

## AULA 06

Desenvolvimento de nematoides, ouriços-do-mar, ascídias e mixomicetos

***Caenorhabditis elegans*** é um organismo modelo para especificação do destino associado com divisão celular assimétrica

Em *C. elegans* o início do desenvolvimento ocorre por construção do padrão célula a célula ao invés de morfógenos

1

**Ouriços-do-mar** são modelos para um desenvolvimento altamente regulado, nos quais foram caracterizados muitos genes chave e seus elementos de controle em cis

2

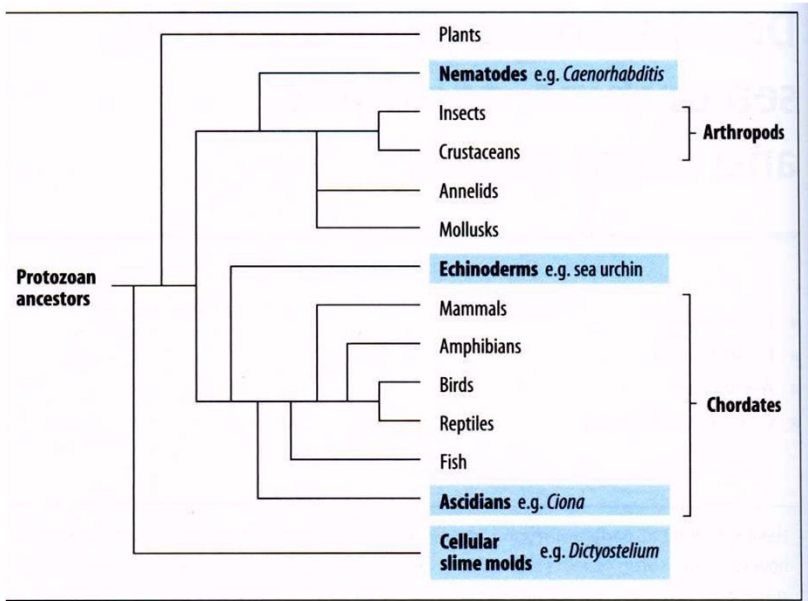
**Ascídias** são cordados e portanto mais relacionados com os vertebrados do que nematoides ou insetos

3

***Dictyostelium discoideum*** é um mixomiceto e não se desenvolve a partir de um ovo mas pela reunião de células individuais que formam um corpo de frutificação

4

## Como eles se relacionam



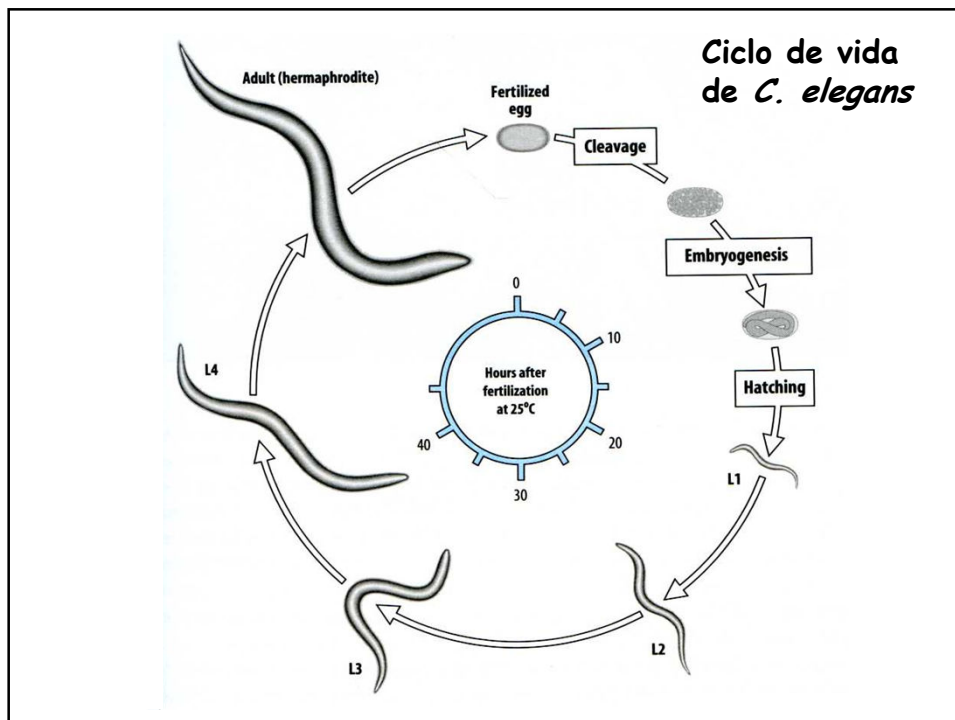
## 1. *Caenorhabditis elegans*

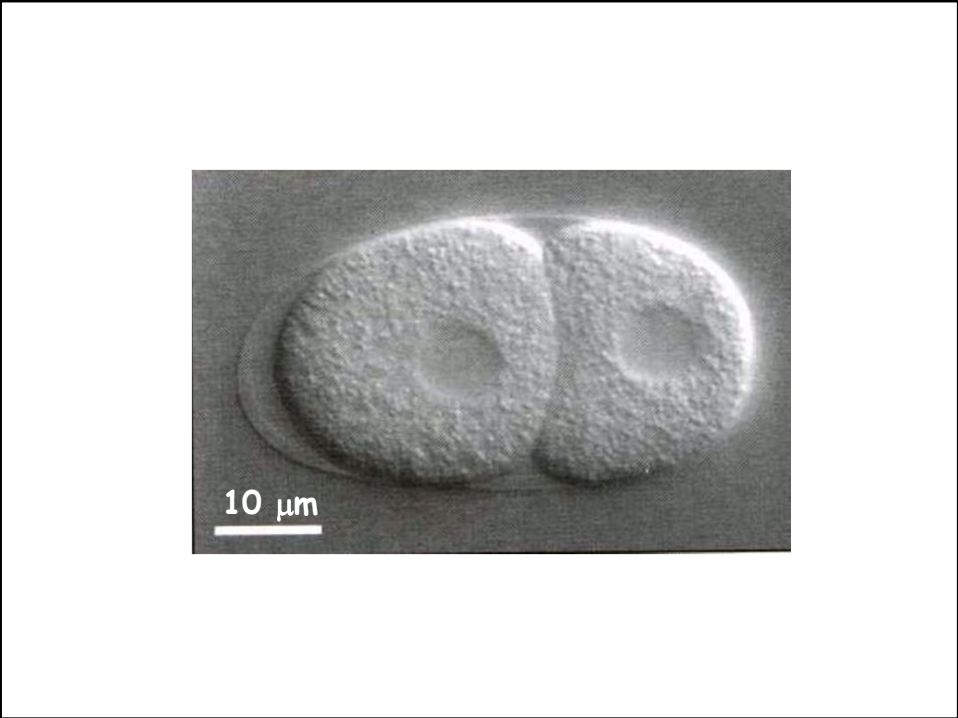
A especificação das células dos nematoides e ascídias ocorre célula a célula e não por grupos como em drosófila

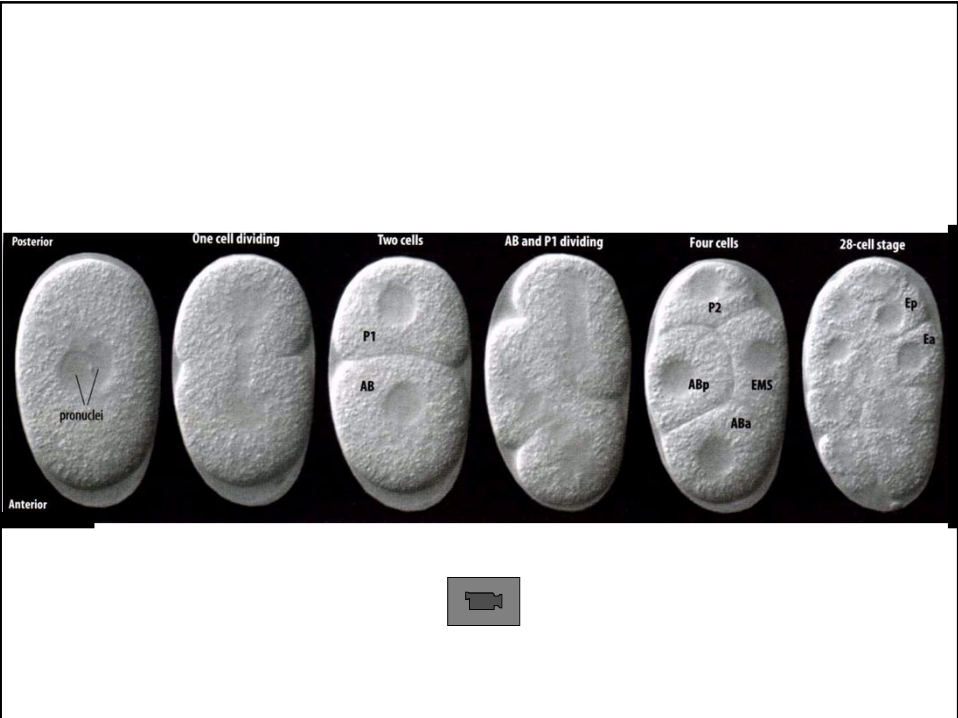
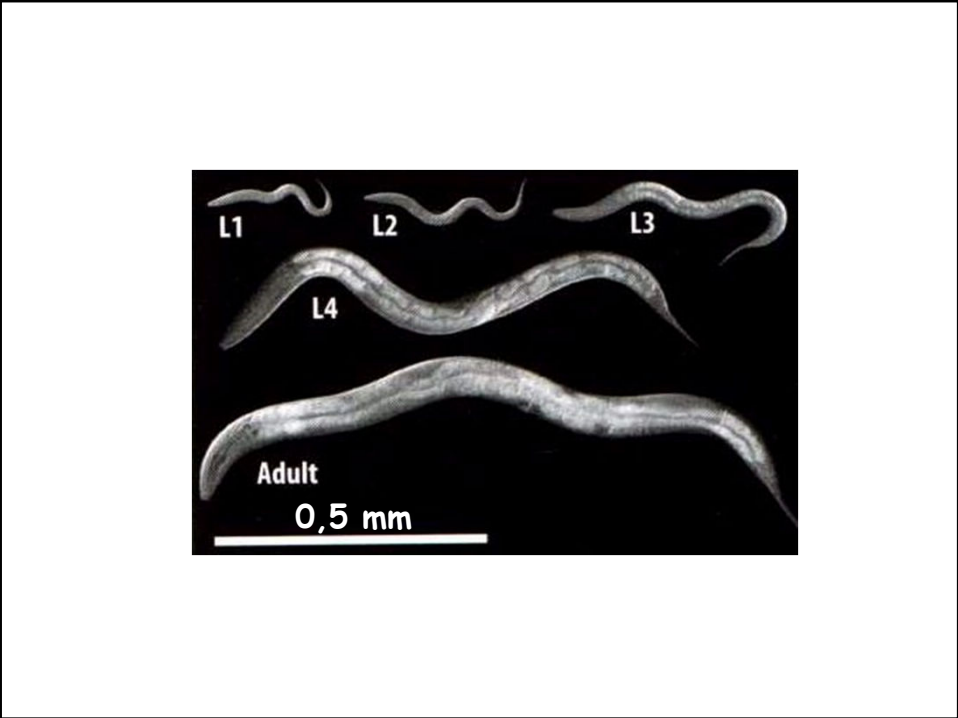
Não depende de informação posicional estabelecida por gradientes de morfógenos

A gastrulação em *C. elegans* começa quando o embrião tem 26 células, em contraposição a milhares nos vertebrados e em drosófila

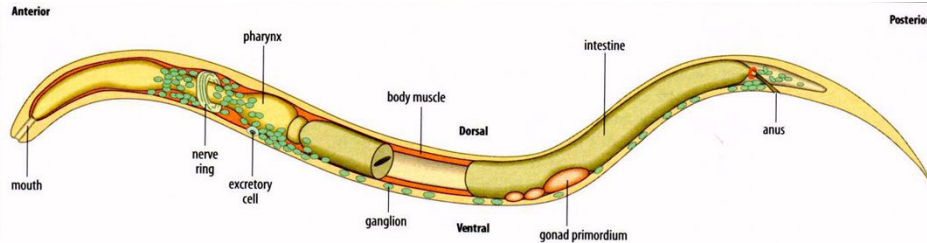
Especificação célula a célula utiliza principalmente a divisão assimétrica de células e distribuição assimétrica de fatores citoplasmáticos para determinar o destino de uma célula







## L1 recém-eclodida de *C. elegans*



Apesar de semelhante ao adulto, é sexualmente imatura e não possui gônada nem vulva das hermafroditas

A observação do desenvolvimento do embrião em microscópio de contraste de interferência permitiu estabelecer a linhagem de todas as células do nematoide

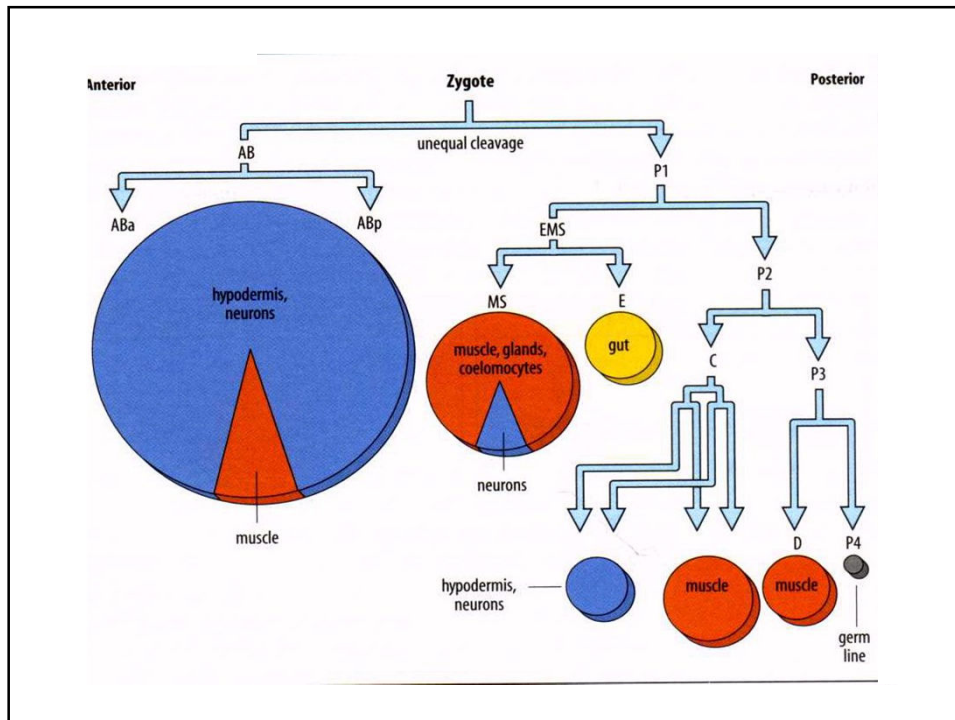
O padrão de clivagem é absolutamente invariável -> o mesmo em todos os embriões.

## Linhagem celular

Depois de quatro mudas o número de células atinge 959, excluindo a linhagem germinativa

131 células morrem como resultado de apoptose

Apesar desta linhagem invariável, interação celular tem um papel importante na determinação do destino celular em *C. elegans*



## Expressão gênica diferencial

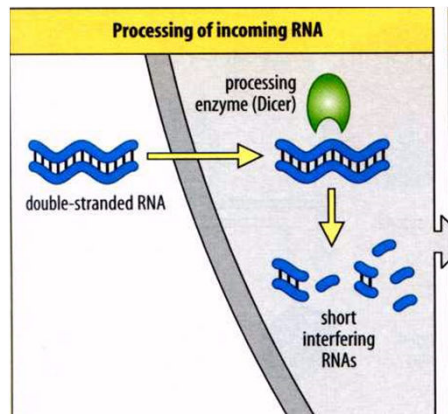
O genoma completo de *C. elegans* foi sequenciado e contém aproximadamente 20.000 genes

1700 genes afetam o desenvolvimento -> 2/3 encontrados por RNAi

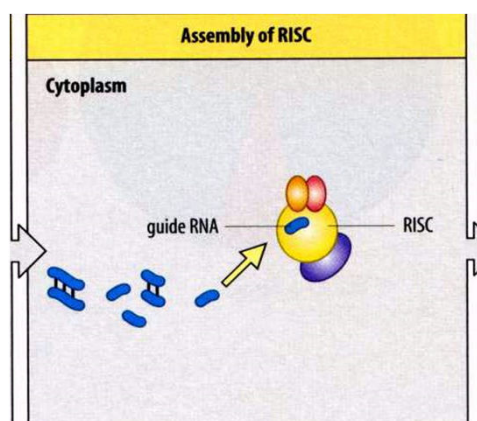
Genes Hox existem em *C. elegans*, bem como a via de Wnt. No entanto a via de Hedgehog não existe.

Apesar dos genes zigóticos serem transcritos já com 4 células, componentes maternos controlam o desenvolvimento até a gastrulação (28 células)

## RNAi

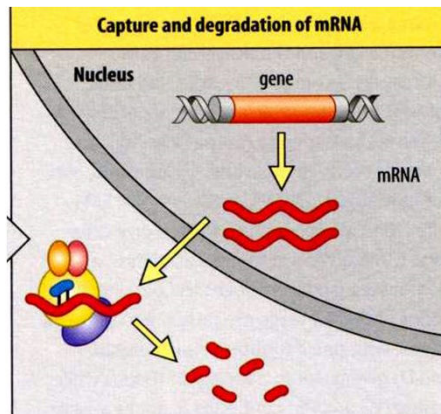


## RNAi





## RNAi



**Eixo antero-posterior em *C. elegans* é determinado por mitose assimétrica**

O eixo antero-posterior é determinado na fertilização

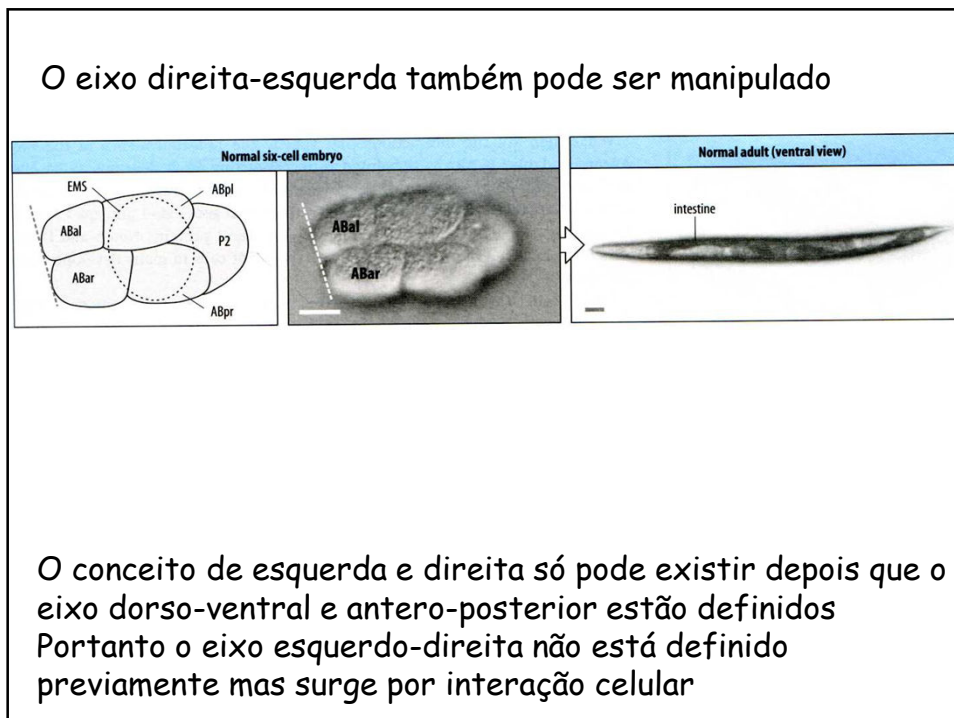
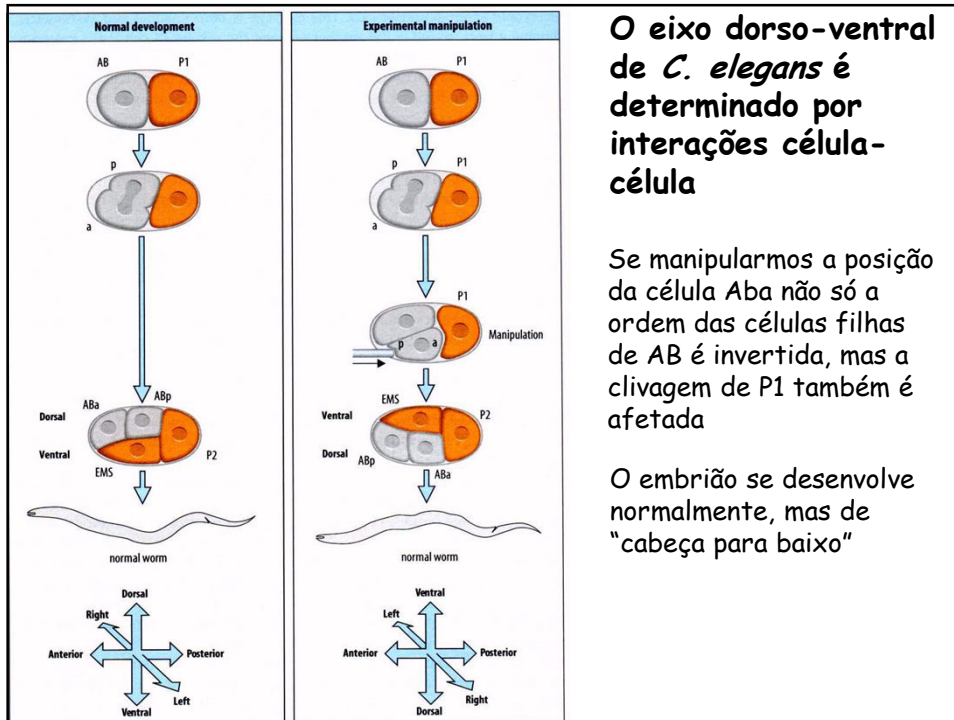
Chromosomes	P granules
<p>a</p>	
<p>b</p>	
<p>c</p>	
<p>d</p>	

A primeira clivagem é tanto desigual como assimétrica, formando uma célula AB grande e uma célula P1 menor

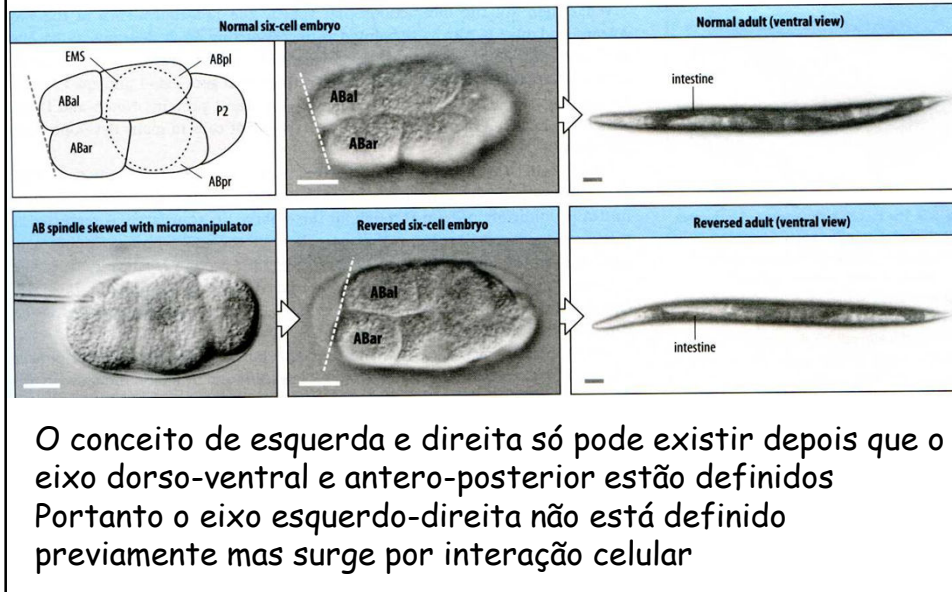
A polaridade do ovo fertilizado pode ser observada antes da primeira clivagem pela formação de filamentos de actina na parte anterior e os **grânulos P** na parte posterior

Proteínas PAR localizadas no córtex são redistribuídas após a fertilização e são responsáveis pela localização dos grânulos P

Normal development	
	<p>O eixo dorso-ventral de <i>C. elegans</i> é determinado por interações célula-célula</p>



O eixo direita-esquerda também pode ser manipulado



Apesar dos mecanismos moleculares para determinação do eixo direita-esquerda não serem conhecidos mutações no gene *gpa-16* resulta em orientação aleatória do fuso

GPA-16 corresponde a subunidade  $\alpha$  de uma proteína G

Muito mais tarde no desenvolvimento uma assimetria entre dois receptores de paladar é controlada pelo miRNA *lcy-6*

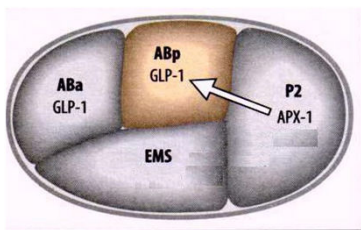
Remoção de P1 na primeira clivagem leva a ausência de células da faringe, um produto normal de ABa

Se ABp não entra em contato com P2 ela se desenvolve como ABa

Portanto, o blastômero P2 especifica ABp

Isso depende dos genes maternos *glp-1* e *apx-1*

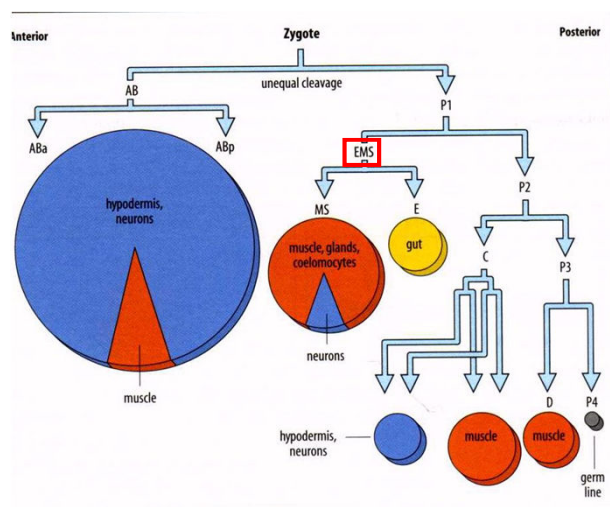
GLP-1 é um receptor transmembrana cujo mRNA não se localiza na linhagem posterior P. Assim, ele é expresso somente em AB no embrião de duas células



Assim ABa e ABp contêm GLP-1, mas um sinal de P2 torna ABp diferente de ABa

O sinal é a proteína APX-1, produzida por P2

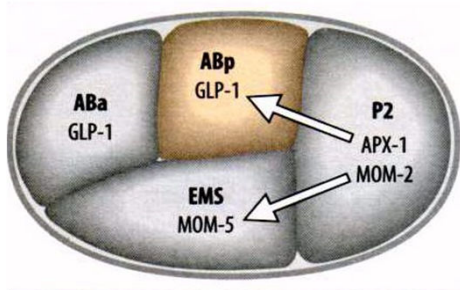
**A formação do tubo digestivo a partir de EMS depende de um sinal que vem de P2**



**A formação do tubo digestivo a partir de EMS depende de um sinal que vem de P2**

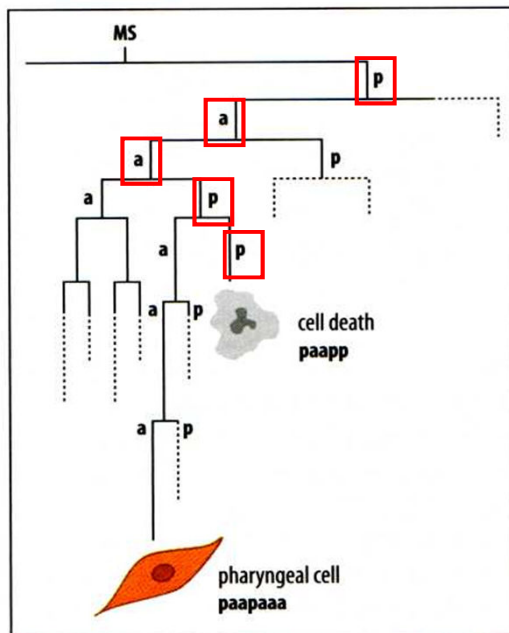
O sinal que induz a polaridade antero-posterior de EMS é dado por uma proteína homóloga a Wnt, MOM-2

MOM-2 interage com um receptor homólogo de Frizzled, MOM-5 na superfície de EMS



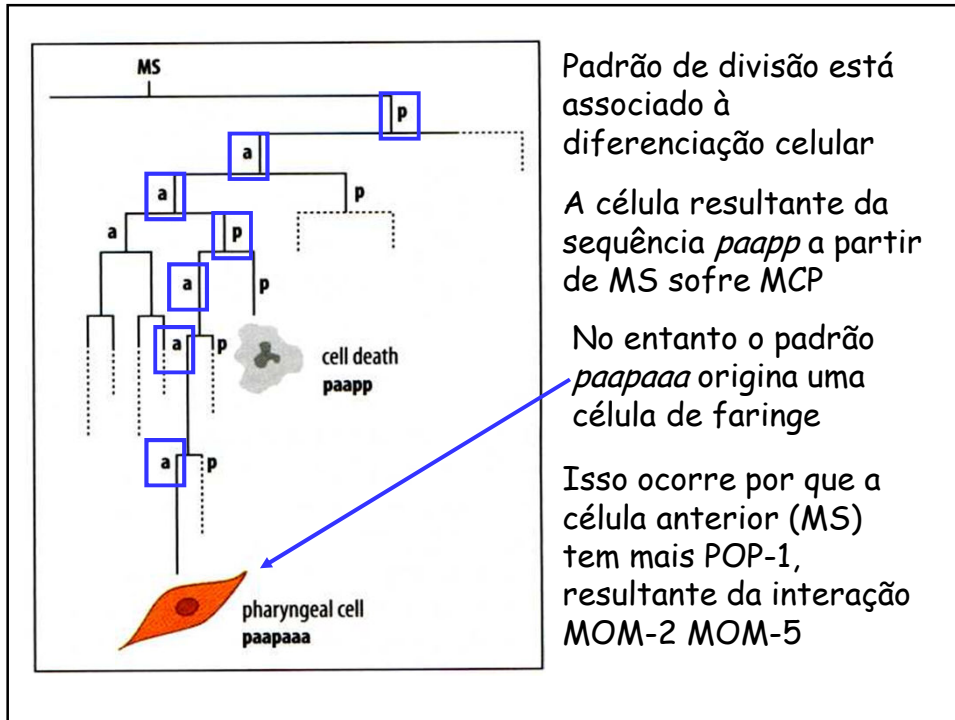
EMS se divide dando anteriormente MS e posteriormente E

No estágio de 32 células, quando começa a gastrulação, a maior parte das linhagens está determinada

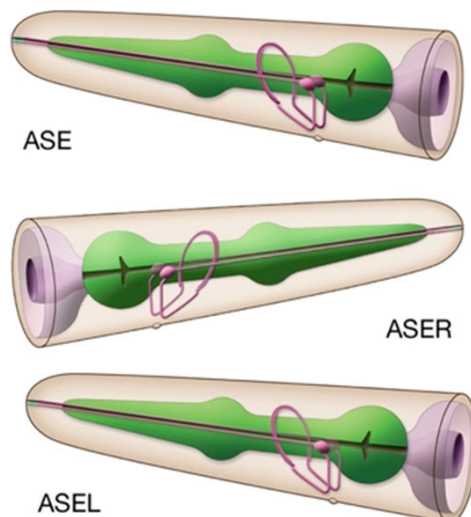


Padrão de divisão está associado à diferenciação celular

A célula resultante da sequência *paapp* a partir de MS sofre MCP



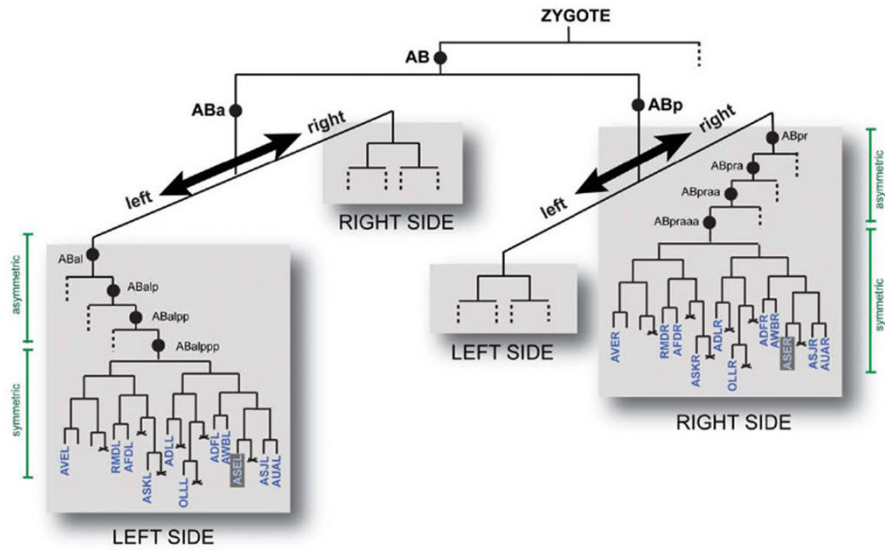
Os neurônios ASE, envolvidos no paladar, são assimétricos



<http://www.wormatlas.org/neurons/Individual%20Neurons/ASEframeset.html>

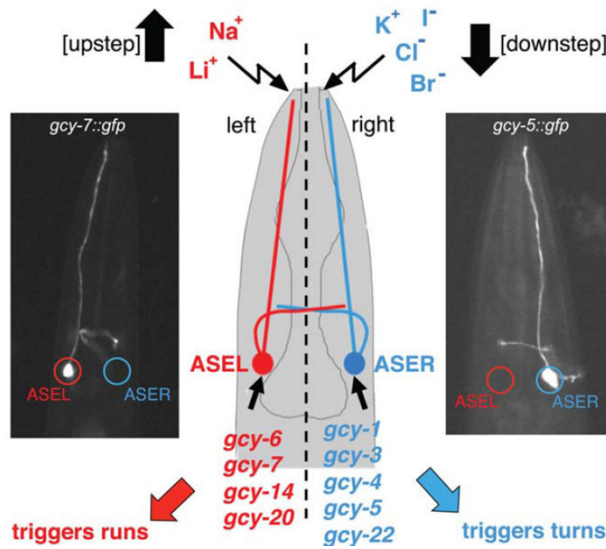


## Genealogia dos neurônios assimétricos ASE



Hobert, *Genesis* 52:528-543, 2014

## Neurônios ASEL e ASER desencadeiam comportamentos diferentes



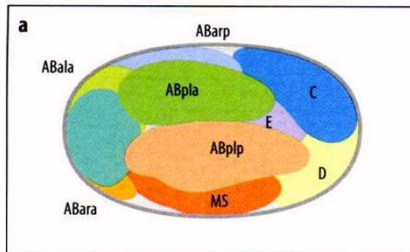
Amplas análises genéticas mostraram uma complexa rede de regulação gênica, composta de fatores de transcrição, miRNAs, reguladores de cromatina e sinais intercelulares, que instruem as características assimétricas de ASEL e ASER.

GCY - guanilato ciclase transmembrana

Hobert, *Genesis* 52:528-543, 2014



Na gástrula de 80 células um mapa dos destinos pode ser construído para o embrião de *C. elegans*

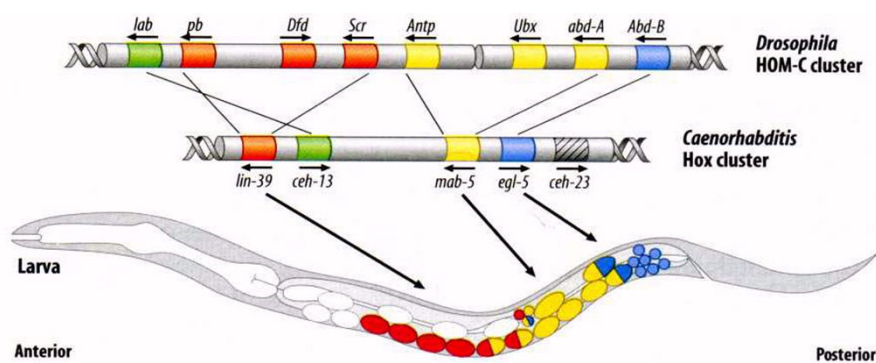


Células de diferentes linhagens se agrupam para formar o mesmo órgão

Genes específicos do órgão são expressos em todas essas células como *pha-4* na faringe

Ausência de *pha-4* resulta em ausência de faringe, enquanto expressão ectópica de *pha-4* resulta na expressão de genes de faringe em outros órgãos

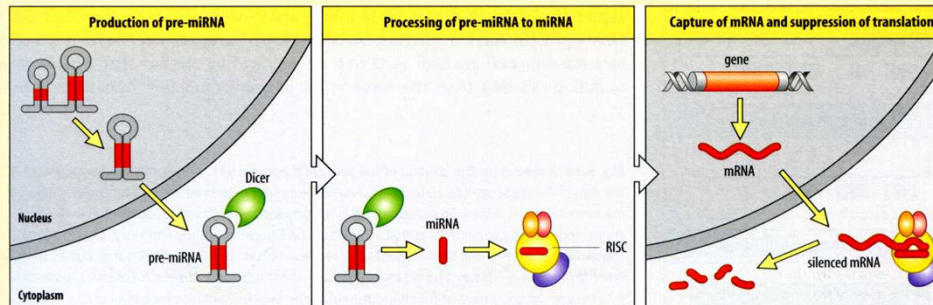
Pequeno conjunto de genes Hox especifica o destino de células no eixo antero-posterior



Os genes *lin-39*, *ceh-13*, *mab-5* e *egl-5* são semelhantes a genes das classes Antennapedia e Ultrabithorax de drosófila

Apesar da expressão dos genes Hox ser regional, não é linhagem-dependente

## Controle genético da expressão temporal de caracteres por microRNAs (miRNAs)

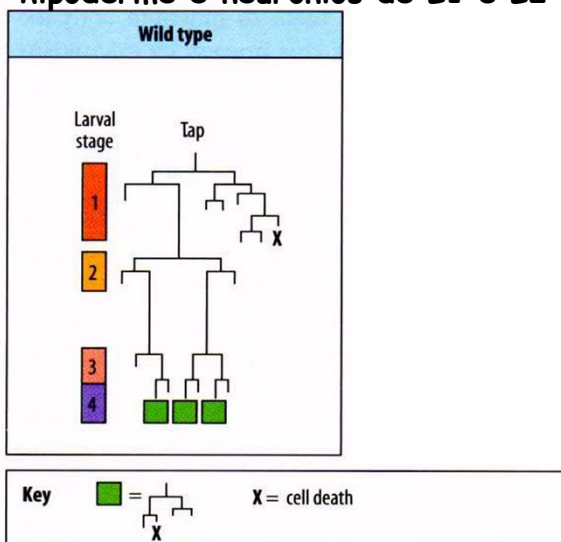


**Genes heterocrônicos** causam mudanças na época da divisão celular em muitos tecidos e tipos celulares

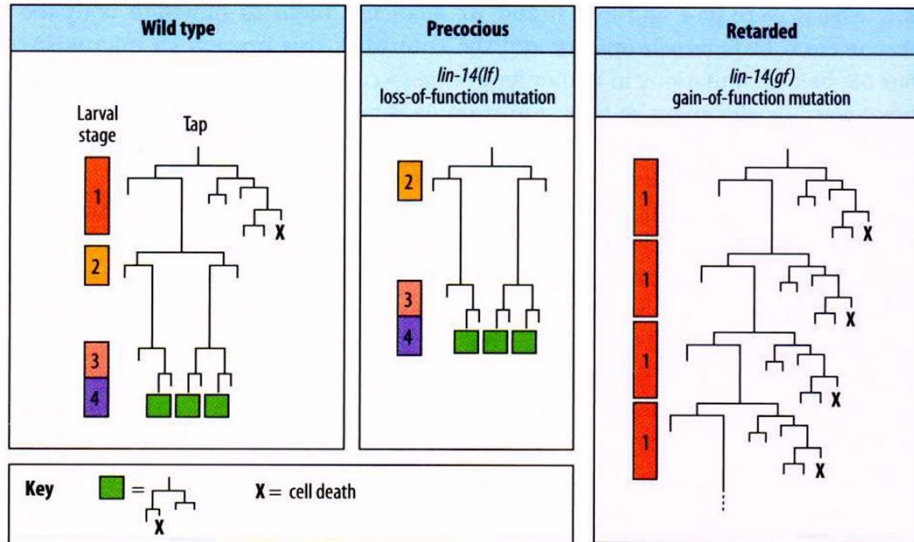
*lin-4* e *lin-14* foram os dois primeiros genes heterocrônicos a serem descritos em *C. elegans*

Mutações em *lin-4* ou *lin-14* resultam em desenvolvimento "atrasado" ou "precoce"

## Célula T gera uma linhagem que dá origem a célula da hipoderme e neurônios de L1 e L2

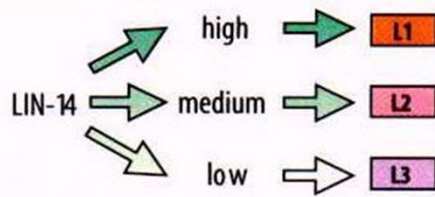


**Célula T gera uma linhagem que dá origem a célula da hipoderme e neurônios de L1 e L2**



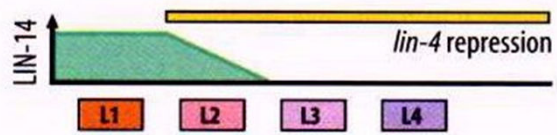
Um gradiente temporal de *lin-14* pode controlar a expressão temporal de outros genes

**The stage-specific pattern of larval development is determined by the level of LIN-14 protein**



The wild-type temporal gradient of LIN-14 may result from post-transcriptional repression of *lin-14* by *lin-4*, beginning early in larval development

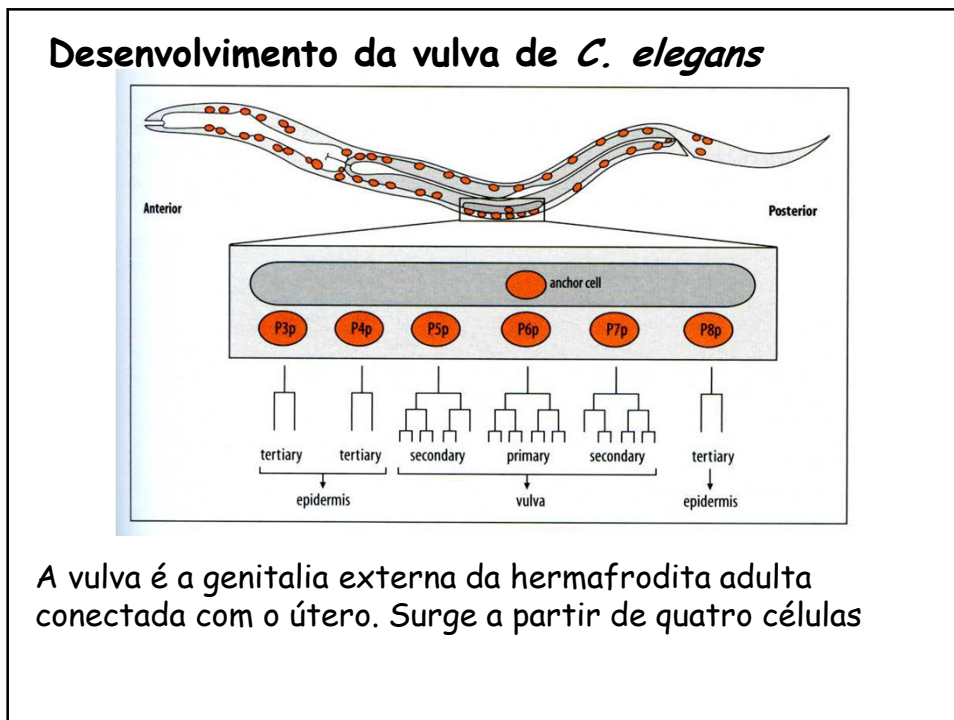
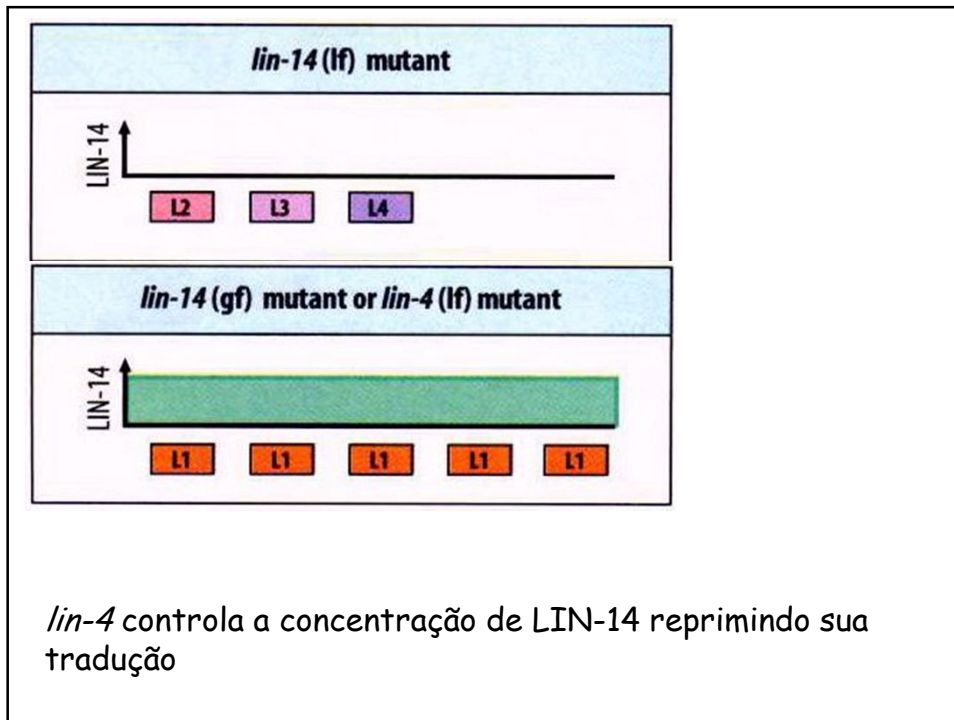
Wild type

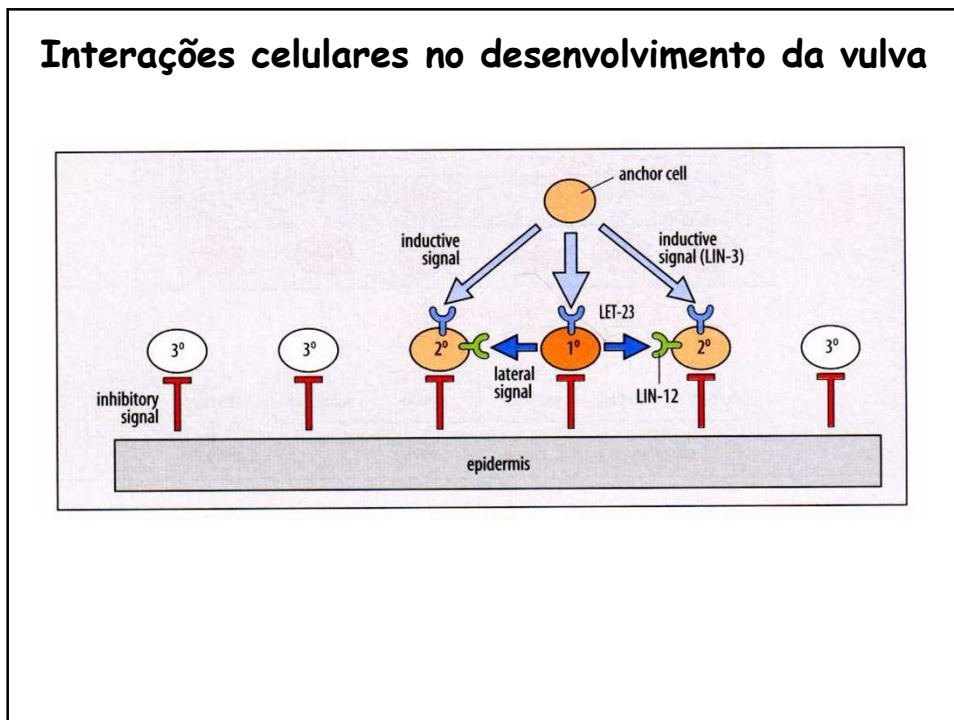
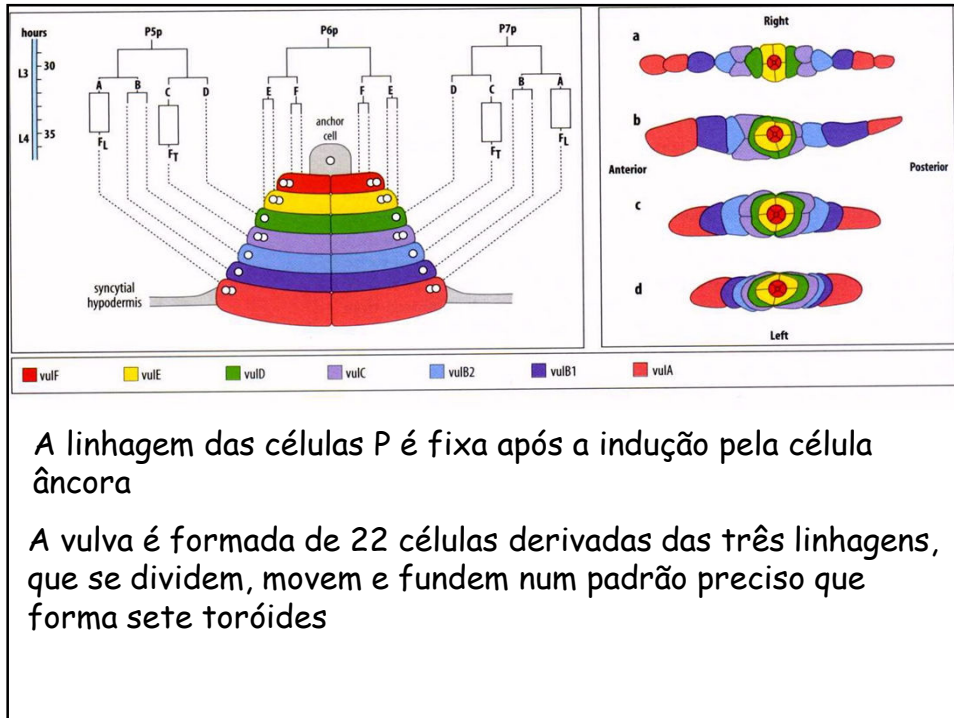


A concentração de LIN-14 cai dez vezes entre L1 e L4

*lin-14* (lf) mutant









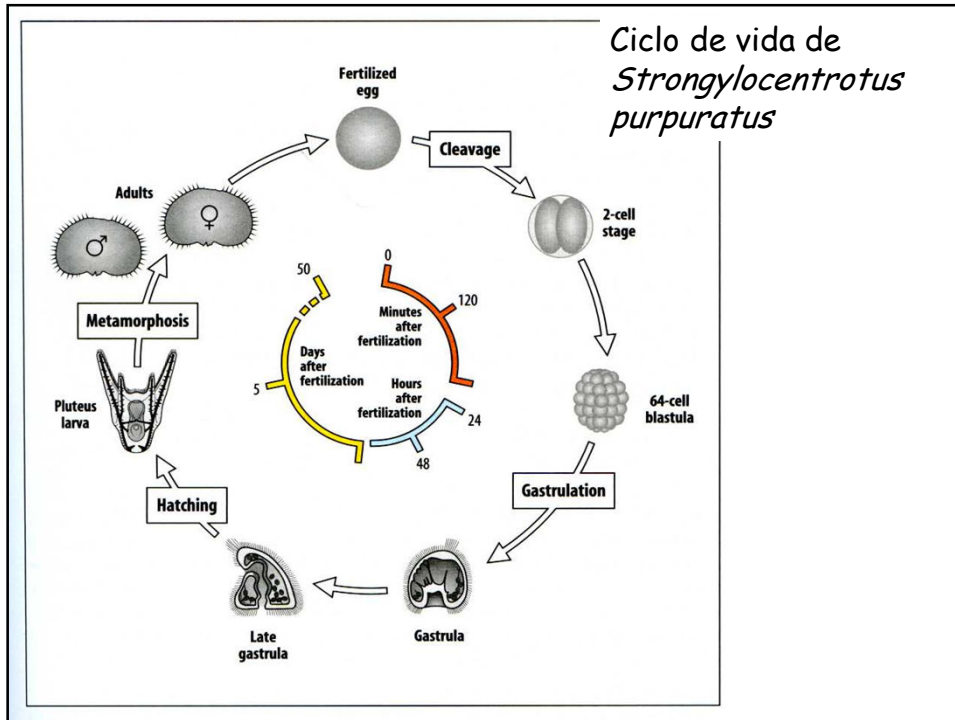
## 2. Ouriços- e Estrelas-do-mar

### **Equinodermos**

Incluem as estrêlas-do-mar e os ouriços-do-mar, além das bolachas-do-mar, um tipo especial de ouriço-do-mar, e os pepinos-do-mar, etc...

Equinodermos são **deuterostômios** - como os vertebrados, são celomados que possuem clivagem radial do ovo e nos quais a invaginação primária do tubo digestivo na gastrulação forma o ânus

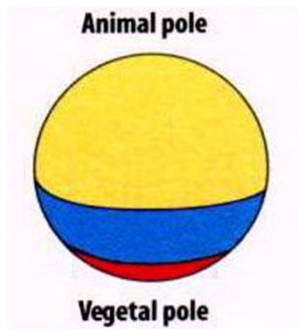
Os artrópodos e nematoides são **protostômios** - a clivagem do zigoto não é radial e a gastrulação forma primariamente a boca. nematoides são pseudo-celomados.





**O ovo de ouriço-do-mar está polarizado ao longo do eixo animal-vegetal**

A

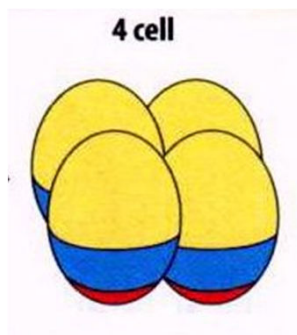


Diferente dos insetos e vertebrados com dois eixos: antero-posterior e dorso-ventral os ouriços tem o eixo animal-vegetal e **oral-aboral**, definido pela posição da boca

V

**O ovo de ouriço-do-mar está polarizado ao longo do eixo animal-vegetal**

A

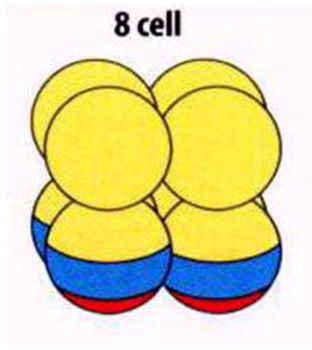


Diferente dos insetos e vertebrados com dois eixos: antero-posterior e dorso-ventral os ouriços tem o eixo animal-vegetal e **oral-aboral**, definido pela posição da boca

V

**O ovo de ouriço-do-mar está polarizado ao longo do eixo animal-vegetal**

A



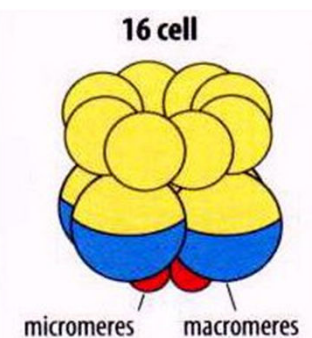
Diferente dos insetos e vertebrados com dois eixos: antero-posterior e dorso-ventral os ouriços tem o eixo animal-vegetal e **oral-aboral**, definido pela posição da boca

Os dois primeiros planos de clivagem são sempre paralelos ao eixo animal-vegetal

V

**O ovo de ouriço-do-mar está polarizado ao longo do eixo animal-vegetal**

A



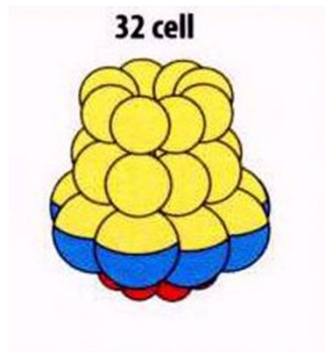
Diferente dos insetos e vertebrados com dois eixos: antero-posterior e dorso-ventral os ouriços tem o eixo animal-vegetal e **oral-aboral**, definido pela posição da boca

Na quarta clivagem (que é desigual) formam-se os **micrômeros** no polo vegetal

V

**O ovo de ouriço-do-mar está polarizado ao longo do eixo animal-vegetal**

A

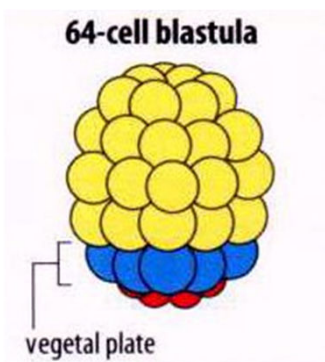


V

Diferente dos insetos e vertebrados com dois eixos: antero-posterior e dorso-ventral os ouriços tem o eixo animal-vegetal e **oral-aboral**, definido pela posição da boca

**O ovo de ouriço-do-mar está polarizado ao longo do eixo animal-vegetal**

A

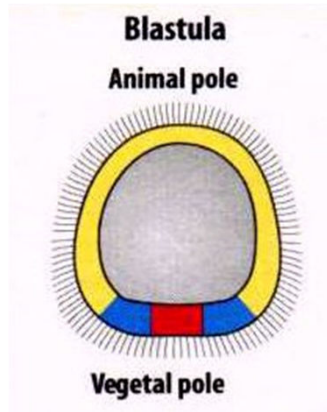


V

Diferente dos insetos e vertebrados com dois eixos: antero-posterior e dorso-ventral os ouriços tem o eixo animal-vegetal e **oral-aboral**, definido pela posição da boca

**O ovo de ouriço-do-mar está polarizado ao longo do eixo animal-vegetal**

A

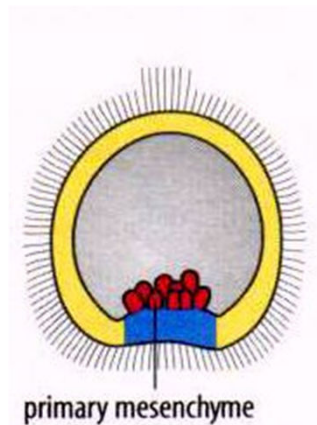


Diferente dos insetos e vertebrados com dois eixos: antero-posterior e dorso-ventral os ouriços tem o eixo animal-vegetal e **oral-aboral**, definido pela posição da boca

V

**O ovo de ouriço-do-mar está polarizado ao longo do eixo animal-vegetal**

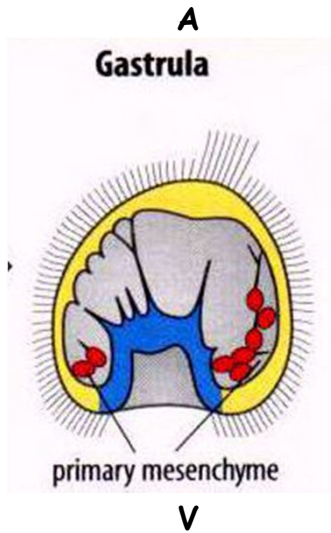
A



Diferente dos insetos e vertebrados com dois eixos: antero-posterior e dorso-ventral os ouriços tem o eixo animal-vegetal e **oral-aboral**, definido pela posição da boca

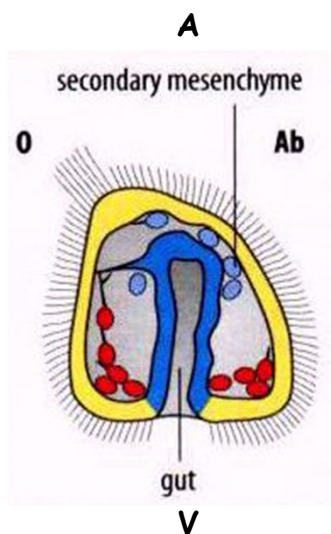
V

**O ovo de ouriço-do-mar está polarizado ao longo do eixo animal-vegetal**



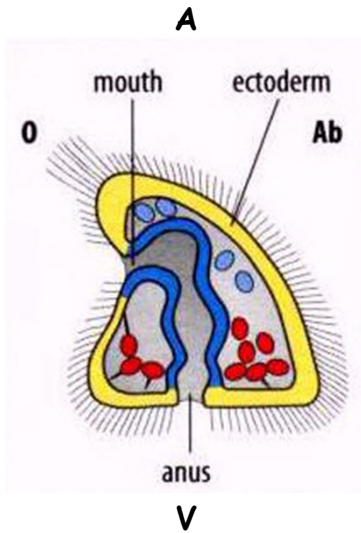
Diferente dos insetos e vertebrados com dois eixos: antero-posterior e dorso-ventral os ouriços tem o eixo animal-vegetal e **oral-aboral**, definido pela posição da boca

**O ovo de ouriço-do-mar está polarizado ao longo do eixo animal-vegetal**



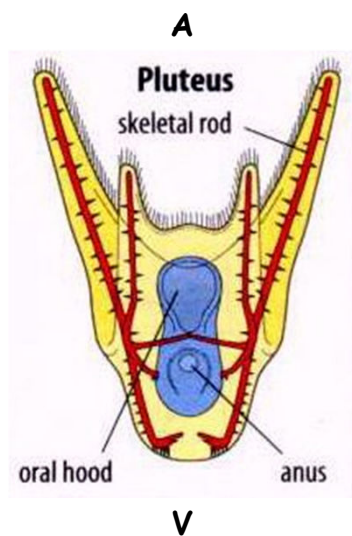
Diferente dos insetos e vertebrados com dois eixos: antero-posterior e dorso-ventral os ouriços tem o eixo animal-vegetal e **oral-aboral**, definido pela posição da boca

**O ovo de ouriço-do-mar está polarizado ao longo do eixo animal-vegetal**



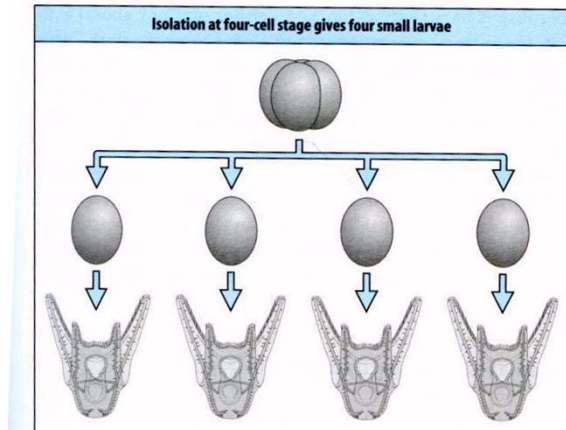
Diferente dos insetos e vertebrados com dois eixos: antero-posterior e dorso-ventral os ouriços tem o eixo animal-vegetal e **oral-aboral**, definido pela posição da boca

**O ovo de ouriço-do-mar está polarizado ao longo do eixo animal-vegetal**



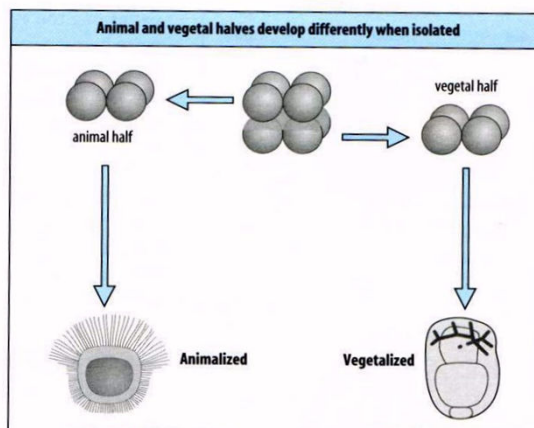
Diferente dos insetos e vertebrados com dois eixos: antero-posterior e dorso-ventral os ouriços tem o eixo animal-vegetal e **oral-aboral**, definido pela posição da boca

O eixo animal-vegetal é estável e não pode ser alterado por centrifugação, que redistribui organelas como as mitocôndrias e os grânulos de vitelo



Blastômeros isolados da blástula de 2 ou 4 células são totipotentes

O eixo animal-vegetal é estável e não pode ser alterado por centrifugação, que redistribui organelas como as mitocôndrias e os grânulos de vitelo

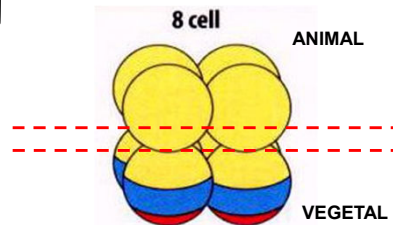


Blastômeros isolados da blástula de 2 ou 4 células são totipotentes

As metades animal e vegetal do estágio de oito células têm destinos diferentes



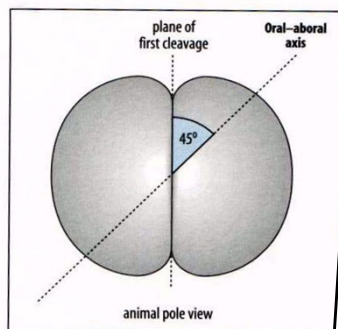
Algumas vezes, no entanto a metade vegetal do estágio de oito células pode formar um pluteus normal se a terceira clivagem for ligeiramente deslocada em direção ao polo animal



Conclusão: há diferenças maternas já estabelecidas ao longo do eixo animal-vegetal

Apesar destas diferenças o embrião de ouriço-do-mar tem clara capacidade de regulação -> interação célula-célula <- micrômeros

### Eixo oral-aboral está relacionado ao plano da primeira clivagem

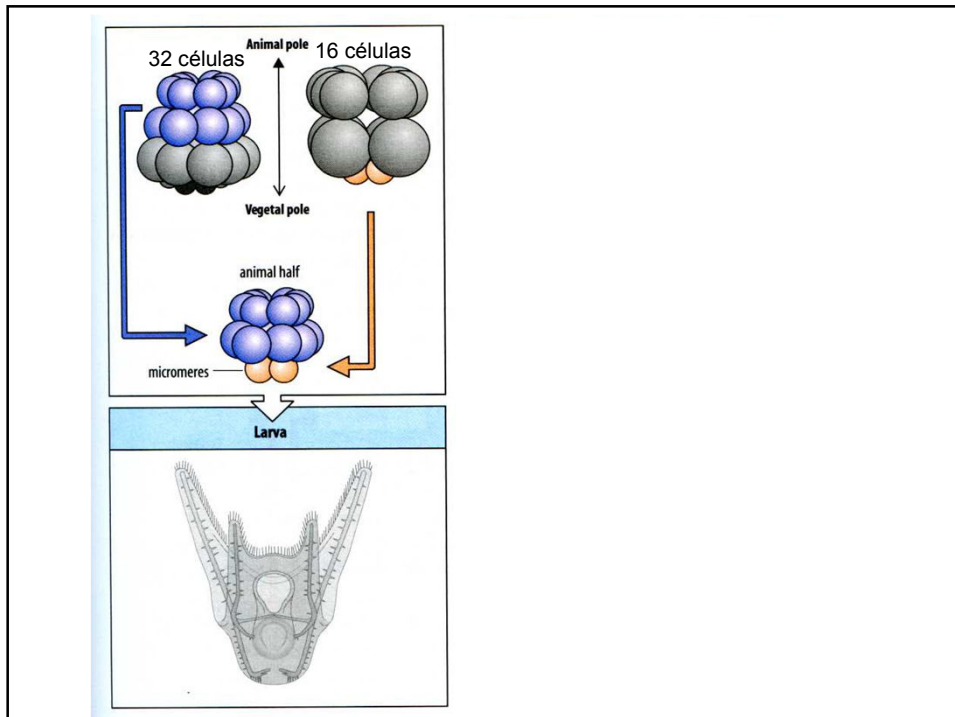
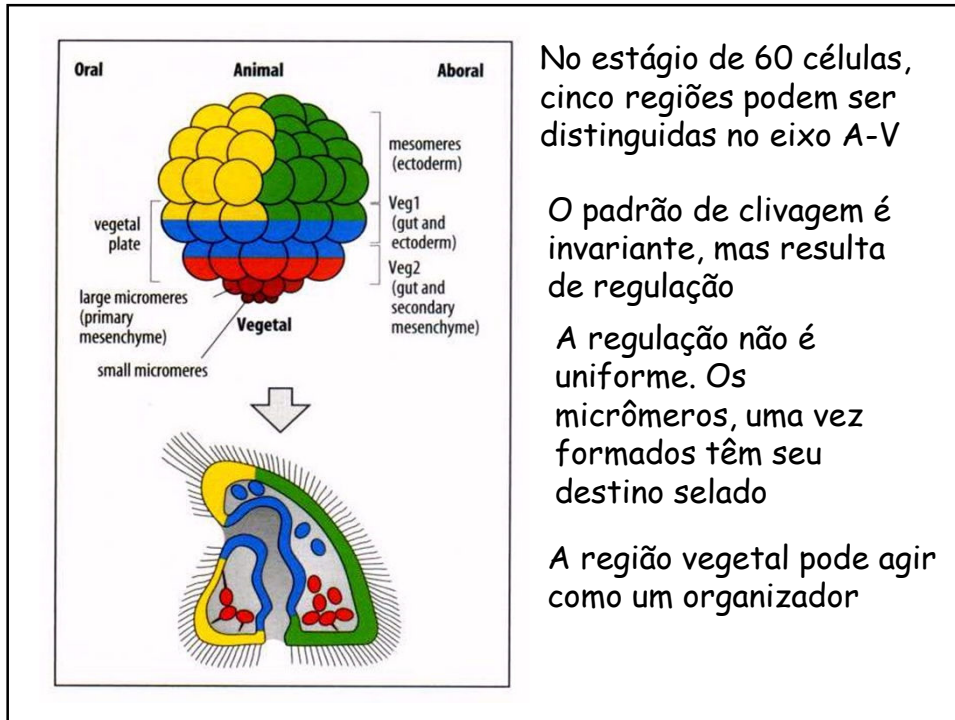


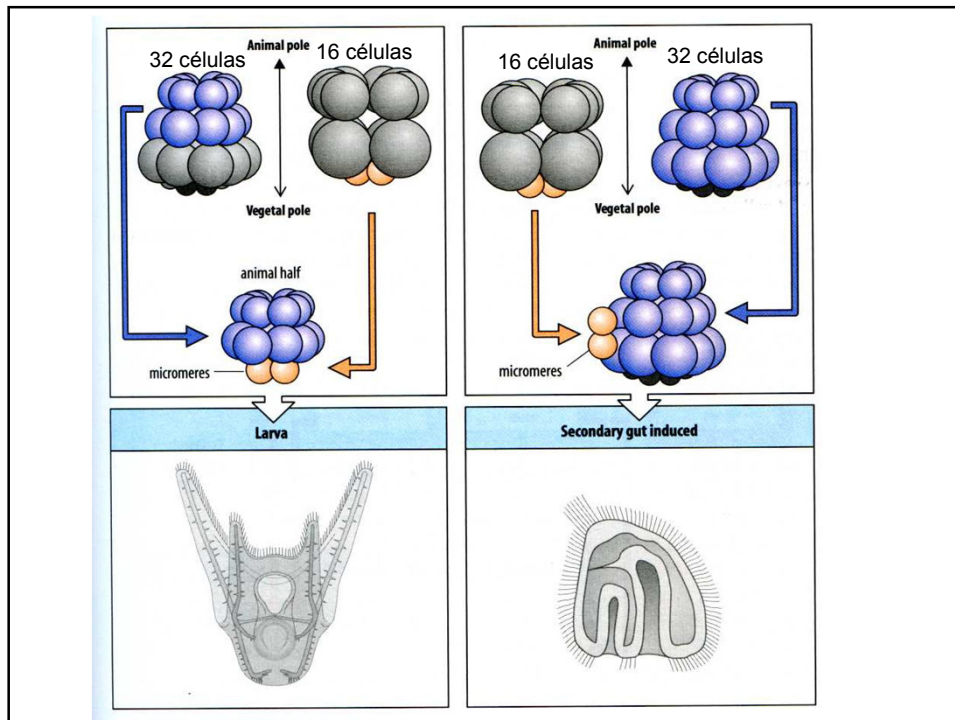
O futuro eixo oral-aboral fica a 45° do plano da primeira clivagem

Isso é válido somente para *Strongylocentrotus purpuratus*. Em outras espécies o ângulo é diferente. A expressão de Nodal (membro da família dos TGF- $\beta$ ) na futura ectoderme oral

ocorre no estágio com 60-120 células. Um dos primeiros genes zigóticos a ser expresso







A região vegetal é especificada pelo acúmulo nuclear de  $\beta$ -catenina

Os blastômeros iniciais acumulam  $\beta$ -catenina materna nos seus núcleos por ativação da via canônica de Wnt

No núcleo  $\beta$ -catenina age para ativar a expressão de genes zigóticos -> a concentração é maior nos núcleos dos micrômeros e ausente na região animal da futura ectoderme

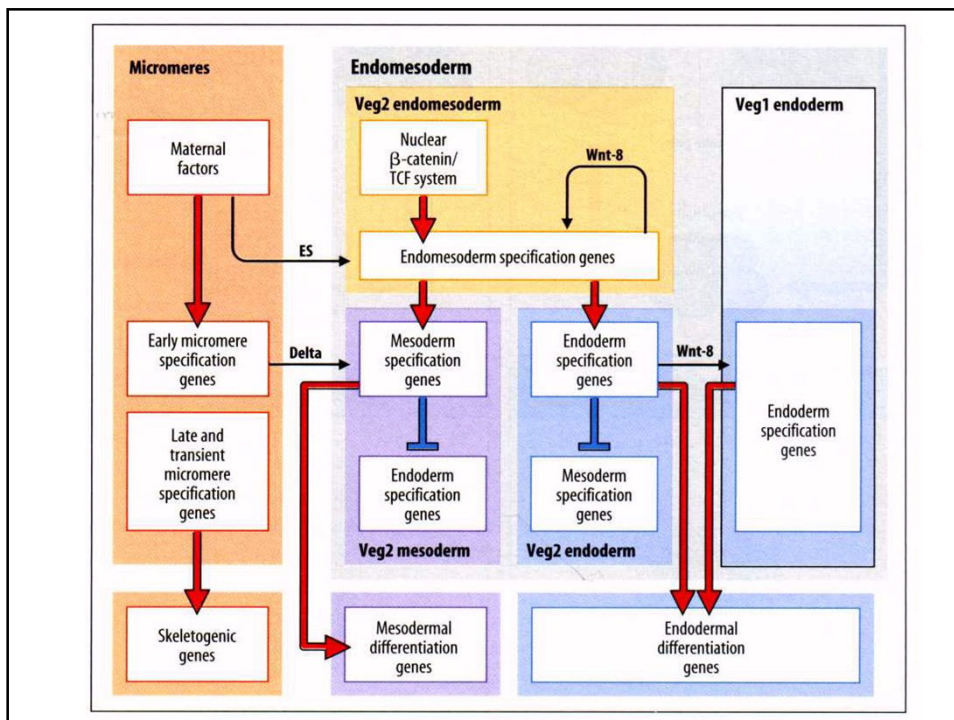
$\beta$ -catenina nuclear promove destino vegetal. Lítio, que inibe a degradação de  $\beta$ -catenina, induz vegetalização

Após formados, os micrômeros produzem um sinal, até agora não identificado, que induz o estado endomesodérmico nas células Veg2

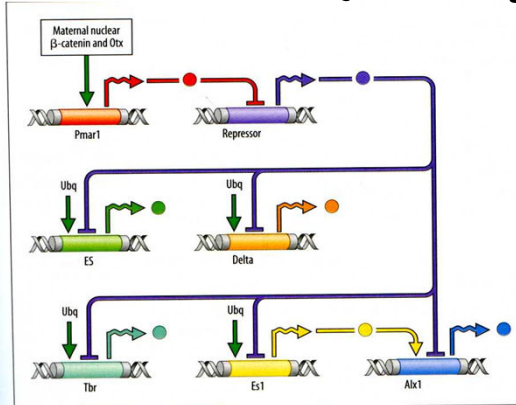
Uma série de sinais a curta distância especifica a endoderme e a mesoderme

A rede de regulação gênica que governa a determinação do destino celular é muito bem conhecida em ouriço-do-mar

Essa rede compreende a descrição dos fatores de transcrição envolvidos e os genes que eles regulam



## Especificação dos micrômeros e ativação da sua função de organizador



Quarta clivagem -> β-catenina materna e Otx (fator de transcrição) no núcleo dos micrômeros ativam *pmar 1*

*Pmar 1* reprime um putativo "repressor dos micrômeros", ativo no resto das células do embrião

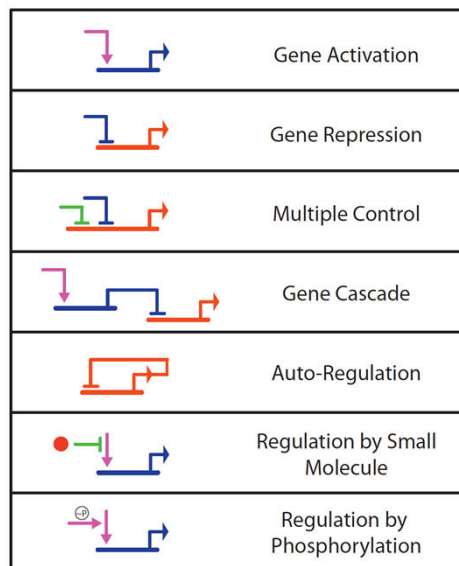
**Ubq** = reguladores positivos ubíquos

**Es** = "early signal" que induz o destino endomesoderme de Veg2 entre a 4a e 6a clivagens

**Delta** = sinal que induz destino de mesênquima secundário em Veg2 após a 7a clivagem

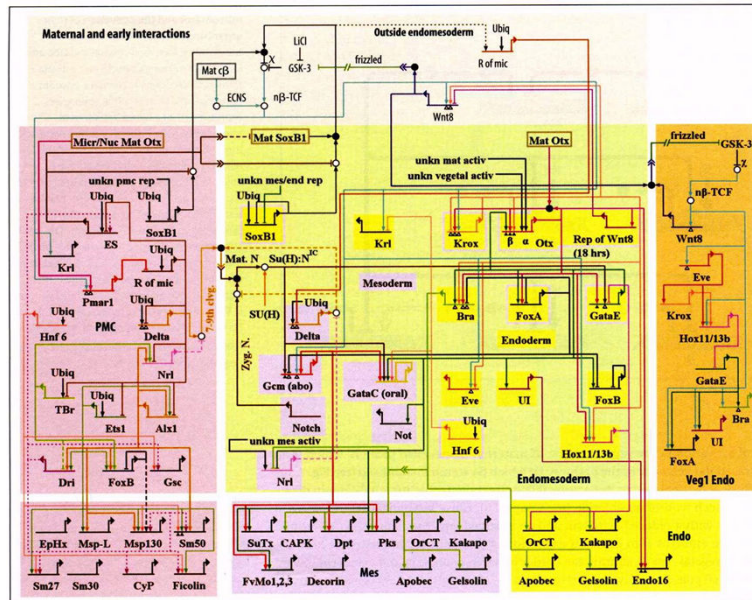
**Tbr, Ets1 e Alx1** = reguladores transcricionais

## Vários motivos simples de regulação gênica



Sauro, *Enzyme kinetics for Systems Biology*, 2011

Esta é somente uma parte de uma rede ainda maior



Apesar de não se conhecer todos os genes que controlam o desenvolvimento do ouriço-do-mar, alguns foram bem estudados

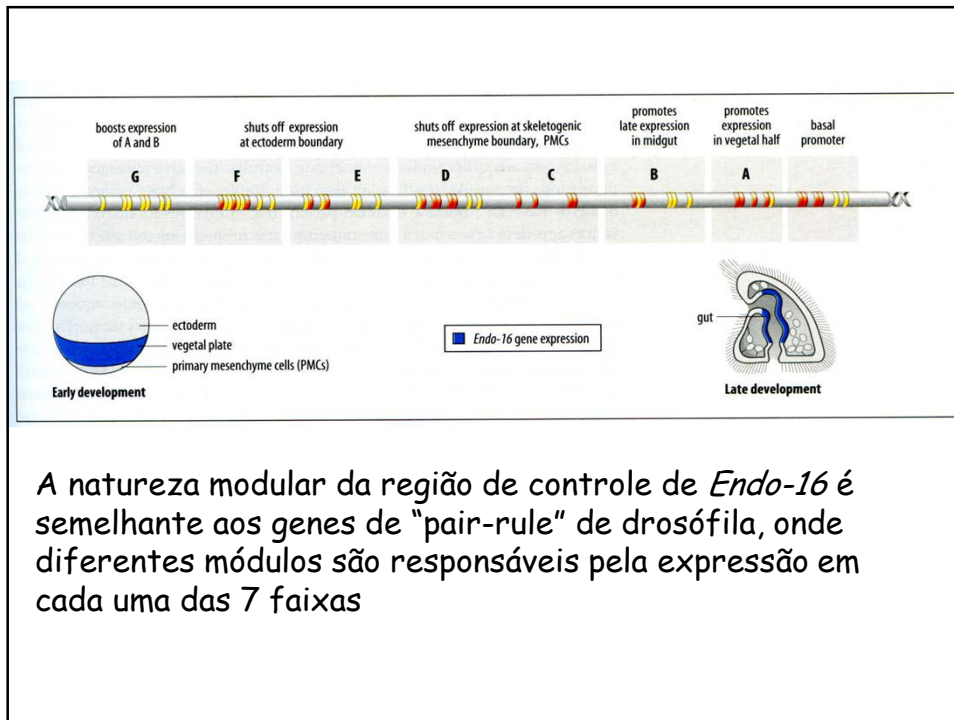
Por exemplo, o gene *Endo-16* possui uma região reguladora extremamente complexa e modular

*Endo-16* é inicialmente expresso na região vegetal da blástula, na futura endoderme

Após a gastrulação a expressão de *Endo-16* aumenta e fica confinada à região mediana do tubo digestivo

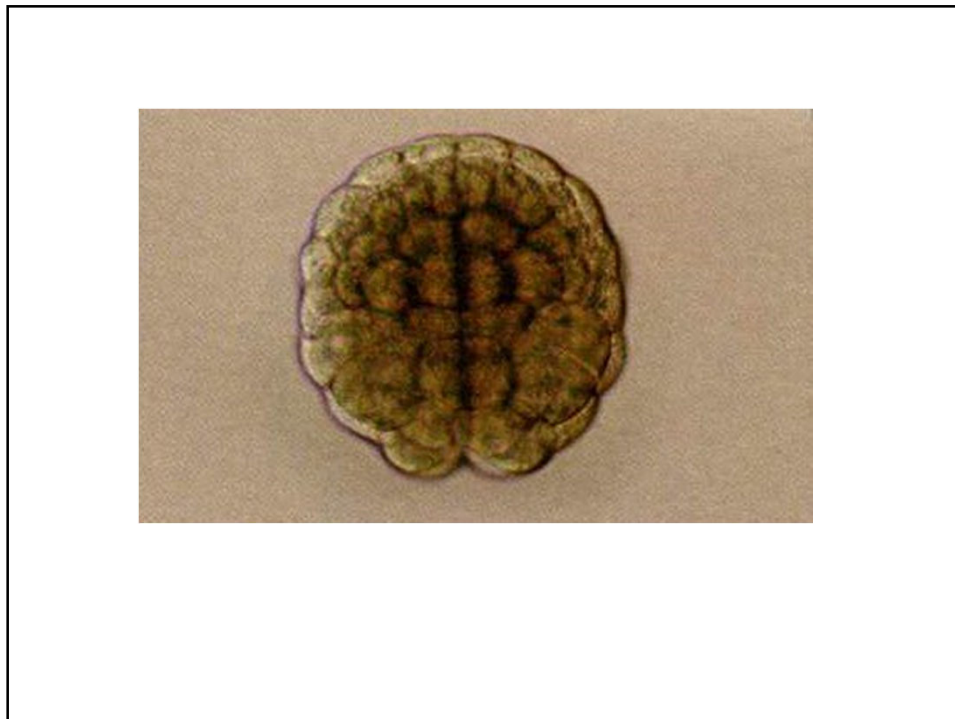
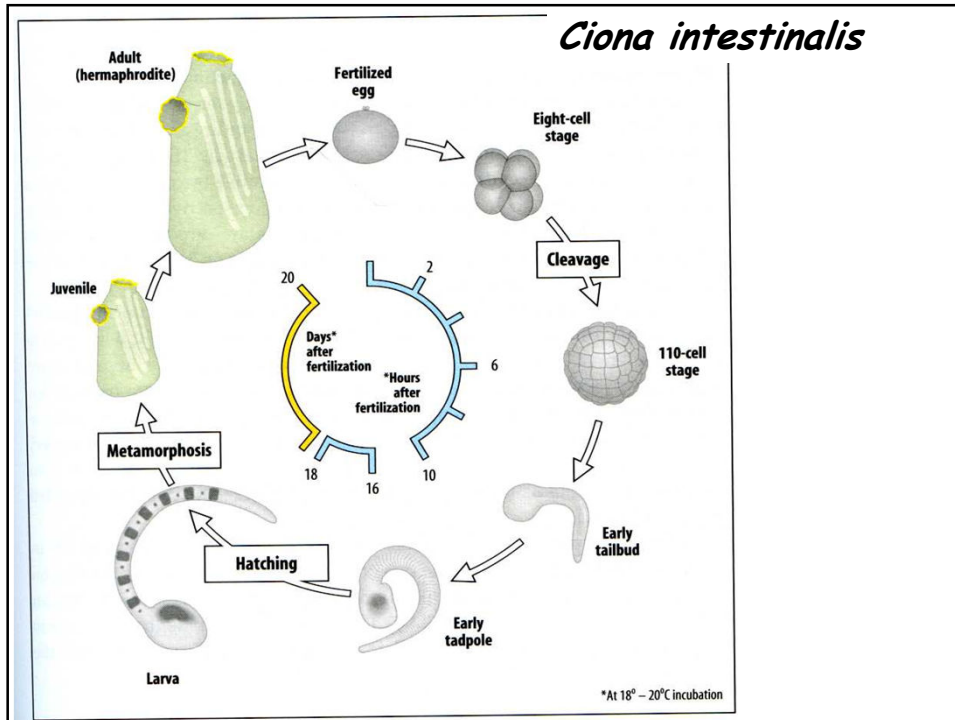
A região reguladora de *Endo-16* tem 2200 pb e contem ao menos 30 sítios alvo aos quais se ligam 13 fatores de transcrição diferentes

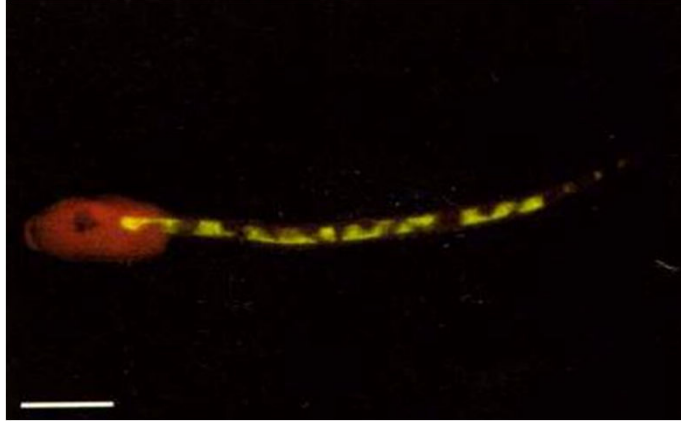
Esses sítios reguladores se agrupam em diversas sub-regiões, ou módulos, cuja função foi determinada por ligação a genes repórteres



### 3. *Ascídia Ciona intestinalis*









As ascídias adultas, também conhecidas como tunicados, são animais marinhos sésseis

Eles são urocordados, que são incluídos no mesmo filo - os Chordata - que os vertebrados

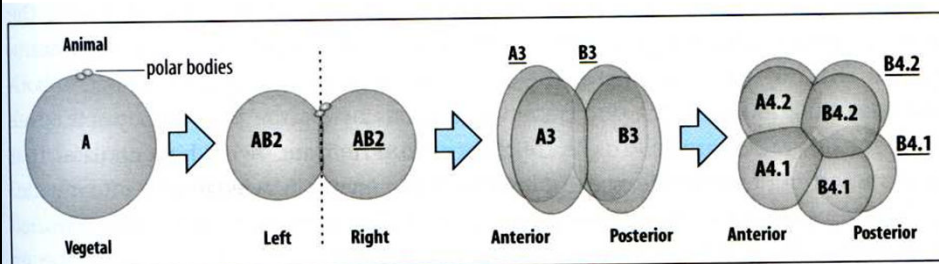
Diferente dos embriões de vertebrados, os embriões de ascídias apresentam um padrão de clivagem invariante

Fatores citoplasmáticos localizados parecem ter um papel importante na especificação do destino das células desses cordados marinhos

O genoma de *Ciona intestinalis* foi inteiramente sequenciado e contém ~15.800 genes

As ascídias compartilham com drosófila a expressão de genes Hox na ectoderme, coisa que os vertebrados não apresentam

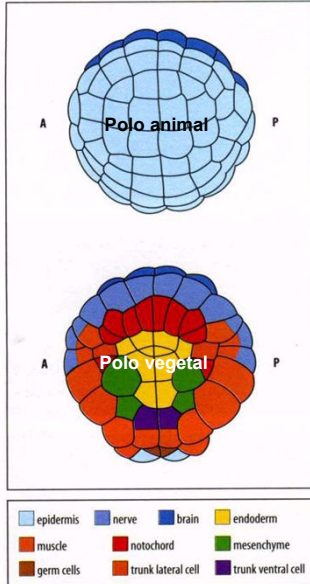
Como os ovos de ouriço-do-mar, os de ascídias também apresentam uma polarização A-V



$\beta$ -catenina acumulada no núcleo de células vegetais especifica a endoderme nesta região, como acontece com ouriço-do-mar

A primeira clivagem passa pelo local da formação do corpúsculo polar e define o futuro eixo antero-posterior, perpendicular ao eixo A-V

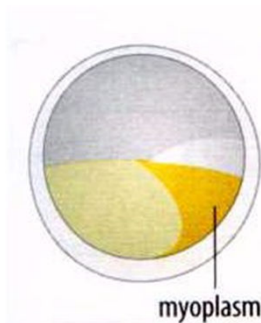
O lado posterior é estabelecido pelos movimentos corticais induzidos pela entrada do espermatozóide



No estágio de 110 células, quando começa a gastrulação, o destino de cada blastômero fica restrito ao seu destino específico

Se cultivados individualmente a partir deste estágio, os blastômeros se desenvolvem na célula especificada pelo seu mapa do destino

### Desenvolvimento dos músculos e determinantes citoplasmáticos na ascídia *Styela*

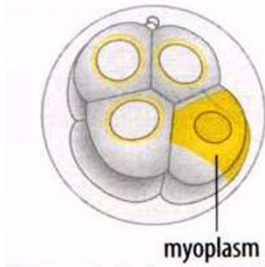


Crescente amarelo no momento da primeira clivagem

Antes da fertilização os grânulos amarelos estão uniformemente distribuídos

Após a fertilização há um rearranjo do citoesqueleto, formando-se o crescente amarelo

## Desenvolvimento dos músculos e determinantes citoplasmáticos na ascídia *Styela*

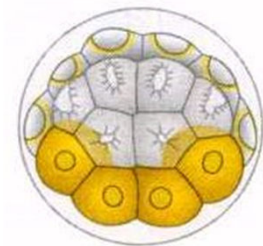


Crescente amarelo  
no estágio de 8  
células

Antes da fertilização os grânulos amarelos estão uniformemente distribuídos

Após a fertilização há um rearranjo do citoesqueleto, formando-se o crescente amarelo

## Desenvolvimento dos músculos e determinantes citoplasmáticos na ascídia *Styela*

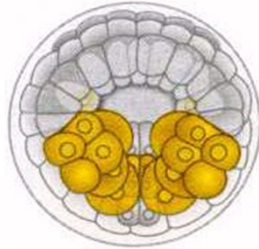


Estágio de 22 células

Antes da fertilização os grânulos amarelos estão uniformemente distribuídos

Após a fertilização há um rearranjo do citoesqueleto, formando-se o crescente amarelo

## Desenvolvimento dos músculos e determinantes citoplasmáticos na ascídia *Styela*



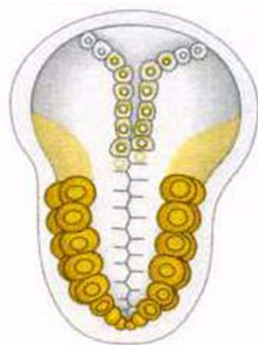
Gástrula com ~180 células

Antes da fertilização os grânulos amarelos estão uniformemente distribuídos

Após a fertilização há um rearranjo do citoesqueleto, formando-se o crescente amarelo

O crescente amarelo originará a parte posterior do embrião, onde se inicia a gastrulação

## Desenvolvimento dos músculos e determinantes citoplasmáticos na ascídia *Styela*



Girino jovem  
Vista Dorsal

Antes da fertilização os grânulos amarelos estão uniformemente distribuídos

Após a fertilização há um rearranjo do citoesqueleto, formando-se o crescente amarelo

O crescente amarelo originará a parte posterior do embrião, onde se inicia a gastrulação

As células que herdam os grânulos amarelos originarão a musculatura da cauda do girino

## Desenvolvimento dos músculos e determinantes citoplasmáticos na ascídia *Styela*



Girino jovem  
Vista lateral

Antes da fertilização os grânulos amarelos estão uniformemente distribuídos

Após a fertilização há um rearranjo do citoesqueleto, formando-se o crescente amarelo

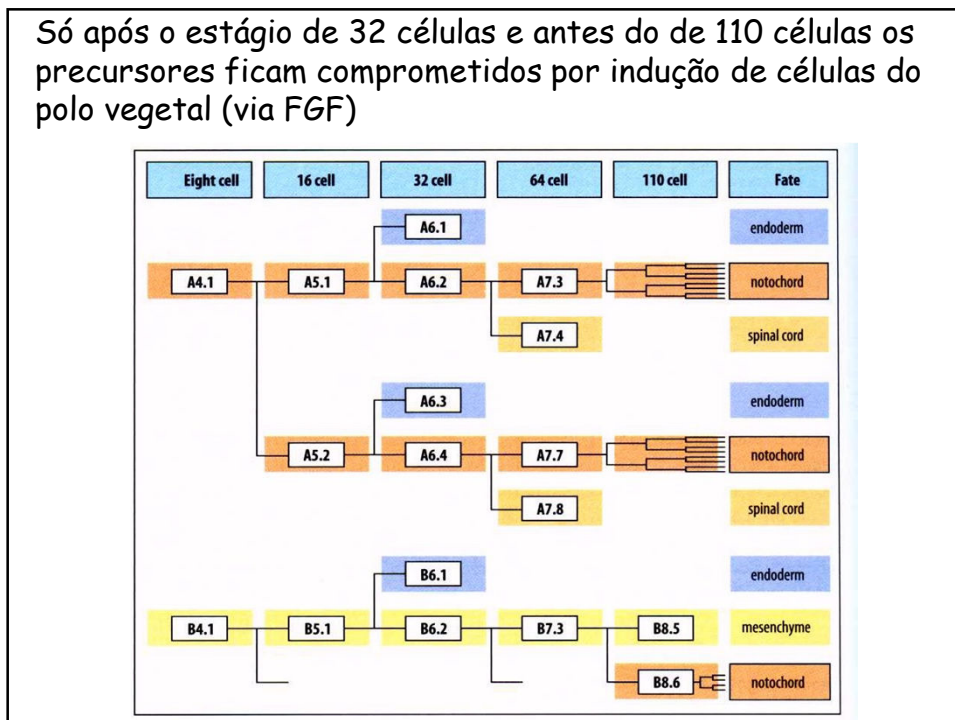
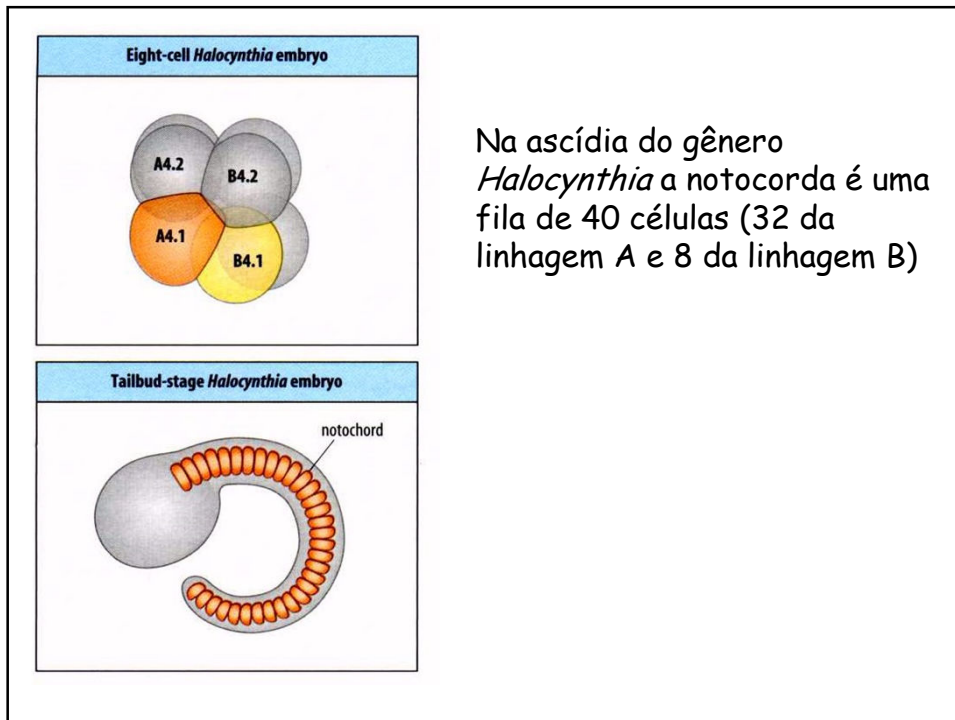
O crescente amarelo originará a parte posterior do embrião, onde se inicia a gastrulação

As células que herdam os grânulos amarelos originarão a musculatura da cauda do girino

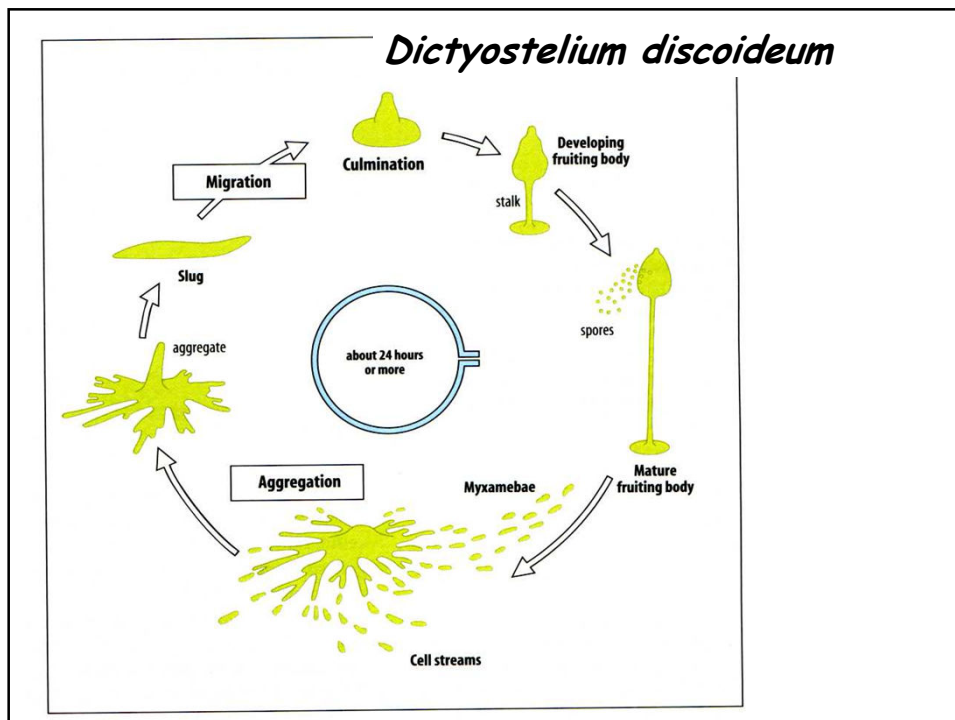
## Desenvolvimento do mesênquima e da notocorda em ascídias necessita de sinais da endoderme

Se blastômeros do estágio de 32 células são isolados, todos se transformam em células musculares

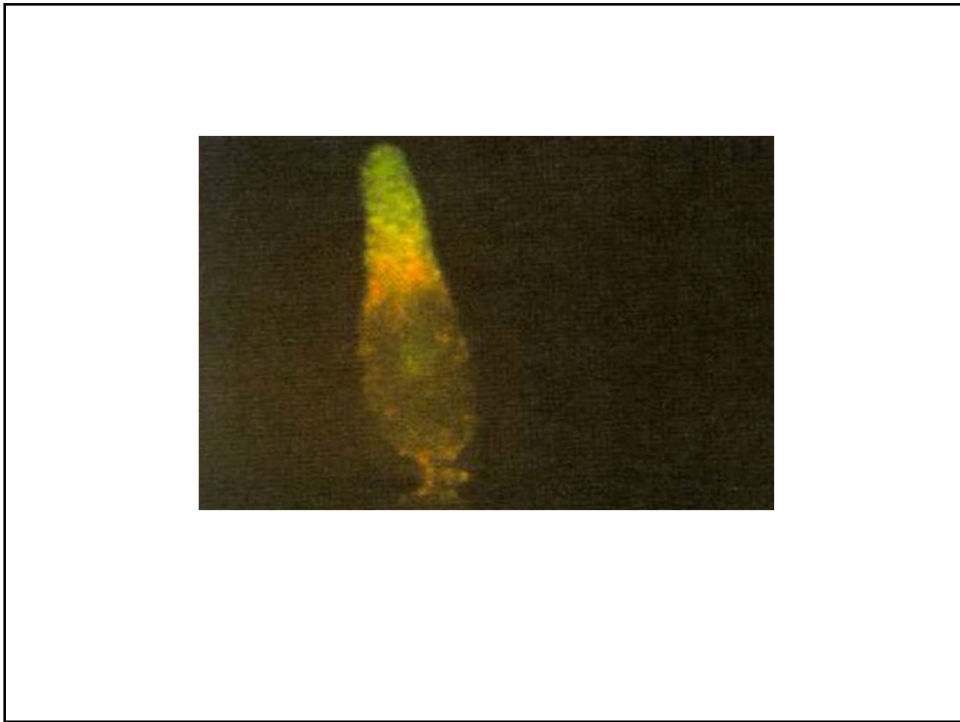
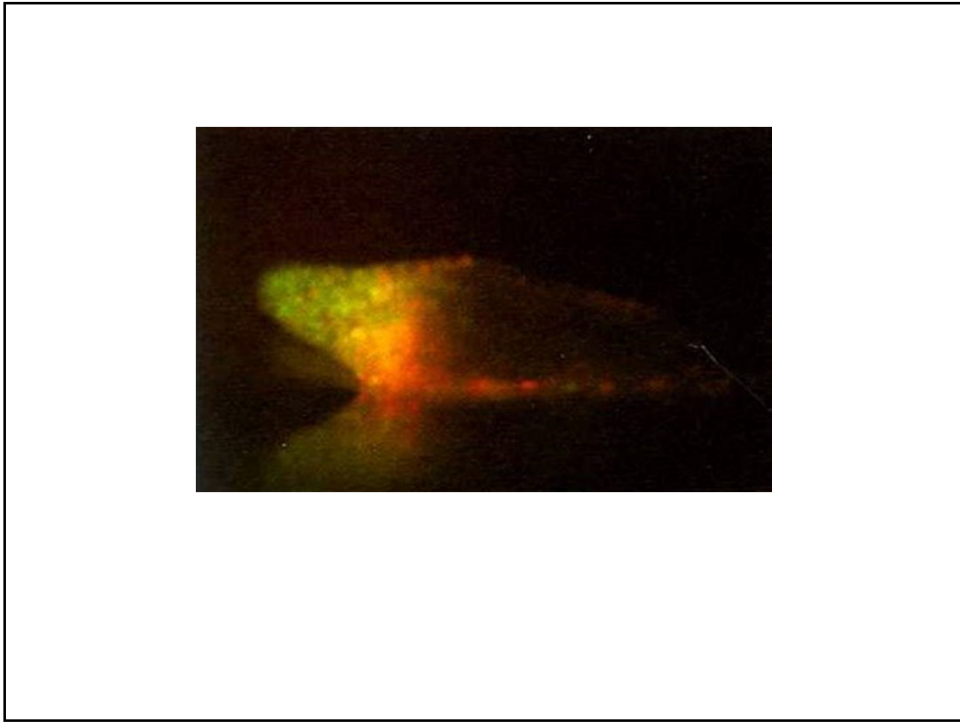
A endoderme manda um sinal (FGF) para essas células suprimindo seu desenvolvimento como células musculares



## 4. *Dictyostelium discoideum*



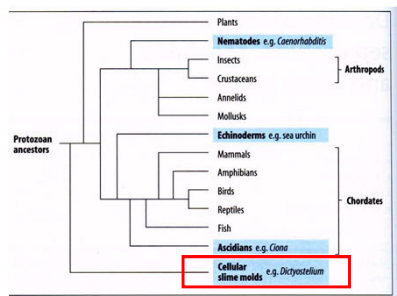






Mixomicetos possuem paredes celulares de celulose em alguns estágios do seu ciclo de vida e formam esporos como plantas, mas possuem células com movimento e morfogênese como animais

Análise de genes de mixomicetos mostram que eles divergiram da linhagem eucariótica antes dos ancestrais das plantas e dos animais.



Alternam fases unicelulares e multicelulares no ciclo

Uma "lesma" pode ter até 100.000 células!

Pode-se usar transposons tipo elemento P para mapear genes em *D. discoideum*

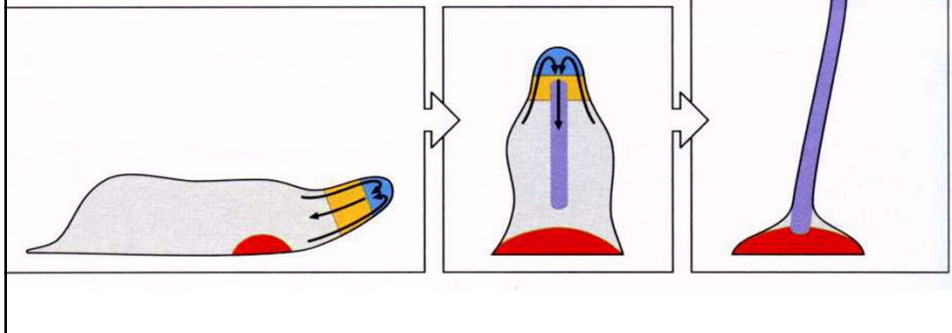
O ciclo de vida envolve a diferenciação em células do talo ou esporos, movimentos e rearranjos celulares

A formação dos agregados iniciais e morfogênese subsequente é mediada primariamente por cAMP agindo como quimioatratante

O genoma de *D. discoideum* possui 12.500 genes, pouco menos que os 13.800 de drosófila

As **células do pré-talo** formam o talo, migrando para trás através da região do **pré-esporo** e empurra essa região para cima

O que especifica as células do pré-esporo posteriores e as células do pré-talo anteriores?



### Dois mecanismos foram propostos para isso

1. Há algum mecanismo que proporciona informação posicional para as células na "lesma"
2. Regulação está envolvida na diferenciação de células em locais aleatórios, que então se separam para dar o padrão normal.

Ambos os mecanismos estão envolvidos na construção do padrão da "lesma", com separação nos estágios iniciais.

A razão inicial de células pré-talo e pré-esporo está baseado no estágio do ciclo celular

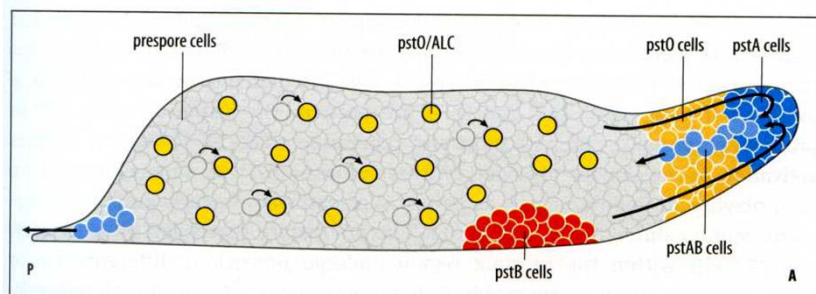
Células carenciadas no início do ciclo celular se diferenciam preferencialmente em pré-talo

cAMP e fator 1 de indução de diferenciação (DIF-1)(hexafenona clorada) controlam a diferenciação do pré-talo. As células se separam do agregado e formam a "lesma"

Dentro da região do pré-talo há diversos tipos celulares: células do pré-talo A, O, B e AB

Células A ocupam a metade anterior da região do pré-talo, células O ocupam a metade posterior

Diversas moléculas de adesão estão envolvidas na migração e separação das células



Células pstA - verdes  
Células pstO - vermelhas

Movimentos de células pstA e pstO numa lesma migratória de *Dictyostelium* (weijer1.mov)



Movimentos de células pstA e pstO durante a culminação (weijer2.mov)

