el SV con la producción de un pool de progenitores eritromieloides, los que cumplen una importante función en la hematopo-

yesis fetal, ya que ellos se diferencian rápidamente en células eritroides maduras definitivas y células mieloides (Van Handel et al., 2010). Esta información no se conoce en humano, como tampoco no se sabe si las células sanguíneas primitivas sufren enucleación y en caso de ocurrir donde este proceso podría tener lugar.

### Nuevas evidencias en humano postulan la génesis de la segunda onda eritropoyética en el cuerpo del embrión

Observaciones recientes nos han permitido constatar que, en humano, hacia el final de la semana 5 pf el volumen de EPs existente en el hígado y en los vasos del cuerpo del embrión aumenta considerablemente (Figura N° 10), volumen que no se explica que provenga solo del SV, dada la escasa cantidad de sangre transportada desde dicha estructura al embrión entre la semana 5 y 6 pf. Este aumento de sangre observado en el cuerpo del embrión es posible que corresponda a la expresión fenotípica del inicio de la segunda onda hematopoyética, la que conduce a la rápida producción

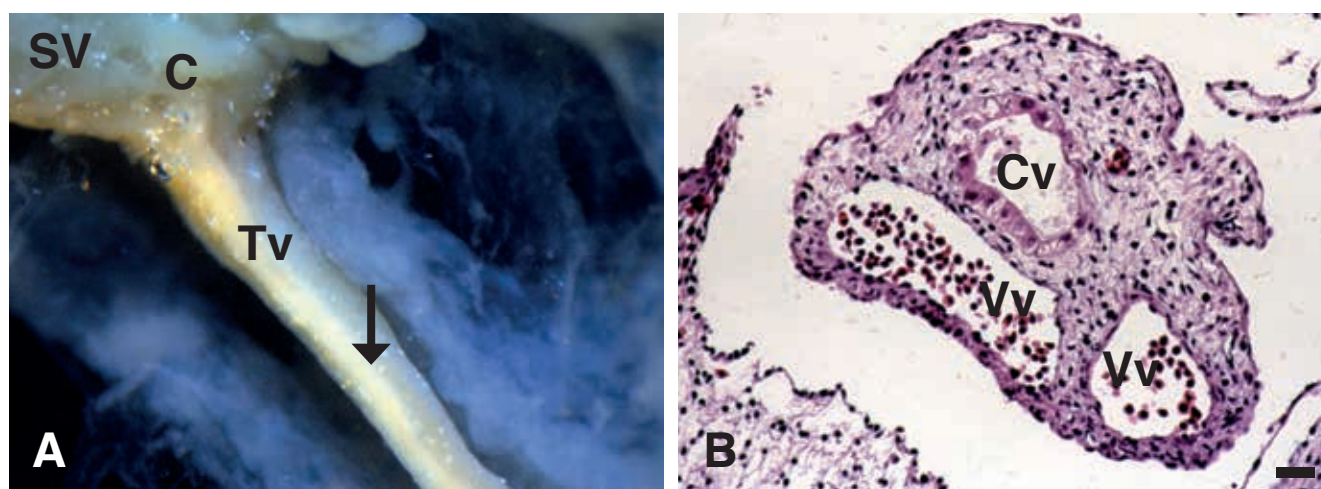


Figura N° 9. En "A" se muestra el tallo vitelino (Tv) a nivel de su emergencia desde la región del cuello (C) del saco vitelino (SV) en un embrión de 5 semanas pf. Se distingue claramente el curso de la vena vitelina (flecha). En "B" se muestra un corte transversal del tallo vitelino teñido con H-E donde se observa: la vena vitelina (Vv) con EPs nucleados en su interior, y el conducto vitelino (Cv), que comunica la cavidad del SV con la cavidad del intestino primitivo. Bar 50  $\mu\text{m}$ .



de progenitores eritromieloides transitorios que cumplirán una función importante en la hematopoyesis fetal, ya que ellos, al igual que ratón, se diferenciarían rápidamente en células sanguíneas maduras definitivas (eritrocitos) y células mieloides después de migrar al hígado fetal (Van Handel et al., 2010).

Sin embargo, es difícil imaginar tal producción de EPs en la circulación del embrión sin la existencia de otros focos hematopoyéticos distribuidos en su cuerpo, tal como ocurre en otras especies de animales (Julian et., 2016). En ratón, se han observado dichos focos en la pared de la aorta, en la región cercana a los futuros riñones y en los esbozos gonadales. En humano, esto no ha sido observado, sin embargo, nuestras actuales observaciones nos permiten sospechar que algo parecido también podría ocurrir.

### Hemoglobina

En mamíferos, la eritropoyesis es el proceso biológico con la mayor demanda de átomos de hierro, porque es requerido para la síntesis de heme y su subsecuente incorporación

en la molécula de hemoglobina. La molécula de hemoglobina contiene 4 grupos heme que, transitoriamente, se unen a la molécula de oxígeno para posteriormente liberarla en el cuerpo del embrión, cumpliendo su vital función respiratoria (Silva and Faustino, 2015). Se ha demostrado que los EPs (Figura N° 9) en el curso de su desarrollo, rápidamente manufacturan hemoglobina. Esto implica que la función eritropoyética embrionaria sea un proceso altamente demandante de átomos de hierro.

En la eritropoyesis hepática fetal la mayor parte del hierro requerido en la generación de eritrocitos es reciclado por macrófagos desde glóbulos rojos envejecidos o bien en proceso de hemólisis. Si el proceso de reciclaje no puede satisfacer la demanda de hierro, el hierro almacenado en los hepatocitos es liberado. En el hígado embrionario, en su fase pre-eritropoyética (Figura N° 11), la sangre primitiva existente en la red vascular sinusoidal no sufre este proceso degradativo por hemólisis o fagocitosis por macrófagos. En el embrión, no existe información aún acerca de los mecanismos de

incorporación de hierro que permitan su utilización en la síntesis de hemoglobina.

Para la generación de la segunda onda hematopoyética, que al parecer ocurre en el cuerpo del embrión durante la semana 5 pf, deben existir fuentes generadoras de hierro que posibiliten la síntesis de nueva hemoglobina y por lo tanto, la generación de nuevas células sanguíneas, como las observadas en el embrión entre la semana 5 y 6 pf. Como se señaló anteriormente, para la síntesis de la molécula de hemoglobina el hierro es indispensable.

### Entonces, ¿Quién provee el hierro necesario para la síntesis de nueva hemoglobina durante la segunda onda eritropoyética que se inicia en la semana 5 pf?

El embrión necesita imperiosamente glóbulos rojos para responder a las demandas metabólicas del crecimiento que le permitan conducir exitosamente la respiración celular, para así asegurar tanto su sobrevivencia como sus procesos organogénicos.

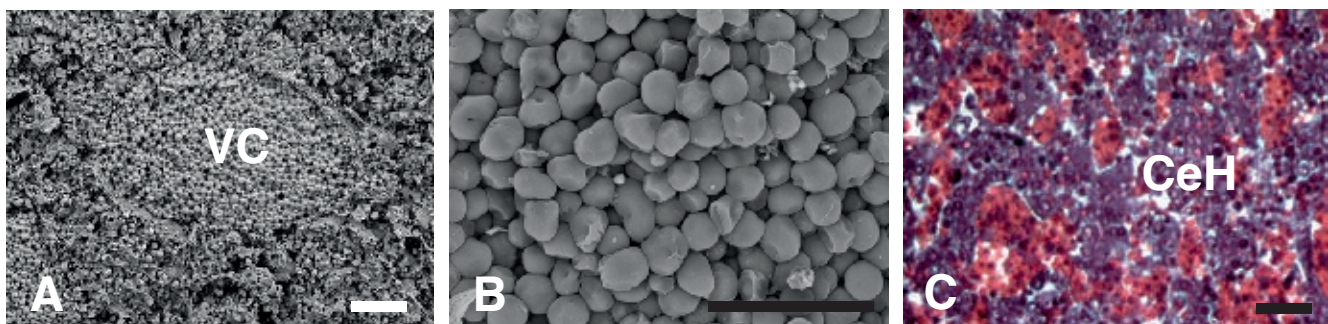


Figura N° 10. Imágenes de hígado de embriones humanos de la semana 5 pf. En "A", microfotografía de MEB de hígado de un embrión de 35 días de edad en el que se observa la vena central (VC) de un lobulillo hepático lleno de células sanguíneas. Aumento de 300x. En "B", a mayor aumento (1500x) se muestra que la sangre contenida en la vena central corresponde por su tamaño (miden entre 12 y 14  $\mu\text{m}$  de diámetro) a eritroblastos primitivos producto de la segunda onda generacional de sangre que al parecer ocurriría en el cuerpo del embrión. En "C", se muestra un corte histológico de hígado de 5 semanas de edad pf, que muestra la gran cantidad de eritroblastos primitivos presentes en los sinusoides (en color rojo) localizados entre los cordones endodérmicos hepáticos (CeH). Bar: 50  $\mu\text{m}$ .

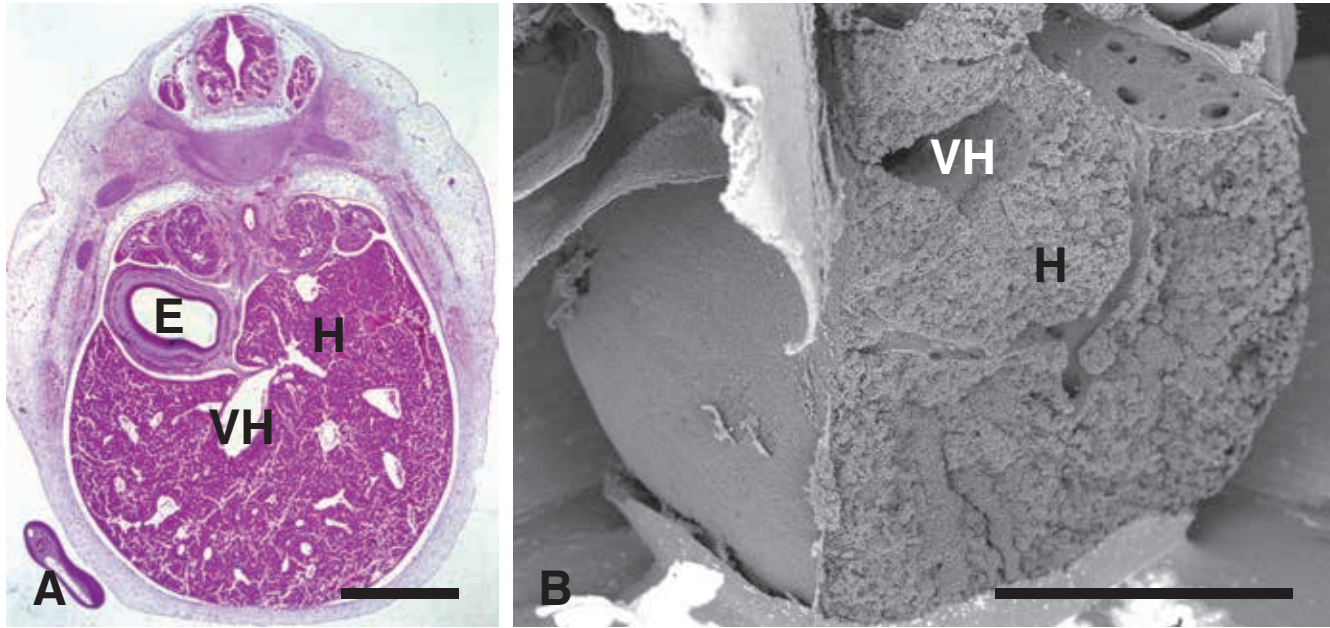


Figura N° 11. Imágenes de hígado (H) de embriones a comienzos de la semana 6 pf, en su fase pre-eritropoyética (endodérmica) vistas por medio de microscopía óptica (A) y MEB (B). Observe la organización lobular y distribución de la red vascular. Estómago (E), vena hepática (VH). Bar: 1 mm.

### Consideraciones previas

En estudios conducidos en nuestro Laboratorio hemos observado que:

1. El SV es un anexo extraembrionario funcional al embrión en desarrollo solo hasta finales de la semana 6 pf, dado que durante la semana 7 pf, inicia su proceso de regresión (Figura N° 12).
2. Este proceso de regresión del SV involucra el colapso de sus paredes y el estrechamiento del tallo vitelino, que lo mantiene unido a la pared ventral del cuerpo del embrión (Figuras N° 5 y 8). Este estrechamiento implica, por un lado, una severa disminución de la circulación sistémica a través de la vena vitelina, única vía por donde la sangre circula hacia el embrión, y por otro, la obliteración del conducto vitelino (Figura N° 12b), estructura que comunica la cavidad del SV con la cavidad del intestino primitivo (vía no vascular), lo que permite el transporte temprano de nutrientes hacia la cavidad del intestino primitivo.

Estas observaciones nos permiten afirmar que el conducto vitelino es funcional solo hasta finales de la semana 5 pf, cerrándose definitivamente en la semana 6 pf (Figura

N° 12). Basados en estas observaciones, concluimos que después de la semana 6 pf, el SV deja de ser funcional al embrión debido a su colapso y regresión.

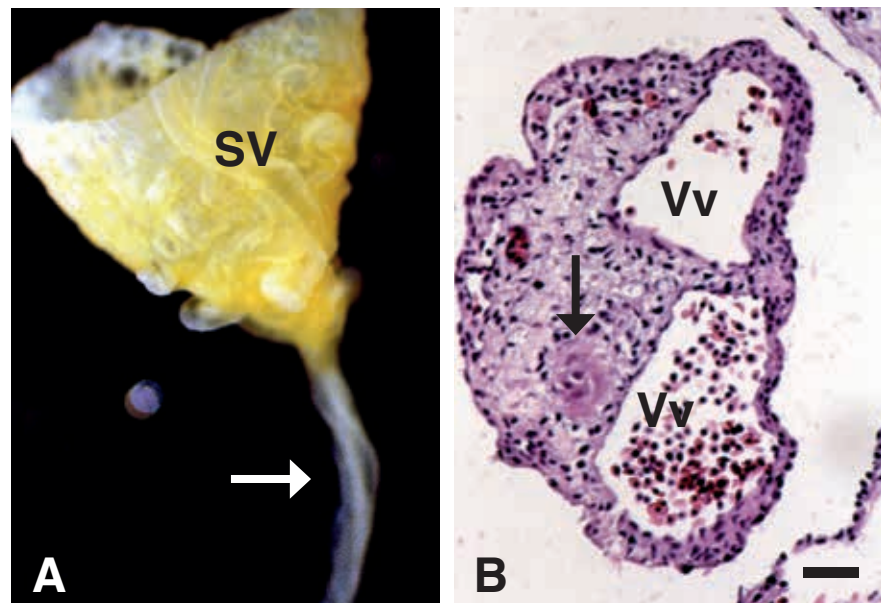


Figura N° 12. Tallo vitelino en proceso de regresión. En "A" se muestra el tallo vitelino (flecha blanca), en el curso de la semana 6 pf. En "B", se muestra un corte transversal de tallo vitelino teñido con H-E, donde el conducto vitelino (flecha negra) a esta edad, ya se encuentra obliterado, bloqueando el tránsito desde el SV hacia el intestino medio (comparar con figura 9 b). A esta edad, la vena vitelina (Vv) es aún funcional. Bar: 50 µm.



Si la vena vitelina que saca la sangre del SV deja de funcionar y si el conducto vitelino se oblitera al término de la semana 5 pf, concluimos que el gran incremento de EPs observados en el cuerpo del embrión a contar de la semana 6 pf no provienen del SV (ni del hígado ni la placenta, ya que estos aún no empiezan a funcionar), sino que son producto de la segunda onda hematopoyética que se iniciaría en el cuerpo del embrión (Figura N° 10). Sin embargo, nos preguntamos:

### ¿de dónde el embrión obtiene el hierro necesario para desencadenar la segunda onda eritropoyética?

#### Eritrocitos No Nucleados

Estudios conducidos en la década pasada en nuestro laboratorio analizando la pared del SV entre la semana 5 y 6 pf, una semana antes de la involución del SV, arrojaron resultados sorprendentes. Pudimos demostrar por primera vez, en humanos, la existencia de dos fenómenos claves en favor del rol fundamental del SV en la sobrevivencia

del embrión (Pereda et al., 2010). Primero, demostramos que el SV además de producir, a partir de la semana 3 pf, EPs desde los islotes sanguíneos, también tenía el potencial para generar, durante la semana 5 pf, un nuevo tipo de célula sanguínea, transitoria, con similar tamaño y forma que los eritrocitos generados por el hígado a partir de la semana 7 pf, pero que no tenían núcleo (Figura N° 13). A este nuevo tipo de célula sanguínea se le designó como eritrocito no nucleado (ENN). La existencia de hemoglobina y ausencia de núcleo transformaba a estos ENN en verdaderos sacos de hemoglobina (Figura N° 13c) (Pereda and Niimi, 2008). Esta observación dejaba en evidencia la existencia de un sistema sanguíneo funcional dispuesto para el transporte de  $O_2$ , diferenciándolo de los EPs, los cuales, al presentar núcleo, no son muy eficientes en el transporte de oxígeno y al parecer sufren hemólisis (Figuras N° 10 y 13) mientras circulan por los estrechos capilares del cuerpo del embrión (Barminko et al., 2016). Otra gran diferencia con los EPs radica en su origen ontogenético y en el meca-

nismo usado para su transporte y liberación de  $O_2$  al cuerpo del embrión.

Respecto a su origen pudimos demostrar que los ENN se generaban en las células del compartimiento endodérmico del SV (Figura N° 13), por lo tanto tenían un origen endodérmico, muy distinto al origen de los EPs que eran de origen mesodérmico. Respecto al transporte, pudimos constatar que los ENN no eran transportados por la sangre, sino que por una vía no vascular: el conducto vitelino (Pereda et al., 2015). Los pasos seguidos en este transporte se resumen en: Desde las vesículas endodérmicas los ENN son vaciados en la cavidad del SV junto a proteínas séricas, generando un suero funcional. Luego, en el transcurso de la semana 5 pf, son transportados en este medio por el conducto vitelino hacia la cavidad del intestino primitivo, donde se almacenan transitoriamente en la cavidad del estómago entre las semanas 5 y 6 pf (Figura N° 14). Estos ENN nunca fueron observados en la sangre circulante durante este periodo (Figura N° 15).

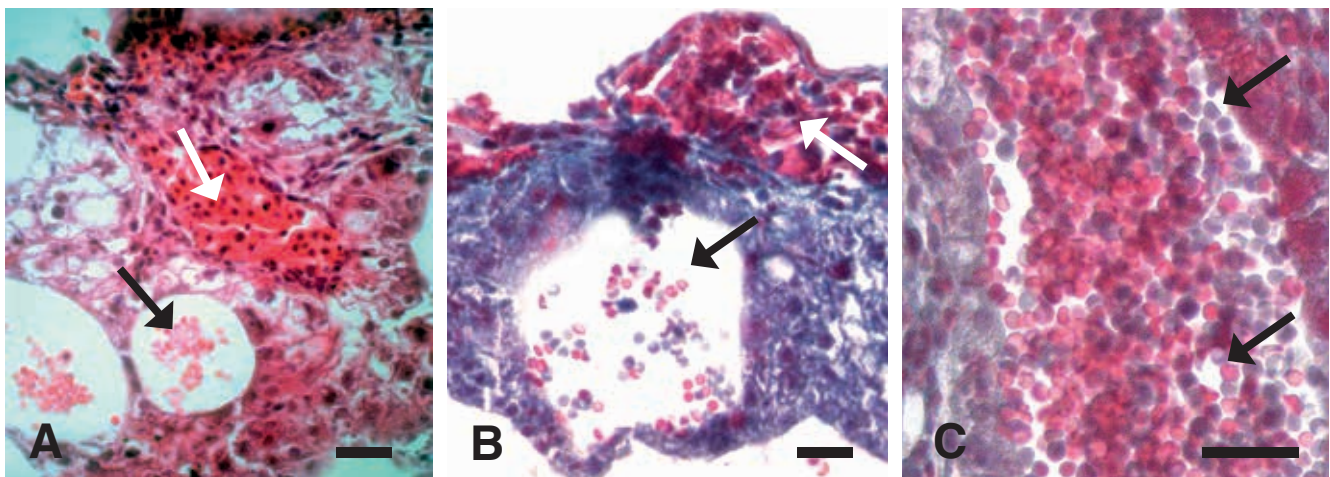


Figura N° 13. Cortes histológicos de la pared del saco vitelino de un embrión de la semana 5 pf. Se observa que las vesículas endodérmicas contienen eritrocitos no nucleados (flechas negras). Estos eritrocitos no nucleados se diferencian de los eritroblastos primitivos (flechas blancas) presentes en la red vascular del mesodermo en que estas últimas son células nucleadas. Obsérvese en "C" la gran cantidad de eritrocitos no nucleados almacenados dentro de la vesícula endodérmica. A: Tinción H-E. B y C: Tinción tricrómica de Masson. Bar: 50  $\mu$ m.

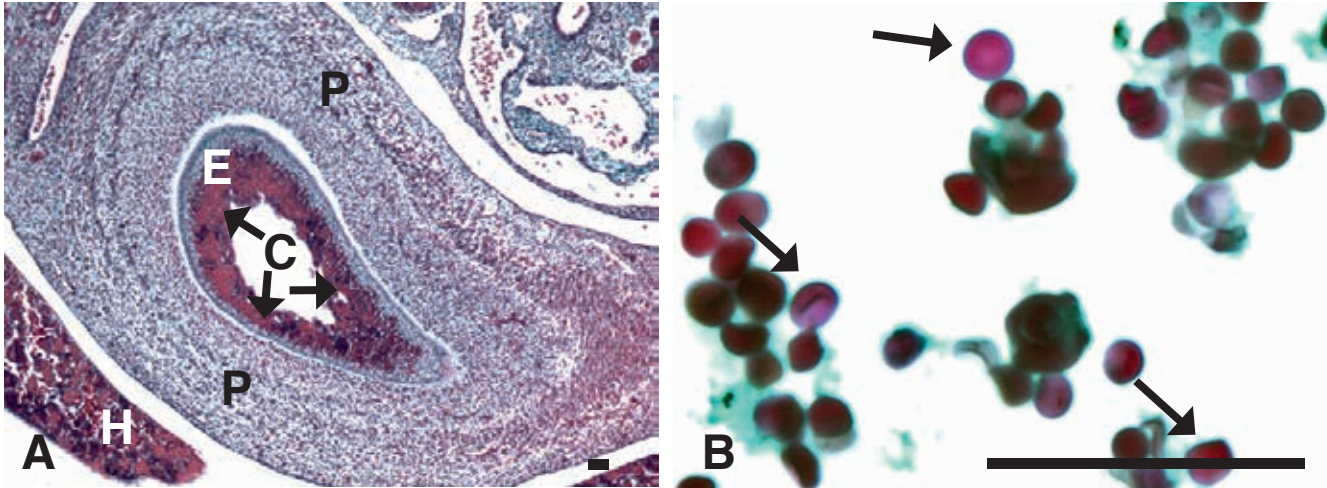


Figura N° 14. En "A" se muestra un corte histológico teñido con Tricrómico de Masson del estómago de un embrión de 34 días pf, donde se reconoce la cavidad estomacal (C), conteniendo gran cantidad de ENN (flechas). Epitelio endodérmico de revestimiento (E) y pared estomacal (P). Hígado: H. En "B", un acercamiento al contenido de la cavidad estomacal, donde se reconocen ENN (Flechas). Bar: 50  $\mu$ m.

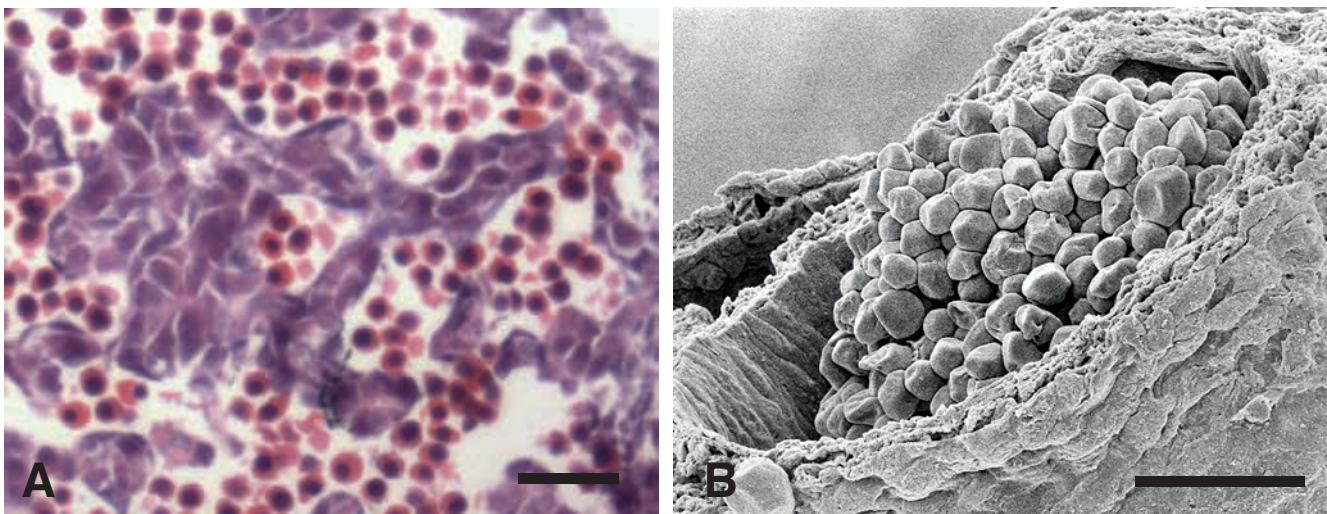


Figura N° 15. En estas imágenes se ilustra que a las 5 semanas de edad toda la población de células sanguíneas circulantes corresponden a eritroblastos primitivos. En "A", se muestra un corte histológico de hígado de un embrión de 34 días pf, teñido con H-E. En "B", microfotografía de barrido que muestra eritroblastos primitivos en el lumen de la arteria mesentérica superior. Observe la regularidad en el tamaño de las células. Bar: 45  $\mu$ m.

### Nutrición histiotrófica

Otro hallazgo por primera vez observado en humano (Pereda et al., 2015) fue la constatación de que la mayoría de los ENN almacenados en el estómago eran fagocitados por las células endodérmicas del epitelio de revestimiento del estómago en un tipo de nutrición histiotrófica y que otros sufrían hemólisis en el lumen del estómago. Esta observación nos permitió pensar

que, además de fagocitosis, los productos generados en el proceso de hemólisis podrían ser absorbidos desde la luz del estómago (Figura N° 14).

Basados en estas observaciones, y considerando que no existe información en la literatura sobre esta materia, extrapolamos nuestros datos a otros procesos en los que sucede eritrofagocitosis, como la ocurrida en macrófagos del sistema

retículoendotelial. En este sistema los eritrocitos fagocitados sufren una serie de procesos degradativos en fagosomas que finalmente conducen a la liberación de hierro, su reciclaje y posterior generación de nueva hemoglobina. En base a estas experiencias, nosotros especulamos que: los ENNs después de ser fagocitados por las células epiteliales del estómago y englobados en fagosomas se produciría la liberación de hemoglobina y oxígeno. Luego,



la hemoglobina (hemoproteínas), bajo la acción de enzimas proteolíticas, liberaría hierro heme. Este hierro sería liberado en su estado férrico y transportado hacia la circulación embrionaria por medio de transportadores específicos, a fin de cubrir las demandas metabólicas de órganos y tejidos, sirviendo de esta forma no solo los requerimientos de hierro que permitirían la expresión de la segunda onda hematopoyética en el embrión sino que además servir la naciente función hematopoyética del hígado embrionario.

### Consumo de Hierro

Durante el periodo embrionario temprano, previo al desarrollo del hígado como órgano hematopoyético, el embrión entre la semana 4 y 7 pf requiere de hierro para la síntesis de hemoglobina, proteína esencial en la eritropoyesis. Entre la semana 5 y 6 pf, los EPs de la segunda onda eritropoyética son los principales demandantes de hierro para poder sintetizar hemoglobina. En el caso de los eritrocitos maduros producidos por el hígado en el periodo fetal, cuya vida media es de 120 días, alrededor del 70% del hierro en el cuerpo es encontrado como heme generado en los eritrocitos senescentes. En el caso del

embrión temprano, donde la vida media de los EPs no se conoce (aunque al parecer tendría una vida corta y muy transitoria), esta situación de reciclaje no se produciría. Hemos observado en cambio, que en el hígado, en su fase inmadura, los EPs presentes en los sinusoides hepáticos cohabitan con macrófagos. Es posible que estos macrófagos actúen como reductores de células sanguíneas muertas o en etapas degenerativas, a fin de englobarlos en vesículas fagocíticas (fagolisosomas) que bajo la acción de enzimas hidrolíticas promueven la liberación de heme y hierro desde la hemoglobina, dejando disponible estos componentes para el inicio de otro ciclo de síntesis de hemoglobina.

Por esta vía de reciclaje, los macrófagos contribuirían con el mayor pool de hierro plasmático a la eritropoyesis hepática. La segunda onda eritropoyética expansiva que se observa durante la semana 5 y 6 pf, con la enorme cantidad de EPs producidos, es altamente demandante de hierro heme necesario para la síntesis de nueva hemoglobina. Los EPs generados en la primera onda eritropoyética a nivel del SV es una población de células muy escasa y transitoria, por lo tanto, el embrión para sobrevivir en esta etapa requiere de fuentes suplemen-

tarias de células sanguíneas que aporten hierro desde hemoglobina.

Como lo hemos señalado anteriormente, el SV contribuye con ENN a la nutrición del embrión, usando el conducto vitelino para su transporte al estómago. Sin embargo, esta vía transportadora no vascular es transitoria, ya que el conducto vitelino, única vía de paso entre la cavidad del SV y el intestino del embrión, se cierra definitivamente al final de la semana 5 pf, tiempo suficiente para permitir el almacenamiento de ENNs en la cavidad estomacal y su uso histiotrófico posterior (en el curso de la semana 6 pf). Teniendo en mente estas observaciones, nosotros postulamos que durante la segunda onda eritropoyética, cuando se genera una gran cantidad de EPs en el cuerpo del embrión, el proceso eritropoyético es posible gracias a los aportes del hierro producidos como consecuencia de la fagocitosis de los ENN por las células endodérmicas del estómago y de la absorción de hemoglobina desde ENN hemolizados. Sin embargo, de acuerdo a nuestros datos, la eritrofagocitosis ocurriría solo hasta el final de la semana 6 pf, ya que no se observan ENNs en la cavidad del estómago en edades posteriores.

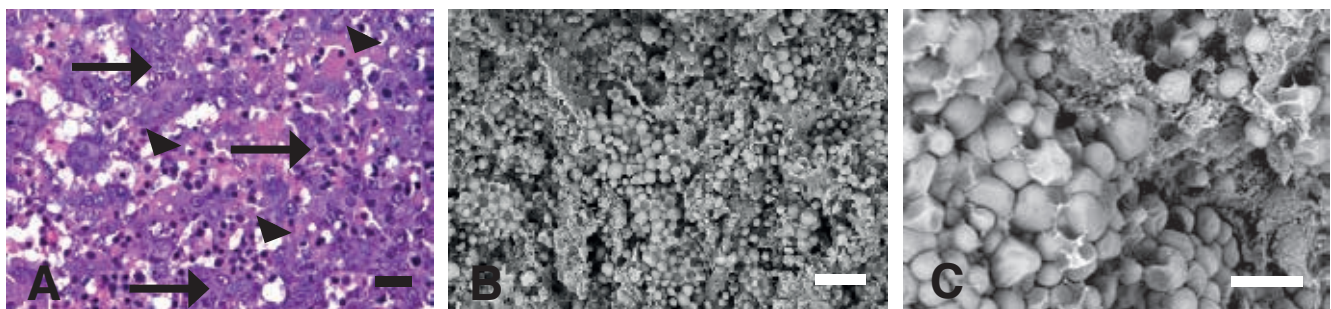


Figura N° 16. Imágenes de hígado obtenidos desde embriones de 7 semanas pf, al inicio de la eritropoyesis hepática. En "A", se muestra un corte histológico teñido con H-E, donde se observa la estructura hepática al inicio de la eritropoyesis. Observe que los núcleos teñidos oscuros de las células eritroideas (flechas) son más numerosos que los núcleos pálidos de los hepatocitos y tienen aproximadamente el mismo tamaño. Células hepáticas y nichos de células sanguíneas (cabezas de flecha). Compárese con las figuras 3 y 15a. En "B" y "C", se muestran fotografías de MEB en las que se puede apreciar una alta heterogeneidad celular en el hígado, producto de la transición eritropoyética que ocurre en este período. Bar: 20  $\mu$ m.

**¿De dónde proviene el hierro necesario para la hematopoyesis definitiva en el hígado embrionario?**

Conociendo que las células endodérmicas del SV tienen el potencial para generar ENN y sabiendo que las células de los cordones endodérmicos del SV tienen un mismo origen embrionario que las células endodérmicas de los cordones hepáticos en su fase inmadura, conocida como endodérmica pre-hematopoyética, nos planteamos la posibilidad de que las células endodérmicas hepáticas también fueran capaces de producir ENN al igual que las células endodérmicas del SV. Si tal potencial existiera, se produciría una transición SV/cordones hepáticos, haciendo posible la continuidad en la producción de

ENNs durante la semana 6 pf. El cese en la producción de ENN se produciría al momento de la diferenciación del hepatoblasto en hepatocito, lo que ocurre en la semana 7 pf. Los ENNs así generados, podrían quedar retenidos en el parénquima hepático desde donde serían fagocitados por macrófagos, generando hierro a fin de mantener la continuidad en la producción de hierro-heme, o bien almacenados en los hepatocitos y con ello cubrir las demandas en la etapa de transición hepatoblasto/hepatocito, lo que da inicio a la eritropoyesis hepática (Figura N° 16). Por medio de microscopía óptica y electrónica de barrido hemos iniciado estudios a fin de verificar esta hipótesis.

En conclusión, con nuestro estudio entregamos claras evidencias que

en la sobrevivencia del embrión humano el SV secundario desempeña una función vital, aportando dos tipos de sangre al embrión, ambas funcionales, como también insumos vitales para la generación de sangre, como la molécula de hierro, elemento fundamental en la síntesis de hemoglobina. Estas observaciones y estudios conducidos por nosotros se difieren de los estudios conducidos por investigadores en otros centros (Burton et al., 2001) que sostienen que la sobrevivencia del embrión depende de sangre e insumos aportados por la placenta.

Estos autores sostienen que los insumos provenientes desde la placenta pasan a la cavidad coriónica y desde allí son absorbidos por el mesotelio del SV desde donde pasan

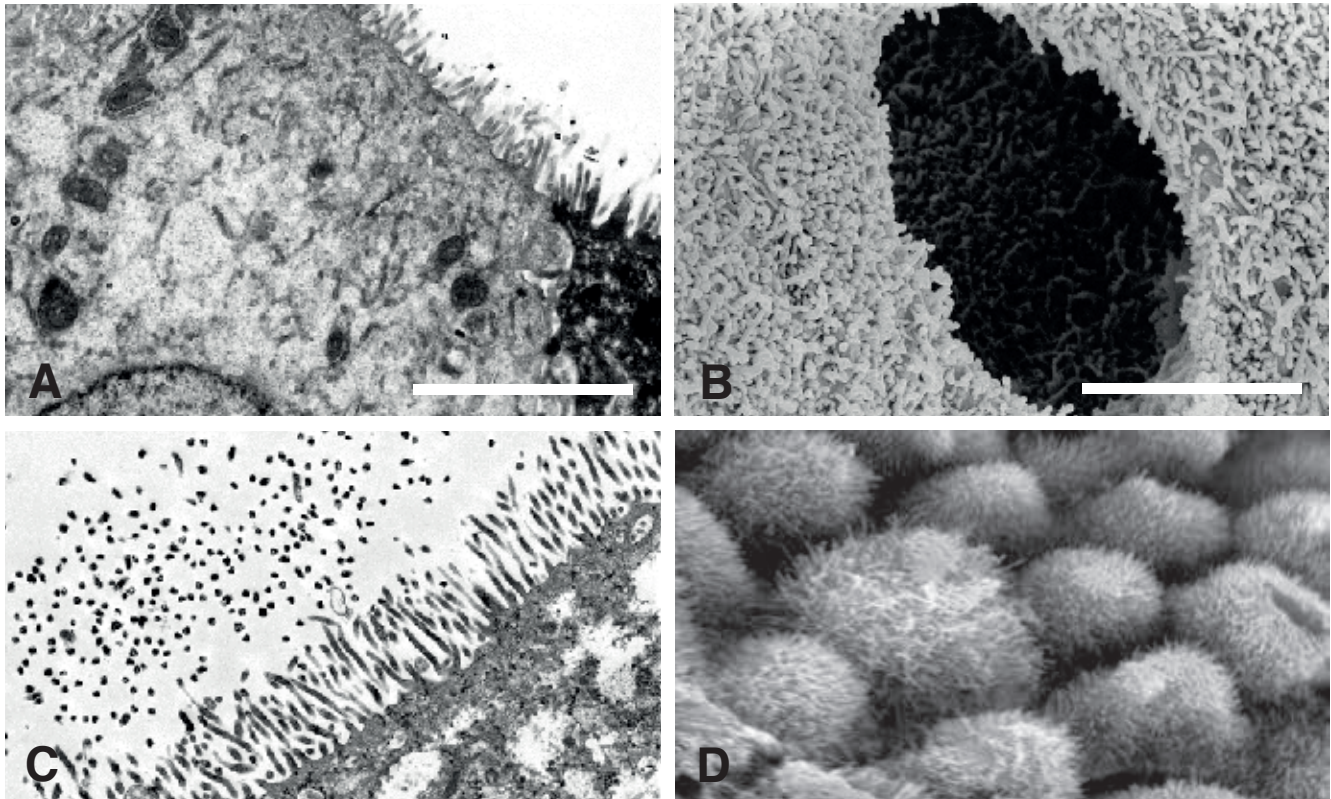


Figura N° 17. Imágenes de microscopía electrónica de las vellosidades asociadas al endodermo (A, B) y al mesotelio (C, D) de la pared del saco vitelino. En "A" y "C", se muestran microscopía electrónica de transmisión y en "B" y "D", MEB. En "B", se muestra un poro por donde la vesícula endodérmica libera sus productos de secreción (nutrientes y ENN) hacia la cavidad del saco vitelino. Nótese la organización microvellosa del revestimiento endodérmico que mira a la cavidad del saco vitelino. En "D", se muestra el mesotelio del saco vitelino (cara que mira hacia la cavidad celómica), en donde se pueden reconocer las macrovellosidades que lo recubren. Nótese la diferencia en tamaño y estructura entre micro y macro vellosidad. Bar: 5 µm.





a la sangre y desde allí al embrión. Nosotros hemos demostrado que el mesotelio es un epitelio de revestimiento superficial formado por macrovellosidades arborizadas, cuya función es proteger al saco vitelino de daño causado por roce o fricción, no presentando las características de los epitelios de absorción, como si ocurre a nivel de la capa endodérmica interna del SV, la cual presenta abundantes microvellosidades y cumple con tales funciones (Figura N° 17).

### Consideraciones finales

Todos los fenómenos que ocurren en la vida del embrión temprano son transitorios: su forma y tamaño van cambiando día a día, así como también van emergiendo las funciones de los diferentes órganos en formación. Estos rápidos cambios también ocurren en los anexos embrionarios, particularmente en el caso del SV. El SV es un anexo extraembrionario de 6 mm de diámetro, efímero, que en el curso de la semana 4 pf experimenta cambios

notables de forma y estructura como resultado del proceso de plegamiento del cuerpo del embrión. Estos cambios estructurales, son determinantes para dar inicio a la circulación de sangre hacia el embrión. Como resultado de este proceso de plegamiento lateral y longitudinal del cuerpo embrionario el SV secundario da paso al SV definitivo que conduce a la instalación del tallo vitelino interpuesto entre el SV propiamente tal y el intestino medio. Por esta vía, la sangre acumulada en la pared del saco vitelino pasa a la circulación embrionaria por medio de la vena vitelina, única vía de paso existente.

Tal como se ha descrito en este trabajo, nuestros resultados y nuestras interpretaciones parecen ser razonables y coherentes para explicar la sobrevivencia del embrión hasta la semana 6 pf. Nos queda por entender cómo el embrión sobrevive, crece y se desarrolla durante la semana peak de la organogénesis, es decir, desde finales de la semana 6 a la semana 7 pf.

Dado que no existe información de los procesos organogénéticos iniciales que ocurren en el curso del desarrollo embrionario humano ni interpretaciones funcionales de los fenómenos que ocurren en el embrión temprano y menos aún información de las relaciones anatómico-funcionales que se establecen entre el SV y embrión, consideramos válido llevar adelante en este trabajo pionero, especulaciones y divagaciones funcionales en base a nuestros resultados morfológicos. Divagaciones que nos acercan a entender los fenómenos funcionales que ocurren en el curso del desarrollo embrionario temprano y que nos permitan entender los grandes hitos que hacen posible la sobrevivencia del embrión en un entorno de permanentes cambios, totalmente desprovisto de fuentes nutricionales que le permitan su subsistencia. No hay que olvidar, que la circulación entre el embrión y la placenta, por ejemplo, solo se inicia a partir de la semana 8 pf.

### Agradecimientos

Agradezco muy sinceramente a la TM Srta. Bárbara Valencia por su dedicación, interés y preocupación en la revisión y estructura final del manuscrito.

Los resultados presentados corresponden a investigaciones financiadas por Proyectos DICYT ejecutados entre el 2010 y 2018.



## Referencias

- Barminko J, Reinholt B, Baron MH. 2016. Development and differentiation of the erythroid lineage in mammals. *Developmental and Comparative Immunology* 58: 18-29.
- Burton GJ, Hempstock J, Jauniaux E. 2001. Nutrition of the human fetus during the first trimester – A review. *Placenta* 22: S70-S76.
- Gitlin D, Perriceli A. 1970. Synthesis of serum albumin, Prealbumin,  $\alpha$ -foetoprotein,  $\alpha$ 1-Antitrypsin and Transferrin by the Human Yolk Sac. *Nature* 228: 995-997.
- Hesseldahl H, Larsen JF. 1969. Ultrastructure of human yolk sac: endoderm, mesenchyme, tubules and mesothelium. *American Journal of Anatomy* 126: 315-335.
- Hoyes A. 1969. The human foetal Yolk Sac, An ultrastructural study of four specimens. *Cell and Tissue Research* 99: 469-490.
- Julien E, El Omar R, Tavian M. 2016. Origin of the hematopoietic system in the human embryo. *FEBS Letters* 590: 3987-4001.
- Luckett W. 1978. Origen and diferenciación of the yolk sac and extraembryonic mesoderm in presomite human and rhesus monkey embryos. *American Journal of Anatomy* 152: 59-97.
- Moore K, Persaud T, Torchia M. 2016. *Embriología clínica*. Elsevier Ed, España.
- Oberlin E, Tavian M, Blazsek I, Péault B. 2002. Blood-forming potential of vascular endothelium in the human embryo. *Development* 129: 4147-4157.
- Palis J, Yoder M. 2001. Yolk-sac hematopoiesis: The first blood cells of mouse and man. *Experimental Hematology* 29: 927-936.
- Pardanaud L, Eichmann A. 2009. The stress of forming blood cells. *Nature* 459: 1068-1069.
- Pereda J, Corral E, Franchitto G. 2005. Emergence of a glomus-like body in the human yolk sac: A microanatomical analysis of its structure. *Italian Journal of Anatomy and Embryology* 110: 167-174.
- Pereda J, Niimi G. 2008. Embryonic erythropoiesis in human yolk sac: Two different compartments for two different processes. *Microscopy Research and Technique* 71: 856-862.
- Pereda J, Monge JI, Niimi G. 2010. Two different pathways for the transport of primitive and definitive blood cells from the yolk sac to the embryo in humans. *Microscopy Research and Technique* 73: 803-809.
- Pereda J, Sulz L, Monge JI. 2015. The role of the gastrointestinal epithelium as a possible pathway for the transfer of nutrients to the embryo's circulation. *Microscopy Research and Technique* 78: 500-507.
- Shi WK, Hopkins B, Thompson S, Heath JK, Luke BM, Graham CF. 1985. Synthesis of apolipoproteins, alpha-foetoprotein, albumin, and transferrin by the human foetal yolk sack and other foetal organs. *Development* 85: 191-206.
- Silva B, Faustino P. 2015. An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. *Biochimica et Biophysica Acta* 1852: 1347-1359.
- Takashina T. 1993. Histology of the secondary human yolk sac with special reference to hematopoiesis. En: Nogales FF. (Ed). *The human yolk sac and yolk sac tumors*. Springer Ed., Heidelberg, Berlin, Germany.
- Van Handel B, Prashad S, Hassanzadeh-Kiabi N, Huang A, Magnusson M, Atanassova B, Chen A, Hamalainen EI, Mikkola A. 2010. The first trimester human placenta is a site for terminal maturation of primitive erythroid cells. *Blood* 116: 3321-3330.