

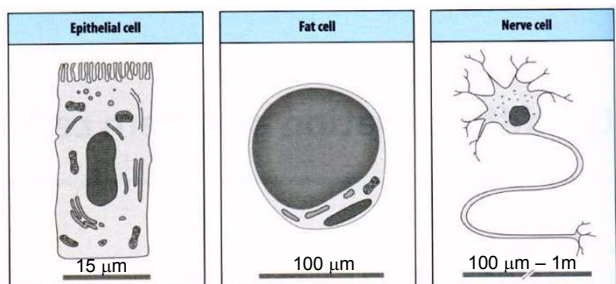
Aula 10

Diferenciação celular e células-tronco

1

Muitos processos no desenvolvimento, como a especificação das camadas germinativas, envolvem mudanças transitórias de forma, padrões de atividade gênica e de proteínas sintetizadas

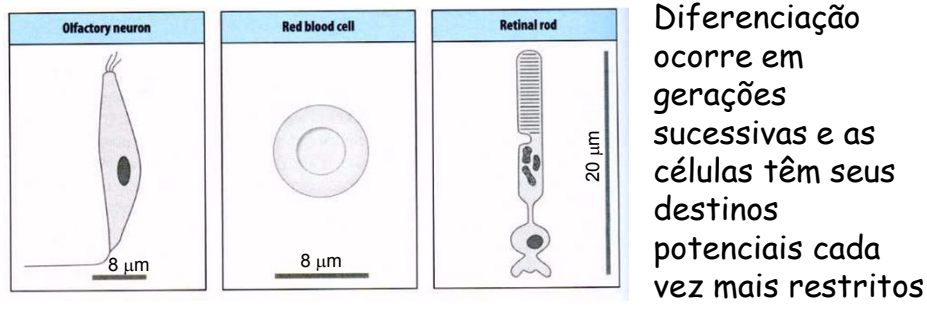
Diferenciação celular, em contraste, envolve a emergência gradual de tipos celulares que possuem uma identidade evidente no adulto, como células musculares, células nervosas e células adiposas



2

Muitos processos no desenvolvimento, como a especificação das camadas germinativas, envolvem mudanças transitórias de forma, padrões de atividade gênica e de proteínas sintetizadas

Diferenciação celular, em contraste, envolve a emergência gradual de tipos celulares que possuem uma identidade evidente no adulto, como células musculares, células nervosas e células adiposas



Diferenciação ocorre em gerações sucessivas e as células têm seus destinos potenciais cada vez mais restritos

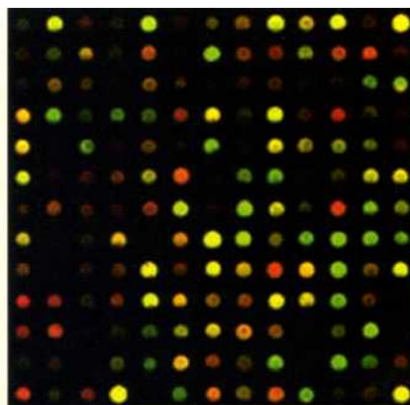
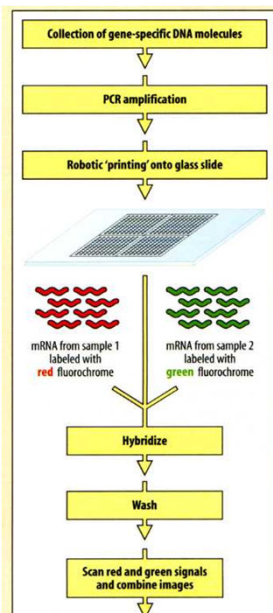
As células diferenciadas servem funções especializadas e atingem um estágio terminal e geralmente estável

Como nos processos iniciais do desenvolvimento a característica central da diferenciação é uma mudança na expressão gênica

Isso leva à produção de proteínas de luxo ("luxury proteins") ou célula-específicas que caracterizam uma célula completamente diferenciada

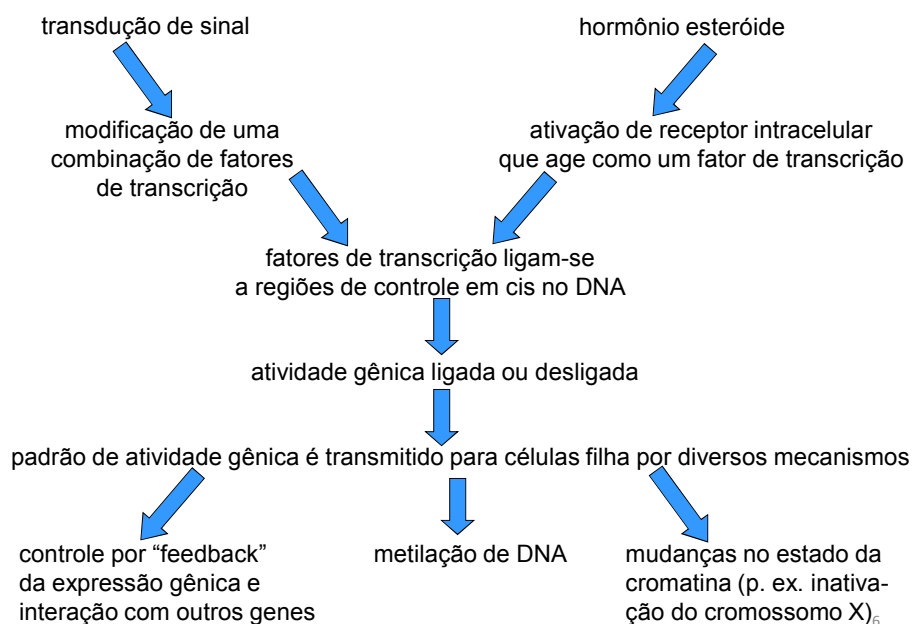
Além destas proteínas de luxo as células diferenciadas também expressam proteínas "da economia doméstica" ("housekeeping")

Os níveis de expressão de muitos genes num tecido podem agora ser determinados pela técnica de microarranjo de DNA



5

O controle da expressão gênica



Modelos de diferenciação celular

Diferenciação celular não está confinada ao embrião

Diversos tecidos adultos, como sangue, pele, e epitélio do tubo digestivo, estão sendo regenerados continuamente a partir de células tronco indiferenciadas

Consideraremos também células de músculo esquelético, que apesar de surgirem principalmente no embrião, podem ser renovadas se necessário a partir de células tronco no adulto

7

Todas as células sanguíneas são derivadas de células-tronco multipotentes

Uma célula-tronco multipotente é uma célula tronco que pode dar origem a muitos tipos diferentes de células diferenciadas

Todas as células sanguíneas no mamífero adulto originam-se de uma população de células tronco multipotentes localizadas na medula óssea

Essas células tronco se auto-regeneram e são as precursoras de células progenitoras que ficam destinadas a uma das linhagens hematopoiéticas

A hematopoiese é um sistema em desenvolvimento em miniatura, no qual uma única célula - a célula tronco multipotente - dá origem a muitos tipos celulares diferentes

8

Uma medida da complexidade do processo é dada pelo número de proteínas expressas nas células tronco hematopoéticas do fígado fetal:

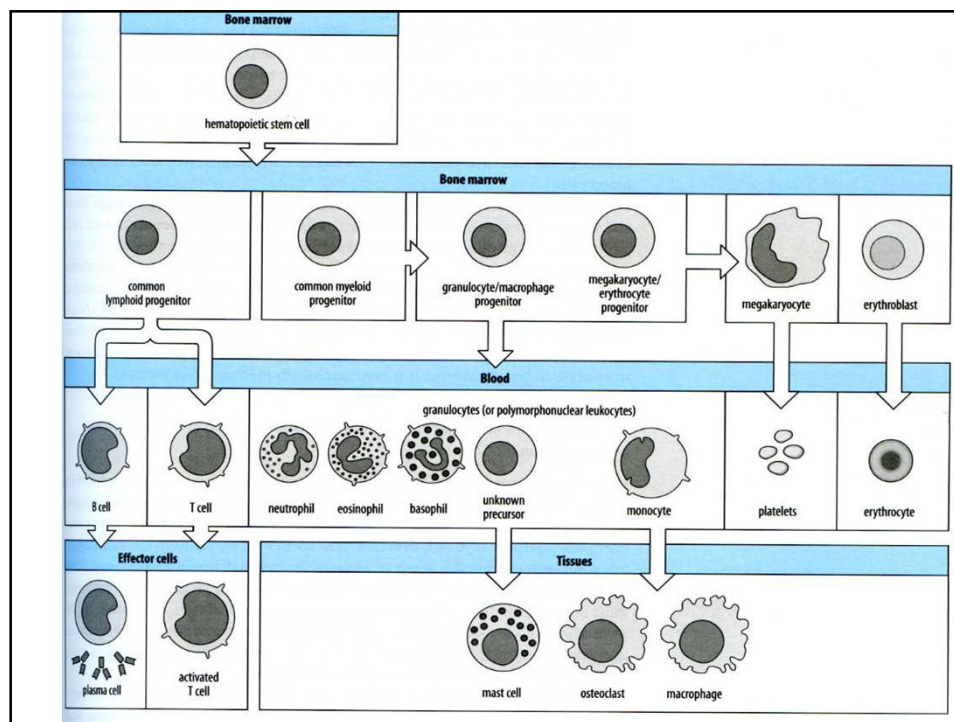
200 fatores de transcrição

200 proteínas associadas à membrana

150 moléculas sinalizadoras

As células tronco para hematopoiese de mamíferos são derivadas da mesoderme. Elas colonizam inúmeros locais incluindo o fígado fetal, timo, baço e medula óssea

9



Dentro da medula óssea, os diferentes tipos de células sanguíneas e seus precursores estão intimamente misturadas com células do tecido conectivo - células do estroma medular

A capacidade de se renovar e diferenciar mostrada pelas células tronco é estritamente regulada pelas células e moléculas do seu micro ambiente - o "*nicho*" que elas habitam

O nicho das células tronco da hematopoiese é fornecido pelas células do estroma da medula óssea

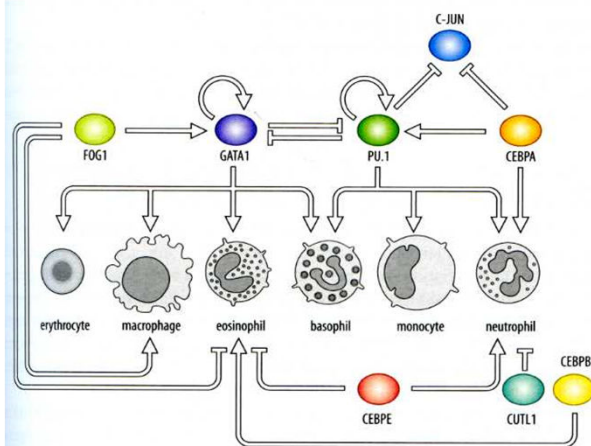
Dentro da medula óssea, os diferentes tipos de células sanguíneas e seus precursores estão intimamente misturadas com células do tecido conectivo - células do estroma medular

A capacidade de se renovar e diferenciar mostrada pelas células tronco é estritamente regulada pelas células e moléculas do seu micro ambiente - o "*nicho*" que elas habitam

O nicho das células tronco da hematopoiese é fornecido pelas células do estroma da medula óssea

Proteínas sinalizadoras secretadas, da família Wnt, junto com outros sinais das células do estroma são necessárias para manter a proliferação das células tronco

Hematopoiese é caracterizada pelas atividades de fatores de transcrição hierárquicos



Alguns são expressos só em células imaturas e não são linhagem específicos - como o proto-oncogene c-Myb

Nos precusores das células sanguíneas o fator *GATA1*, só é encontrado nos

precusores de eritrócitos e algumas linhagens mielóides e necessário para a diferenciação delas

13

[*GATA1*] ↓ → eosinófilos

[*GATA1*] ↑ → eritrócitos
megacariócitos

PU.1 inibe a atividade de *GATA1* e vice-versa

A combinação dos fatores é responsável pelo padrão específico de expressão gênica que leva à diferenciação de um dado tipo de célula

Como a atividade de todos esses fatores é controlada?

Há 20 proteínas extracelulares, conhecidas como fatores estimuladores de colônias (CSF) que transmitem sinais para controlar a atividade dos fatores de transcrição

14

Foram descritos tanto fatores estimuladores como inibidores da proliferação e diferenciação

Alguns fatores hematopoiéticos de crescimento e suas células alvo	
Tipo de fator de crescimento	Células hematopoiética respondedora
Eritropoietina (EPO)	Progenitores eritróides
Fator estimulador de colônia de Granulócito (G-CSF)	Granulócitos, neutrófilos
Fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago (GM-CSF)	Granulócitos, macrófagos
Interleucina-3	Células precursoras multipotentes
Fator de célula tronco (SCF)	Células tronco
Fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF)	Macrófagos, granulócitos

Nem todos os fatores que controlam a produção de células sanguíneas são feitos por células sanguíneas ou do estroma

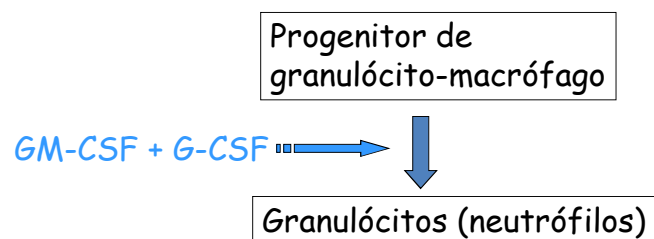
EPO é produzida principalmente pelos rins em resposta a sinais fisiológicos que indicam falta de células sanguíneas

15

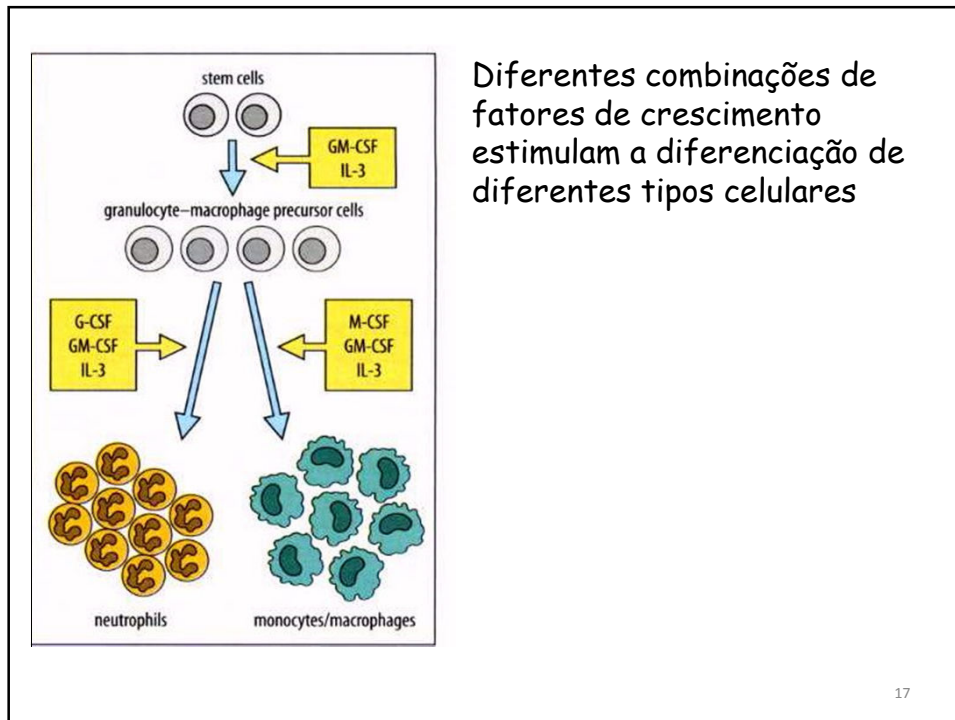
Há evidências que o comprometimento de uma célula com uma ou outra via da linhagem mielóide seja um evento ao acaso

Os fatores de crescimento simplesmente promoveriam a sobrevivência de algumas linhagens celulares

GM-CSF é necessário para o desenvolvimento da maioria das células mielóides a partir dos progenitores iniciais



16



A principal característica na diferenciação dos eritrócitos é a biossíntese de grandes quantidades de hemoglobina

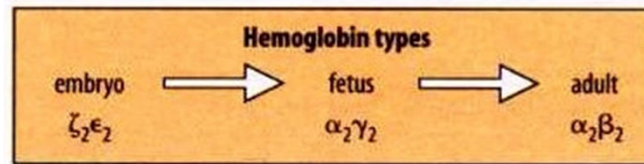
Expressão de globina é controlada por sequências reguladoras muito distantes das regiões codificadoras

Isso envolve a regulação coordenada de dois conjuntos de genes de globina controlada por fatores de transcrição *GATA2* e *GATA1* que se ligam a sítios nos genes de globina e recrutam outras proteínas reguladoras

$\alpha_2\beta_2$ = hemoglobina de vertebrados

Genes de α -globina e β -globina pertencem a diferentes famílias multigênicas, cada uma com um conjunto de genes localizados em diferentes cromossomos

Em mamíferos diferentes membros de cada família são expressos em vários estágios do desenvolvimento

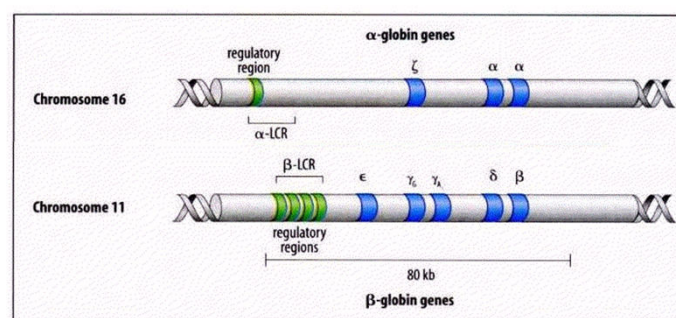


A troca de hemoglobinas nos mamíferos é uma adaptação a diferentes necessidades para transporte de oxigênio em diferentes estágios da vida

A hemoglobina fetal humana tem maior afinidade por oxigênio do que a hemoglobina adulta e assim obtém o oxigênio liberado pela hemoglobina materna na placenta

19

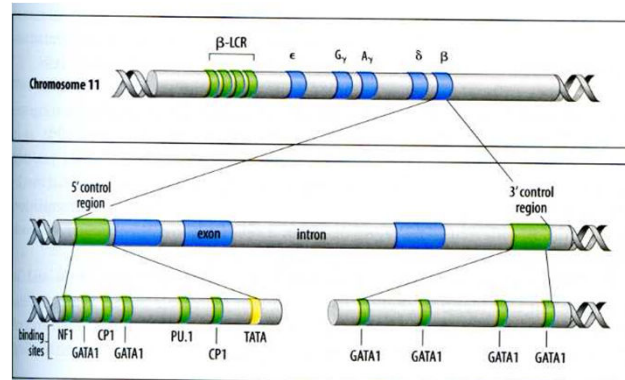
O conjunto de genes de β -globina humana contém cinco genes: ϵ , γ_G , γ_A , δ e β



Esses genes são expressos em diferentes épocas do desenvolvimento: ϵ no saco vitelínico do embrião; os dois genes γ , que codificam proteínas que diferem num único aminoácido, são expressos no fígado embrionário; e os genes δ e β são expressos nos precursores eritróides da medula óssea adulta

20

Mutações nos genes de globina são a causa de diversas doenças hereditárias relativamente comuns como a ciclemia



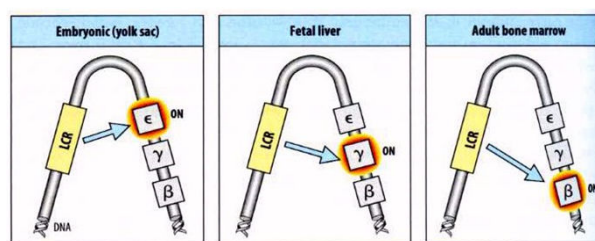
As regiões de controle que regulam a expressão do grupo de genes de β -globina são complexas e longas

No entanto, essas regiões não são suficientes para regular a expressão correta dos genes de β -globina

21

O ligar e desligar sucessivo dos diferentes genes do cluster de β -globina durante o desenvolvimento depende de uma região a uma distância considerável do gene ϵ

Esta é a região do controle do locus (LCR) que tem 10.000pb e fica a uma distância de 5.000pb do lado 5' do gene ϵ



Proteínas ligadas à LCR interagem com promotores de genes sucessivos de globina por causa de uma dobra no DNA que separa a LCR dos genes de globina

LCR promove a transição de iniciação para alongamento da transcrição por pol II

22

Diferenciação celular é causada por associações reversíveis das proteínas reguladoras com o DNA ou modificações enzimáticas reversíveis do DNA e histonas, produzindo o padrão de expressão gênica

Há casos raros nos quais o DNA numa célula diferenciada se torna irreversivelmente alterado.

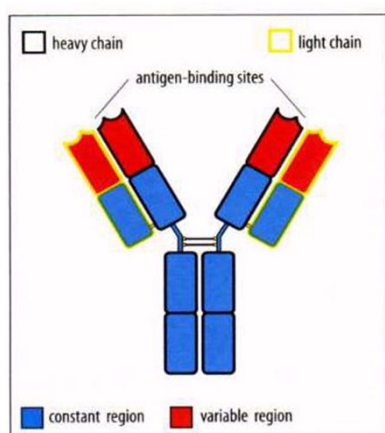
O único exemplo conhecido em vertebrados são os linfócitos B e T do sistema imune que também são derivados das células tronco hematopoiéticas

Examinaremos aqui os linfócitos B - células que originam as células plasmáticas produtoras de anticorpo

Estima-se que o sistema imune humano pode produzir até 10^{15} moléculas diferentes de anticorpo, que variam na capacidade de se ligar a diferentes antígenos

23

Esta extraordinária diversidade surge de um mecanismo especial de recombinação que monta genes completos de anticorpo, durante a diferenciação celular, pela combinação de algumas centenas de segmentos gênicos



Uma molécula de anticorpo, ou imunoglobulina, é composta de duas cadeias "leves" idênticas e duas cadeias "pesadas" maiores, também idênticas

Há dois sítios de ligação a antígenos em cada anticorpo, que determinam a especificidade pelo antígeno

24

As regiões variáveis dos genes para cadeias leves e pesadas são montadas por rearranjos irreversíveis de DNA durante o desenvolvimento dos linfócitos B

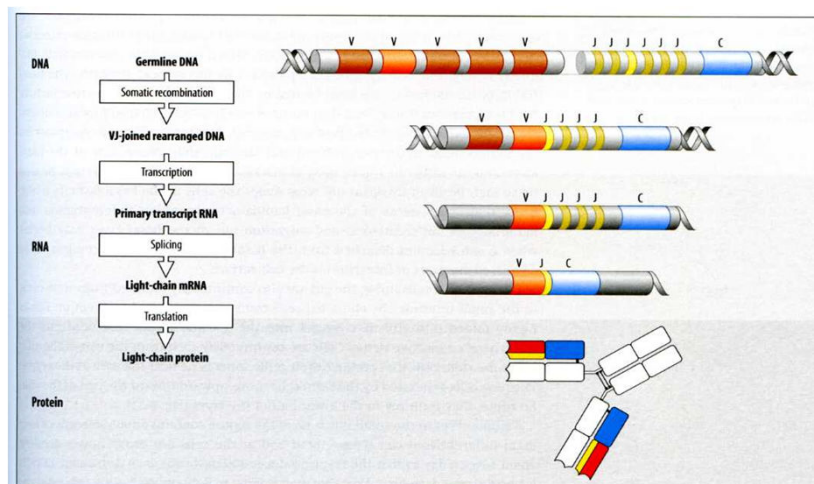
Cada célula B diferenciada expressa somente um tipo de cadeia pesada e um tipo de cadeia leve, e produz uma imunoglobulina específica para um tipo de antígeno

Cada região variável da cadeia pesada é codificada numa sequência de DNA construída por três segmentos gênicos diferentes -> V, D e J

Cada região variável da cadeia leve é codificada por somente dois segmentos gênicos -> V e J

Durante o desenvolvimento dos linfócitos B, ocorrem diversos eventos de recombinação que montam genes completos de cadeias leves e pesadas

25

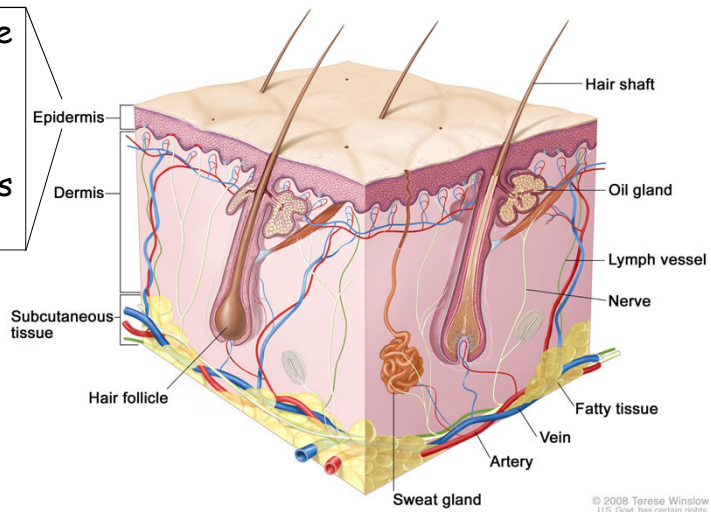


Um gene do segmento V é movido por recombinação e fica próximo a um dos segmentos J

26

A pele dos mamíferos é composta de três camadas:

Epiderme -> que contém principalmente células cheias de queratina, os queratinócitos

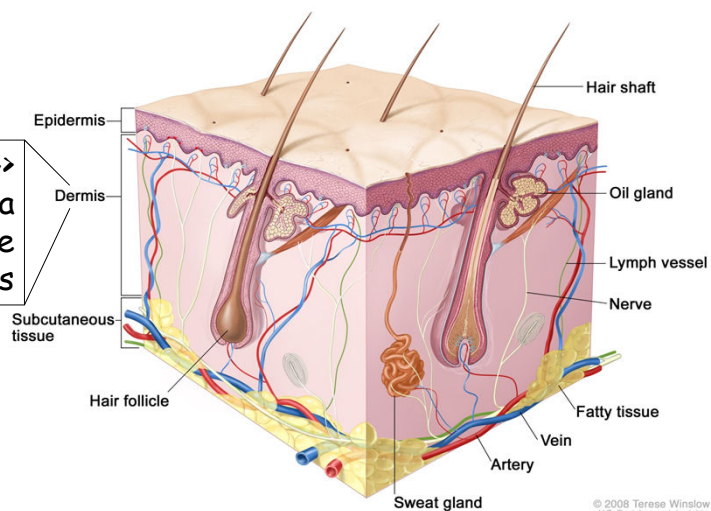


© 2008 Terese Winslow
U.S. Govt. has certain rights

<http://www.curetoday.com/tumor/cll/screening/cdr0000258037>

A pele dos mamíferos é composta de três camadas:

Derme -> composta principalmente de fibroblastos

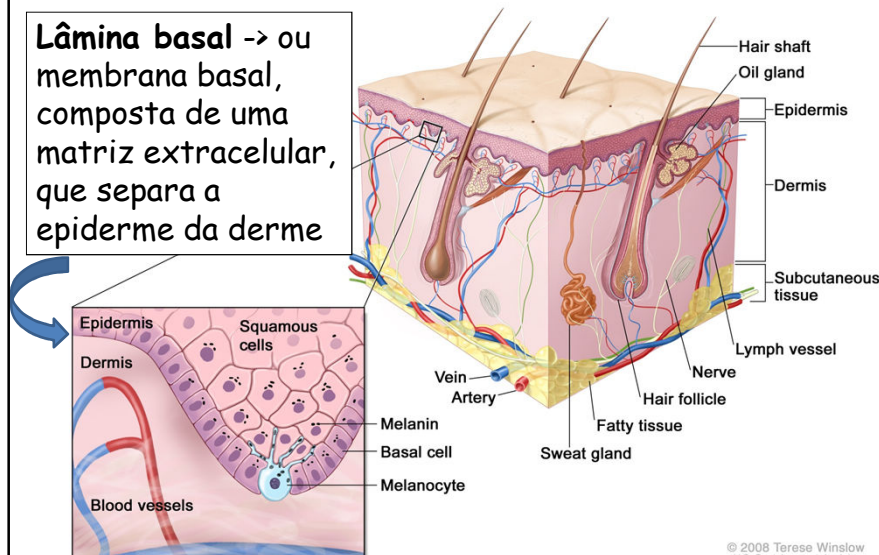


© 2008 Terese Winslow
U.S. Govt. has certain rights

<http://www.curetoday.com/tumor/cll/screening/cdr0000258037>

A pele dos mamíferos é composta de três camadas:

Lâmina basal -> ou membrana basal, composta de uma matriz extracelular, que separa a epiderme da derme



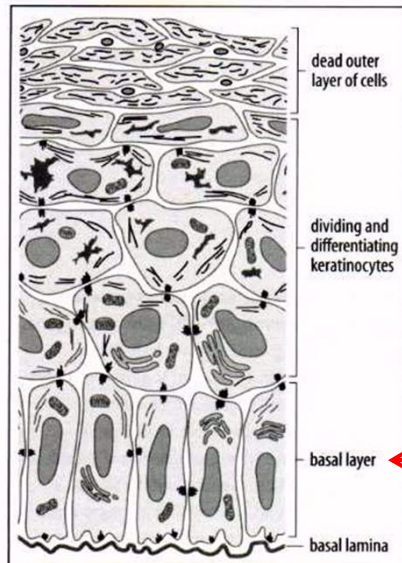
© 2008 Terese Winslow
U.S. Govt. has certain rights

<http://www.curetoday.com/tumor/cll/screening/cdr0000258037>

A epiderme, compreende um epitélio com múltiplas camadas de queratinócitos, folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas

Por causa da função protetora da epiderme, células são continuamente perdidas da superfície externa e devem ser repostas por células tronco, durante toda a vida do indivíduo

EPIDERME



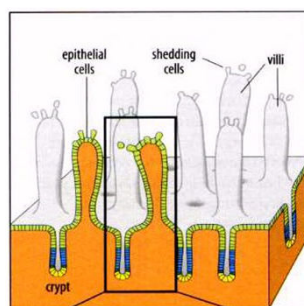
As células tronco estão localizadas na camada basal da epiderme

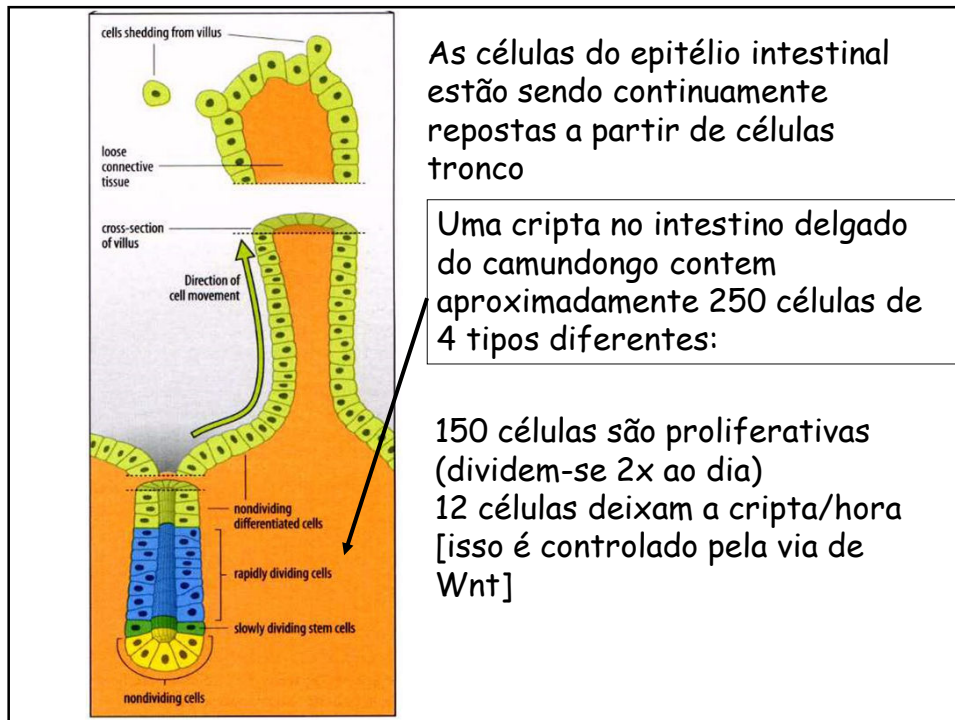
As células tronco se dividem assimetricamente: uma célula-filha permanece uma célula tronco e outra está destinada a se diferenciar

Esta célula ainda se divide mais algumas vezes após deixar a camada basal

31

As células do epitélio intestinal estão sendo continuamente repostas a partir de células tronco





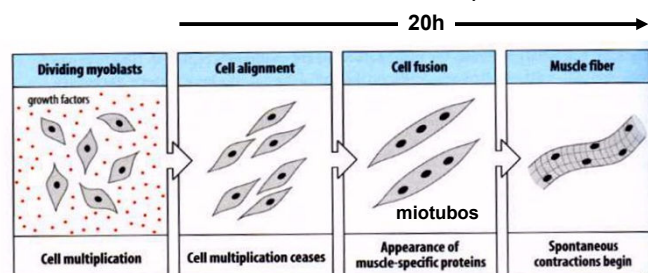
Ativação de transcrição músculo-específica

Consideraremos aqui os músculos esqueléticos

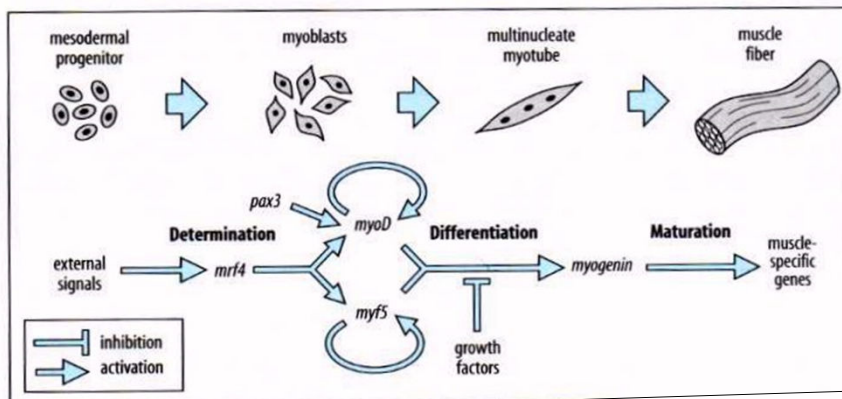
A diferenciação dos **mioblastos**, células destinadas a formar o músculo, pode ser estudada *in vitro*

Os mioblastos se dividem até que retiremos os fatores de crescimento do meio

As células começam a produzir proteínas específicas de músculo como actina, miosina II e tropomiosina



34



myoD irá induzir diferenciação em músculos quando transfetado em fibroblastos

Camundongos knock-out para myoD são normais se myf5 estiver ativo -> são redundantes

35

MyoD e Myf5 são fosforiladas por proteína quinases dependentes de ciclina, ativadas em pontos chave do ciclo celular

Quando MyoD e Myf5 são fosforiladas, ficam sujeitas a degradação proteolítica

Em células que se dividem ativamente os fatores miogênicos estão em baixa concentração

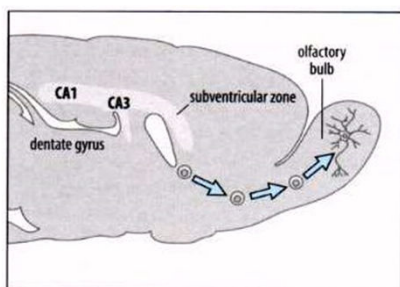
Por sua vez a miogenina e MyoD ativam transcrição de membros da família de proteínas p21, que bloqueiam o ciclo celular, fazendo as células saírem do CC e diferenciar

Há uma oposição entre proliferação e diferenciação terminal

36

Nos músculos adultos há células chamadas **células satélite** que podem proliferar e se diferenciar em novas células musculares

Essas células satélite ficam entre a lâmina basal e as fibras musculares e são reconhecidas por expressar a proteína de superfície CD34 e o fator de transcrição Pax7



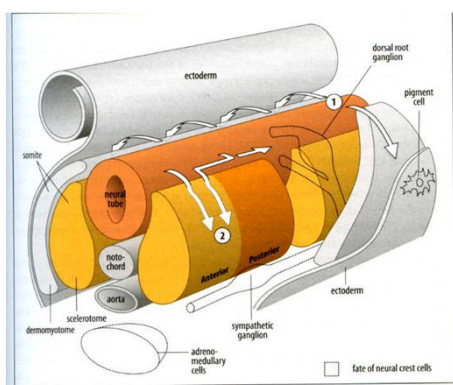
Recentemente foi mostrado que a neurogênese é um fenômeno normal no cérebro adulto

A via de Wnt e β -catenina têm um papel importante na neurogênese do hipocampo de cérebros adultos

37

Células da crista neural podem originar muitas células diferentes

As células da crista neural surgem do tubo neural dorsal

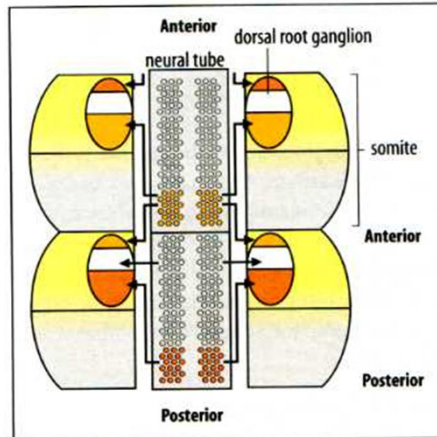


As células da crista neural migram em dois grupos: (1) originam os melanócitos; (2) gânglios dorsais; gânglios simpáticos e células do córtex adrenal

38

Células da crista neural podem originar muitas células diferentes

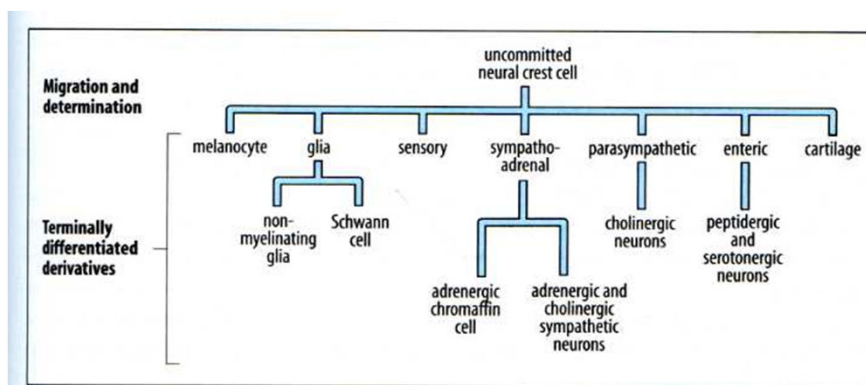
As células da crista neural surgem do tubo neural dorsal



As células da crista neural migram em dois grupos: (1) originam os melanócitos; (2) gânglios dorsais; gânglios simpáticos e células do córtex adrenal

O arranjo segmentado dos gânglios dorsais se deve à migração das células da crista dorsal somente pela parte anterior do somito

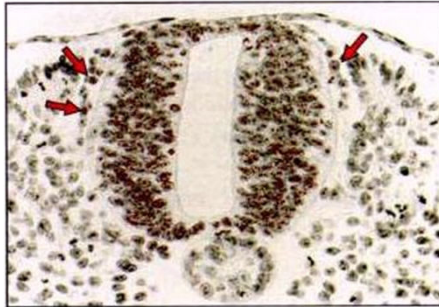
As células da crista neural dão origem à maior parte do esqueleto da cabeça, neurônios e glia do sistema nervoso periférico, células endócrinas e melanócitos



As células da crista neural dão origem não só a derivados da ectoderme, mas também à mesoderme, como ossos faciais, cartilagem e derme -> **mesectoderme**

A diferenciação das células da crista neural foi estudada em transplantes de células de pato em galinhas

As células de pato têm um núcleo com características diferentes das de galinha e permite seguir suas

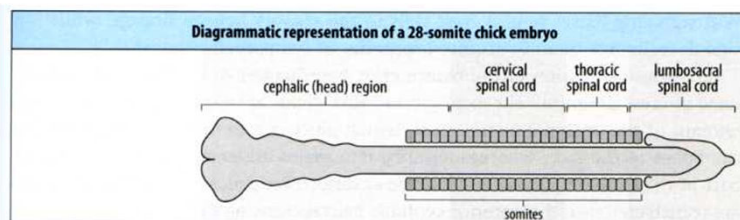


migrações no embrião de galinha e construir um mapa dos destinos para as células da crista neural no embrião de galinha

41

O mapa dos destinos mostra uma correspondência geral entre a posição das células da crista e a posição das células que elas originarão

Algumas células da crista são multipotentes, mesmo após a migração, no entanto a medida que migram em geral perdem a capacidade de ter outro destino



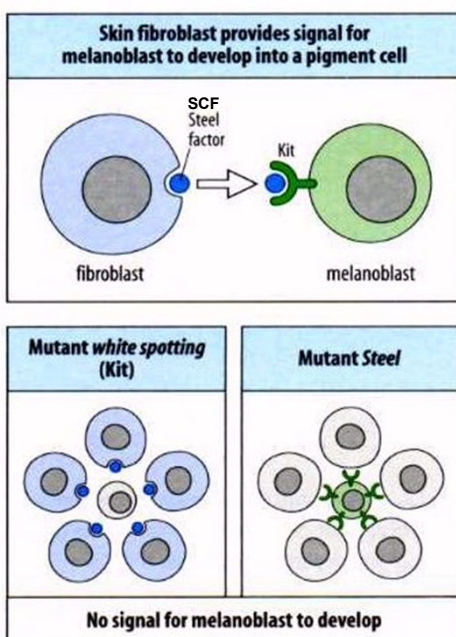
42

Diversos fatores afetam a diferenciação e proliferação das células da crista

Por exemplo a diferenciação e sobrevivência dos melanócitos são estimuladas por Wnts e citocinas como endotelina e SCF (fator de células tronco)

Camundongos homocigotos para as mutações em *white spotting (W)* ou *Steel* (genes cujo fenótipo altera a cor da pelagem) não possuem melanócitos na pele e outros tecidos

43



Mutações em um dos dois genes bloqueiam a diferenciação dos melanócitos

O peptídeo endotelina estimula a diferenciação de células da crista neural em melanócitos

44

Morte celular programada

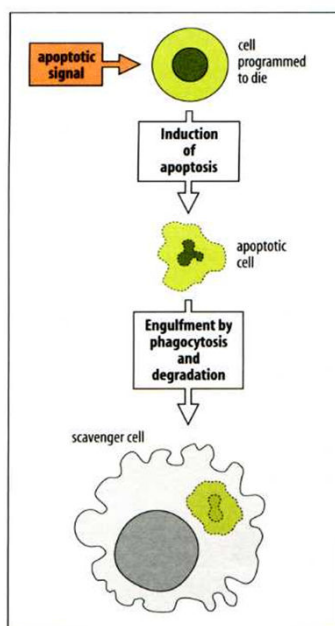
Morte celular seletiva é uma parte normal do desenvolvimento

Morte celular programada é particularmente importante no desenvolvimento de *C. elegans*: 12% das células que surgem na embriogênese morrem desta maneira.

Esta morte, chamada de **apoptose**, requer transcrição e síntese de proteína e é bem diferente da morte patológica

Na apoptose o aumento intracelular de Ca^{2+} leva à ativação de uma endonuclease que fragmenta a cromatina

45



Os conteúdos da célula permanecem envolvidos pela membrana celular,

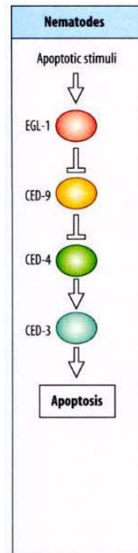
apesar da célula se fragmentar

A célula moribunda é fagocitada por uma outra célula próxima

O outro tipo de morte celular é a **necrose** onde a célula é lisada

46

Os estudos em *C. elegans* mostraram que a MCP se inicia pela ação de CED-3, uma protease chamada **caspase**

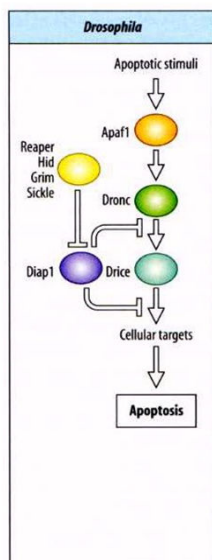


CED-4 é uma proteína adaptadora que ativa CED-3

CED-9 por outro lado impede a ativação de CED-3 por CED-4

A apoptose acontece quando EGL-1 remove a inibição de CED-4

Os estudos em *C. elegans* mostraram que a MCP se inicia pela ação de CED-3, uma protease chamada **caspase**



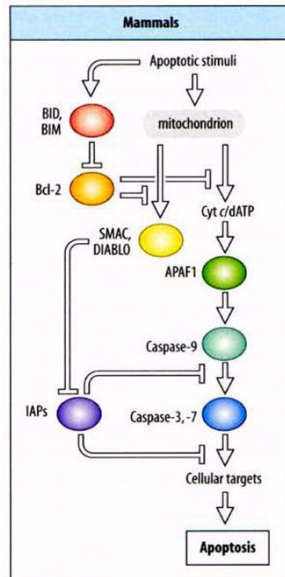
CED-4 é uma proteína adaptadora que ativa CED-3

CED-9 por outro lado impede a ativação de CED-3 por CED-4

A apoptose acontece quando EGL-1 remove a inibição de CED-4

Vias semelhantes existem em drosófila e mamíferos

Os estudos em *C. elegans* mostraram que a MCP se inicia pela ação de CED-3, uma protease chamada **caspase**



CED-4 é uma proteína adaptadora que ativa CED-3

CED-9 por outro lado impede a ativação de CED-3 por CED-4

A apoptose acontece quando EGL-1 remove a inibição de CED-4

Vias semelhantes existem em drosófila e mamíferos

Os homólogos de *ced-9* em mamíferos são os genes da família Bcl-2

49

A plasticidade da expressão gênica

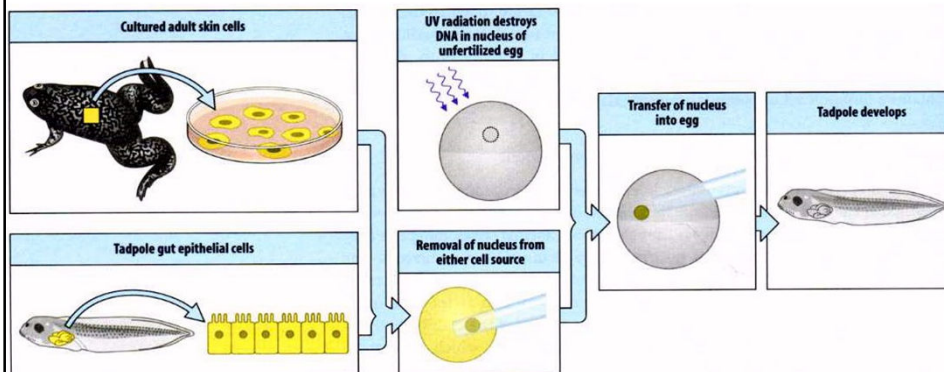
Até que ponto são reversíveis os processos de controle de expressão gênica que vimos até agora?

Poderiam as células tronco sanguíneas dar origem a neurônios?

Podemos reverter o padrão de expressão gênica de uma célula aquele observado no ovo fertilizado?

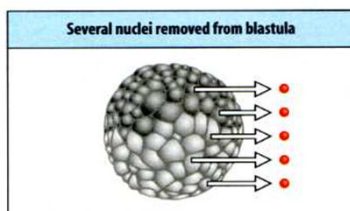
50

Se o núcleo diplóide de uma célula diferenciada puder substituir o núcleo do zigoto, isto indicaria que não houve mudanças irreversíveis durante a diferenciação

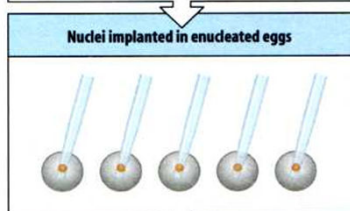


Em anfíbios este tipo de experimento é simples de ser realizado, produzindo **clones** do organismo original

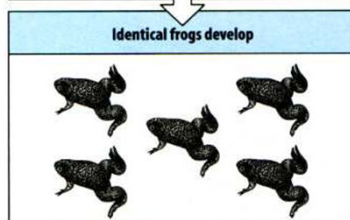
51



Núcleos de pele, rins, coração e pulmão podem dirigir o desenvolvimento quando transplantados para ovos enucleados



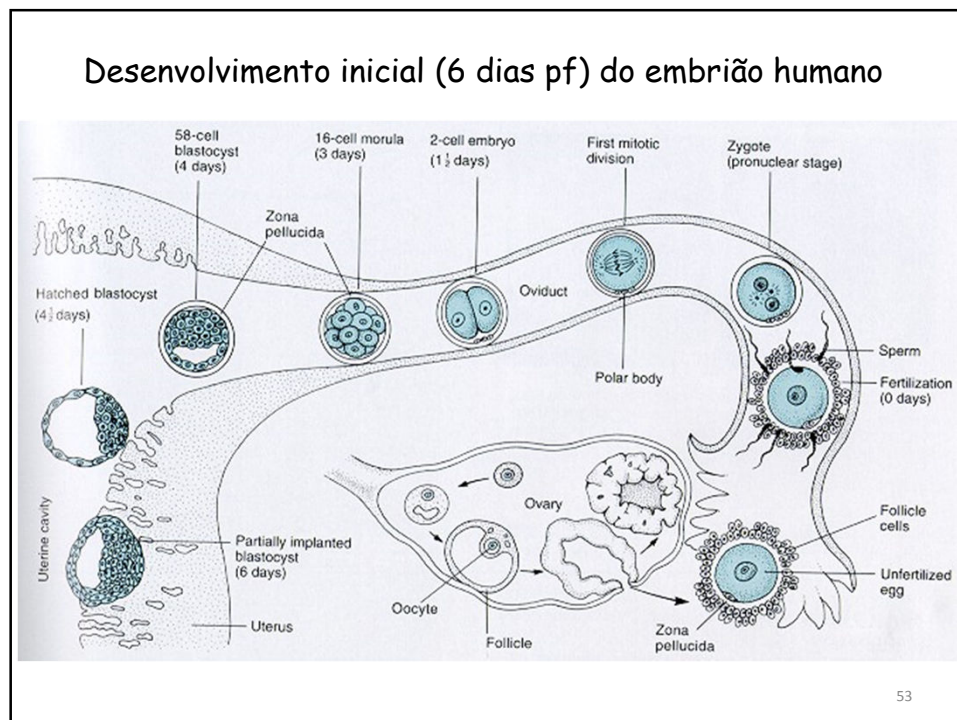
No entanto a taxa de sucesso para núcleos de células adultas é muito baixa



Núcleos de blástulas podem ser utilizados para produzir clones de rãs geneticamente idênticas

Resultados semelhantes foram obtidos com outros organismos, inclusive mamíferos

52

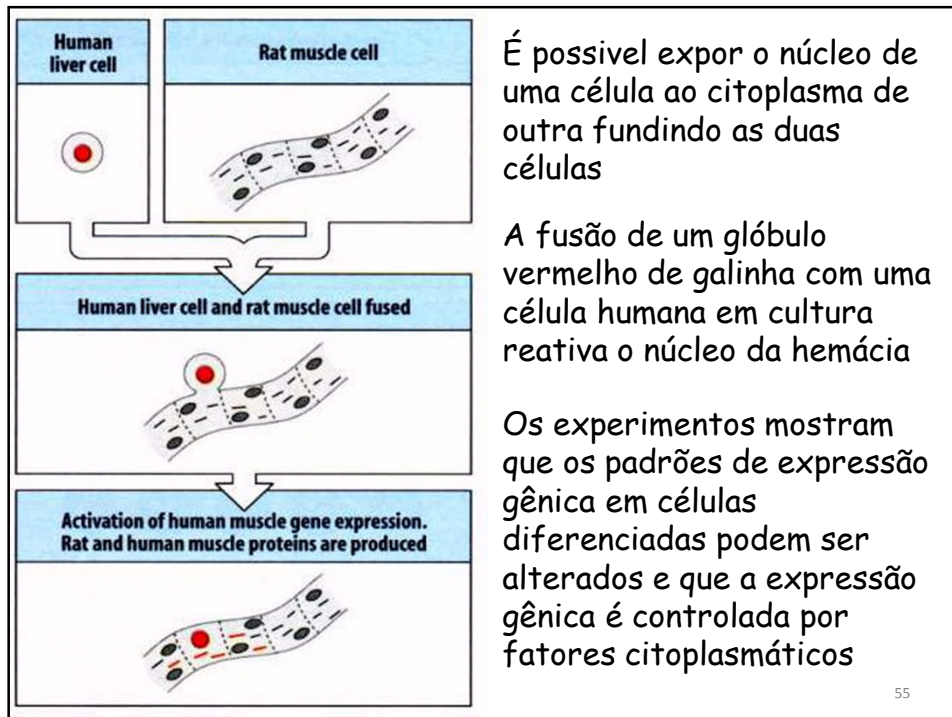


Para clonagem de camundongos foram utilizadas células da massa interna de células do embrião transferidas para embriões tetraplóides

O sucesso de clonagem de mamíferos, a partir de núcleos de células somáticas, é extremamente baixo

Possíveis razões:

1. Reprogramação incompleta do núcleo para remover todas as modificações epigenéticas
2. Os genes reprogramados não passaram pelo processo de 'imprinting' durante o desenvolvimento das células germinativas
3. Em mamíferos há uma série de anormalidades nos animais clonados: morte prematura, deformidades nos membros e hipertensão



55

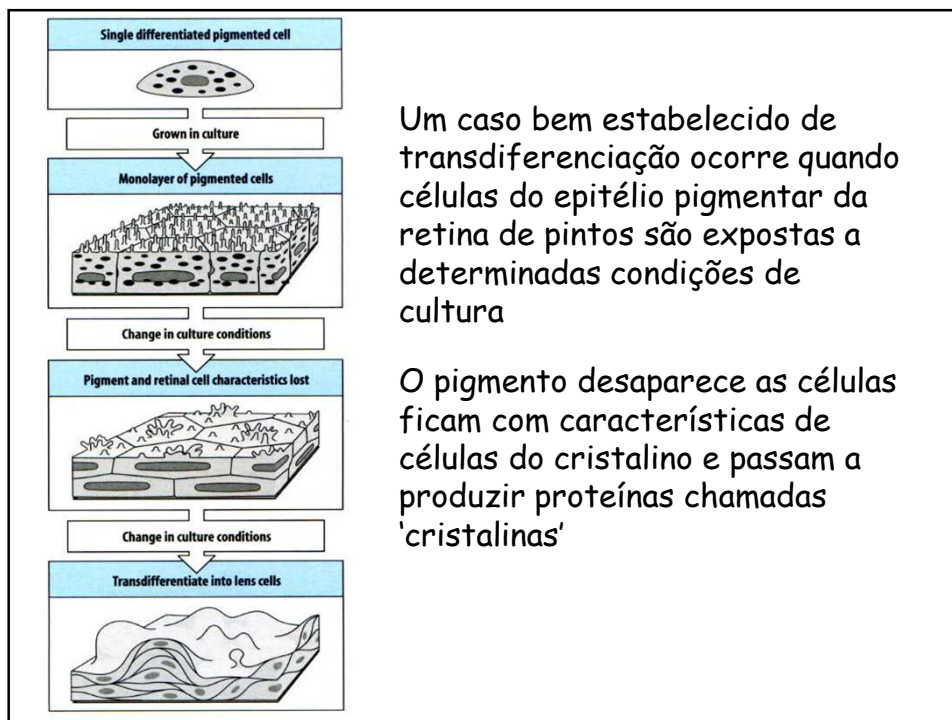
Uma célula diferenciada é geralmente estável. Neurônios mantêm o estado diferenciado por anos

Células vegetais mantêm seu estado diferenciado enquanto na planta, mas não quando colocadas em cultura

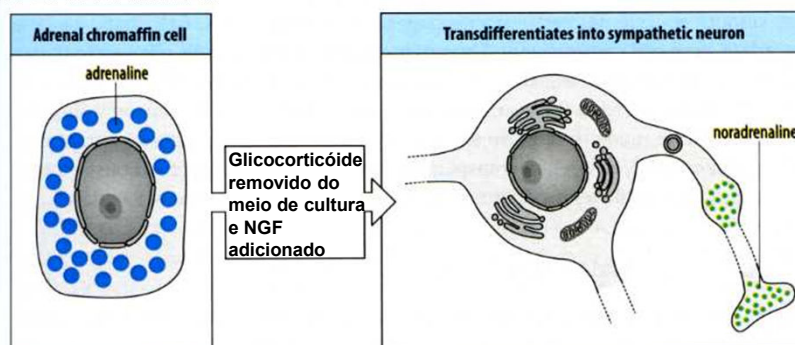
Sob algumas condições células animais não são estáveis e isso mostra a reversibilidade potencial dos padrões de atividade gênica

A mudança de um tipo de célula diferenciada num outro tipo é conhecido como **transdiferenciação**

56



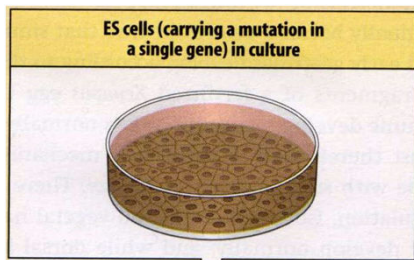
Outro caso de transdiferenciação é o das células cromafins da glândula adrenal (supra-renal), derivadas da crista neural



Elas podem ser mantidas em cultura na presença de glicocorticóides

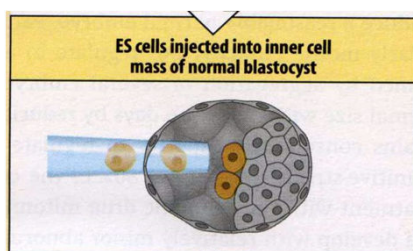
Todos esses casos de transdiferenciação ocorrem entre células relacionadas do ponto de vista do desenvolvimento

As células tronco embrionárias da massa interna de células do embrião de mamífero são praticamente totipotentes e podem ser mantidas indefinidamente em cultura



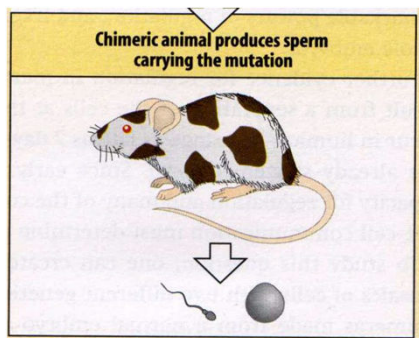
59

As células tronco embrionárias da massa interna de células do embrião de mamífero são praticamente totipotentes e podem ser mantidas indefinidamente em cultura

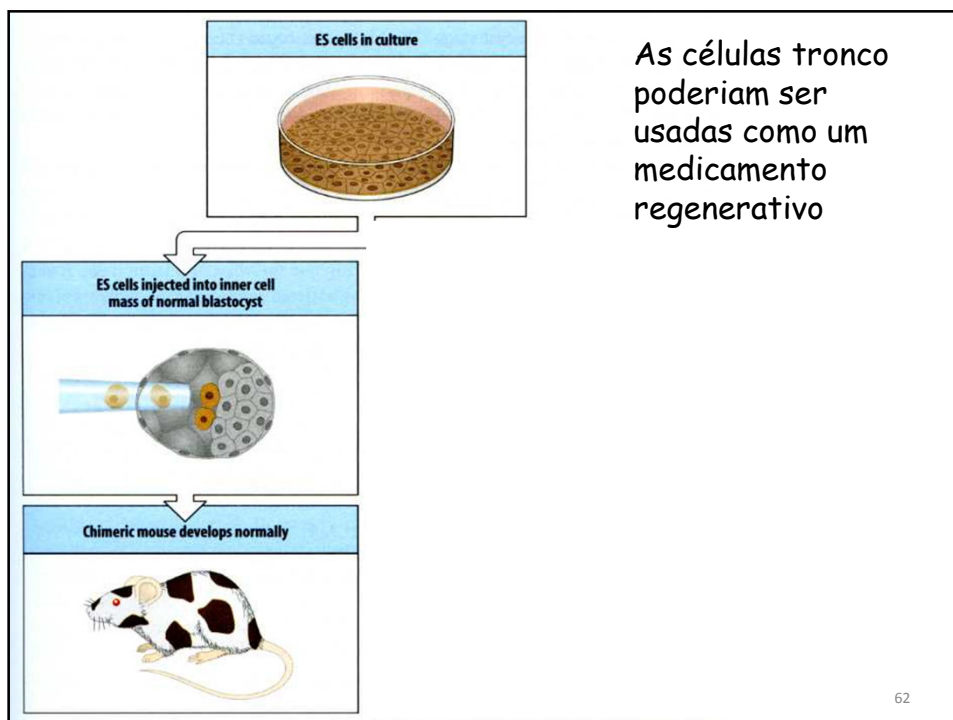


Se injetadas num blastocisto e então retornada para o útero elas podem se diferenciar em qualquer das células do embrião

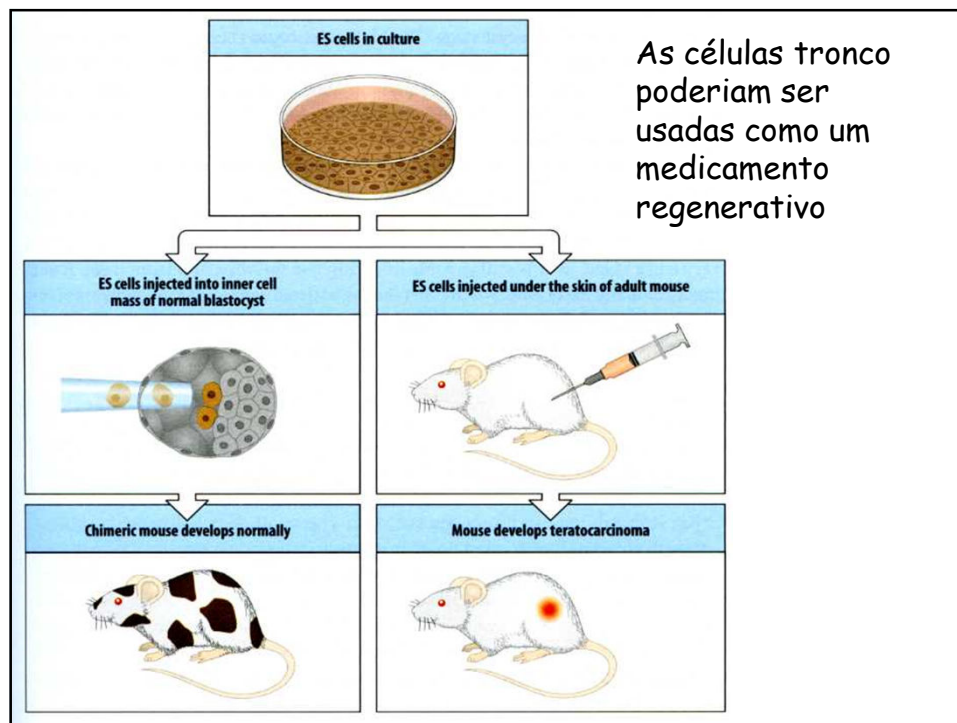
As células tronco embrionárias da massa interna de células do embrião de mamífero são praticamente totipotentes e podem ser mantidas indefinidamente em cultura



Se injetadas num blastocisto e então retornada para o útero elas podem se diferenciar em qualquer das células do embrião



As células tronco poderiam ser usadas como um medicamento regenerativo



Chiral blastomere arrangement dictates zygotic left-right asymmetry pathway in snails

http://www.cecm.usp.br/~cewinter/aulas/artigos/2009/chiral_lymanaea.pdf

Nature, 462, 790-794, 2009

Chiral blastomere arrangement dictates zygotic left–right asymmetry pathway in snails

Most animals display internal and/or external left–right asymmetry. Several mechanisms for left–right asymmetry determination have been proposed for vertebrates^{1–10} and invertebrates^{1,2,4,9,11–14} but they are still not well characterized, particularly at the early developmental stage. The gastropods *Lymnaea stagnalis* and the closely related *Lymnaea peregra* have both the sinistral (recessive) and the dextral (dominant) snails within a species and the chirality is hereditary, determined by a single locus that functions maternally^{15–18}. Intriguingly, the handedness-determining gene(s) and the mechanisms are not yet identified.

http://www.cecm.usp.br/~cewinter/aulas/artigos/2009/chiral_lymanaea.pdf

Nature, 462, 790-794, 2009 65

