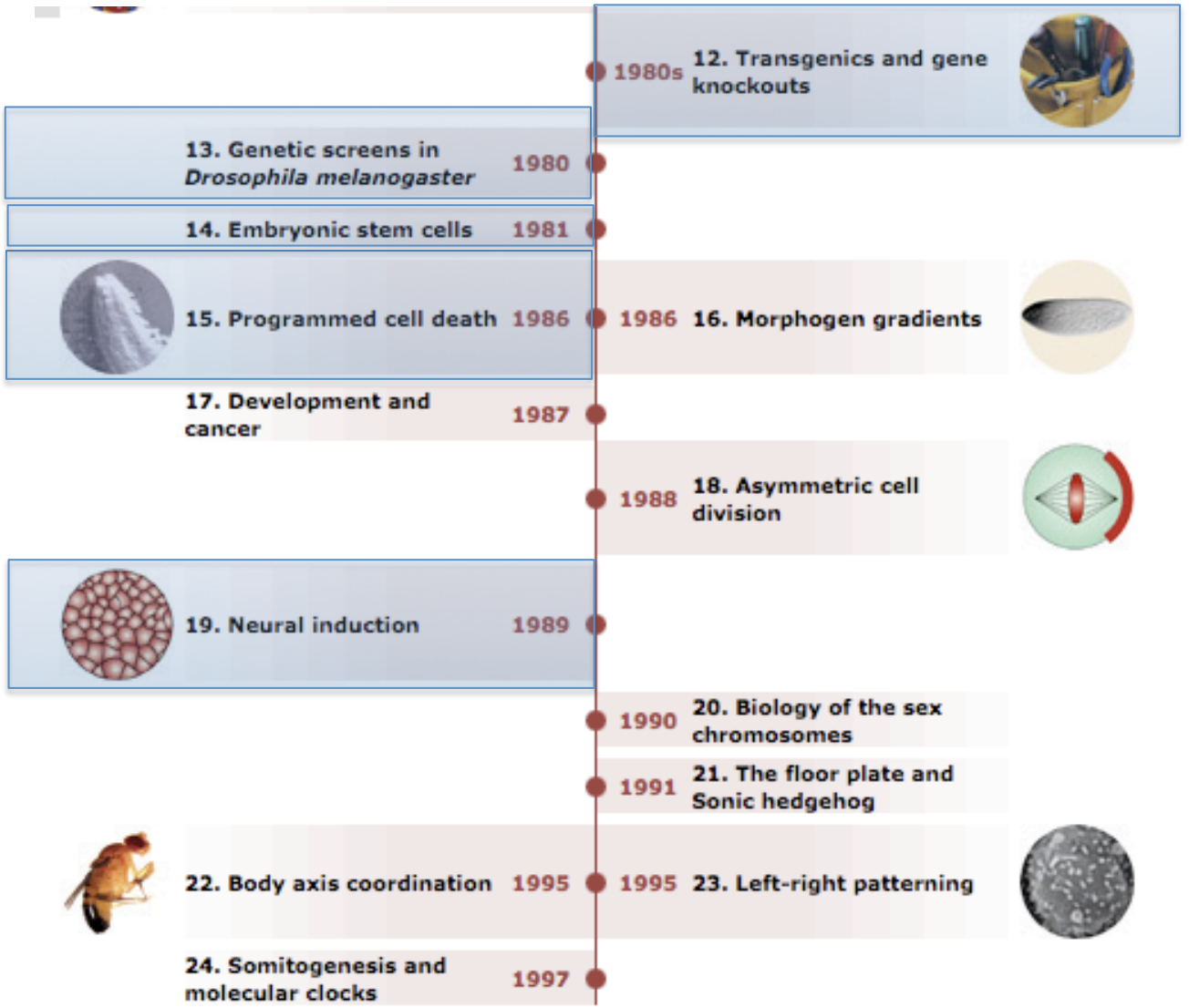
XX-XI Ideias Contemporâneas do desenvolvimento

Impacto da biologia do desenvolvimento na ciência do século XX

http://www.nature.com/milestones/development/milestones/index.html

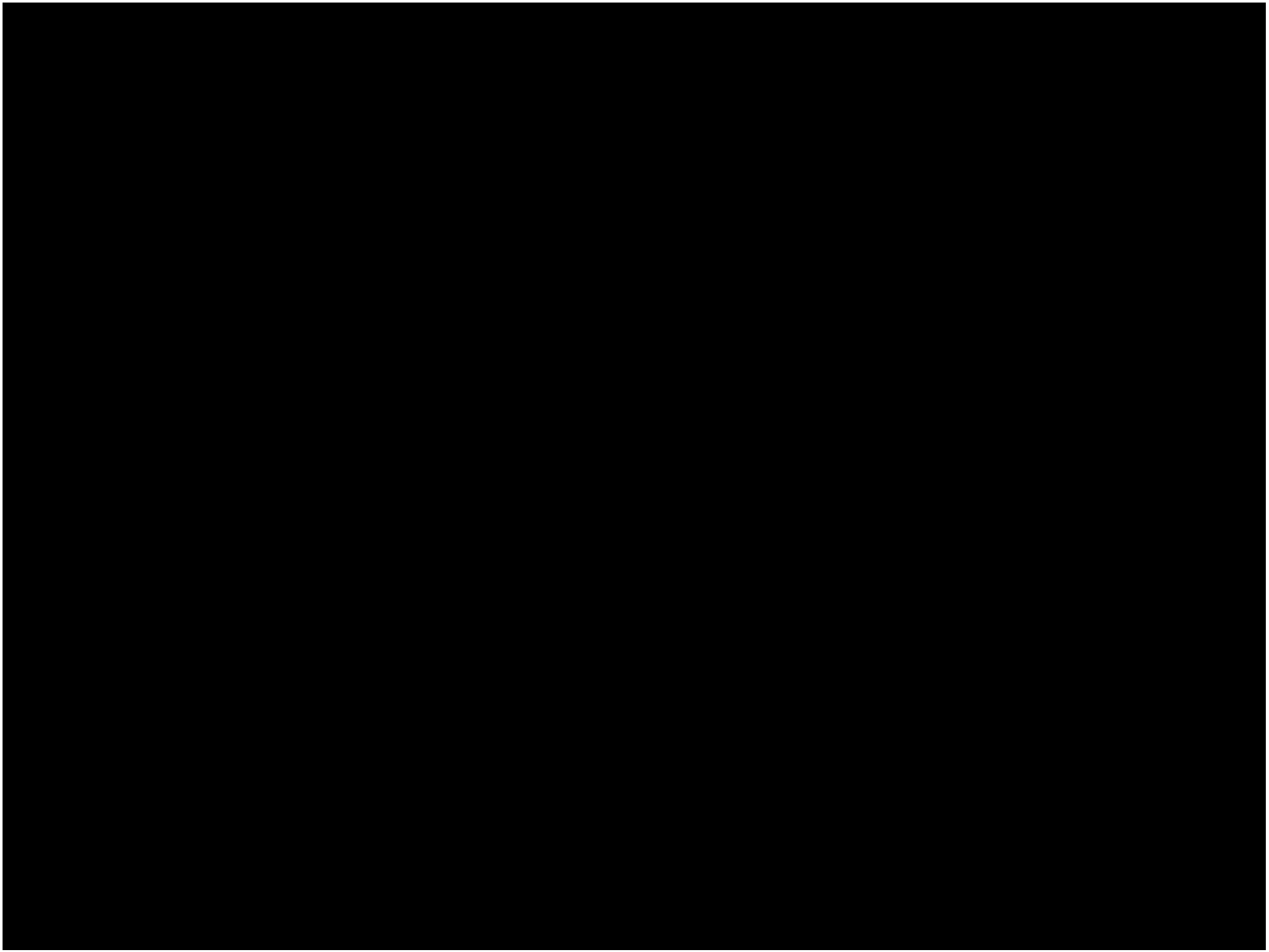
Impacto da biologia do desenvolvimento na ciência do século XX



http://www.nature.com/milestones/development/milestones/index.html

1997-2016 Nobels em áreas de pesquisa relacionadas à biologia do desenvolvimento

- 2001 Tim Hunt & Paul M. Nurse
  - pela descoberta de reguladores fundamentais do ciclo celular
- 2002 Sydney Brenner, H.Robert Horvitz, and John E. Sulston
  - pelas descobertas sobre “regulação gênica do desenvolvimento de orgãos e morte celular programada.”
- 2006 Andrew Z. Fire & Craig C. Mello
  - pela descoberta do RNA de interferência - silenciamento gênico por RNA dupla-fita
- 2007 Mario R. Capecchi, Martin J. Evans, and Oliver Smithies
  - pelas descobertas dos princípios para introdução de modificações específicas em genes de camundongos usando células tronco embrionárias
- 2010 Robert G. Edwards
  - pelo desenvolvimento de fertilização in vitro
- 2012 John Gurdon & Shinya Yamanaka
  - pela descobera que células maturas podem ser reprogramadas para serem pluripotentes
- 2014 John O’Keefe, May-Britt Moser, and Edvard I. Moser
  - pelas descobertas de células que constituem um sistema de posicionamento no cérebro
- 2015 Tomas Lindahl, Paul Modrich, Aziz Sancar
  - por estudos mecanísticos de repar de DNA
- 2016 Yoshinori Ohsumi
  - pelas descobertas de mecanismos de autofagia



CELULAS TRONCO
REGENERAÇAO EM ANIMAIS

STEM CELLS®

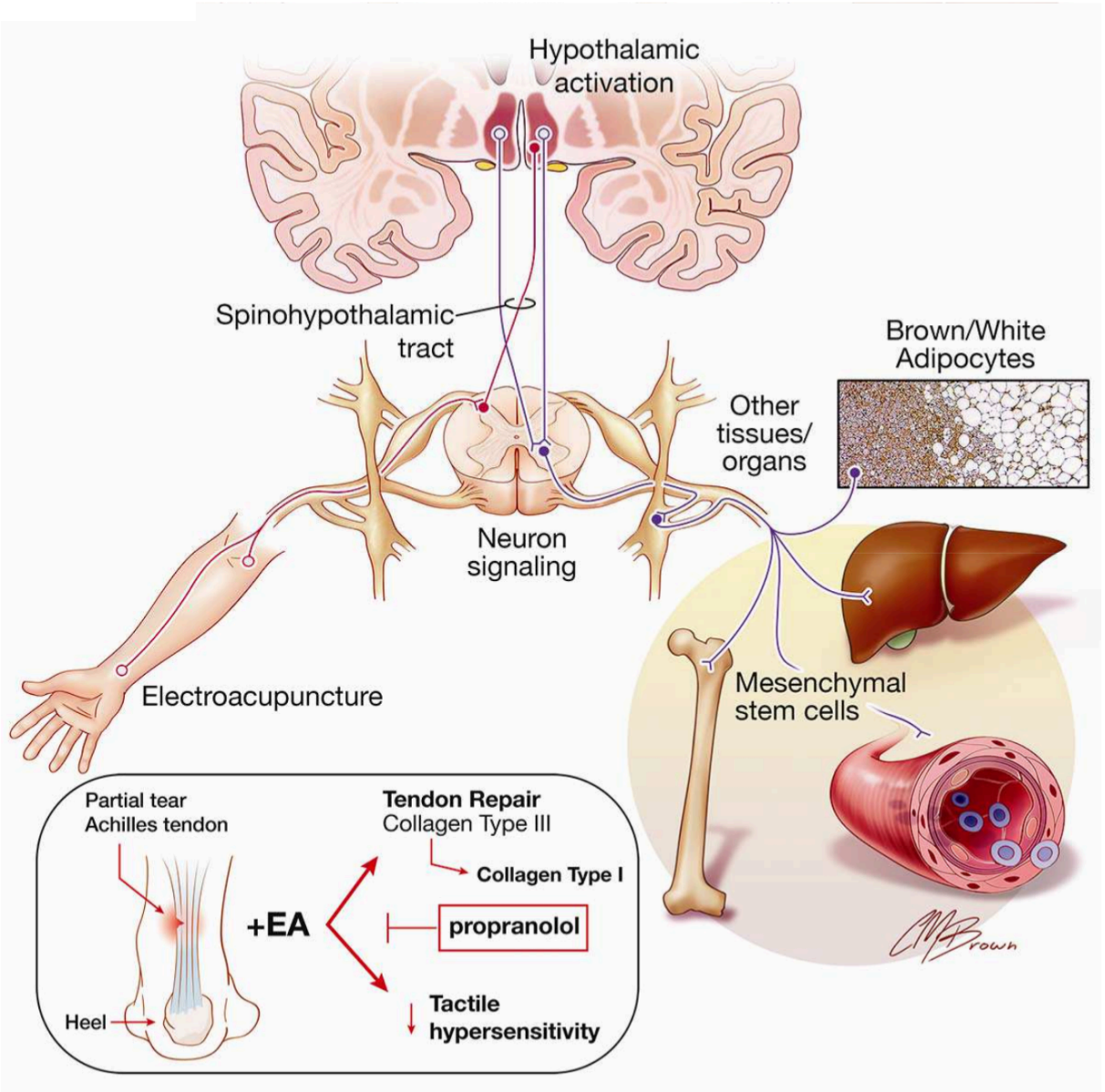
Notícias atuais

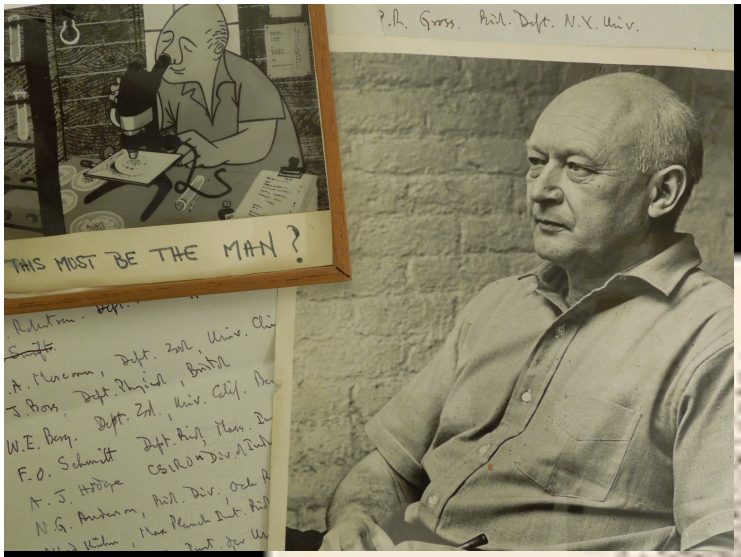
REGENERATIVE MEDICINE

Electroacupuncture Promotes CNS-Dependent Release of Mesenchymal Stem Cells

TATIANA E. SALAZAR[A,C,Dº], MATTHEW R. RICHARDSON[Bº], ELENI BELI[C], MATTHEW S. RIPSCH[E], JOHN GEORGE[D], YOUNGSOOK KIM[E], YAQIAN DUAN[C], LENI MOLDOVAN[C], YUANQING YAN[A], ASHAY BHATWADEKAR[C], VAISHNAVI JADHAV[C], JARED A. SMITH[E], SUSAN MCGORRAY[F], ALICIA L. BERTONE[G], DMITRI O. TRAKTUEV[H,I], KEITH L. MARCH[H,I], LUIS M. COLON-PEREZ[J], KEITH AVIN[K], EMILY SIMS[L], JULIE A. MUND[B,L], JAMIE CASE[B,L,M,N], SHAOLIN DENG[O], MIN SU KIM[P], BRUCE MCDAVITT[Q], MICHAEL E. BOULTON[C], JEFFREY THINSCHMIDT[R], SERGIO LI CALZI[C], STEPHANIE D. FITZ[K], ROBYN K. FUCHS[K], STUART J. WARDEN[K], TODD MCKINLEY[S], ANANTHA SHEKHAR[T], MARCELO FEBO[J], PHILLIP L. JOHNSON[U], LUNG JI CHANG[V], ZHANGUO GAO[W], MIKHAIL G. KOLONIN[W], SONG LAI[X], JINFENG MA[X], XINZHONG DONG[Y], FLETCHER A. WHITE[E†], HUISHENG XIE[Z†], MERVIN C. YODER[B,L†*] AND MARIA B. GRANT[C†*].

Key words. Mesenchymal stem cells • Adult stem cells • Nervous system • Neurones





Regulação gênica

TOTIPOTENTES
(zigoto)

PLURIPOTENTES
(ICM,ESC, EGC)

MULTIPOTENTES

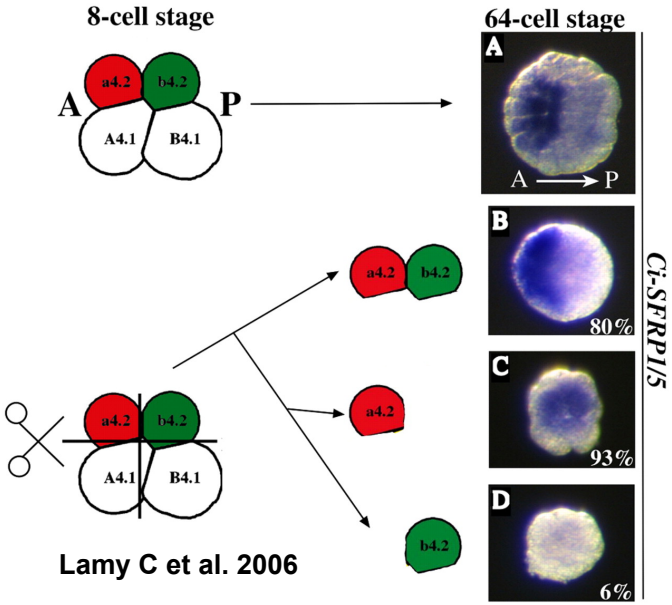
UNIPOTENTES

Paissagem epigenética de Waddington (Waddington's Epigenetic Landscape - Creode)

Especificação dos linhagens celulares por determinantes

1. Especificação condicional

- Especificação regulativa (!!!!)



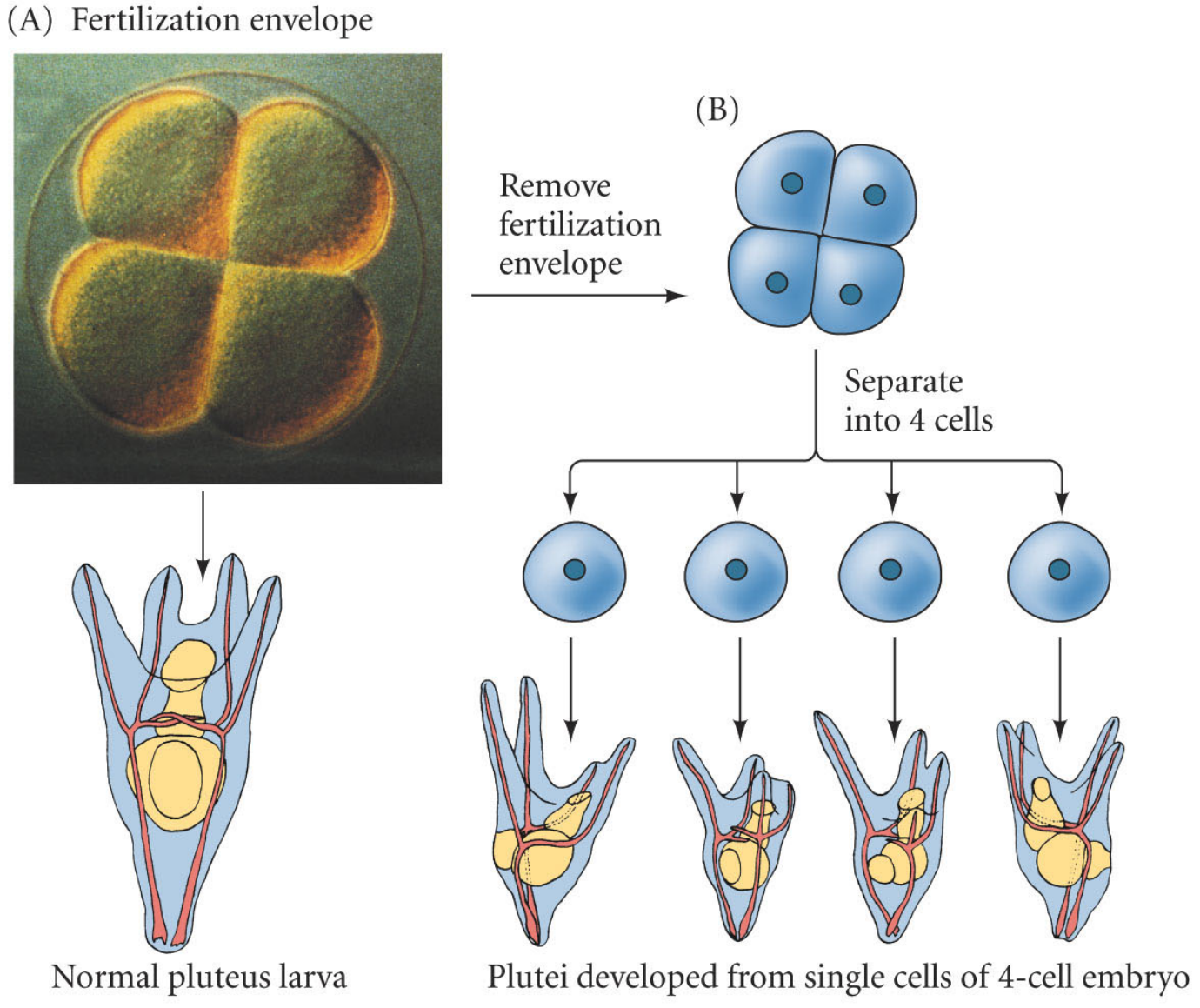
2. Especificação autónoma

Especificação dos linhagens celulares por determinantes

1. Especificação condicional

- Especificação regulativa (!!!!)

Especificação condicional: Desenvolvimento regulativo no Ouriço



DEVELOPMENTAL BIOLOGY, Eighth Edition, Figure 3.17 © 2006 Sinauer Associates, Inc.

Especificação condicional

II. Conditional specification

Characteristic of all vertebrates and few invertebrates.

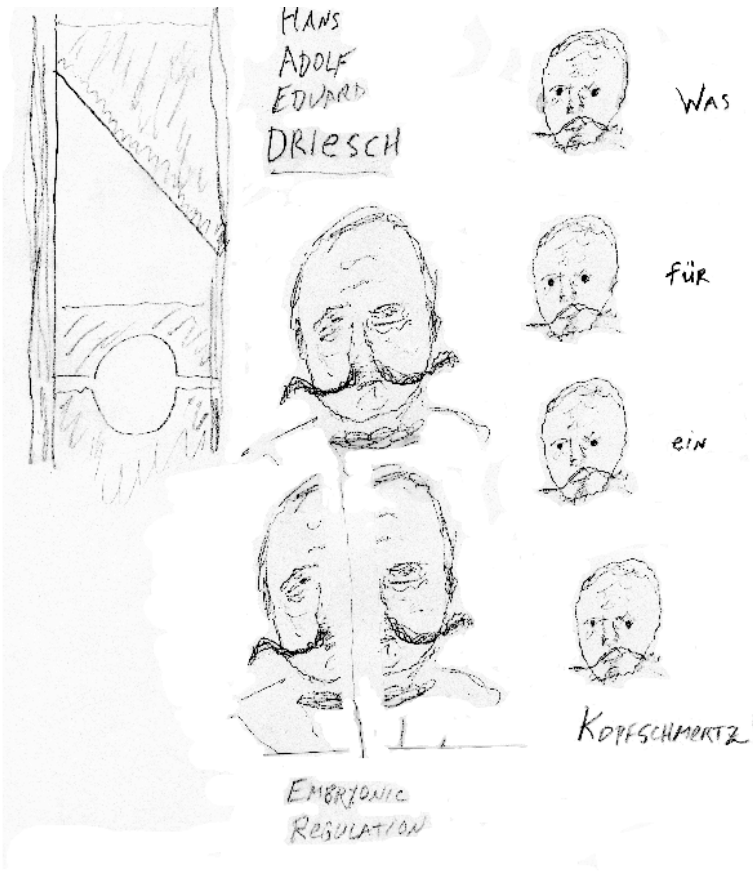
Specification by interactions between cells. Relative positions are important.

Variable cleavages produce no invariant fate assignments to cells.

Massive cell rearrangements and migrations precede or accompany specification.

Capacity for "regulative" development: allows cells to acquire different functions.

Source: After Davidson 1991.



Especificação condicional

II. Conditional specification

Characteristic of all vertebrates and few invertebrates.

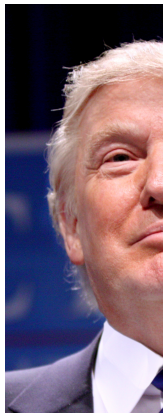
Specification by interactions between cells. Relative positions are important.

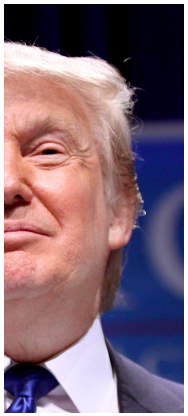
Variable cleavages produce no invariant fate assignments to cells.

Massive cell rearrangements and migrations precede or accompany specification.

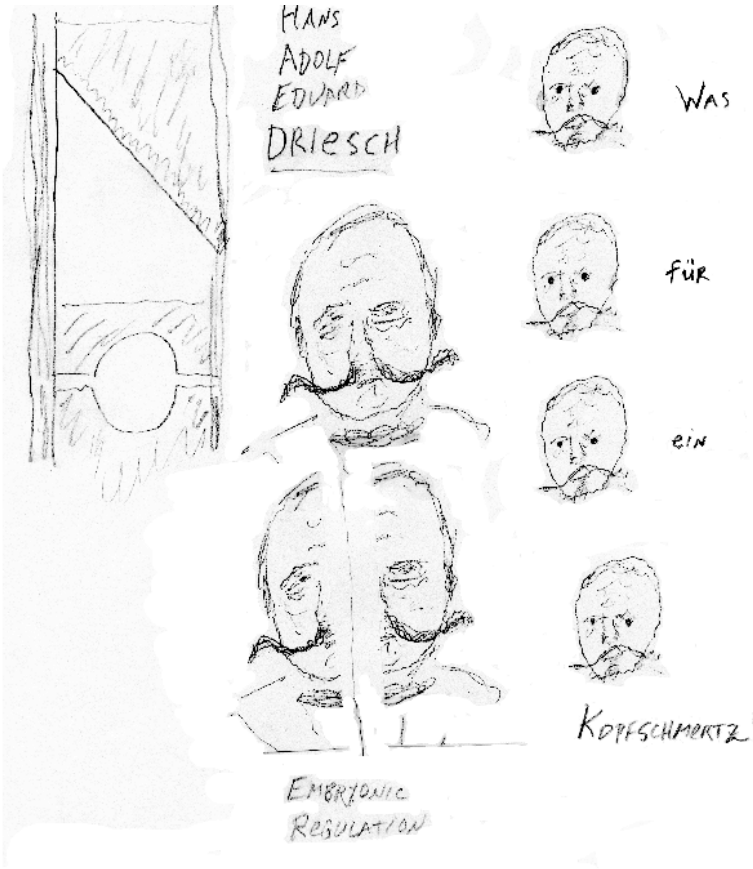
Capacity for "regulative" development: allows cells to acquire different functions.

Source: After Davidson 1991.





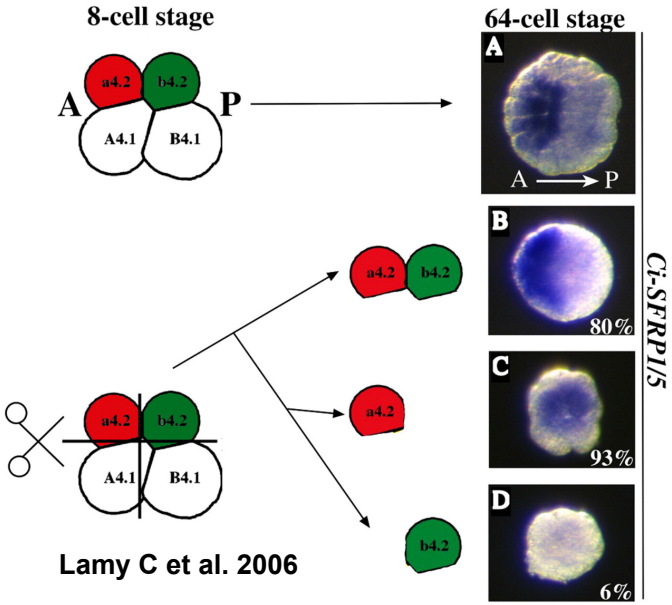
***DEVELOPMENTAL BIOLOGY, Eighth Edition,* Table 3.2** © 2006 Sinauer Associates, Inc.



Especificação dos linhagens celulares por determinantes

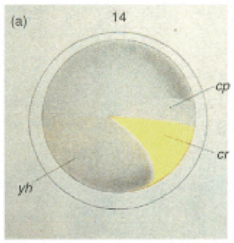
1. Especificação condicional

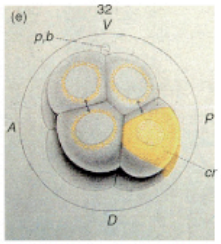
- Especificação regulativa (!!!!)

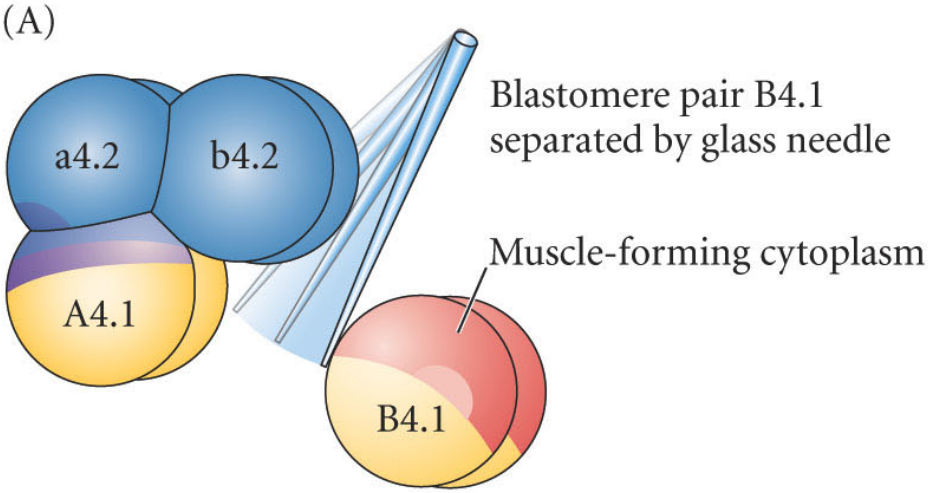


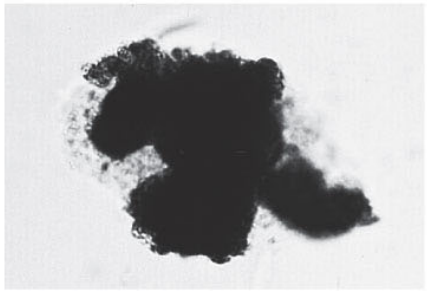
2. Especificação autónoma

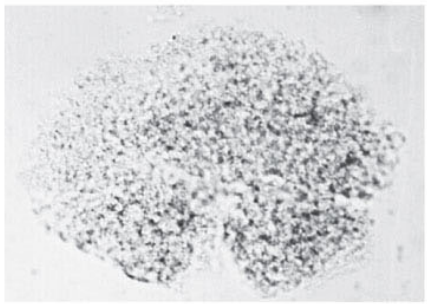
Desenvolvimento do músculo em tunicados (Cordata)



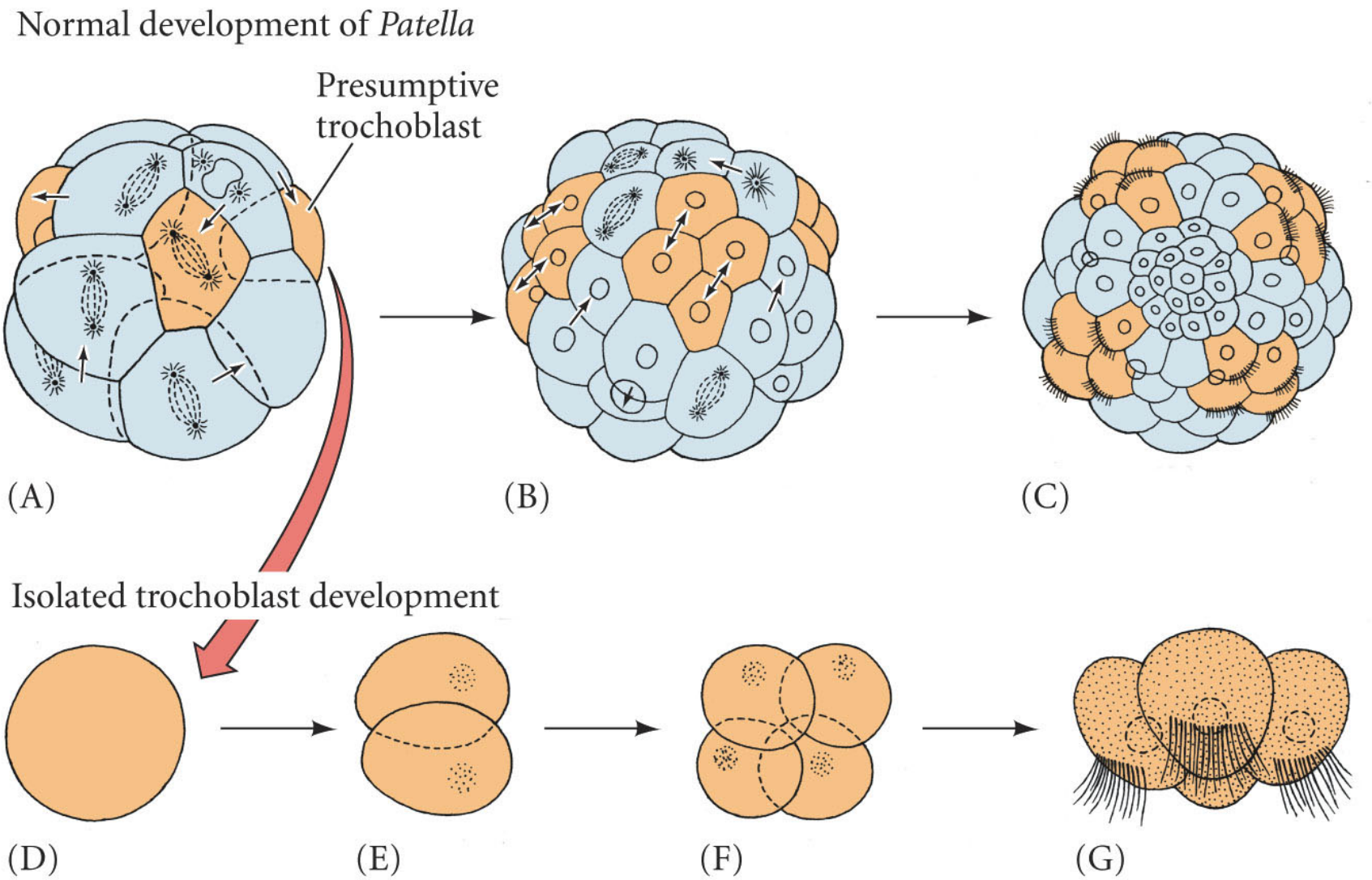








Especificação autónoma nos espiralados (lapas-gastrópodos-Mollusca)



Especificação autónoma

Divisiones asimétricas: Kemphues (1988) identifica PARs en nemátodos

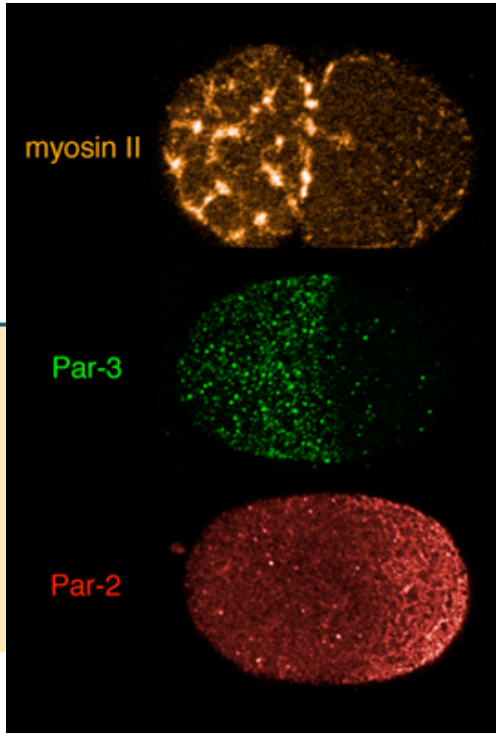


TABLE 3.2 **Modes of cell type specification and their characteristics**

I.	**Autonomous specification**
	Characteristic of most invertebrates.
	Specification by differential acquisition of certain cytoplasmic molecules present in the egg.
	Invariant cleavages produce the same lineages in each embryo of the species. Blastomere fates are generally invariant.
	Cell type specification precedes any large-scale embryonic cell migration.
	Produces "mosaic" development: cells cannot change fate if a blastomere is lost.

Styela

Polyandrocarpa

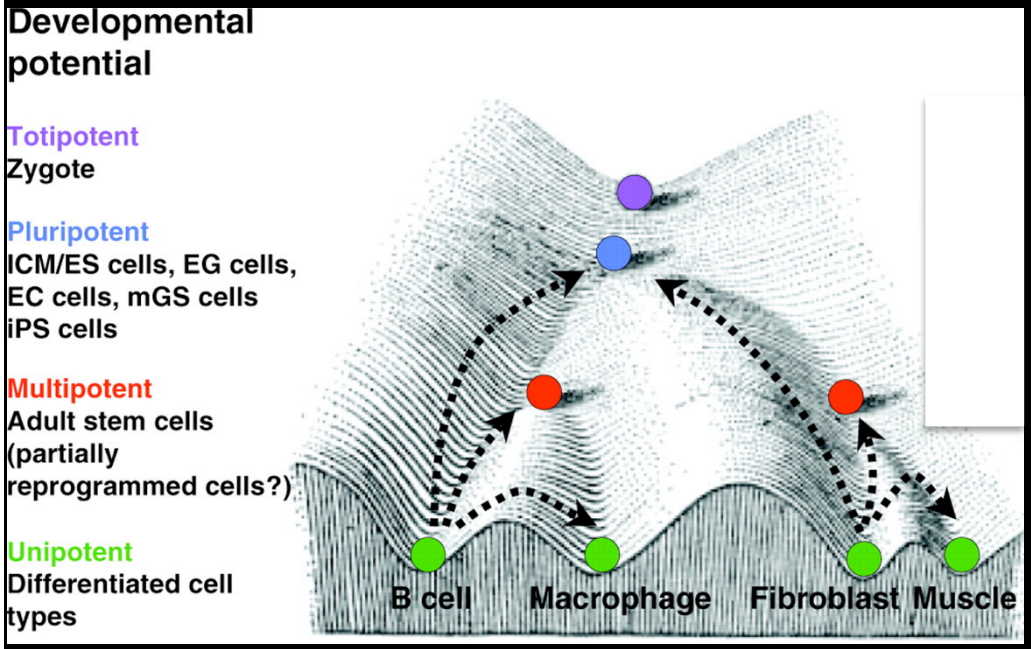
Symplegma

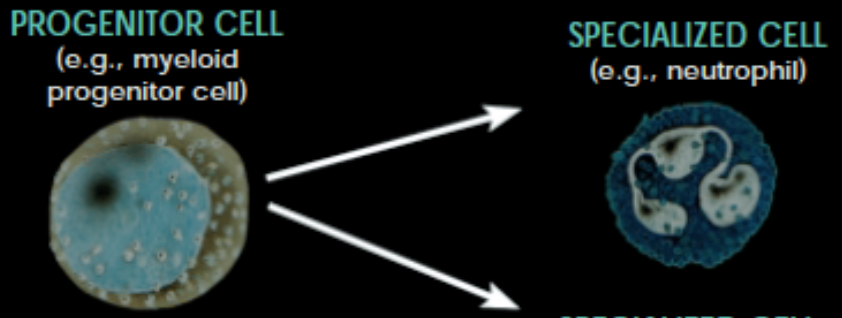
Botryllus or *Botrylloides*

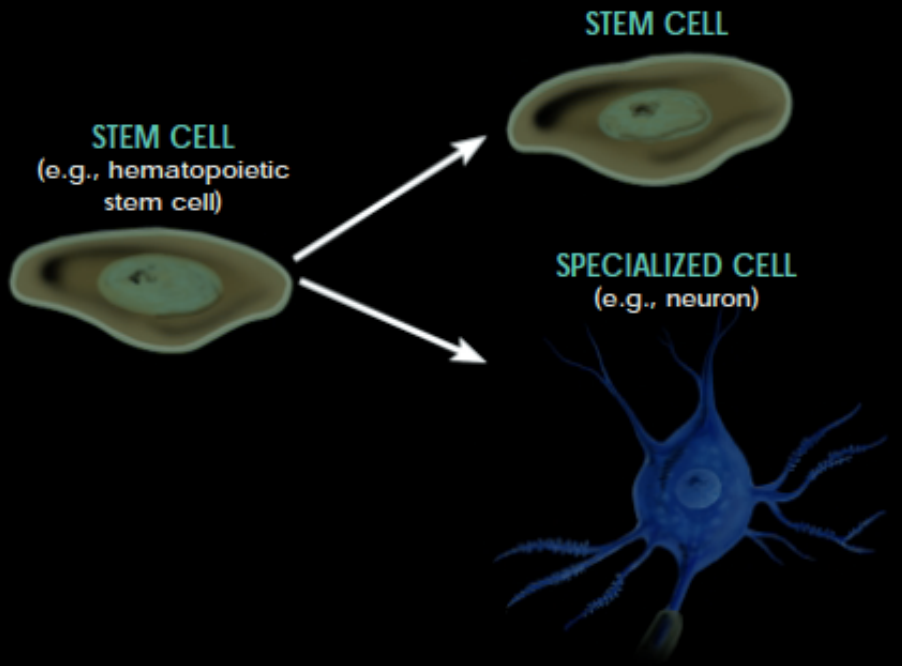
Como evoluiu a capacidade de brotação nas ascidias coloniais (Styelidae)?

S. Gutierrez

Células tronco vs células progenitoras:







Regulação das células tronco

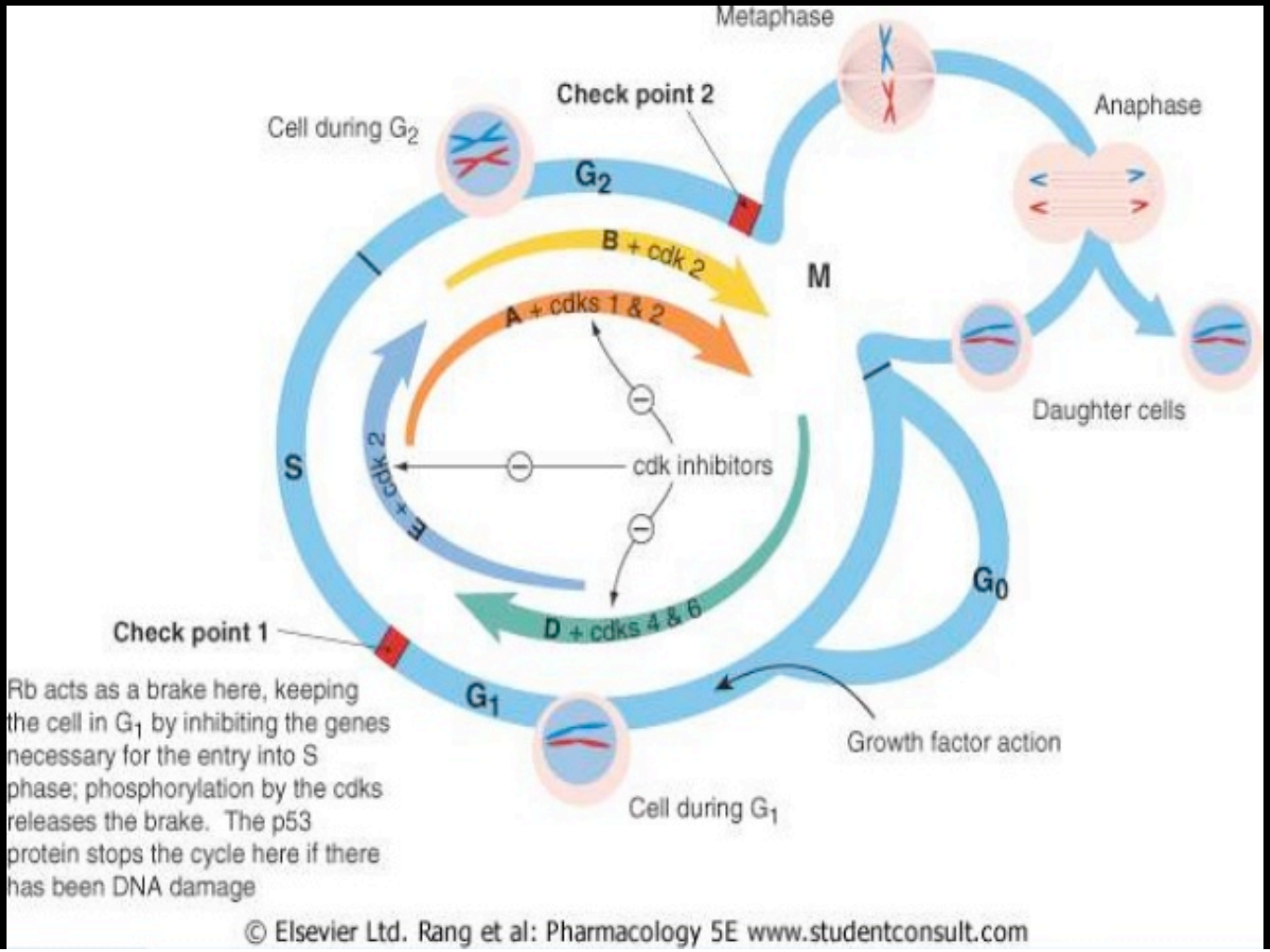
1. **REGULACÃO DO CICLO CELULAR:** Carecem de controle G1 e são hipersensíveis ao dano de DNA, induzindo a apoptose.

2. **DINÂMICA DA CROMATINA:** pode regular a taxa de autorenovação, tempos do desenvolvimento, e potenciais de diferenciação celular. Mudanças na cromatina refletem mudanças na funcão celular.

3. **SINALIZACÃO CELULAR:** a decisão final de diferenciar ou manter a indiferenciação depende de várias rotas de sinalização celular (ambiente, nicho).

CÉLULAS TRONCO

1. **REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR:** Carecem de controle G1 e são hipersensíveisa danos no DNA, induzindo a apoptose para liberar-se das células danificadas

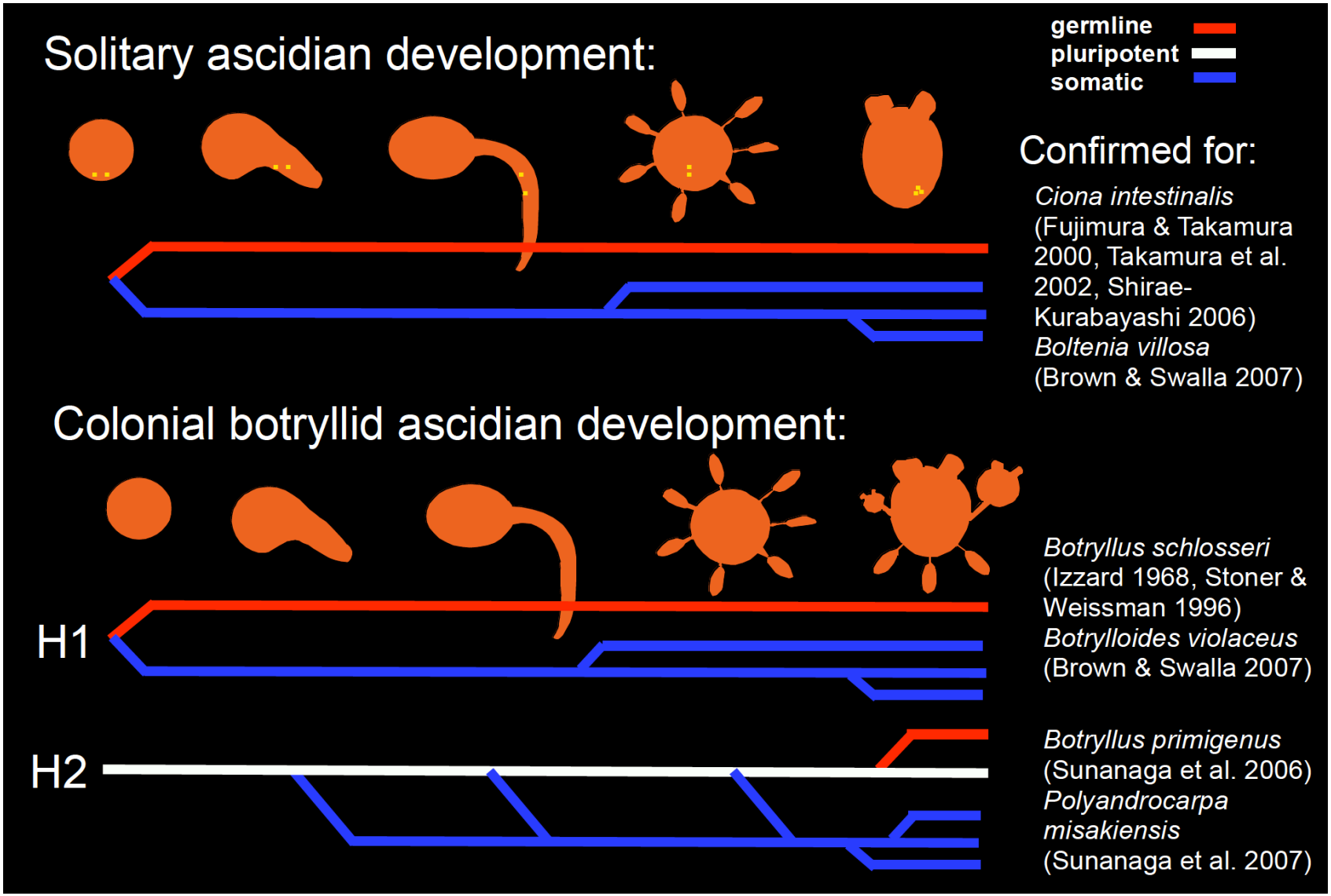


CÉLULAS TRONCO

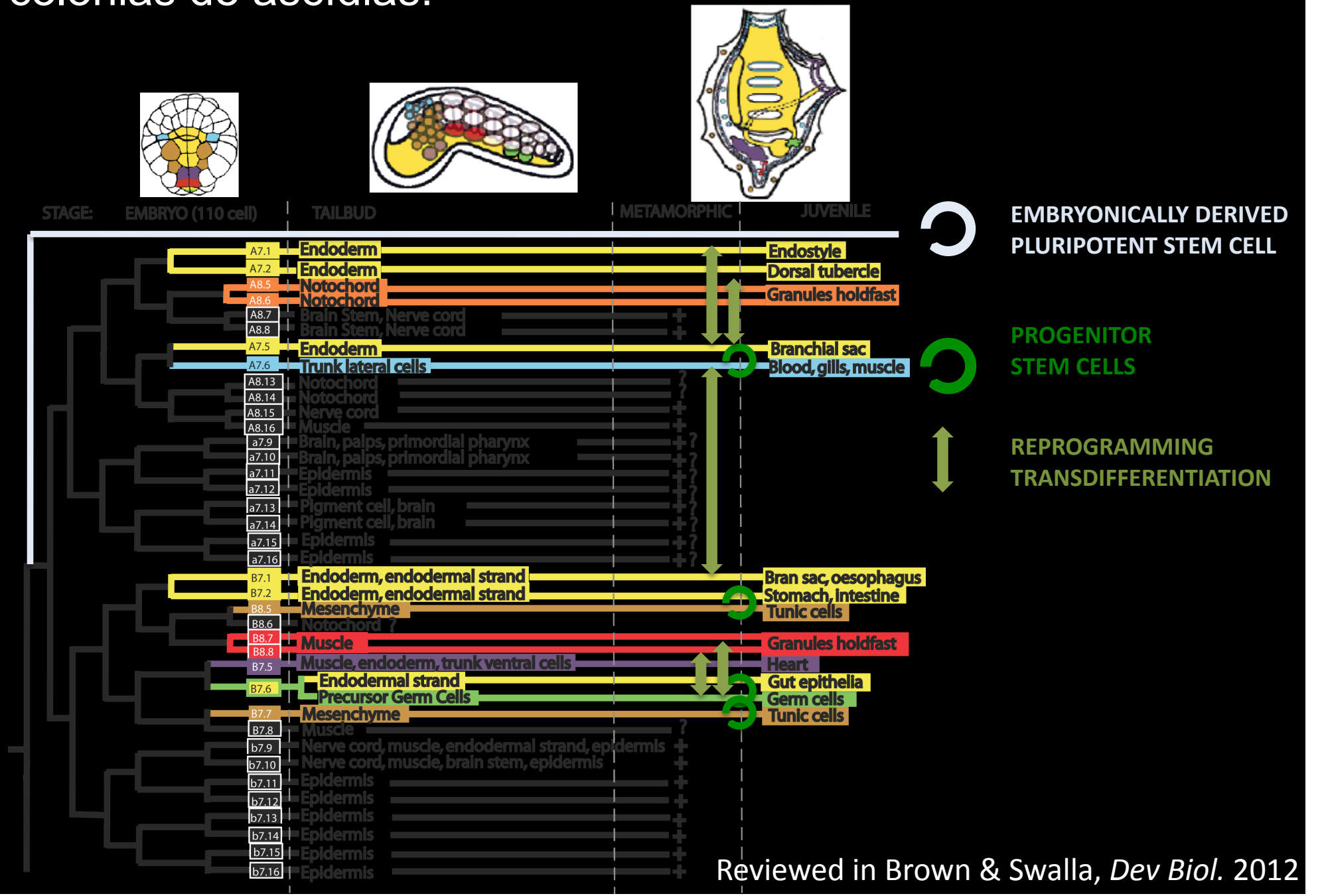
Definição:

Células indiferenciadas que tem a capacidade de **autorenovar-se** por divisão celular e podem diferenciar-se em **vários tipos de células**

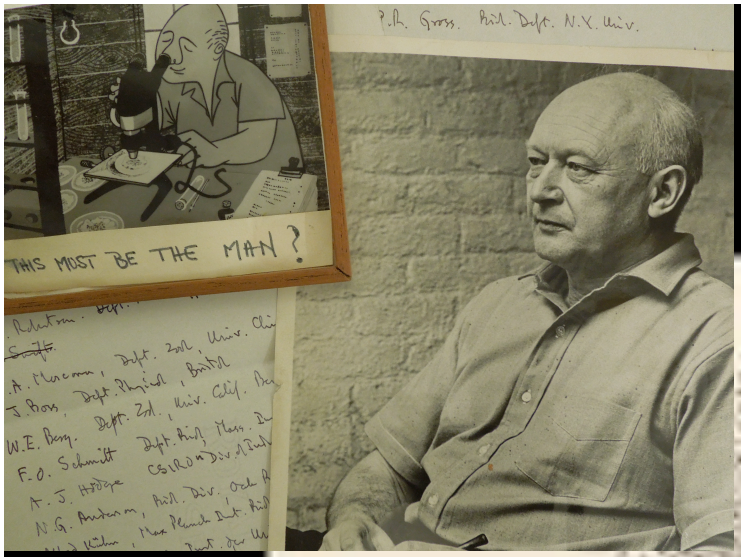
Linhagem germinativa em ascídias



Possivel plasticidade da linhagem celular progenitora em colônias de ascídias:



Reviewed in Brown & Swalla, *Dev Biol.* 2012



Regulação gênica

TOTIPOTENTES
(zigoto)

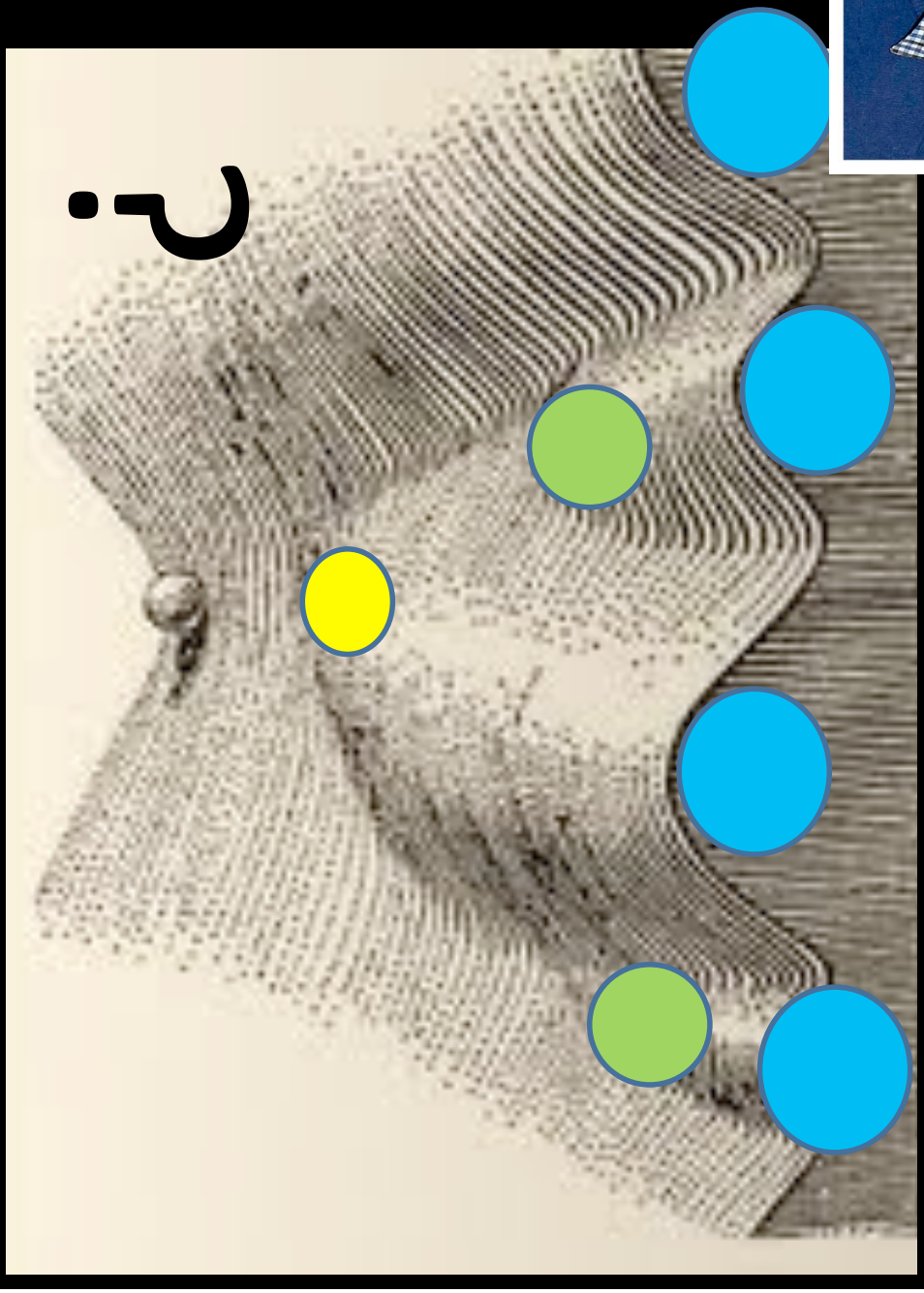
PLURIPOTENTES
(ICM,ESC, EGC)

MULTIPOTENTES

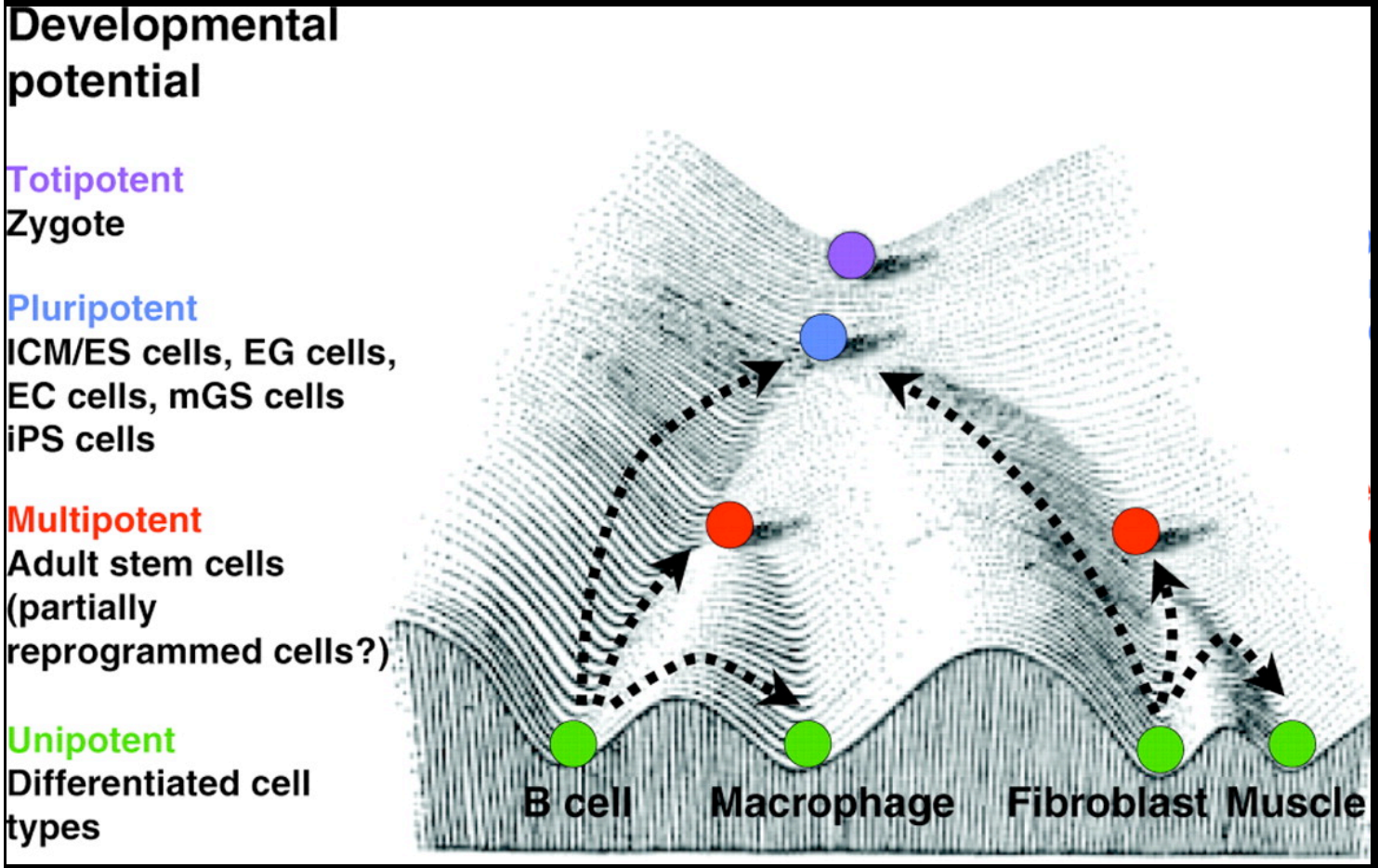
UNIPOTENTES

Paissagem epigenética de Waddington (Waddington's Epigenetic Landscape - Creode)

Reprogramação/dediferenciação



Restrição do destino celular e potencial pata diferenciar em diferentes linhagens



Regulação gênica

Hochedlinger & Path, *Development* 2009

Restrição do destino celular e modificações epigenéticas

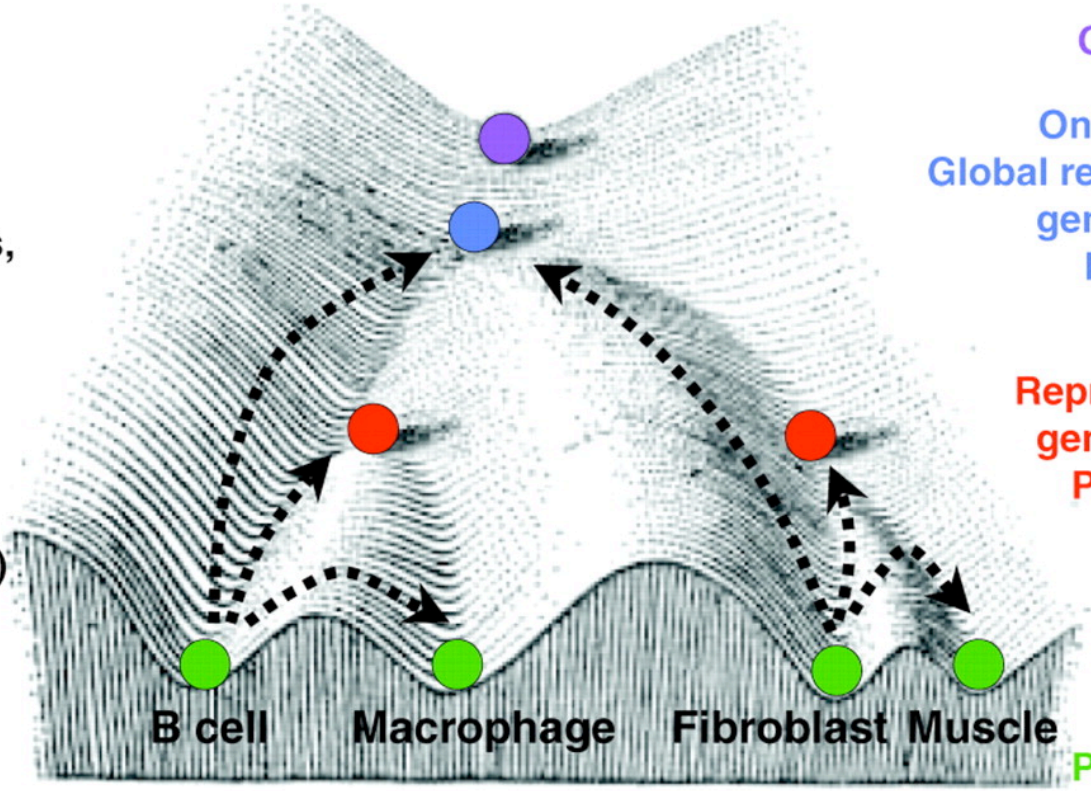
Developmental potential

Totipotent
Zygote

Pluripotent
ICM/ES cells, EG cells, EC cells, mGS cells iPS cells

Multipotent
Adult stem cells (partially reprogrammed cells?)

Unipotent
Differentiated cell types



Epigenetic status

Global DNA demethylation

Only active X chromosomes;
Global repression of differentiation genes by Polycomb proteins;
Promoter hypomethylation

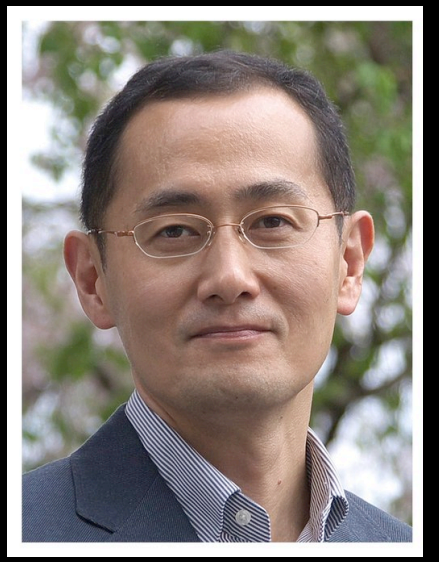
X inactivation;
Repression of lineage-specific genes by Polycomb proteins;
Promoter hypermethylation

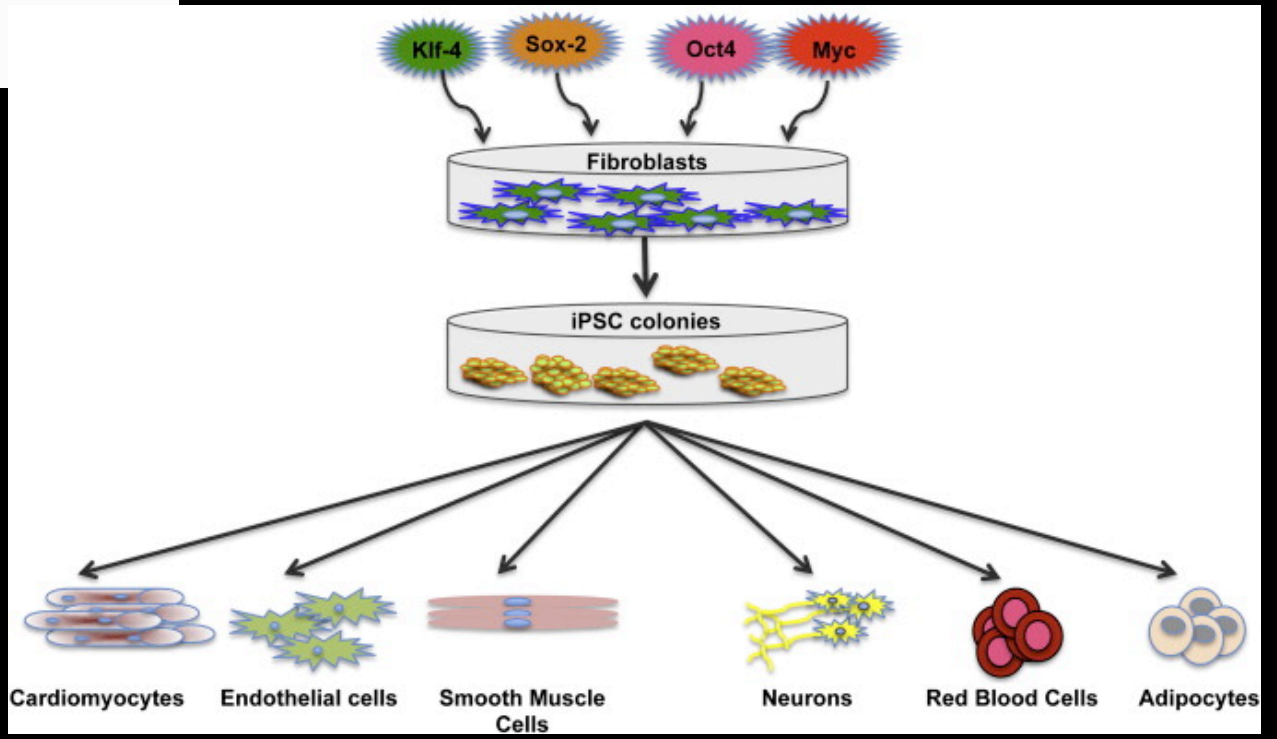
X inactivation;
Derepression of Polycomb silenced lineage genes;
Promoter hypermethylation

Hochedlinger & Path, *Development* 2009

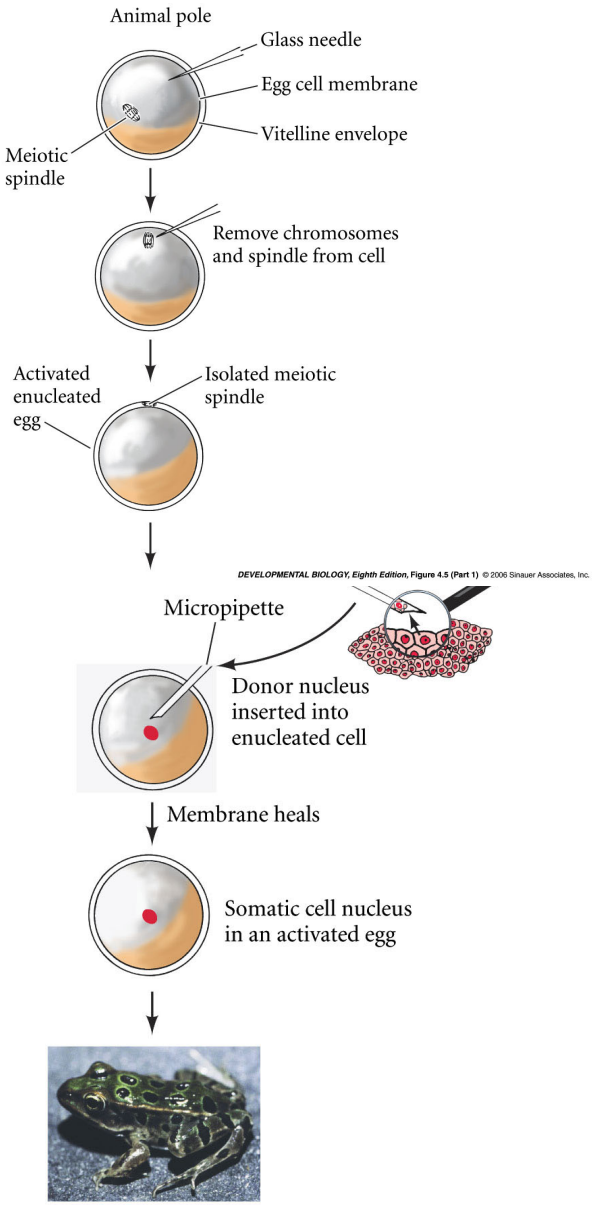
iPSCs


hKlf4
hc-Myc
hSox2
hOct3/4




Klf-4
Sox-2
Oct4
Myc
Fibroblasts
iPSC colonies
Cardiomyocytes
Endothelial cells
Smooth Muscle Cells
Neurons
Red Blood Cells
Adipocytes

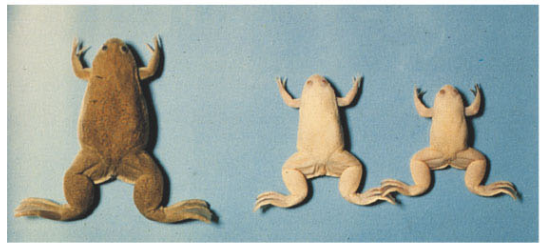
Reprogramação nuclear e clonagem



DEVELOPMENTAL BIOLOGY, Eighth Edition, Figure 4.5 (Part 1) © 2006 Sinauer Associates, Inc.

DEVELOPMENTAL BIOLOGY, Eighth Edition, Figure 4.5 (Part 2) © 2006 Sinauer Associates, Inc.

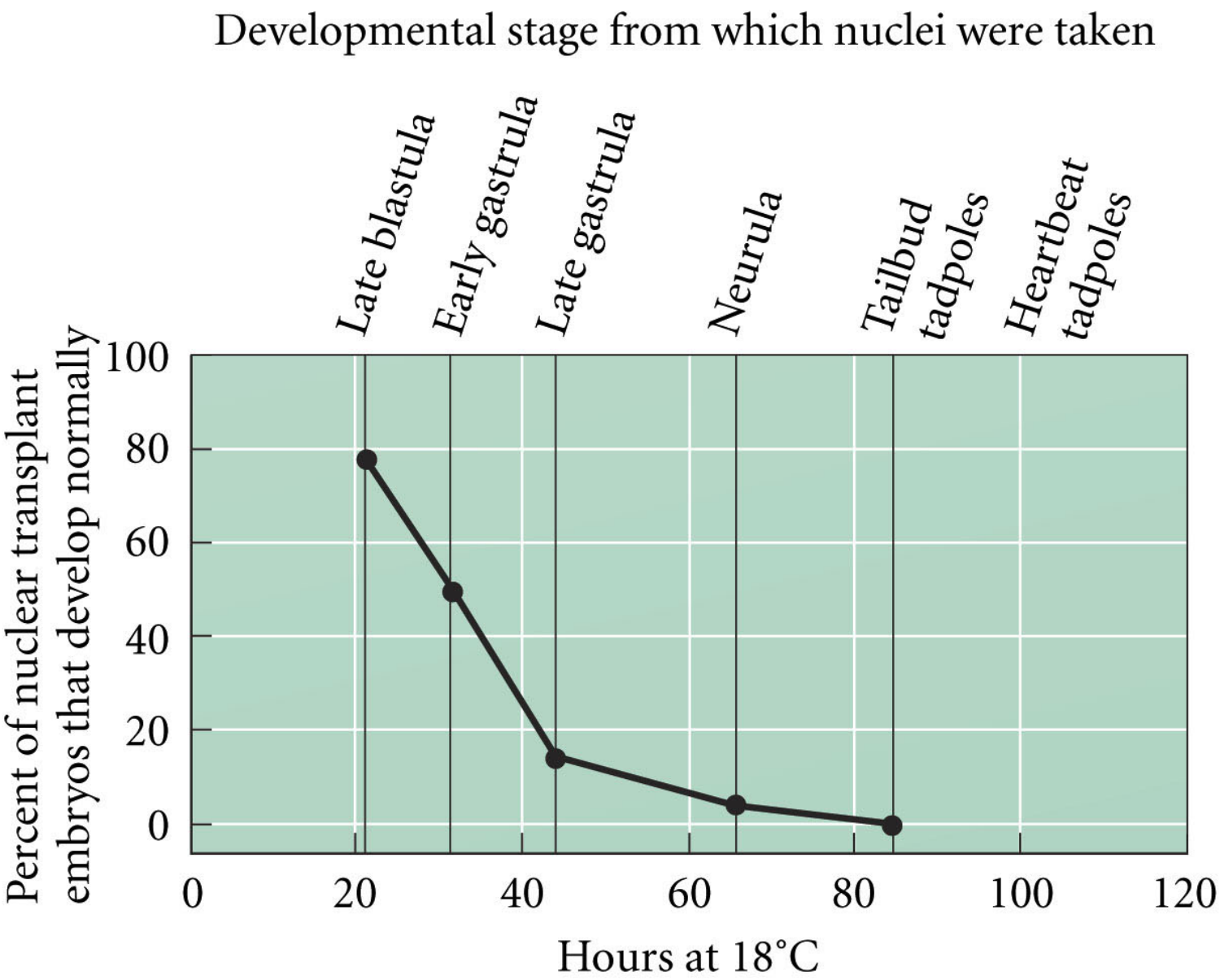
- Robert Briggs e Tomas King transplantam núcleos de **blastocistos** a ovos anucleados em *Rana pipiens* (1952)
- John Gurdon transplanta núcleo do epitelio intestinal de **girinos** a ovos de *Xenopus laevis* (1962)



Wild-type donor of enucleated eggs

Albino parents of nucleus donor

Porcentagem de sucesso de transplante nuclear como uma função da idade do desenvolvimento do núcleo doador

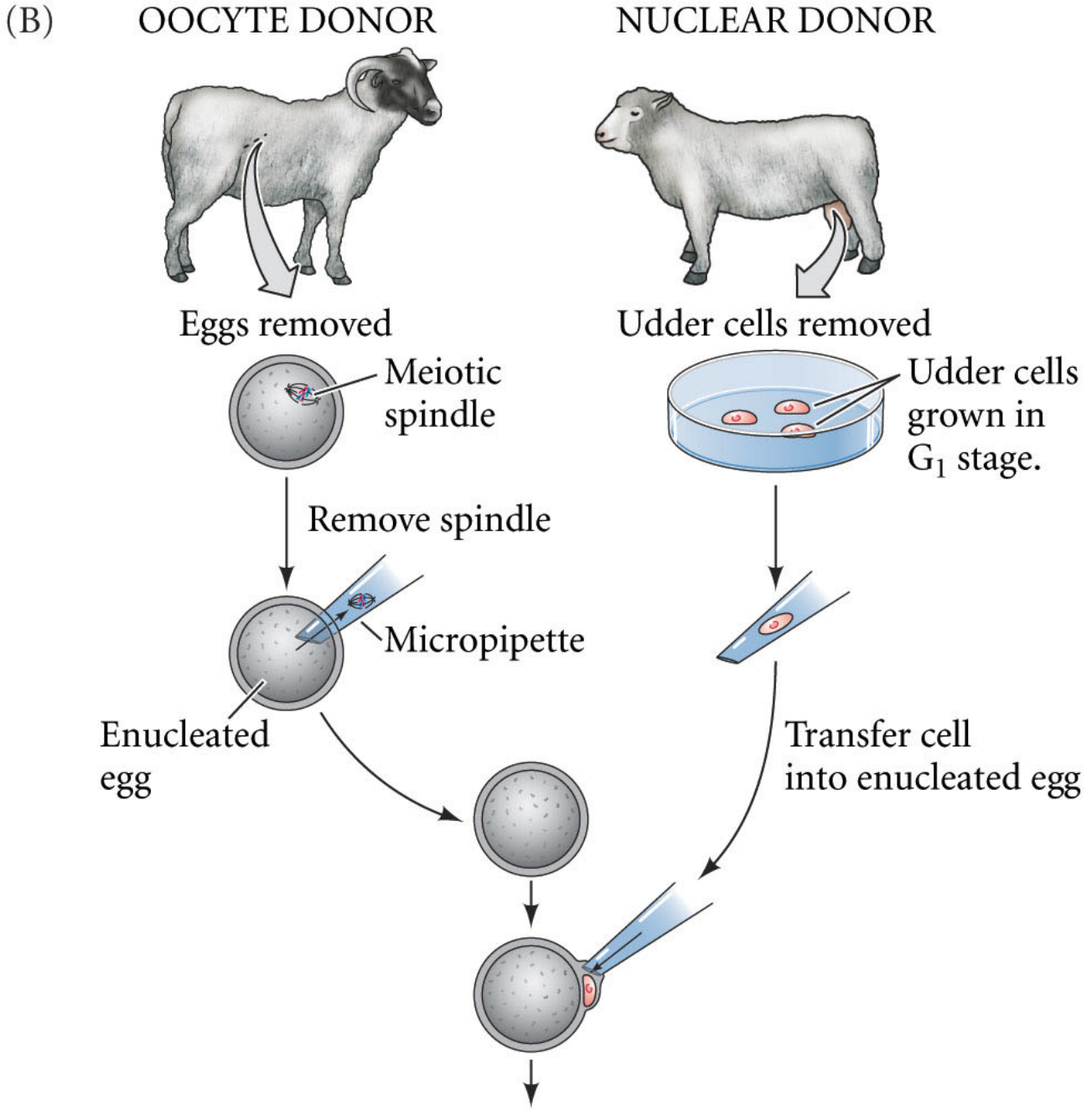


Mamíferos clonados, dos quais os núcleos vieram de células somáticas adultas(Parte 1)

- Ian Wilmut clona Dolly a partir de células de **adulto** (c. mamarias) (1997)

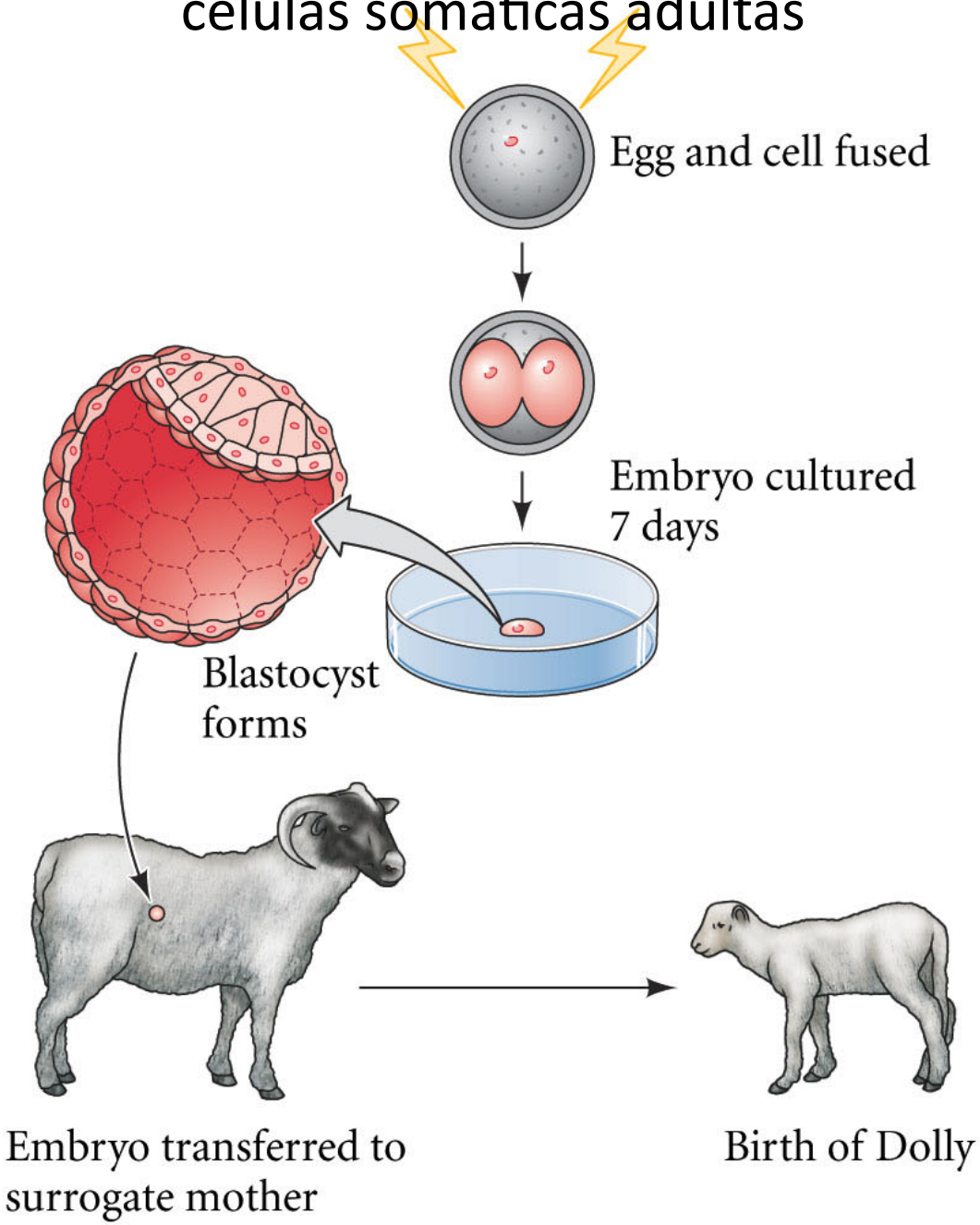
(A)

Dolly: Mamíferos clonados, dos quais os núcleos vieram de células somáticas adultas



DEVELOPMENTAL BIOLOGY, Eighth Edition, Figure 4.8 (Part 2) © 2006 Sinauer Associates, Inc.

Dolly: Mamíferos clonados, dos quais os núcleos vieram de células somáticas adultas

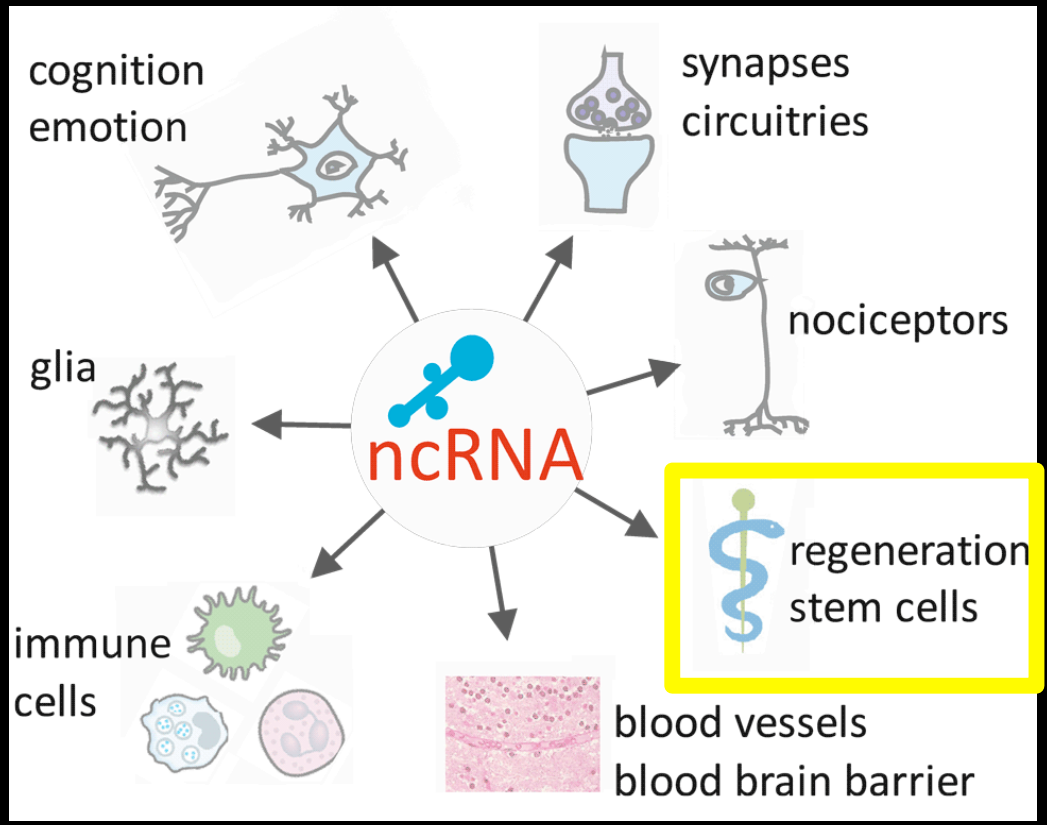


Clonagem em outros mamíferos: O gatinho “CC” (A) é um clone produzido usando transferência nuclear somática do “Rainbow” (B)

(A)

(B)

ncRNAs e regulação de células tronco



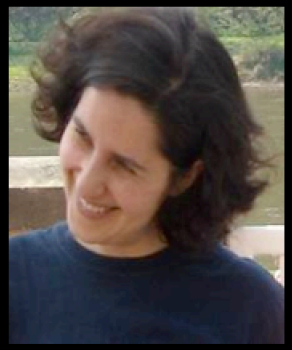
Colaboracão com Clara Bermudez
RNAomica Computacional UNAL (Colombia)

Genômica comparativa de Tunicados

Table I. Tunicate genomes currently in study for ncRNAs (in collaboration with C. Bermudez U. Nacional de Colombia, Bogotá)

Species	Size (Mb)	Life history	Reference
Oikopleura dioica	70.47	Solitary	(Seo et al., 2001)
Molgula occidentalis	262.55	Solitary	(B. Swalla, T. Brown, E. Lowe, C. Lionel in progress)
Molgula occulta	189.11	Solitary	(B. Swalla, T. Brown, E. Lowe, C. Lionel in progress)
Molgula oculata	159.89	Solitary	(B. Swalla, T. Brown, E. Lowe, C. Lionel in progress)
Botryllus schlosseri	580.39	Colonial	(Voskoboynik et al., 2013)
Didemnum vexillum	542.32	Colonial	(A. Gittenberger in progress)
Ciona savignyi	177.01	Solitary	(Small, Brudno, Hill, & Sidow, 2007)
Ciona intestinalis	115.23	Solitary	(Dehal et al., 2002)

C. Velandia
U. Nacional
de Colombia

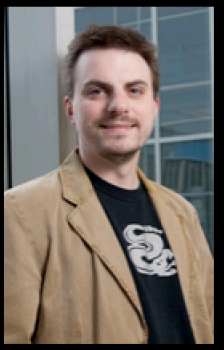


C. Bermudez
U. Nacional
de Colombia

A.
Gittenberger
GIMARIS

B. Swalla
U. Washington

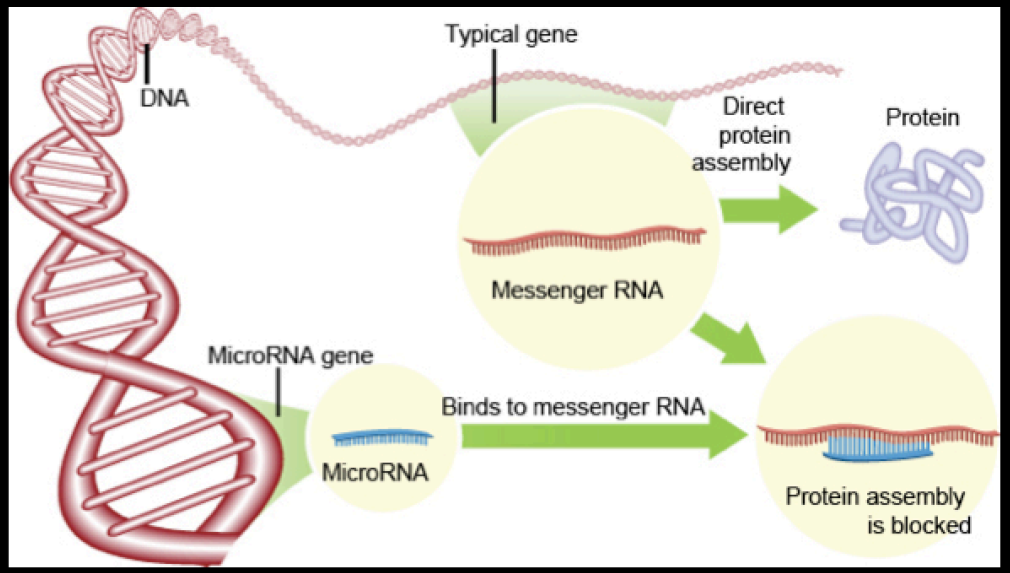
L. Christien
NYU



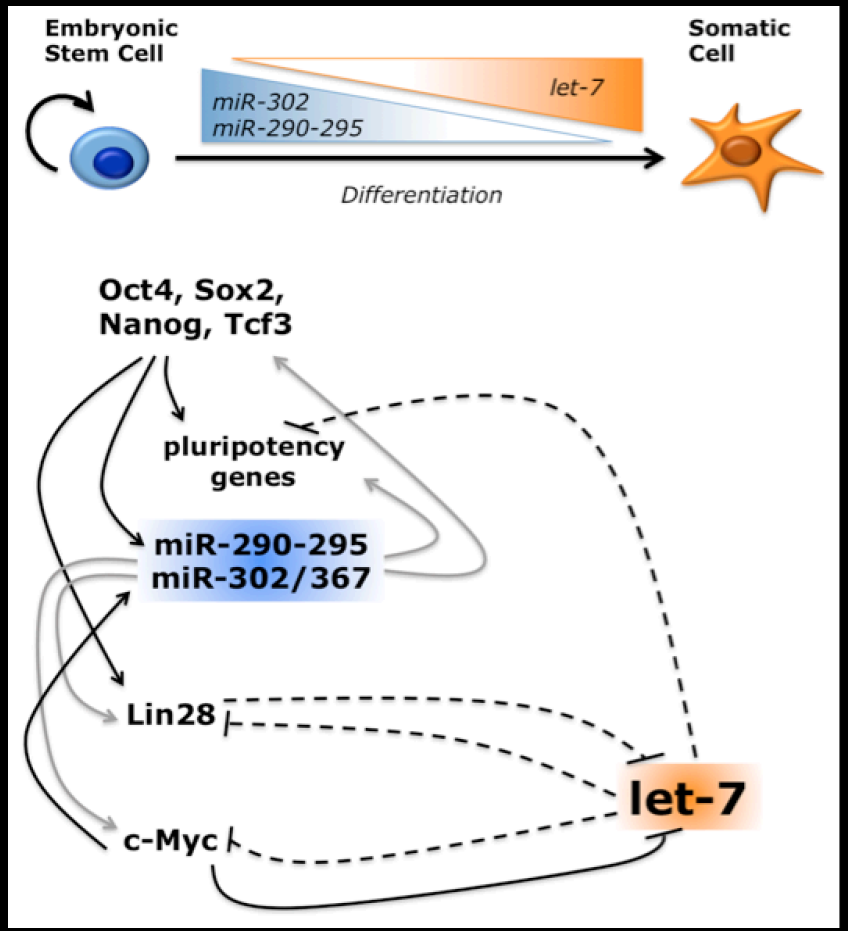
T. Brown
Mich. State U.

A. Stolfi
NYU

miRNA regulação gênica de células tronco

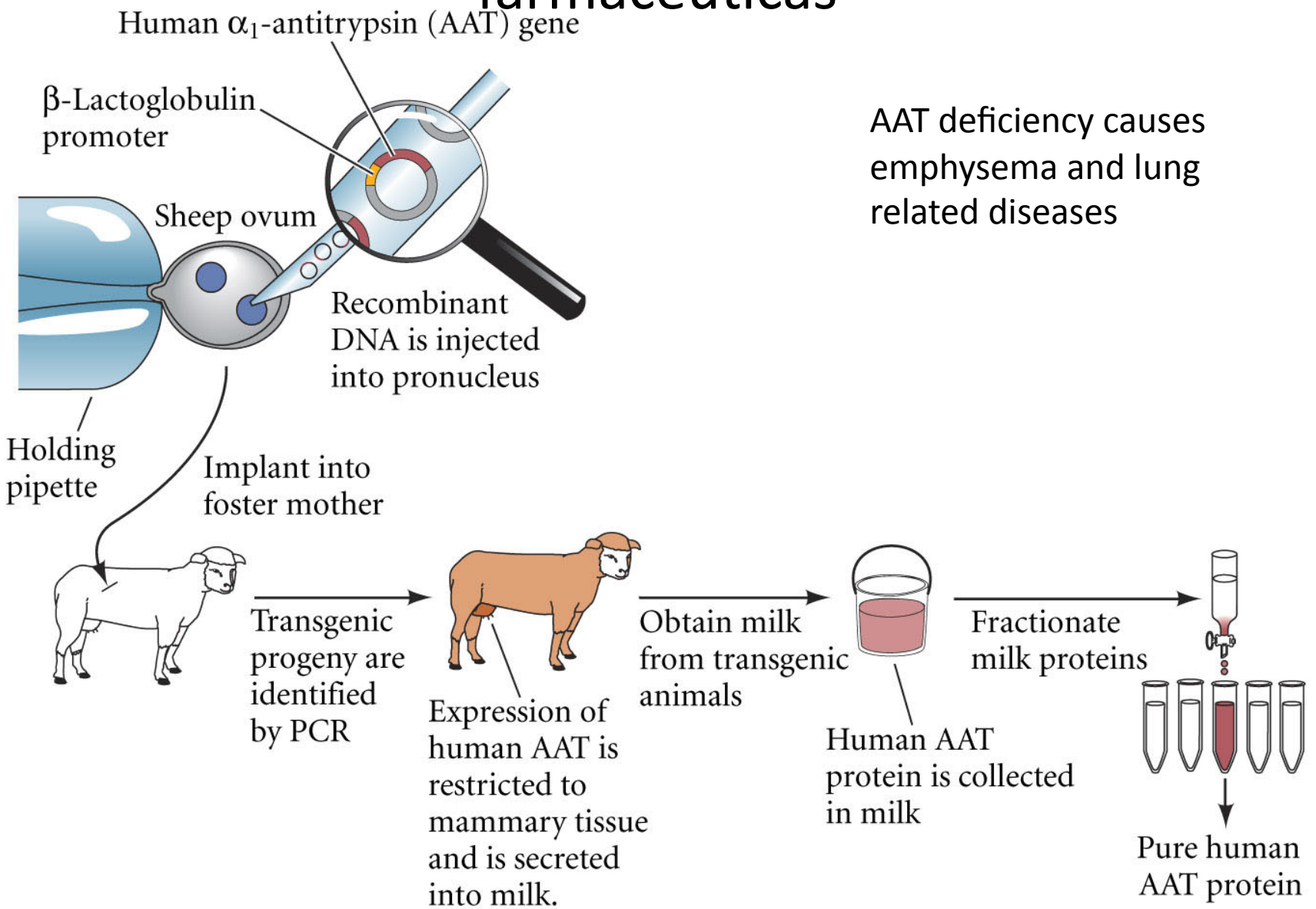


Discover Magazine Taubes, 2009



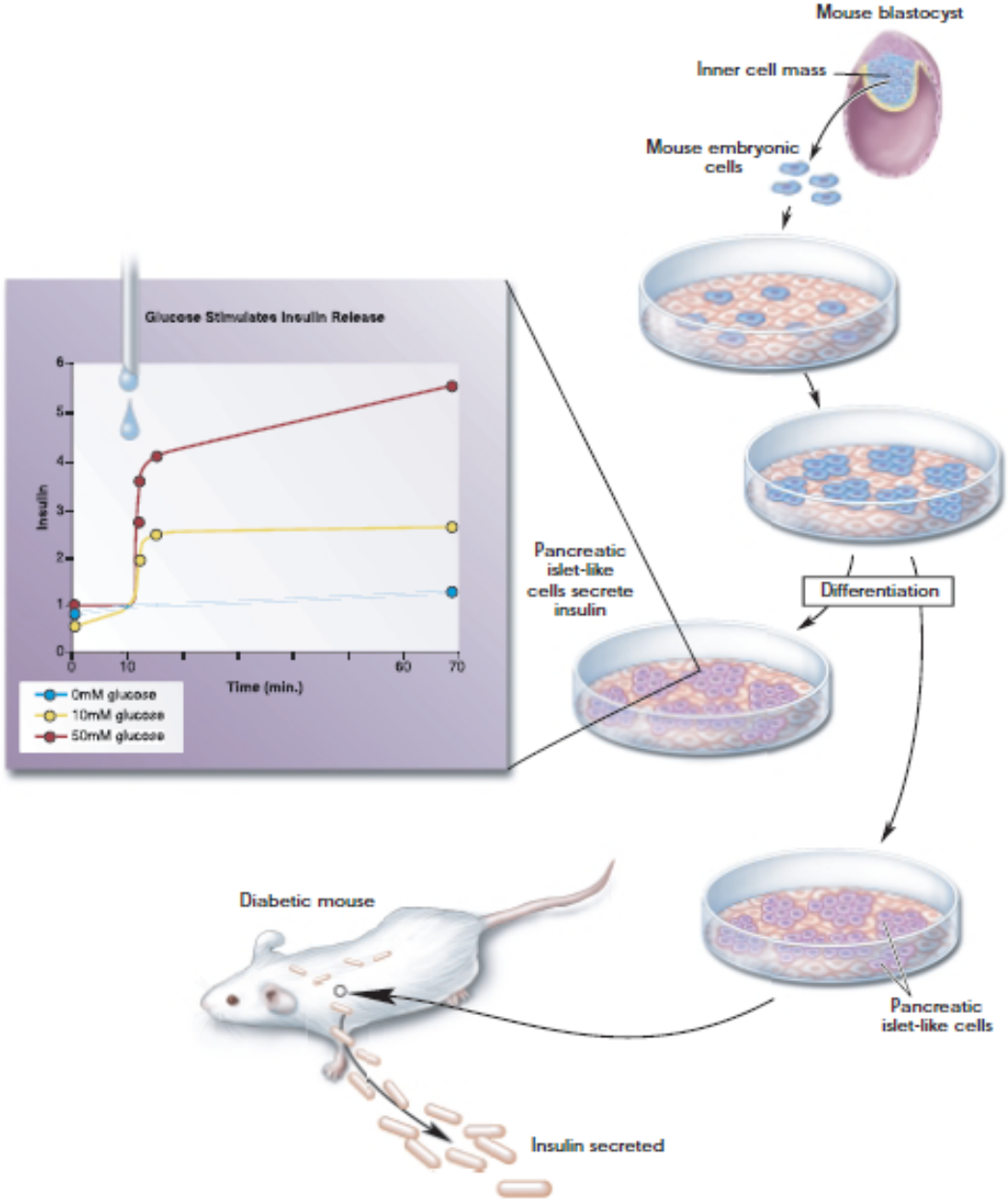
Rosa & Brivanlou, 2013

Aplicações de células tronco: Clonagem de mamíferos transgênicos para produzir proteínas farmaceuticas

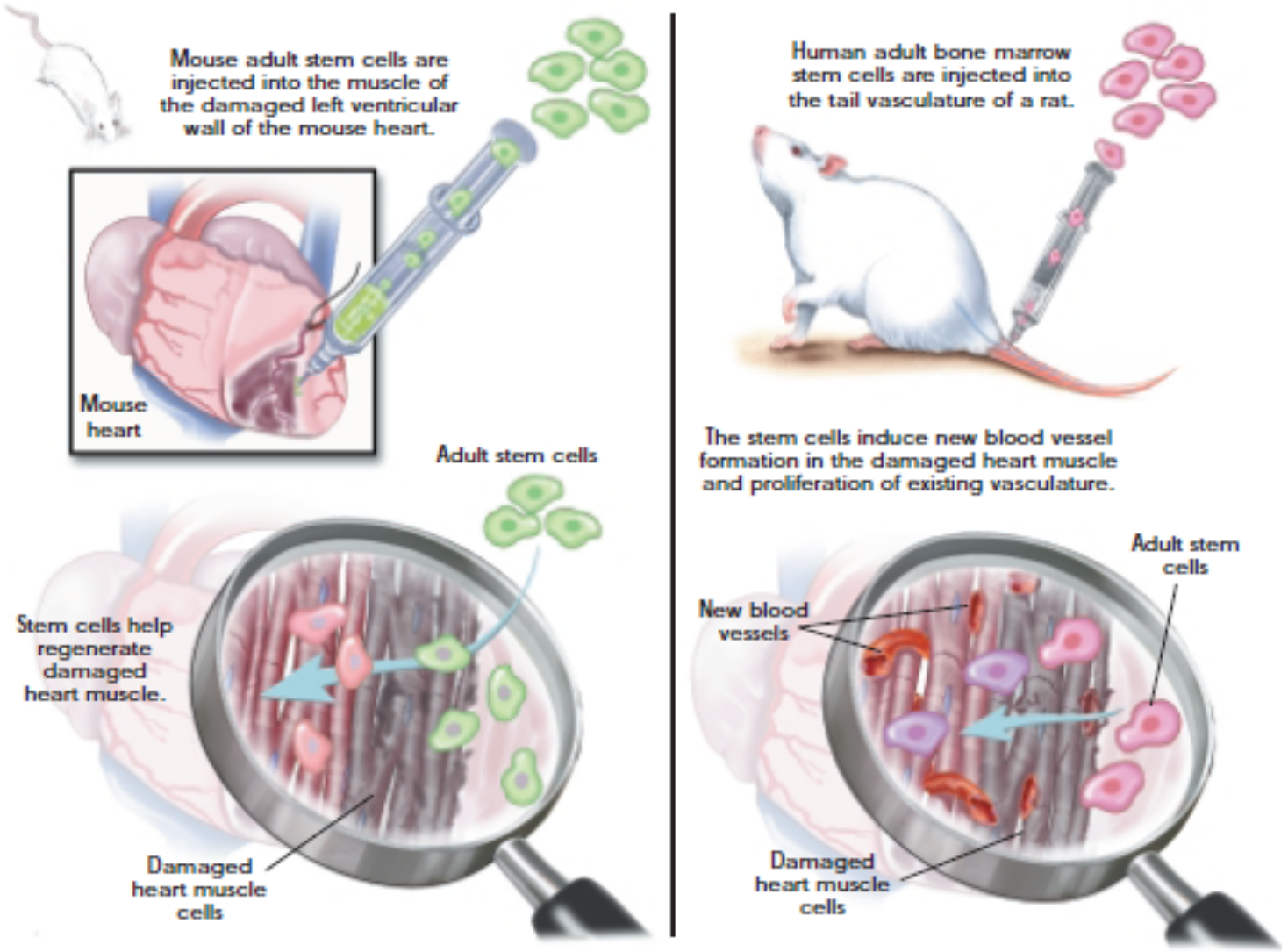


AAT deficiency causes emphysema and lung related diseases

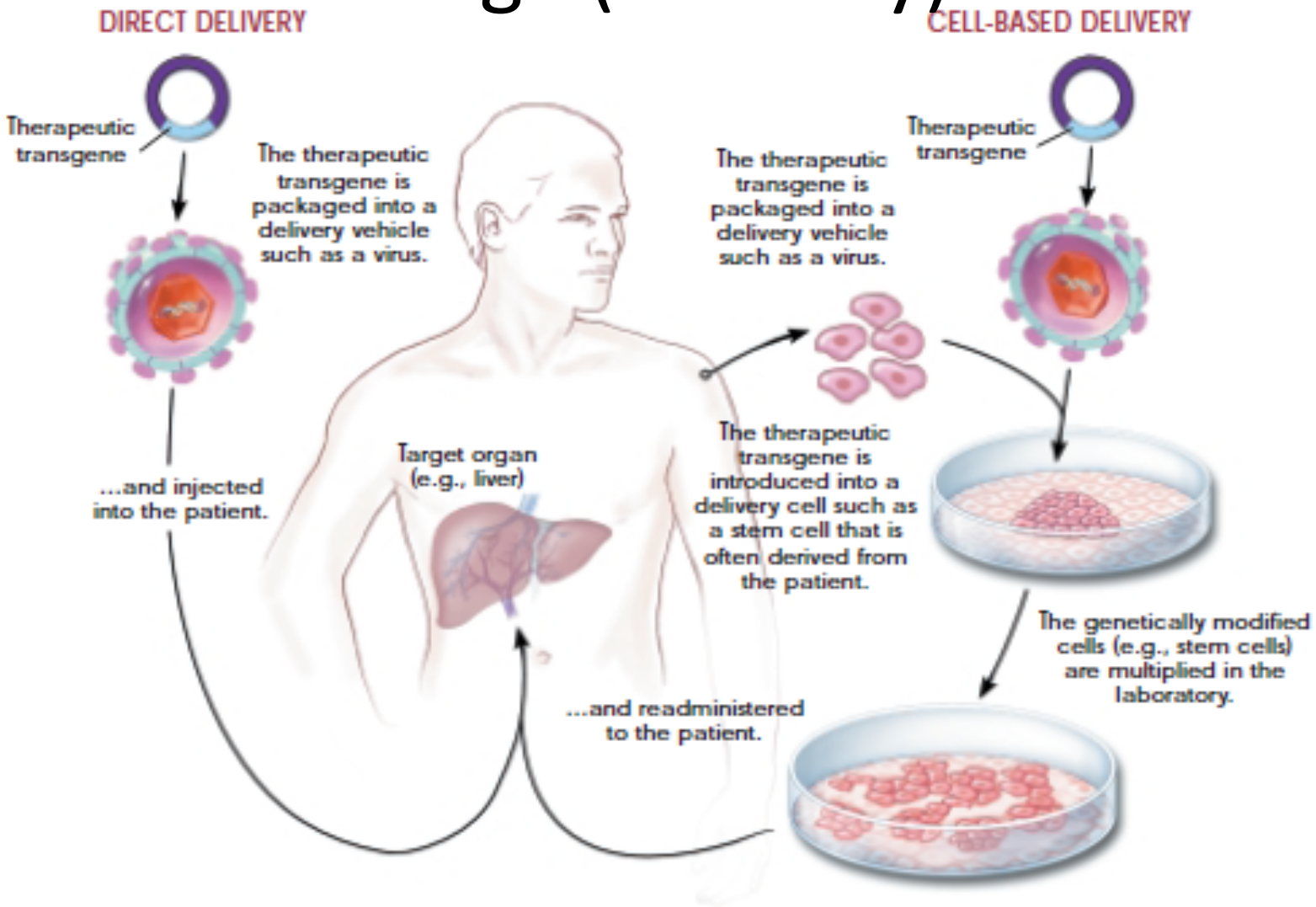
Aplicações de células tronco: diabetes



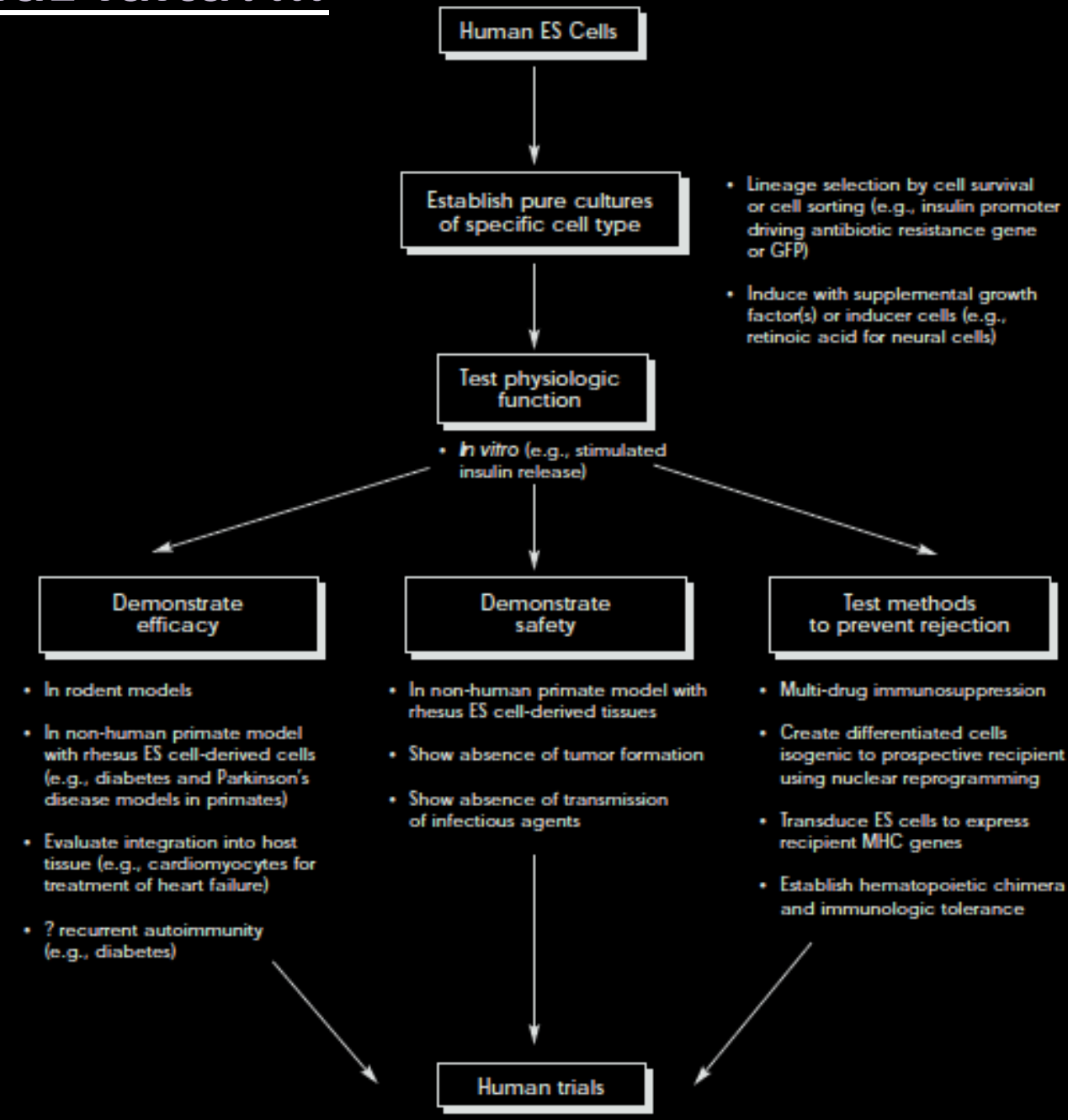
Aplicações de células tronco: transplante de tecidos



Aplicações de células tronco: entrega (Delivery)

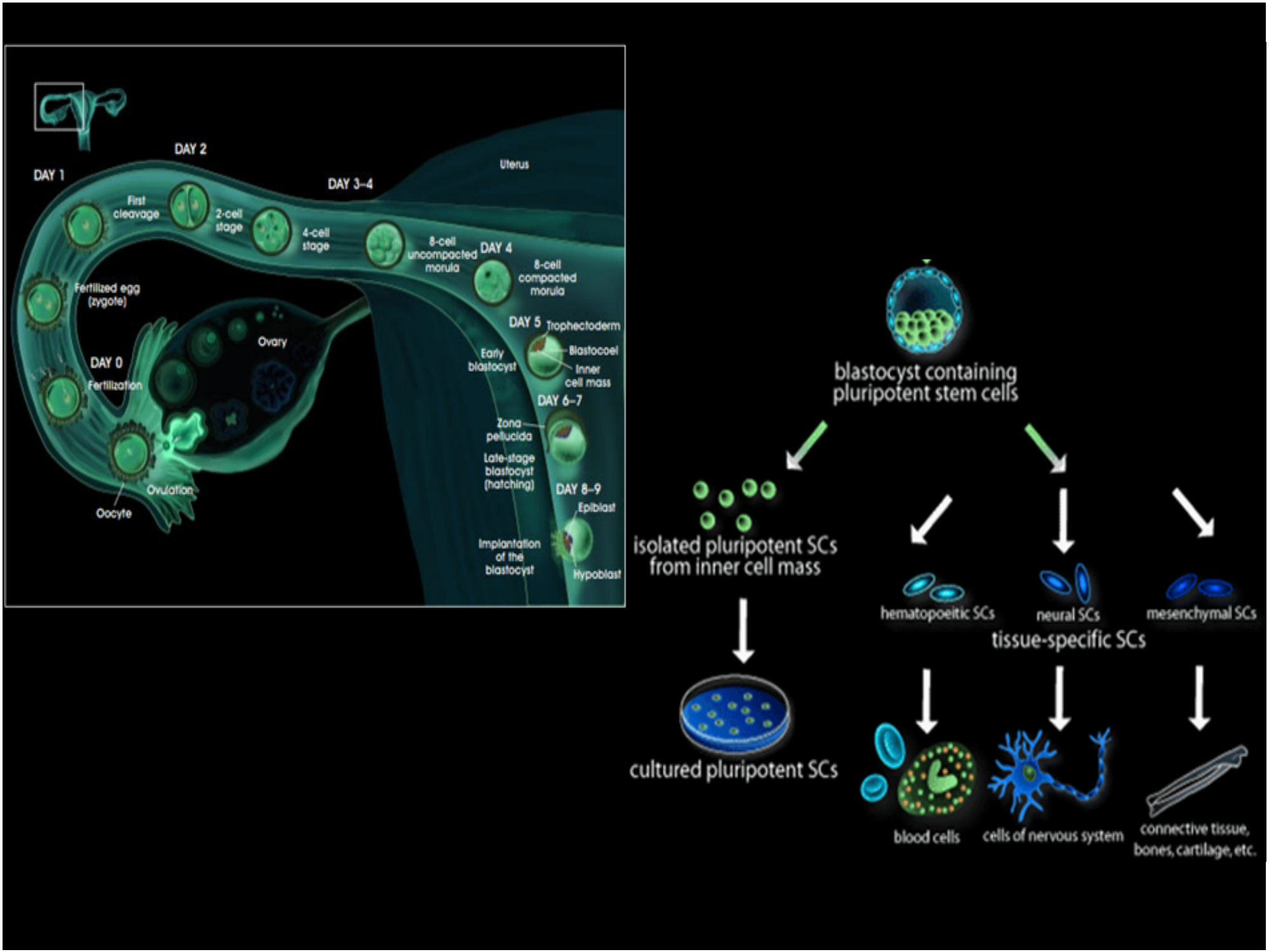


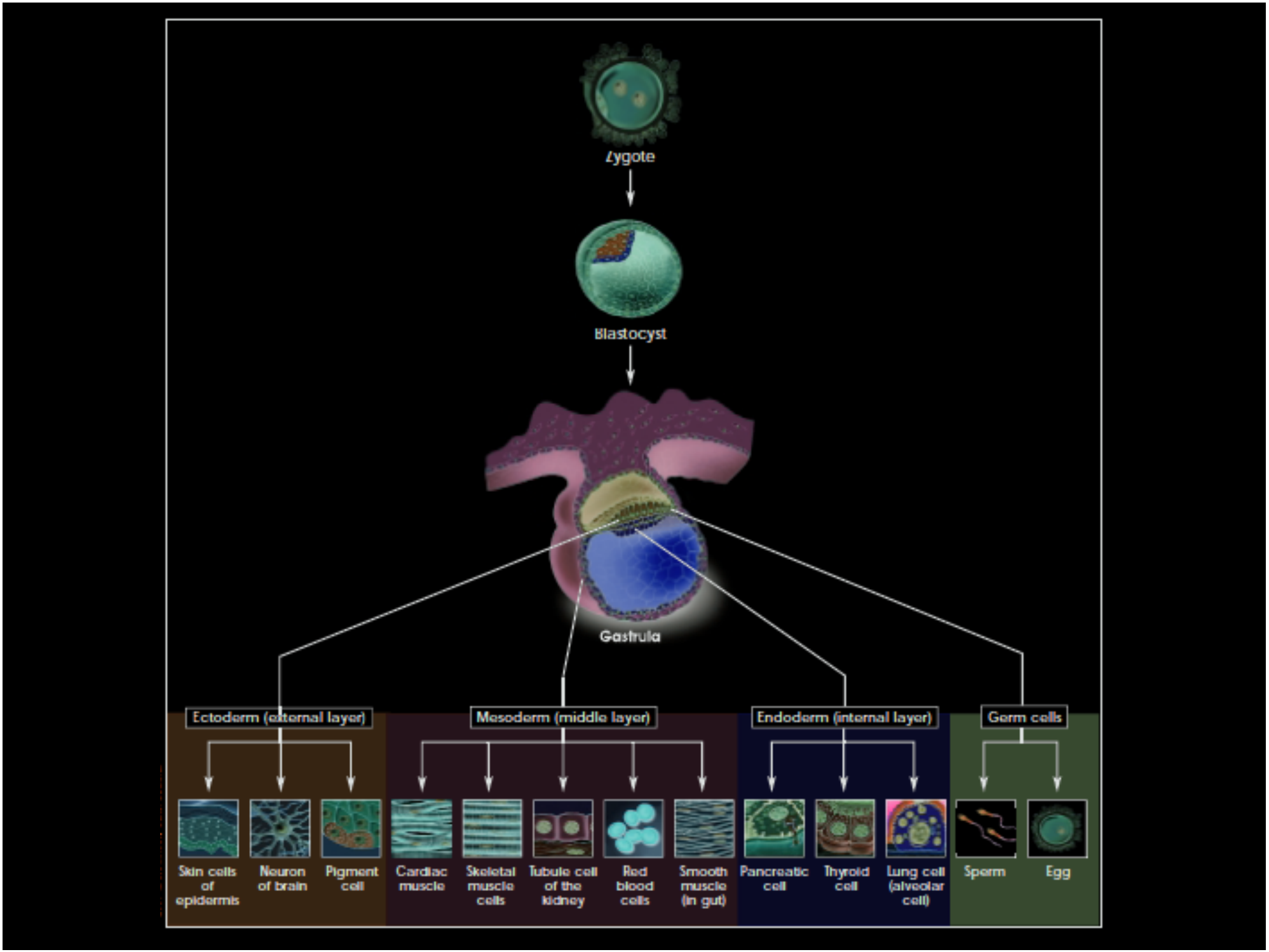
O que faz falta?...



TIPOS DE CÉLULAS TRONCO

1. **Células tronco embrionarias (ESC)—**Células primitivas indiferenciadas derivadas de la masa celular interna del blastocisto (un embrión? de 5-6 días).
    - Son capaces de renovarse indefinidamente por un largo periodo de tiempo sin diferenciarse
    - Capacidad de diferenciarse en células y tejidos de las tres líneas germinales del embrión (ectodermo, mesodermo y endodermo)


DAY 1
DAY 2
DAY 3–4
Uterus
First cleavage
2-cell stage
4-cell stage
8-cell uncompacted morula
DAY 4
8-cell compacted morula
Fertilized egg (zygote)
DAY 5
Trophectoderm
Blastocoel
Early blastocyst
Inner cell mass
Ovary
DAY 0
Fertilization
DAY 6–7
Zona pellucida
Late-stage blastocyst (hatching)
DAY 8–9
Epiblast
Ovulation
Oocyte
Implantation of the blastocyst
Hypoblast
blastocyst containing pluripotent stem cells
isolated pluripotent SCs from inner cell mass
cultured pluripotent SCs
hematopoeitic SCs
neural SCs
mesenchymal SCs
tissue-specific SCs
blood cells
cells of nervous system
connective tissue, bones, cartilage, etc.

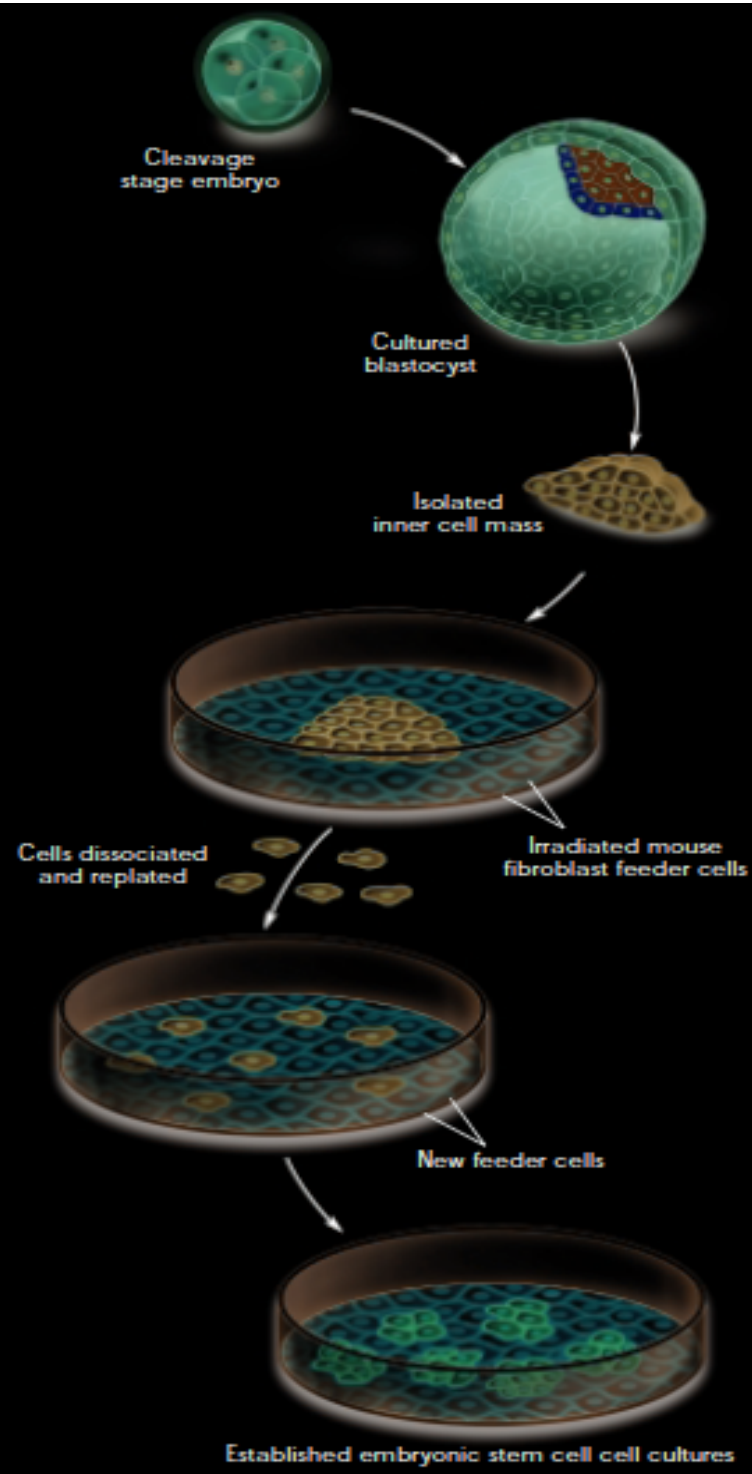

Zygote
Blastocyst
Gastrula
Ectoderm (external layer)
Mesoderm (middle layer)
Endoderm (internal layer)
Germ cells
Skin cells of epidermis
Neuron of brain
Pigment cell
Cardiac muscle
Skeletal muscle cells
Tubule cell of the kidney
Red blood cells
Smooth muscle (in gut)
Pancreatic cell
Thyroid cell
Lung cell (alveolar cell)
Sperm
Egg

Células madre embrionarias humanas (hESC)

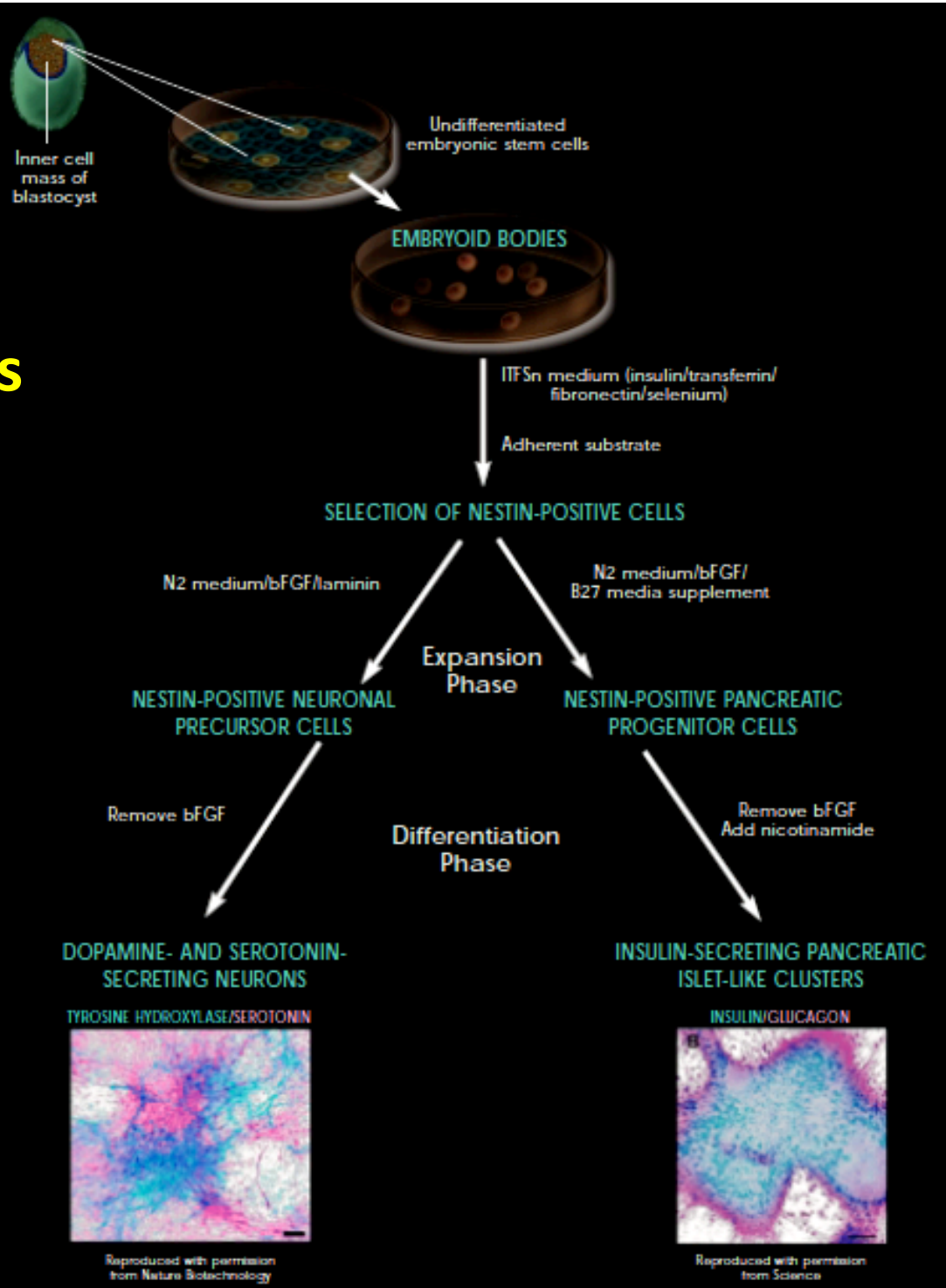
Hasta 1998 se pudo establecer un cultivo de células madre embrionarias humanas (hESC) proveniente de cigotos fertilizados *in vitro*

a. Fibroblastos de ratón tratados: **capa alimentadora**

- Provee superficie pegajosa
- Libera nutrientes al medio



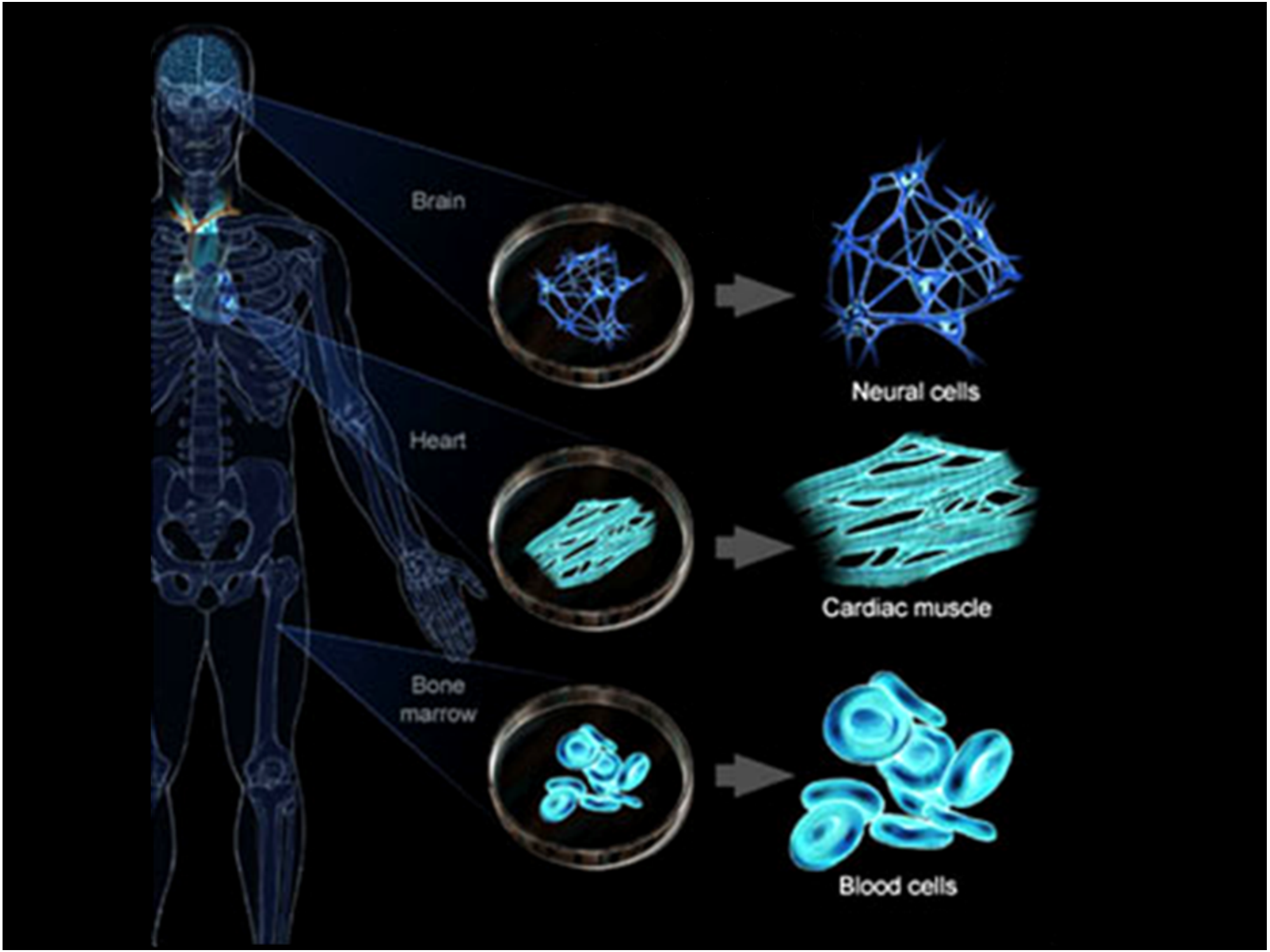
¿Cómo son estimuladas las células madre para la diferenciación en células especializadas?



TIPOS DE CÉLULAS TRONCO

2. Células tronco adultas, somáticas o no embrionarias (ASC)— Células indiferenciadas, relativamente raras, que se encuentran en muchos órganos y tejidos diferenciados.

- Tienen capacidades limitadas para la autorenovación y la diferenciación.
- Normalmente limitadas al tipo de células del órgano de origen para mantener y reparar cualquier daño.
- No se conoce exactamente su origen


Brain
Neural cells
Heart
Cardiac muscle
Bone
marrow
Blood cells

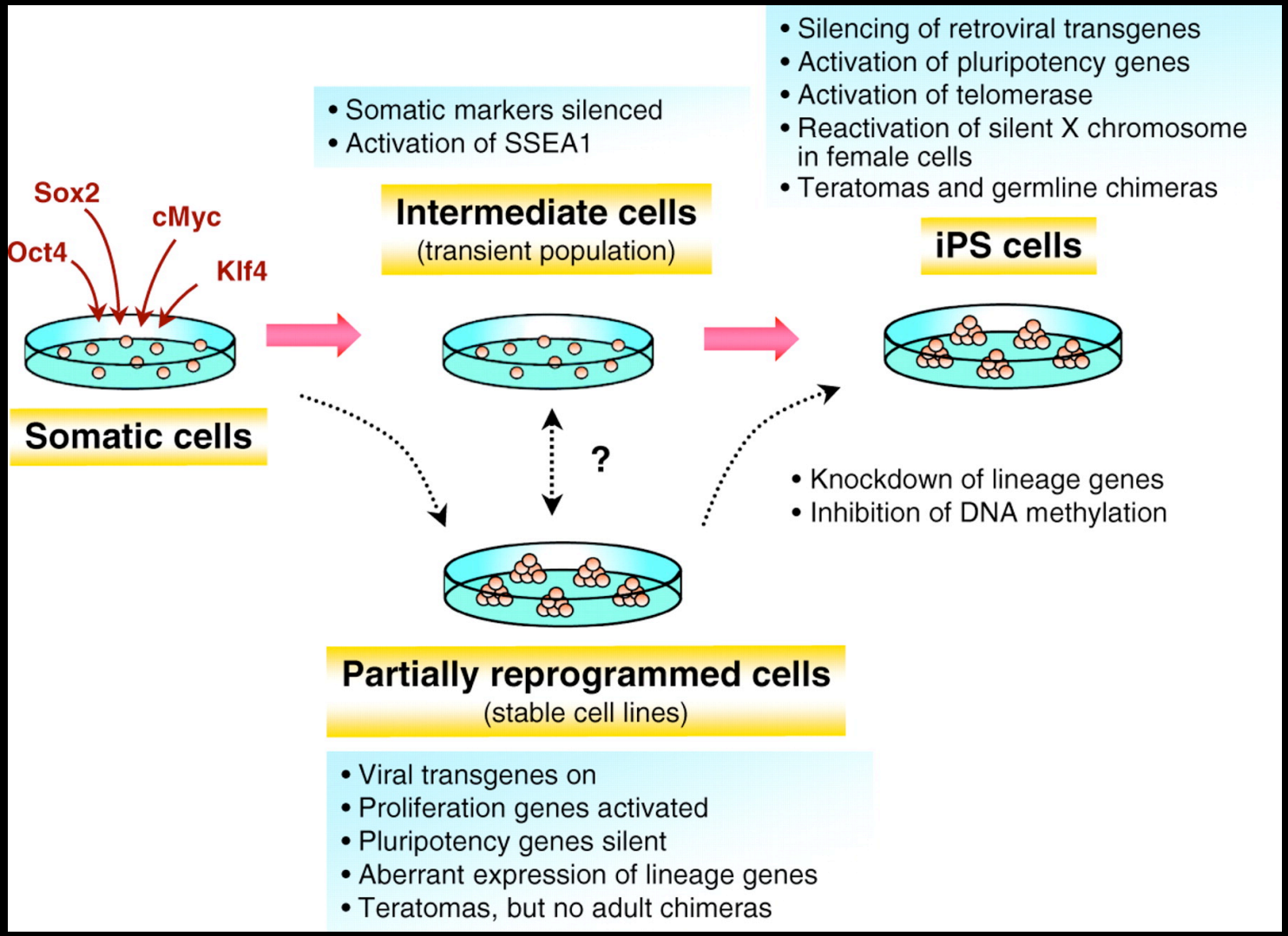
Diferencias entre ESC y ASC

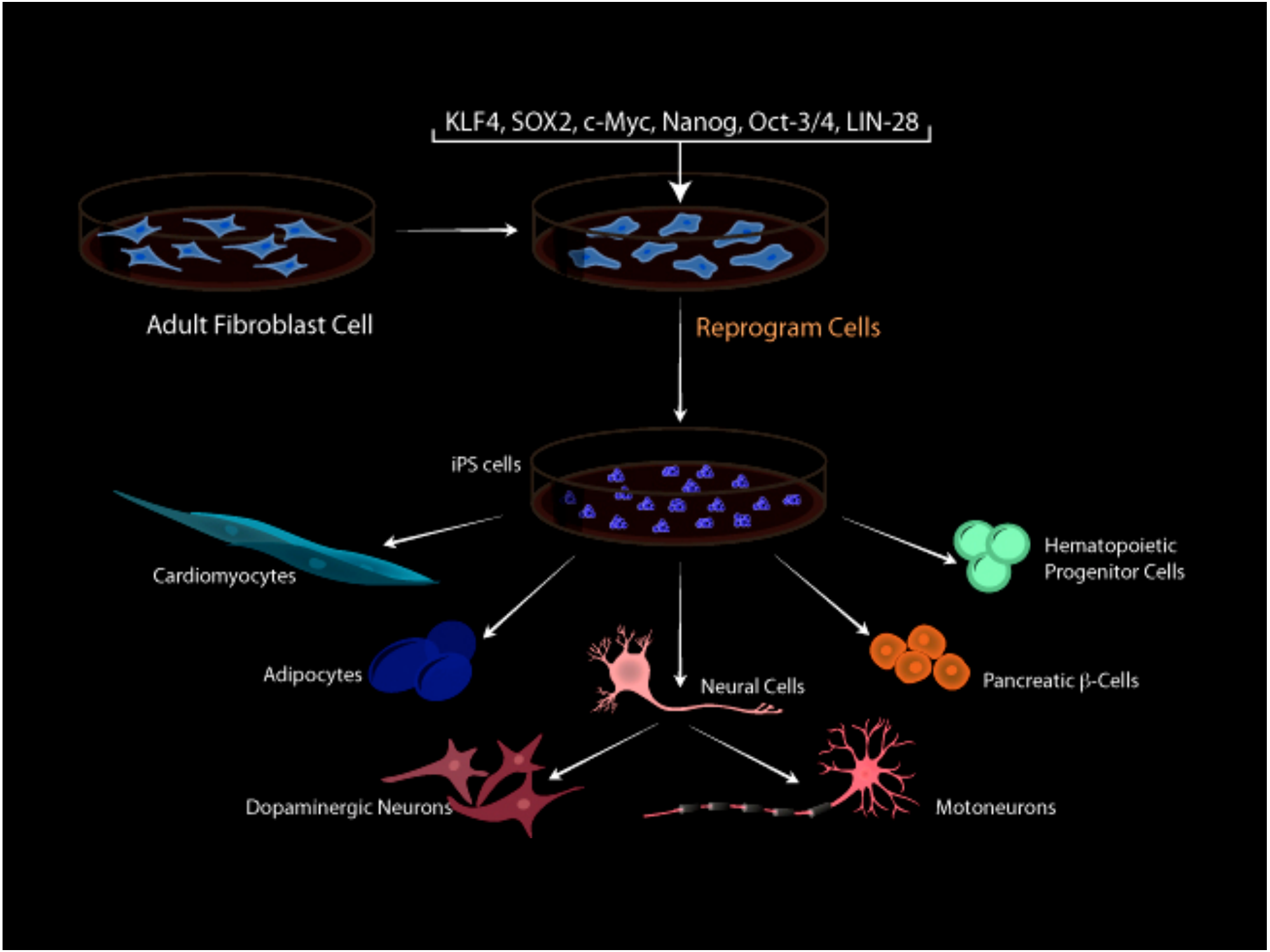
Característica	ESC	ASC
Habilidad de autorenovación y de originar células y tejidos especializados	+	+
Buenas capacidades de proliferación	+	+
Conocimiento del origen de las células	+	-
Habilidades en el número y tipo de celulas del cuerpo que pueden originar	+	-
Crecimiento en cultivos celulares y facil manipulacion	+	-
Tipo de células	pluripotentes	multipotentes
Uso en terapias regenerativas	+	+

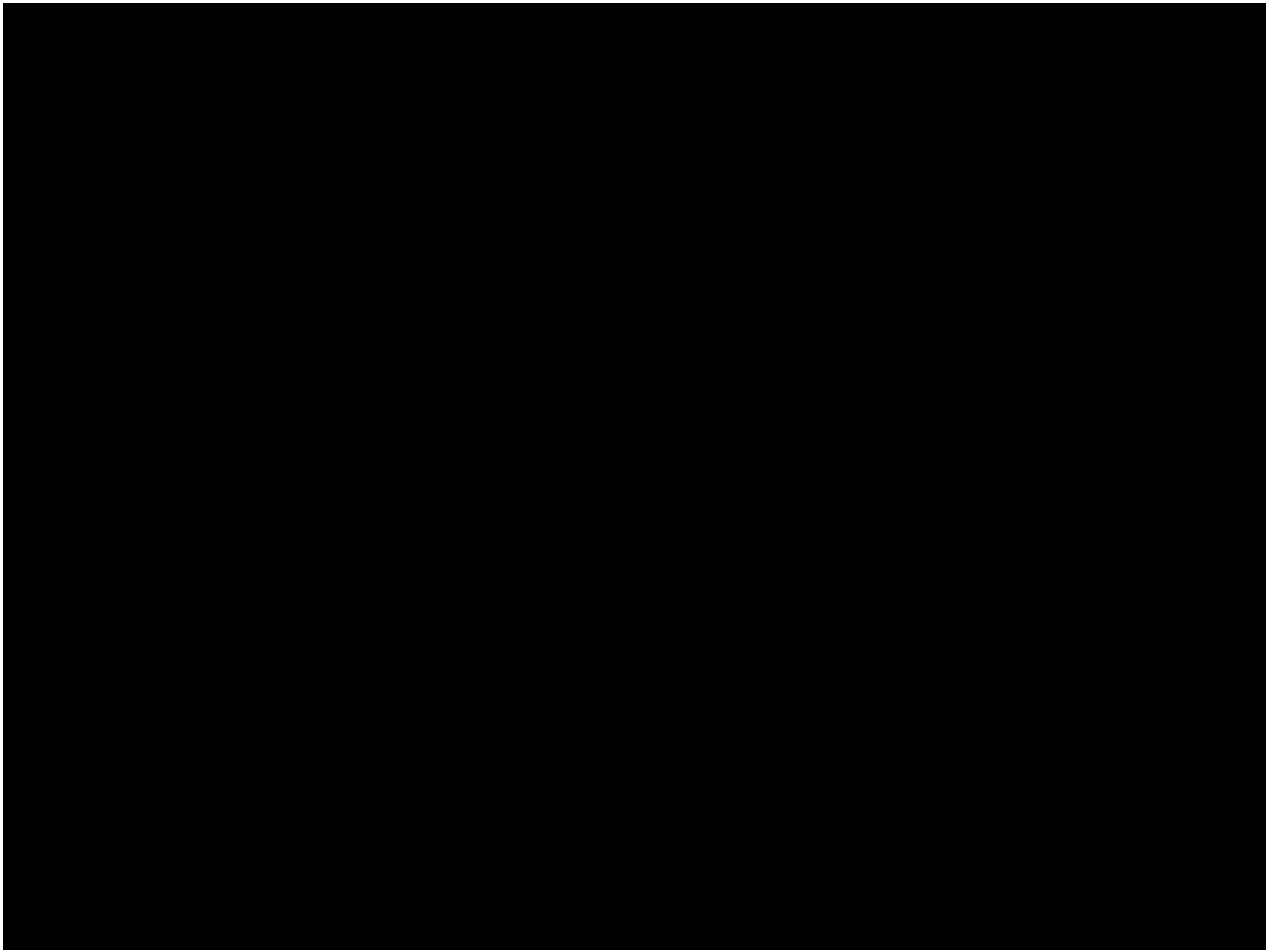
TIPOS DE CÉLULAS TRONCO

3. Células tronco pluripotentes inducidas (iPSC) — células adultas especializadas reprogramadas geneticamente (introduccion de genes embrionarios) para asumir un estado indiferenciado de célula tronco

S. Yamanaka generan iPSCs en 2006 en ratón


• Silencing of retroviral transgenes
• Activation of pluripotency genes
• Activation of telomerase
• Reactivation of silent X chromosome in female cells
• Teratomas and germline chimeras
• Somatic markers silenced
• Activation of SSEA1
Sox2
cMyc
Oct4
Klf4
Intermediate cells
(transient population)
iPS cells
Somatic cells
?
• Knockdown of lineage genes
• Inhibition of DNA methylation
Partially reprogrammed cells
(stable cell lines)
• Viral transgenes on
• Proliferation genes activated
• Pluripotency genes silent
• Aberrant expression of lineage genes
• Teratomas, but no adult chimeras


KLF4, SOX2, c-Myc, Nanog, Oct-3/4, LIN-28
Adult Fibroblast Cell
Reprogram Cells
iPS cells
Cardiomyocytes
Hematopoietic
Progenitor Cells
Adipocytes
Neural Cells
Pancreatic β-Cells
Dopaminergic Neurons
Motoneurons

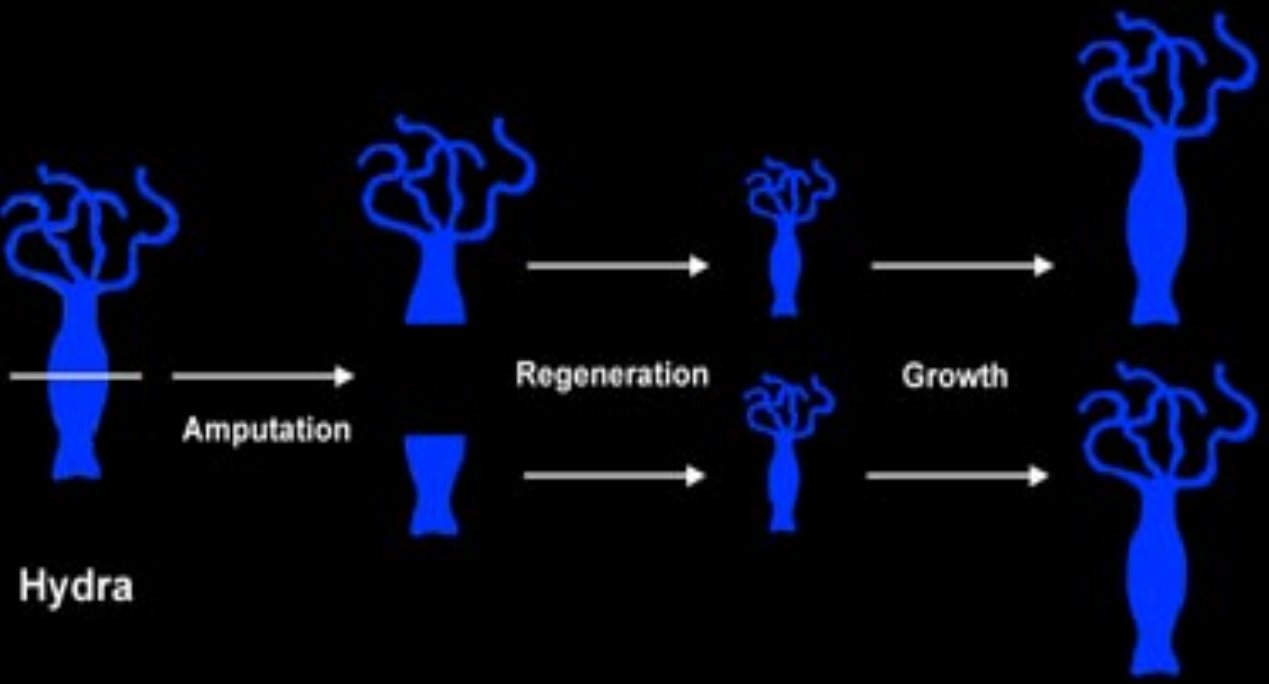


REGENERAÇÃO EM ANIMAIS

1. HISTÓRIA
2. ANIMAIS COM POTENCIAL REGENERATIVO
3. REGENERAÇÃO EM PLANÁRIAS

INTRODUÇÃO

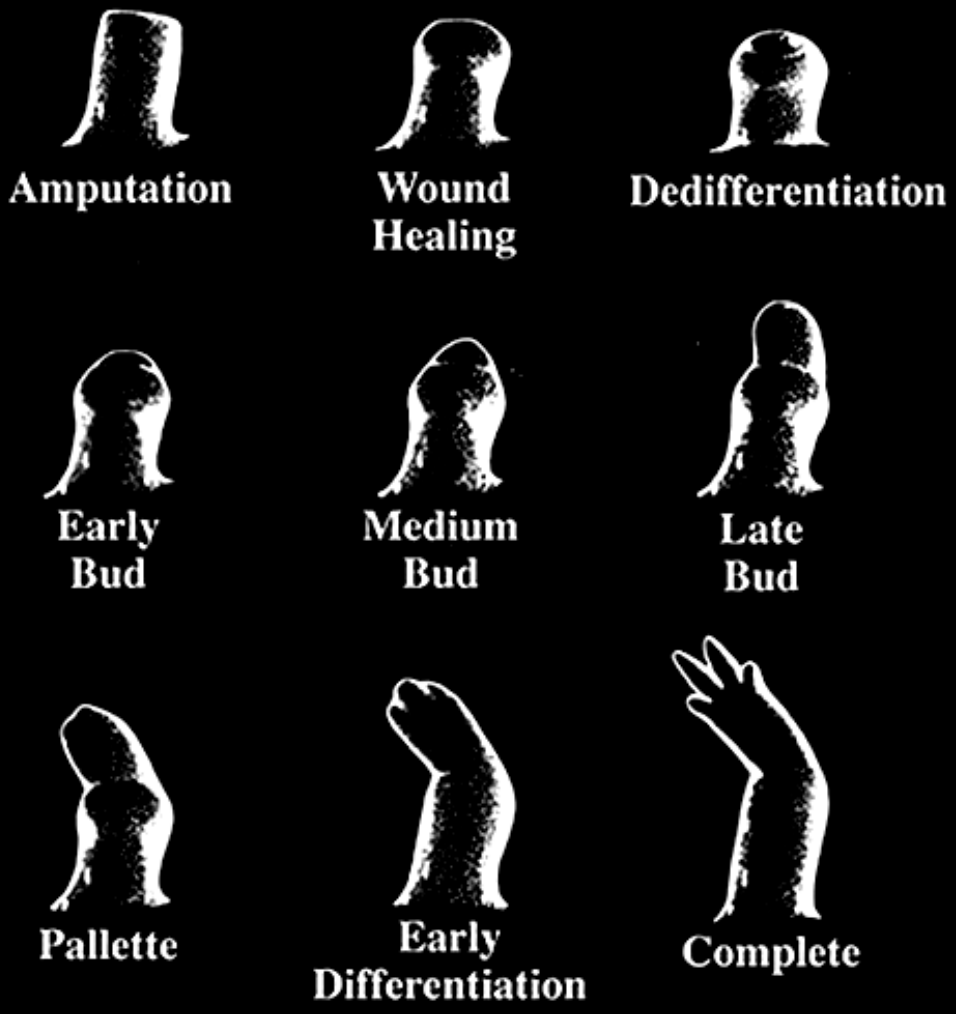
1. Regeneração **morfalática**



http://www.youtube.com/watch?v=lGJXS7XN8u8

INTRODUÇÃO

2. Regeneração **epimórfica**



1. Cicatrização: As células epidêrmicas das bordas da ferida migram e se distribuem sobre a área exposta.

2. Formação de blastema: Horas ou dias depois, células indiferenciadas se acumulam dentro da epiderme formando uma massa horas ou dias depois, células indiferenciadas se acumulan dentro de la epidermis formando una masa avultada .

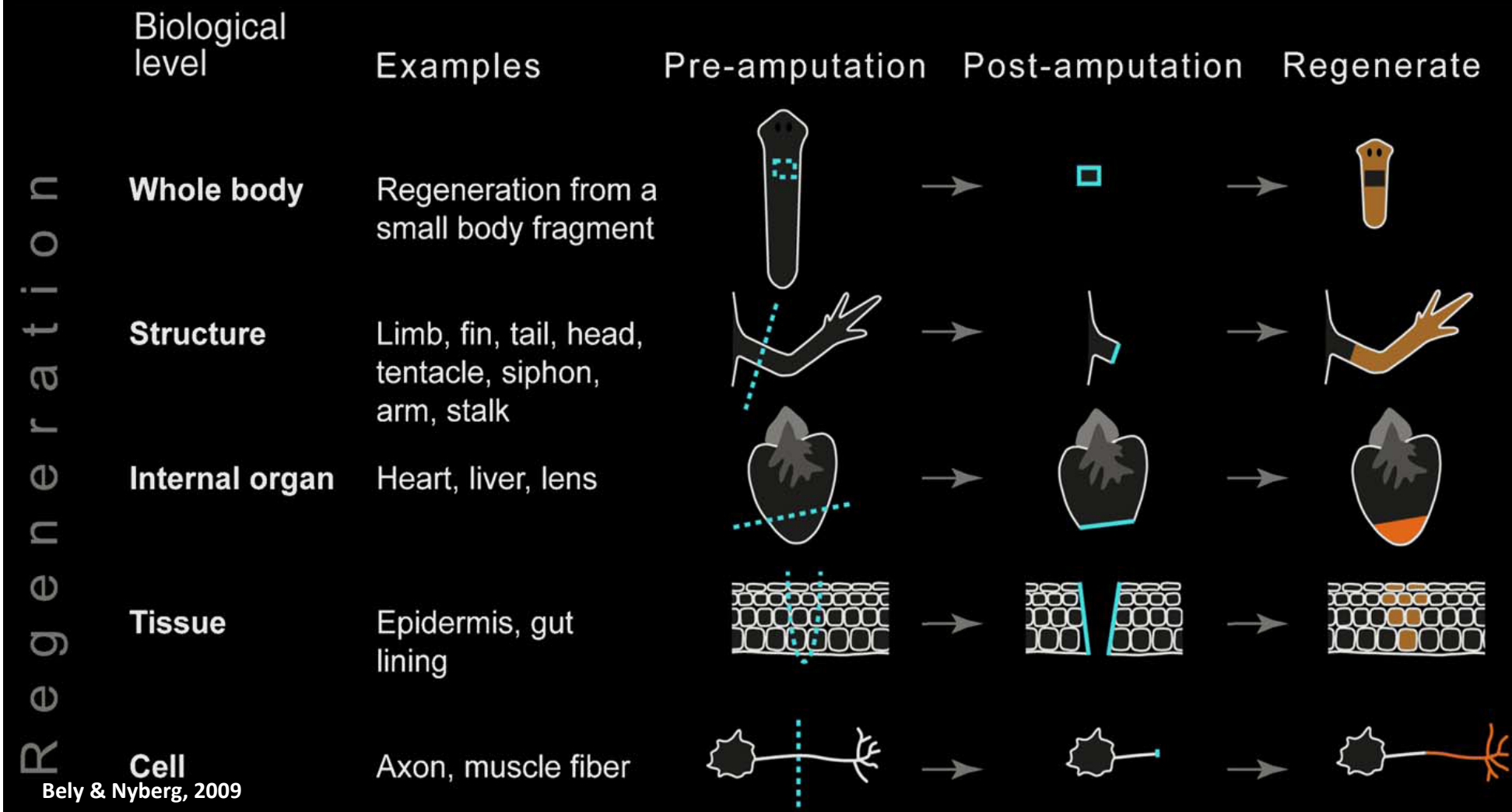
3. Dediferenciação e morfogênese: O blastema começa a desenvolver tecidos rudimentares dos órgãos perdidos.

4. Crecimento: a estrutura regenerada incrementa seu tamanho e obtem a estrutura normal.

http://regeneration.bio.uci.edu

REGENERAÇÃO EM ANIMAIS

- Regeneração a diferentes níveis de organização biológica



Bely & Nyberg, 2009

Células tronco em humanos: Regeneração de estruturas

Trapped Fingers and Amputated Finger Tips in Children

By Cynthia M. Illingworth

Journal of Pediatric Surgery, Vol. 9, No. 6 (December), 1974

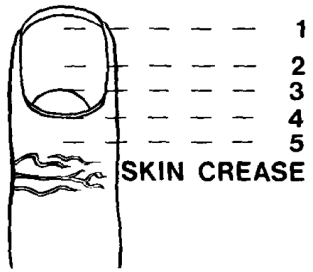


Fig. 5. *Grading of level of tissue loss.*

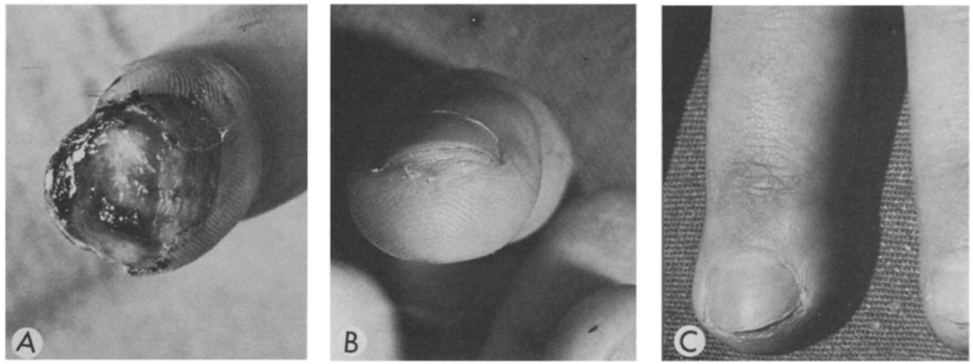


Fig. 2. (A) Amputation of finger tip in 5-yr-old girl. (B), (C) Twelve weeks after accident.

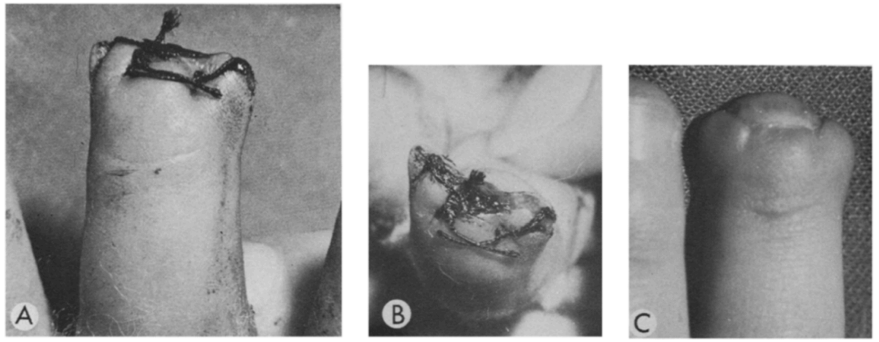
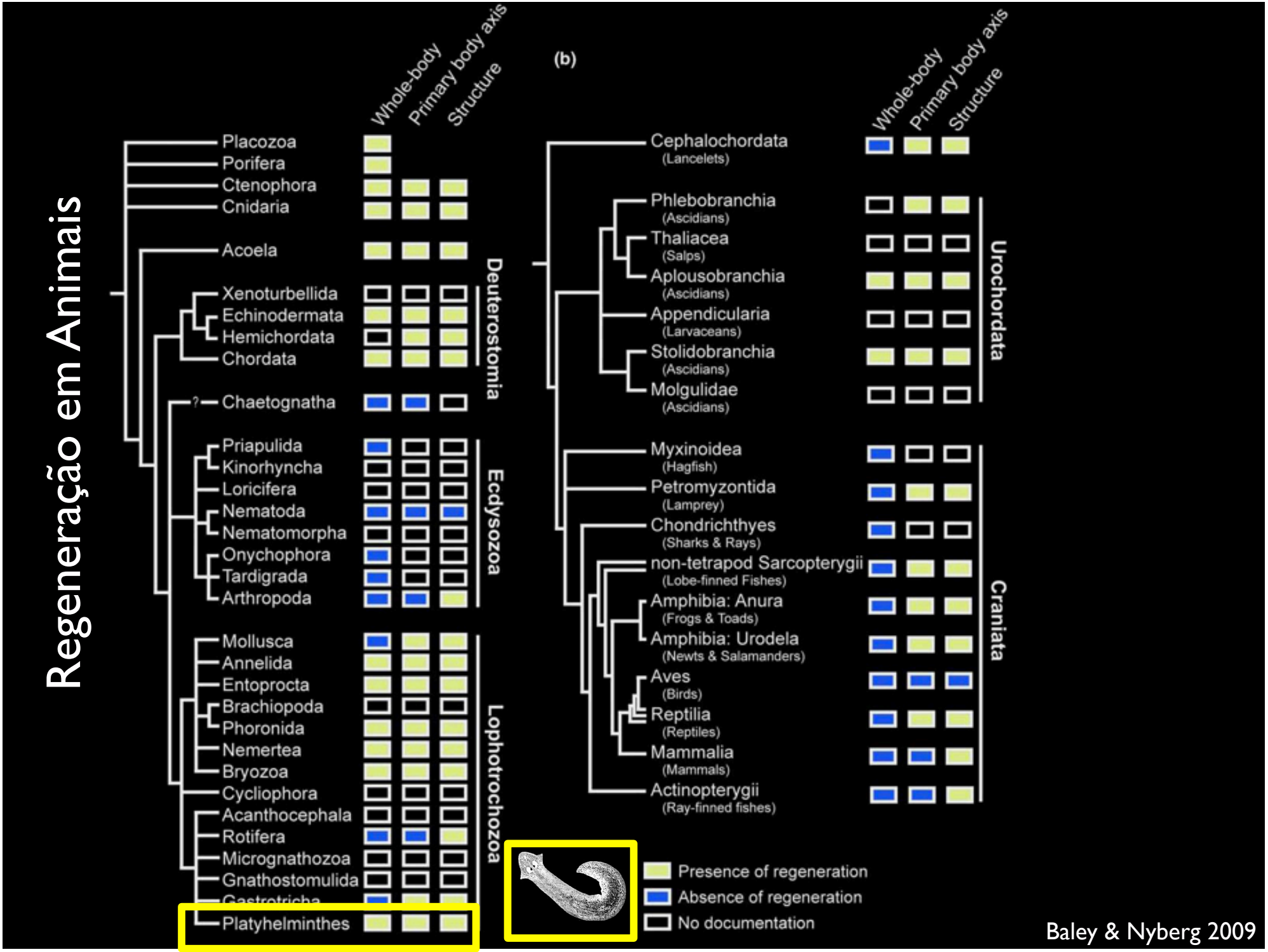


Fig. 4. (A and B) *Guillotine amputation* of finger tip treated surgically in girl of 3-yr. (C) Four months after accident.

Regeneração em Animais



Baley & Nyberg 2009

REGENERAÇÃO EM PLANÁRIAS

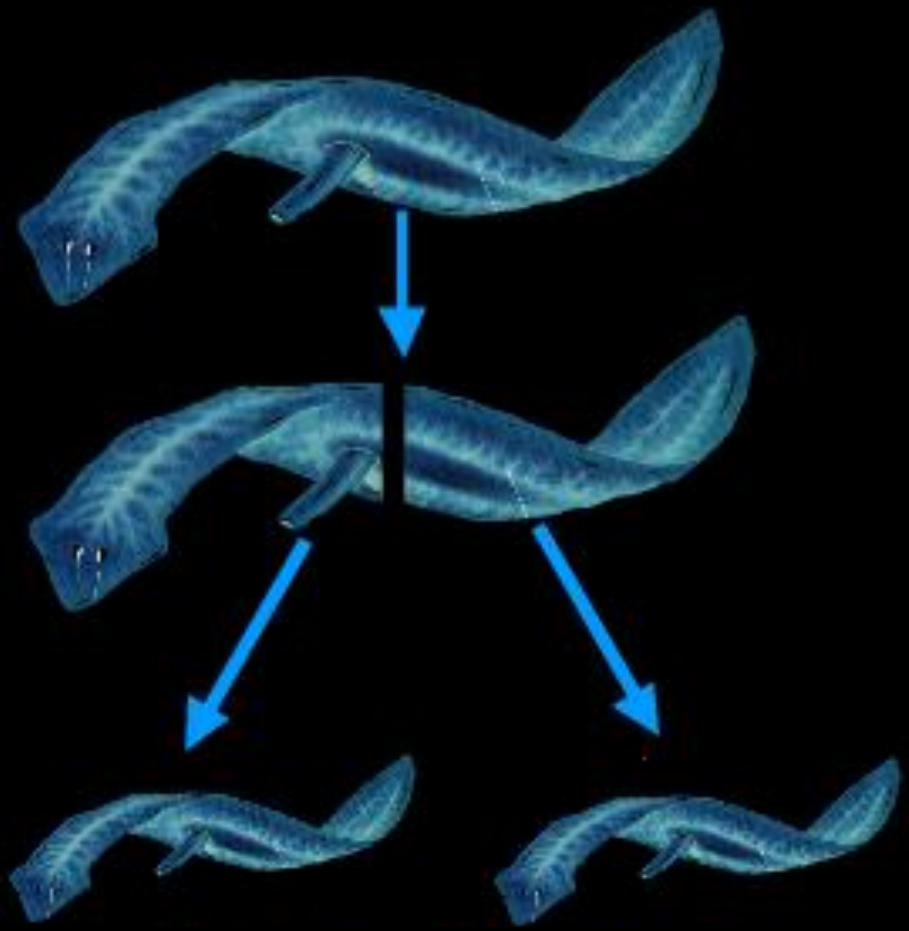
- Organismos morfologicamente simples
- Alto podere de regeneração

- Fácil de manipular e cultivar em Condições de laboratório
- Reprodução sexuada e assexuada
- Genoma pequeno (4.8 x 10^8 pb)
- Permitem manipulação molecular
- Presença de “Neoblastos”

(Dev. Biol 220: 142-153, 2000)

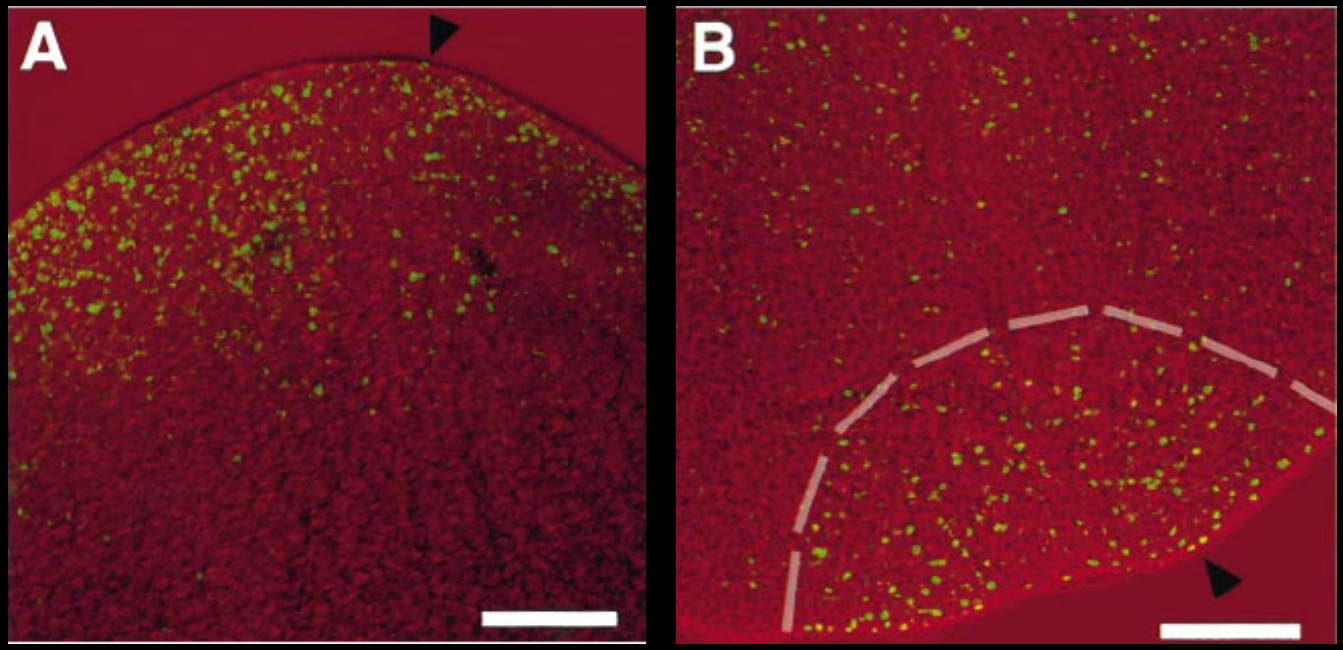
INTRODUÇÃO

- **O que passa com as planárias?**

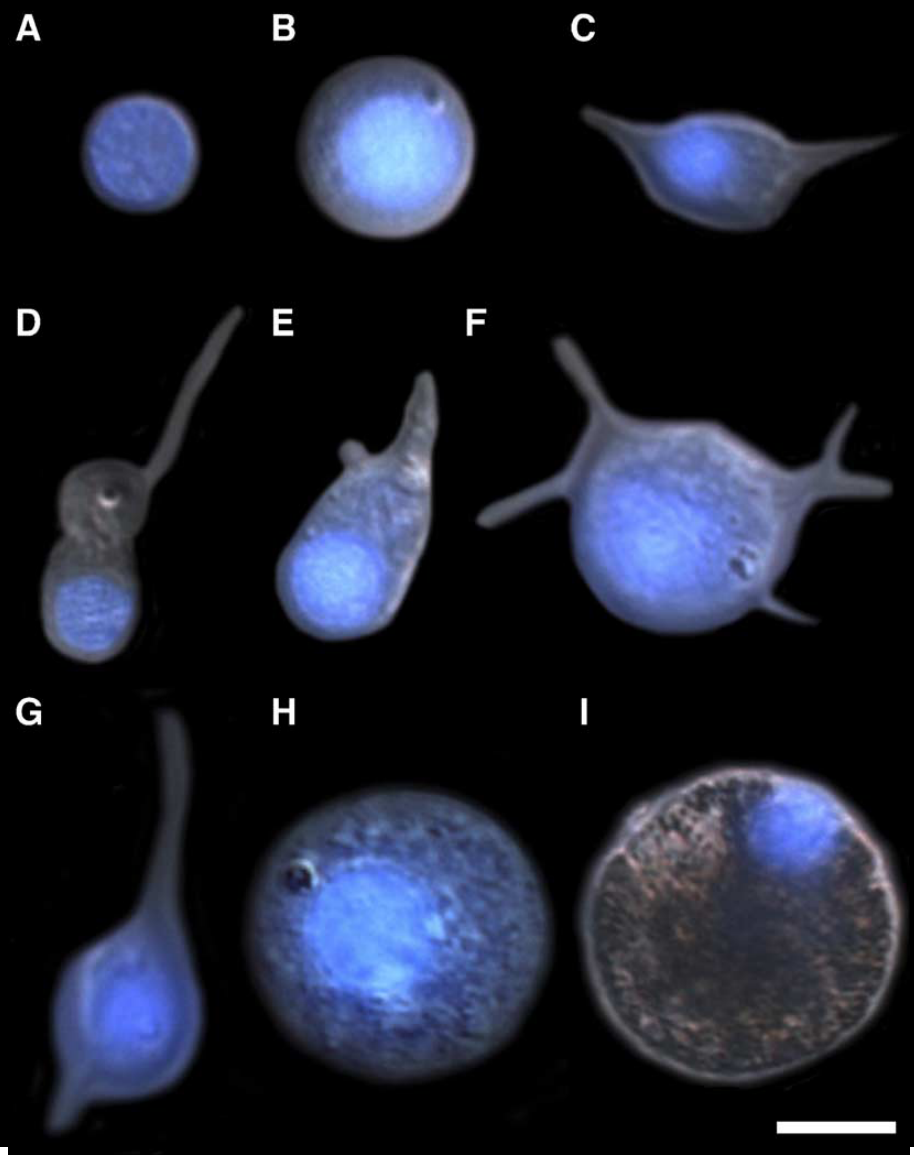


REGENERAÇÃO EM PLANÁRIAS

1. Localização de neoblastos

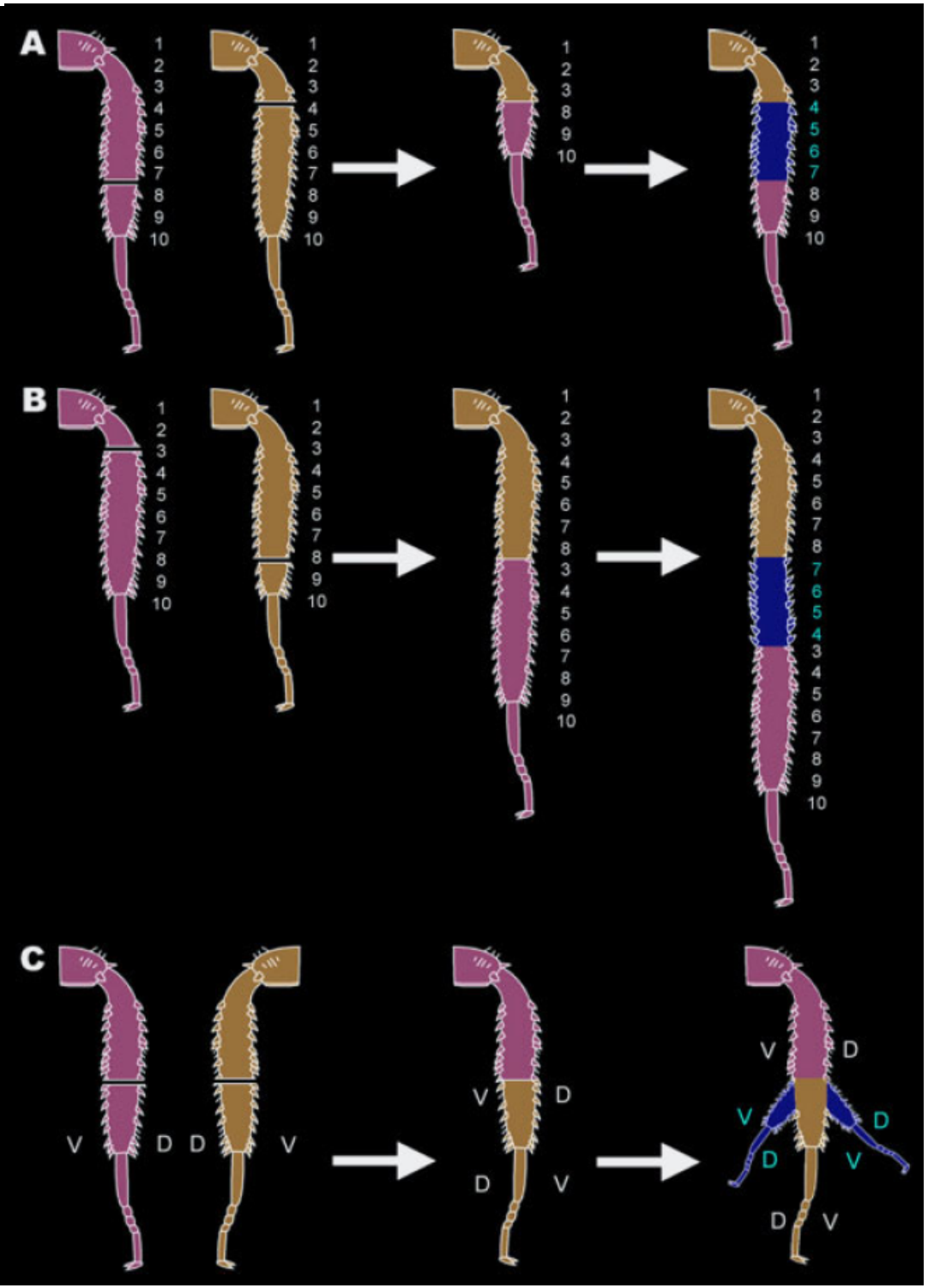


REGENERAÇÃO EM PLANÁRIAS



NEOBLASTOS =
CÉLULAS TRONCO

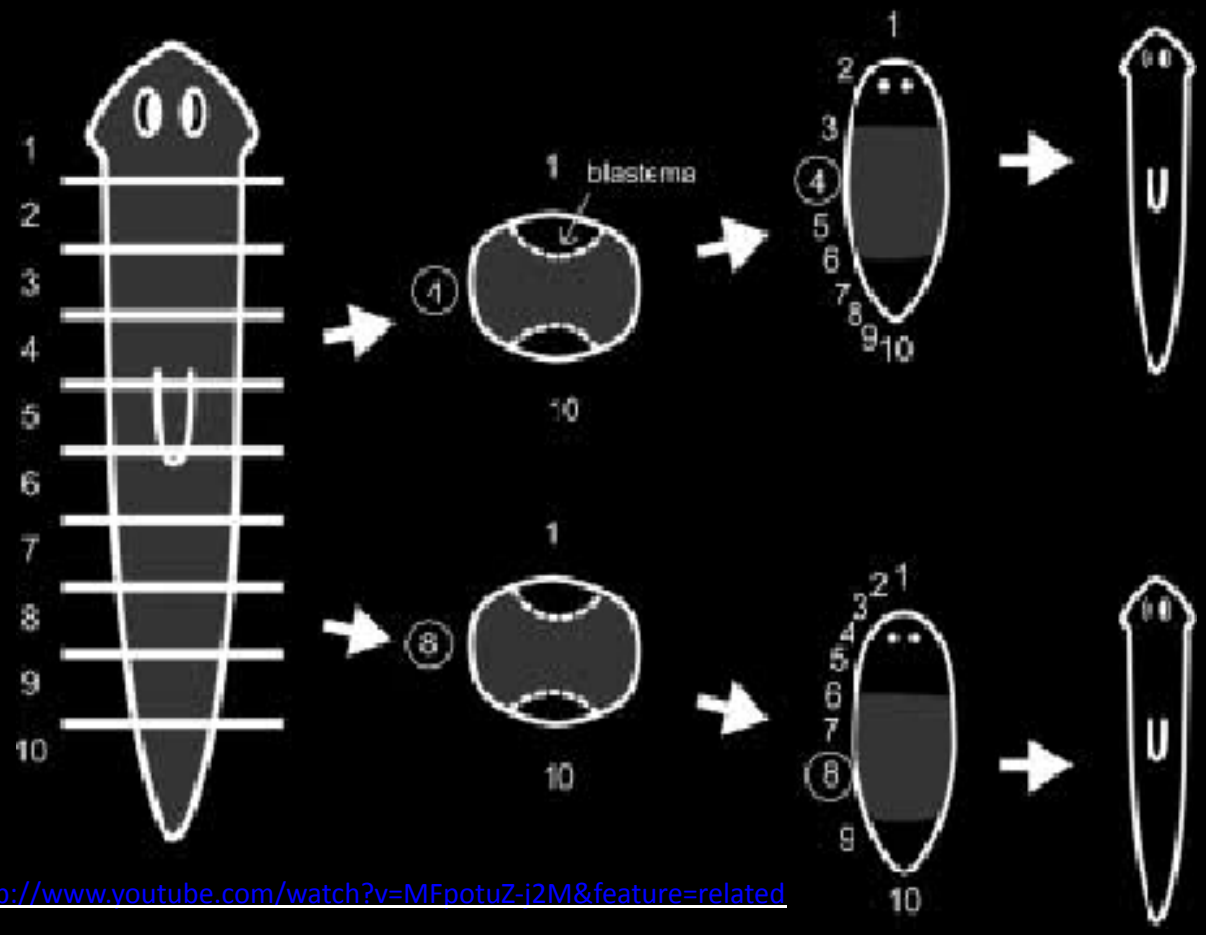
Regeneração Intercalar



INTRODUÇÃO

- **Combinação de mecanismos**

Regeneração Intercalar



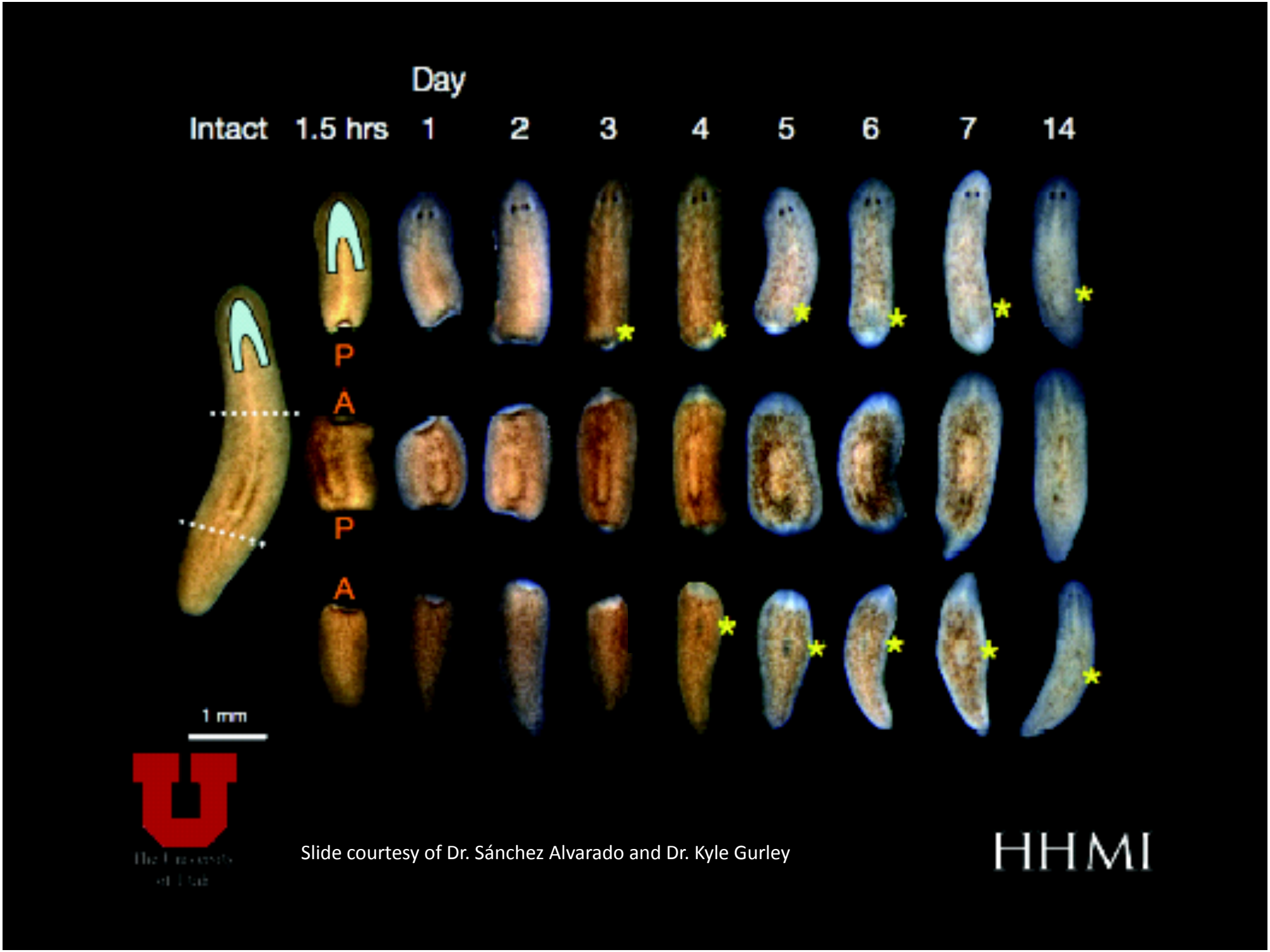
Nove dias depois amputação, o fragmento de cabeça regenerou um corpo completo com proporções normais.

Formação clara de blastema durante regeneração como um cluster de *DjvlgA-positive cells.*

Células formadoras pré-faringeais e faringeais claramente aparecem no toco, não no blastema.

Esta observação demonstra que as células tronco são comprometidas no espaço mesenquimal do toco.

http://www.youtube.com/watch?v=MFpotuZ-j2M&feature=related



Slide courtesy of Dr. Sánchez Alvarado and Dr. Kyle Gurley

Comparação de capacidades regenerativas dos platelmintos

Turbellaria

"Archoophora"

Neoophora

	Regeneração:	Vida:
Catenulida	excelente	t (terrestre)
Macrostomorpha	excelente	m (marinha)>t
Polycladida	bom	m
Lecithoepitheliata	bom	t>m
Proseriata	bom	t & m
Bothrioplanida	bom	m
Rhabdocoela	ruim	t>>p (parasitario)
Fecampiida	desconhecido	p
Prolecithophora	bom	t=m
Tricladida	excelente	t>m
Neodermata	bom	p

Modified from Martin-Duran & Egger 2012 & Collins et al. Nature 2013