

Morfogénesis y migración celular

Dr. Germán Reig



LABORATORIO ONTOGENIA EXPERIMENTAL

GENE . MORPH . EVO-DEVO . BIOMED

www.ontogenesis.cl

VISUAL•D



UNIVERSIDAD
DE CHILE



Morfogénesis

- Perspectiva histórica: Ontogenia y filogenia.
- Influencia de factores celulares, químicos y biofísicos.
- Gastrulación.

Migración celular

- Conceptos generales.
- Peces anuales como modelo de migración celular.



Ontogenia y filogenia en la forma embrionaria



Ontogenia



Filogenia



Ontogenia y filogenia en la forma embrionaria



Ontogenia



Filogenia



Factores que influyen en la generación/mantenimiento de forma



Biofísicos

Celulares

Moleculares



1917

D'Arcy Wentworth
Thompson
(1860-1948)

1924

Hans Spemann
(1869-1941)

Hilde Mangold
(1898-1924)

1952

Alan Turing
(1912-1954)

1969

Lewis Wolpert
(1929-)



Factores que influyen en la generación/mantenimiento de forma

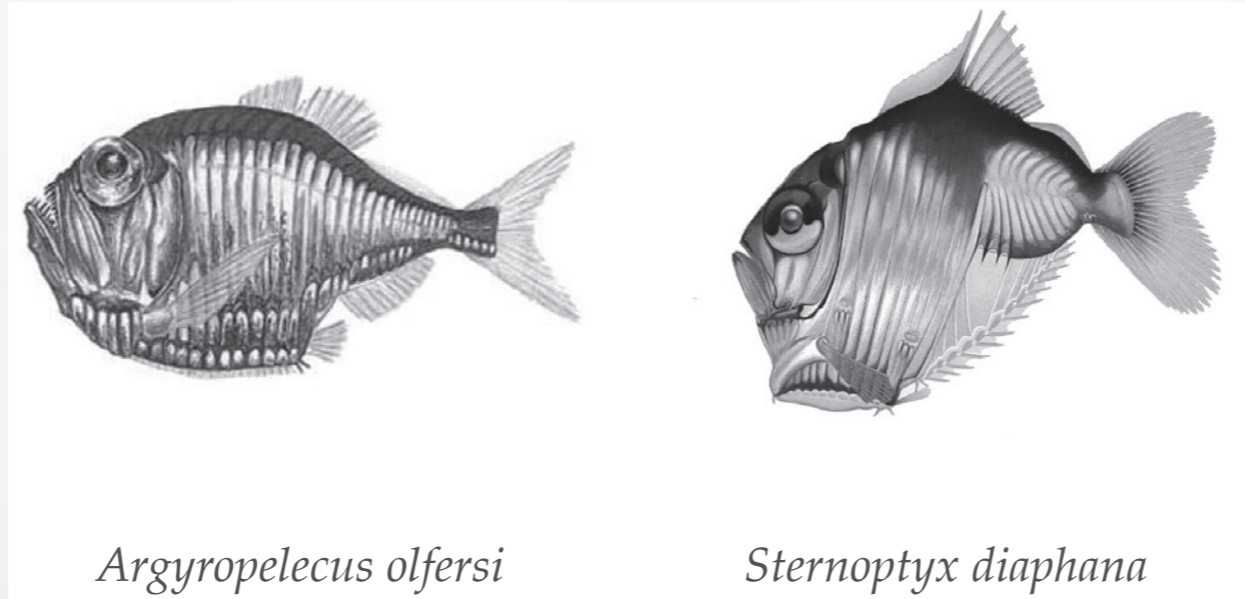
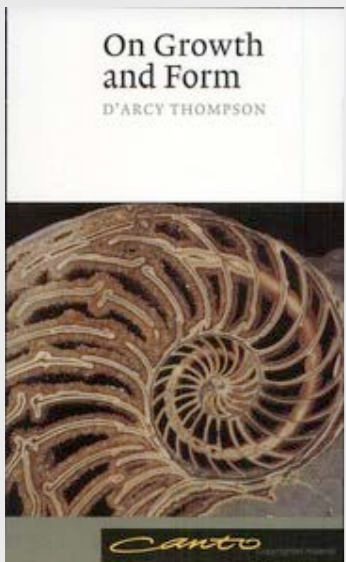


Biofísicos



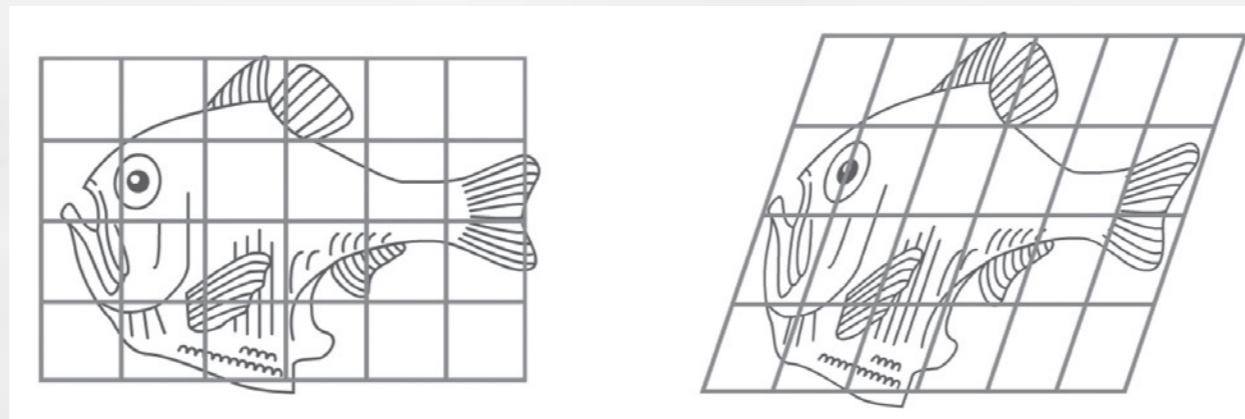
1917

D'Arcy Wentworth
Thompson
(1860-1948)



Argyropelecus olfersi

Sternoptyx diaphana



- Establece la premisa que el **crecimiento** y la **forma** se encuentran acopladas, de manera que no es posible explicar una en ausencia de la otra.
- La presentación tiene un fuerte **componente matemático/físico**.

- En su último capítulo establece la **validez y aplicabilidad** de estos conceptos durante la **evolución**.

- Las **mallas o grillas** corresponderían a regiones con **tasas diferenciales de crecimiento** o **fuerzas físicas**.



Factores que influyen en la generación/mantenimiento de forma



Biofísicos

Celulares

Moleculares



1917

D'Arcy Wentworth
Thompson
(1860-1948)

1924

Hans Spemann
(1869-1941)

Hilde Mangold
(1898-1924)

1952

Alan Turing
(1912-1954)

1969

Lewis Wolpert
(1929-)



Factores que influyen en la generación/mantenimiento de forma



Biofísicos



1917

D'Arcy Wentworth Thompson
(1860-1948)

Celulares



1924

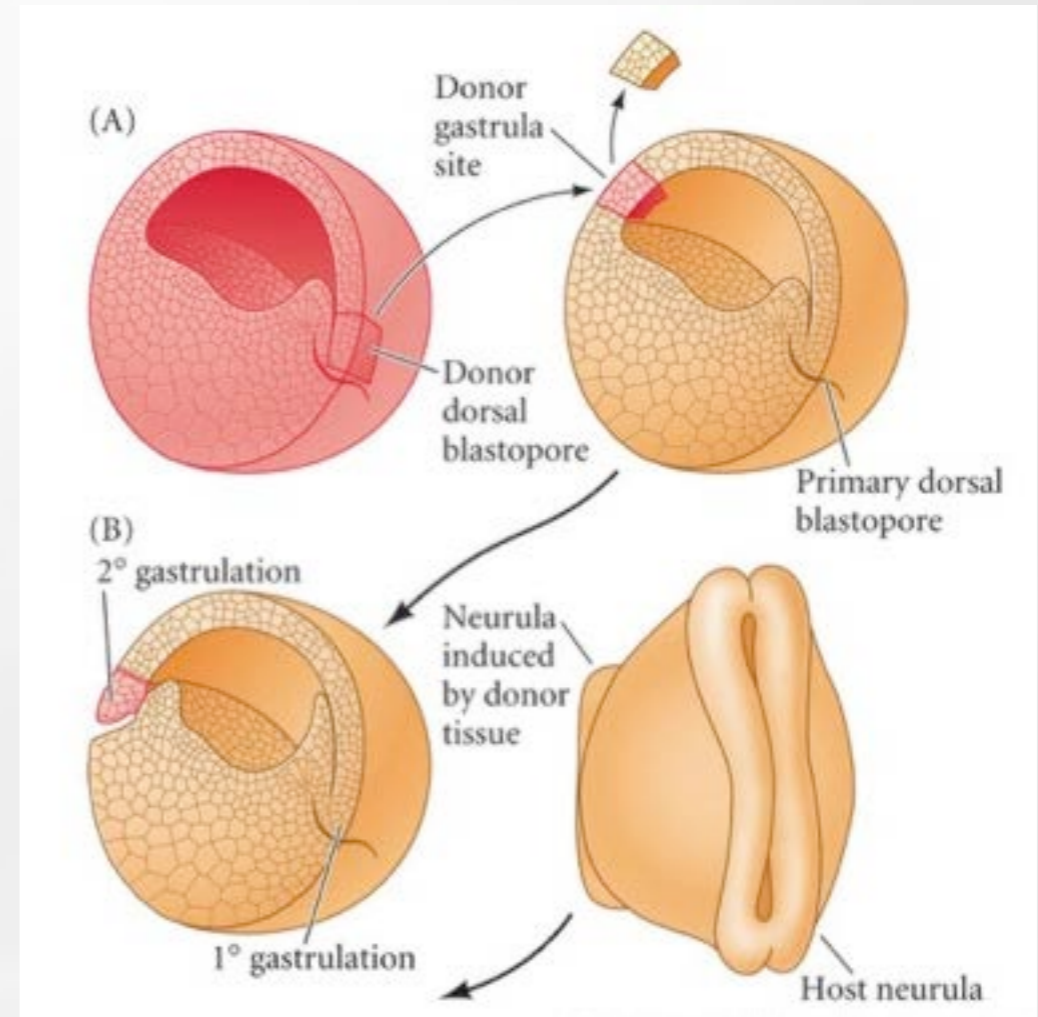
Hans Spemann
(1869-1941)



Hilde Mangold
(1898-1924)

INDUCCIÓN

Proceso por el cual una célula o grupo de células es capaz de determinar el destino de otras células.



- *Introduce el concepto de la Inducción.*



Factores que influyen en la generación/mantenimiento de forma



Biofísicos

Celulares

Moleculares



1917

D'Arcy Wentworth
Thompson
(1860-1948)

1924

Hans Spemann
(1869-1941)

Hilde Mangold
(1898-1924)

1952

Alan Turing
(1912-1954)

1969

Lewis Wolpert
(1929-)



Factores que influyen en la generación/mantenimiento de forma



Biofísicos

Celulares

Moleculares



1917

D'Arcy Wentworth
Thompson
(1860-1948)

1924

Hans Spemann
(1869-1941)

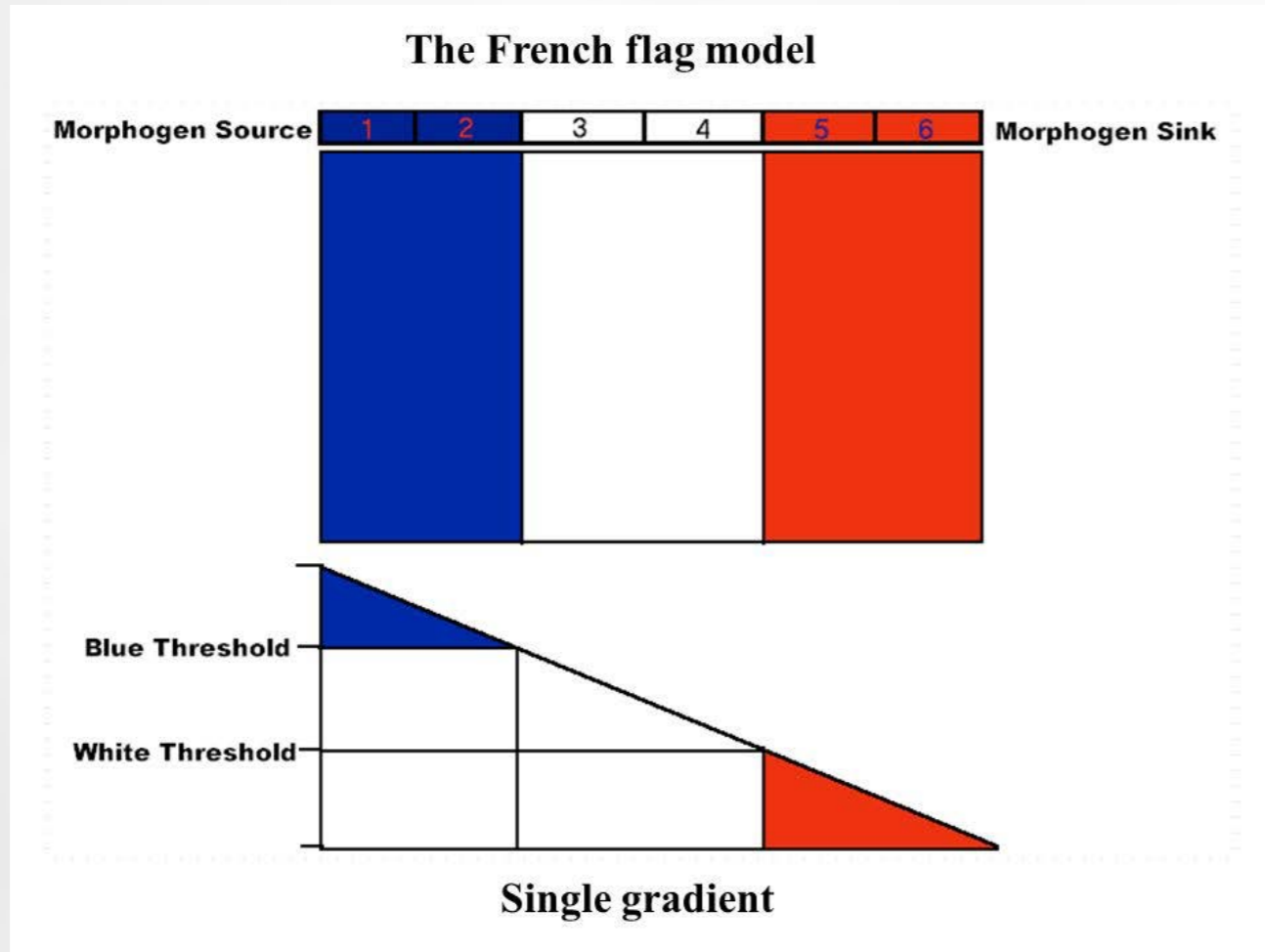
Hilde Mangold
(1898-1924)

1952

Alan Turing
(1912-1954)

1969

Lewis Wolpert
(1929-)



Información posicional y morfógenos.
Las células responden de manera diferencial dependiendo de la concentración de morfógeno secretado.

Moleculares



1969

Lewis Wolpert
(1929-)

- *Información posicional*
- *Moléculas difusibles llamadas Morfógenos.*



Factores que influyen en la generación/mantenimiento de forma



Biofísicos

Celulares

Moleculares: adhesión celular



1917

D'Arcy Wentworth
Thompson
(1860-1948)

1924

Hans Spemann
(1869-1941)

Hilde Mangold
(1898-1924)

1955

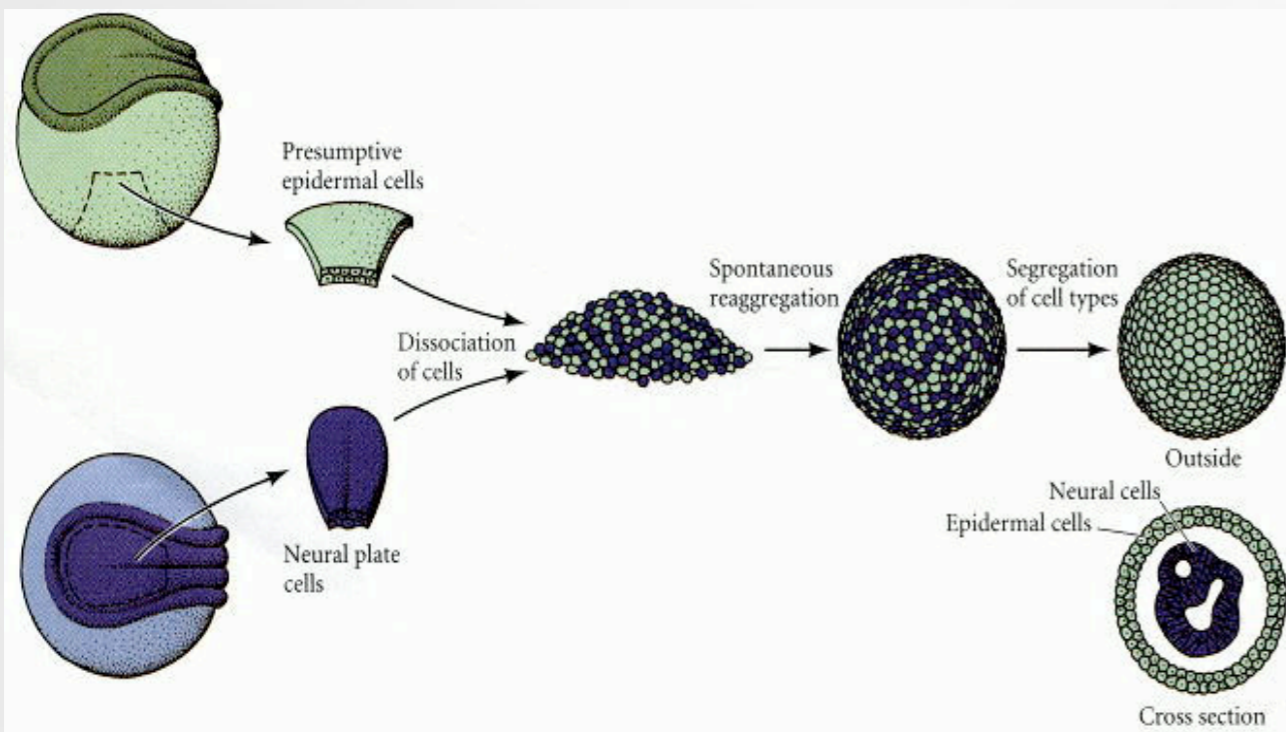
Townes and Holtfreter
(1955)

1969

Malcolm
Steinberg
(1962)



Moleculares: adhesión celular



1955

Townes and Holtfreter (1955)

- *Afinidad selectiva de células*
- *Durante la reagregación se producen movimientos celulares que recapitulan los embrionarios*
- *Conservación de la topología embrionaria.*



1969

Malcolm Steinberg (1962)

Hipótesis de afinidad selectiva.

"The tissue segregation becomes complete because of the emergence of a selectivity of cell adhesion: homologous cells when they meet remain permanently united to form functional tissues, whereas a cleft develops between certain non-homologous tissues".

Townes PL, Holtfreter J.1955



Factores que influyen en la generación/mantenimiento de forma



Biofísicos

Celulares

Moleculares: adhesión celular



1917

D'Arcy Wentworth
Thompson
(1860-1948)

1924

Hans Spemann
(1869-1941)

Hilde Mangold
(1898-1924)

1955

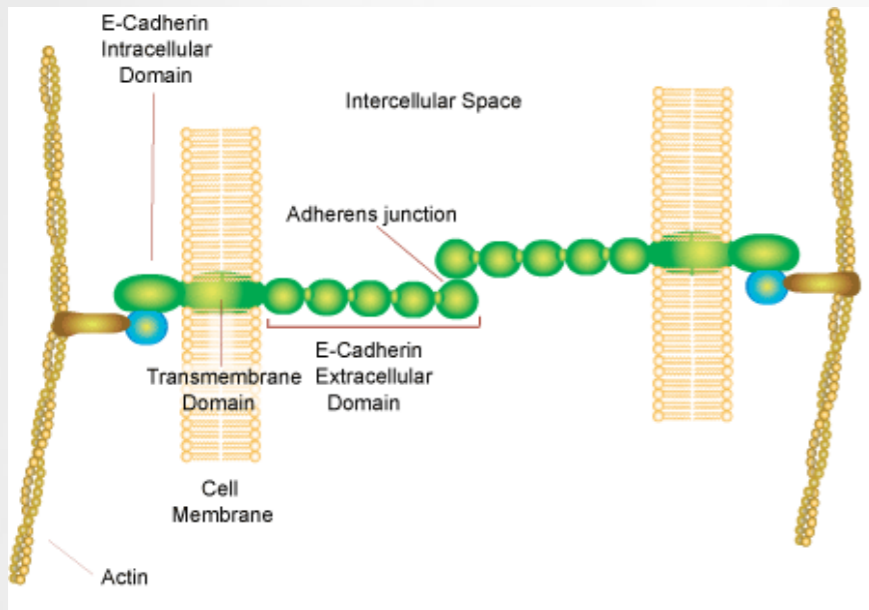
Townes and Holtfreter
(1955)

1969

Malcolm
Steinberg
(1962)

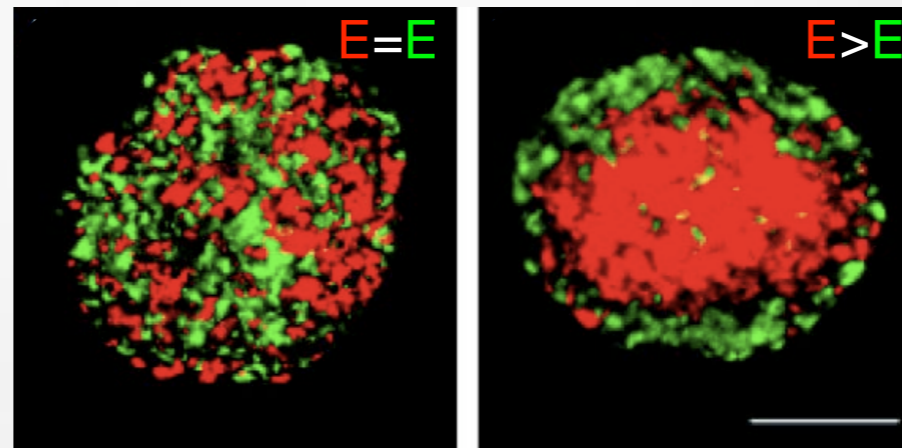


Factores que influyen en la generación/mantenimiento de forma



Moleculares: adhesión celular

Unión homofílica



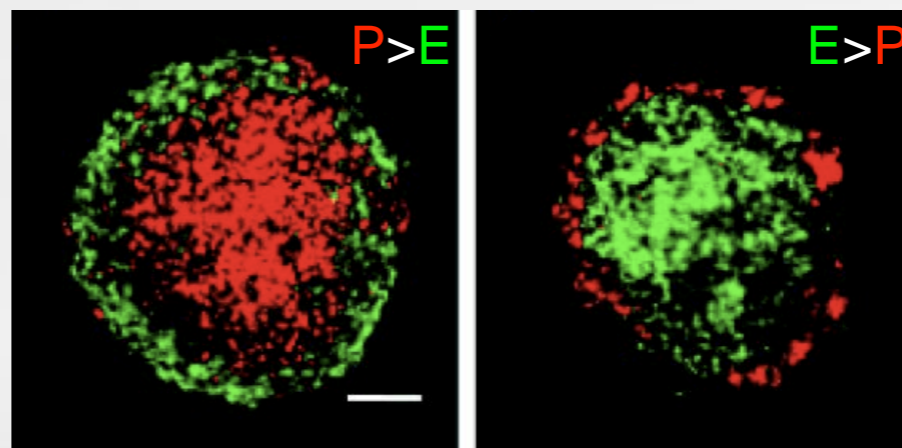
Foty and Steinberg, 2004



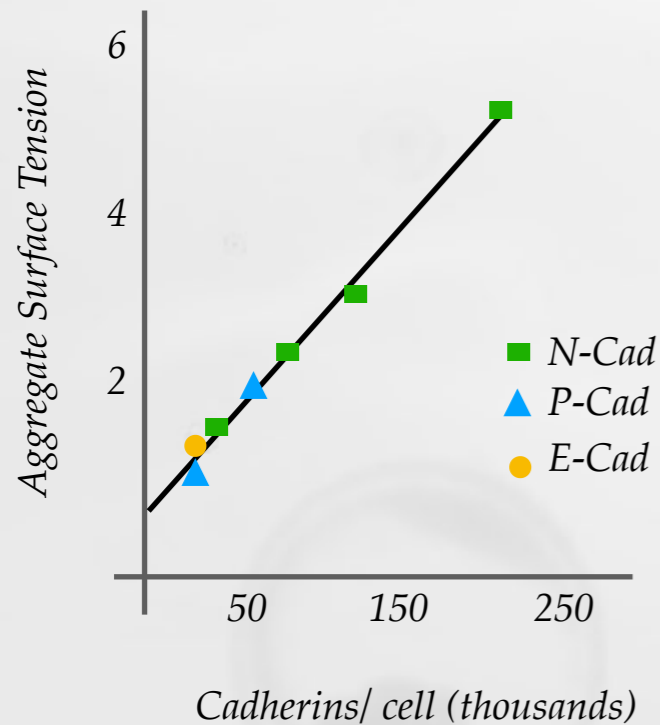
1969

Malcolm Steinberg (1962)

Unión heterofílica



Duguay, et al. 2003





Factores que influyen en la generación/mantenimiento de forma



Biofísicos

Celulares

Moleculares



1917

D'Arcy Wentworth
Thompson
(1860-1948)

1924

Hans Spemann
(1869-1941)

Hilde Mangold
(1898-1924)

1969

Lewis Wolpert
(1929-)

1955

Townes and
Holtfreter
(1955)

1969

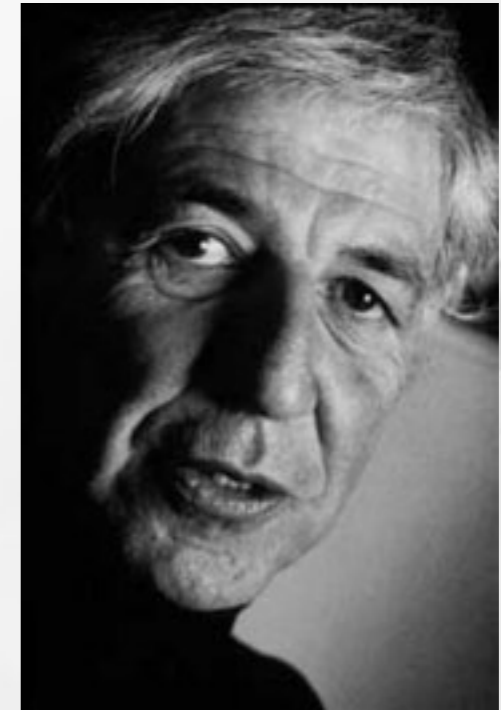
Malcolm
Steinberg
(1962)

INTEGRACIÓN DE FACTORES → GASTRULACIÓN



Lewis Wolpert

“El evento más importante de nuestras vidas, no es el nacimiento, el matrimonio ni la muerte sino la gastrulación”.





Definición clásica

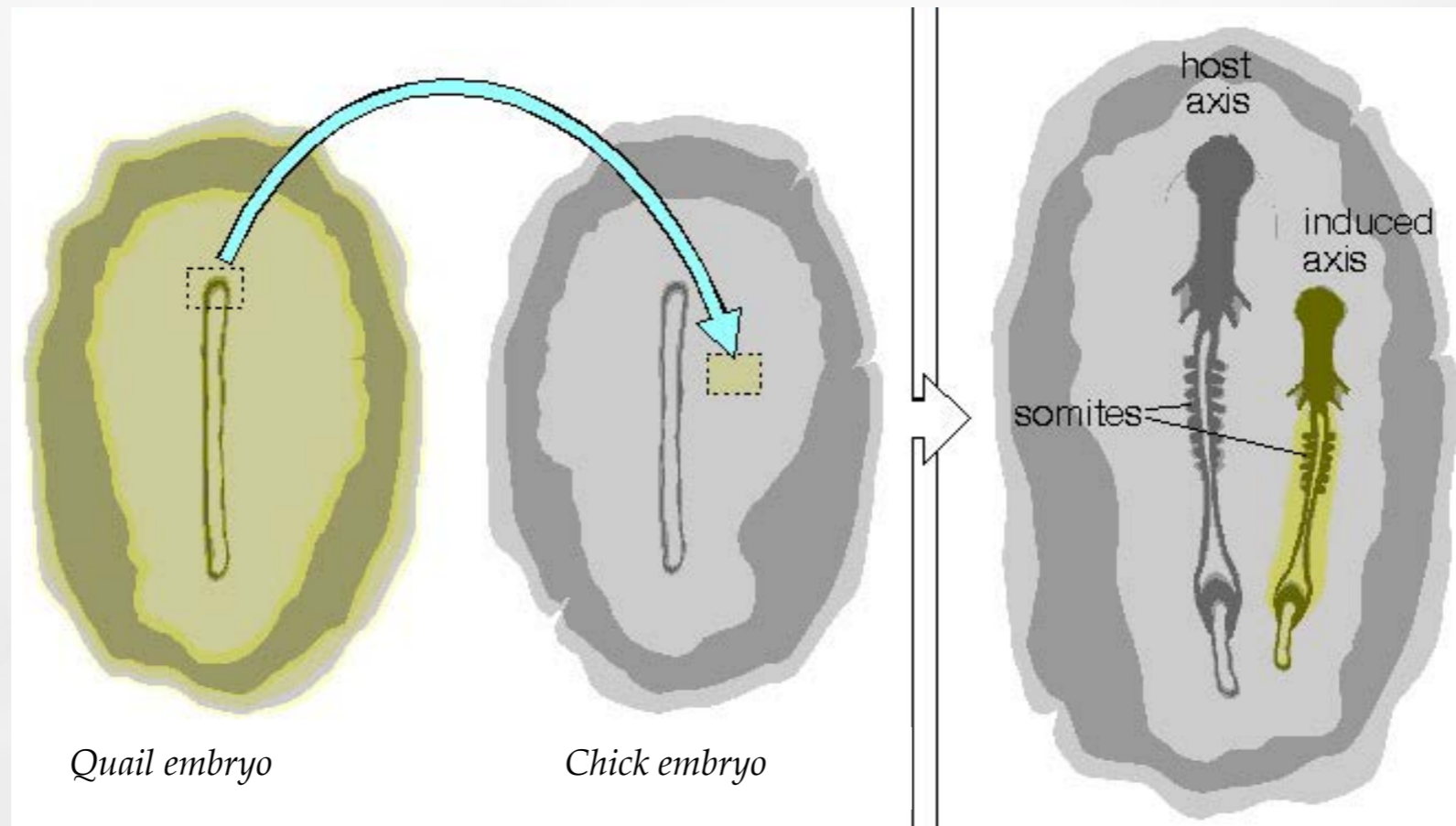
“Proceso morfogénético por el cual se establecen las capas germinales correspondientes a Ectodermo, Mesodermo y Endodermo”.

Definición moderna

*“Período del desarrollo embrionario caracterizado por **procesos celulares inductivos** y **movimientos celulares morfogénéticos**, los cuales dan origen a las capas germinativas transformando un embrión bilaminar (blástula) en uno trilaminar alargado donde los ejes principales están claramente definidos.*



Inducción de destino celular

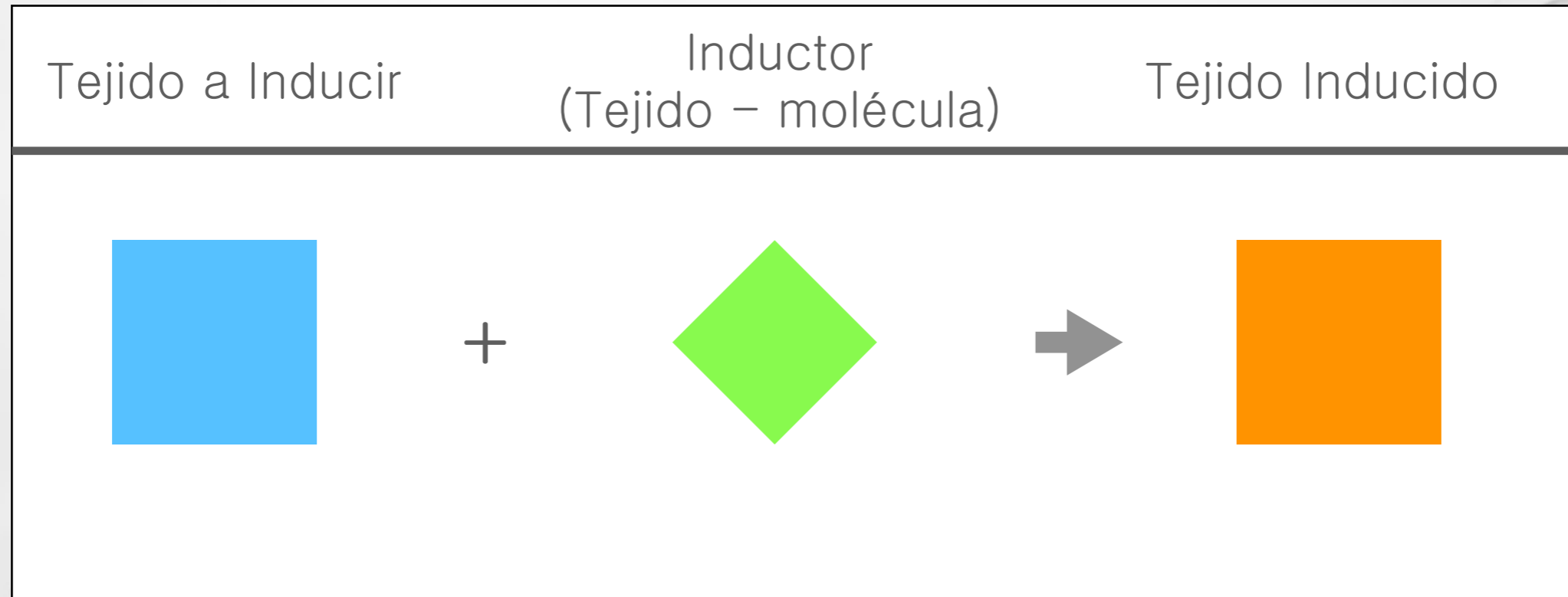


Esta región con capacidad inductora se observa en embriones de todas las especies de vertebrados estudiadas



Inducción de destino celular

Proceso mediante el cual un grupo celular influencia el destino celular de otro
– base del desarrollo condicional –



Requisito esencial: El tejido a inducir debe ser competente.

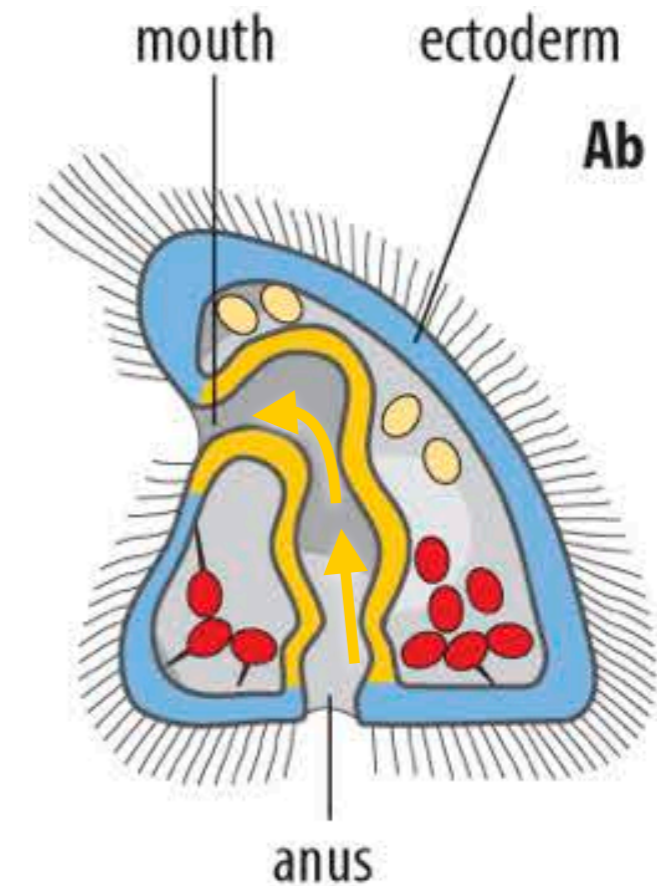
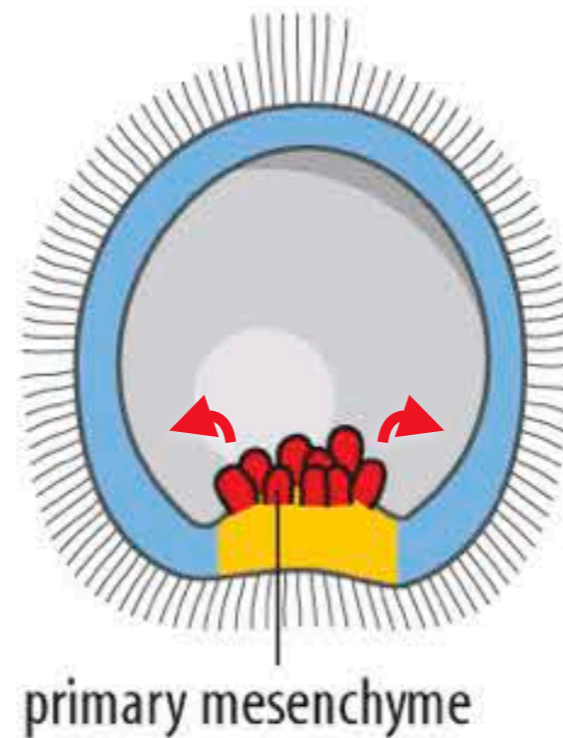
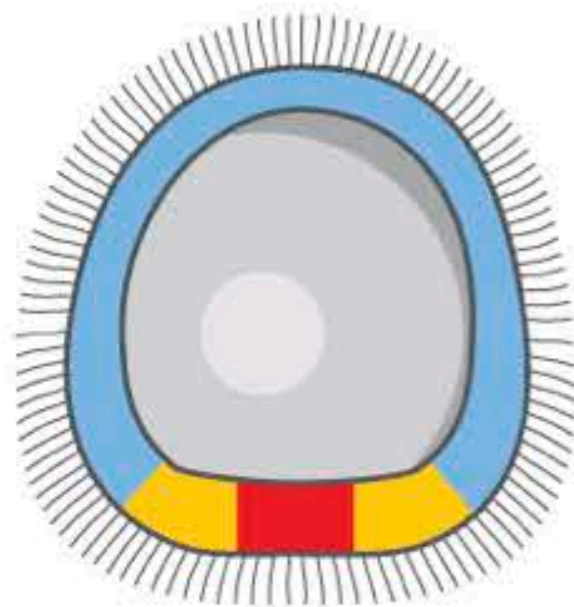


Desplazamiento coordinado de grupos celulares que generan un cambio de “forma” en el embrión

- este cambio puede ser global o restringido a un tejido -

Gastrulación en el erizo de mar

Ectodermo Mesodermo Endodermo

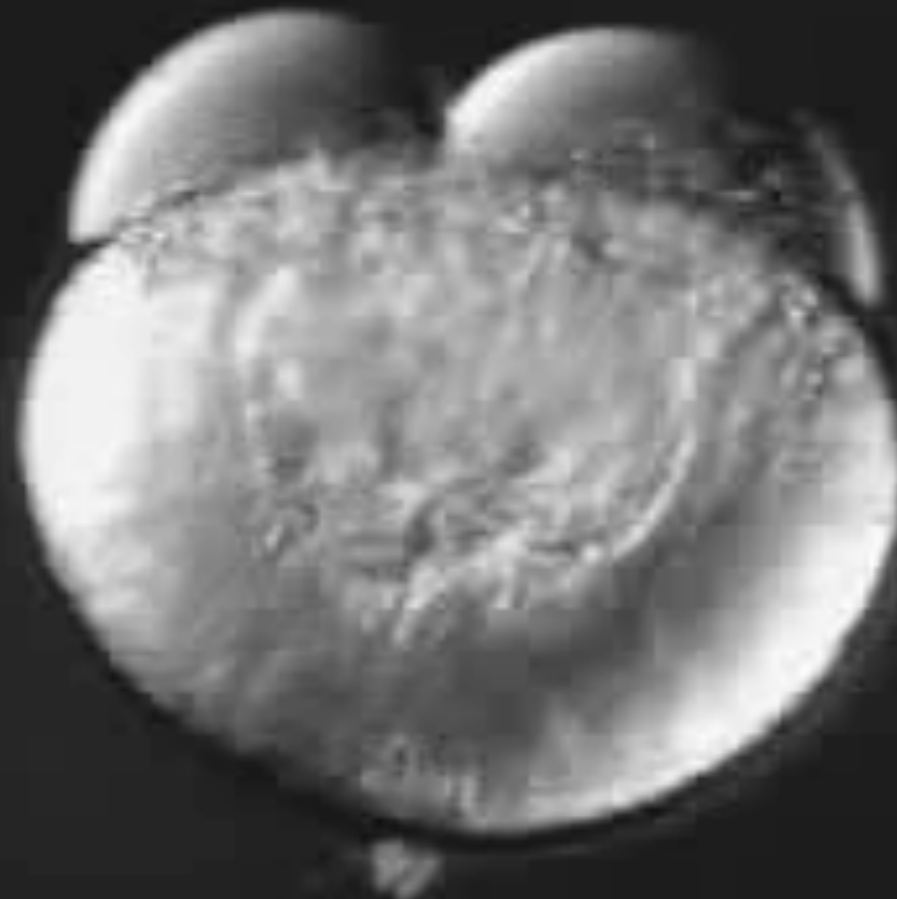




Desplazamiento coordinado de grupos celulares que generan un cambio de “forma” en el embrión

- este cambio puede ser global o restringido a un tejido -

Gastrulación en el pez cebra





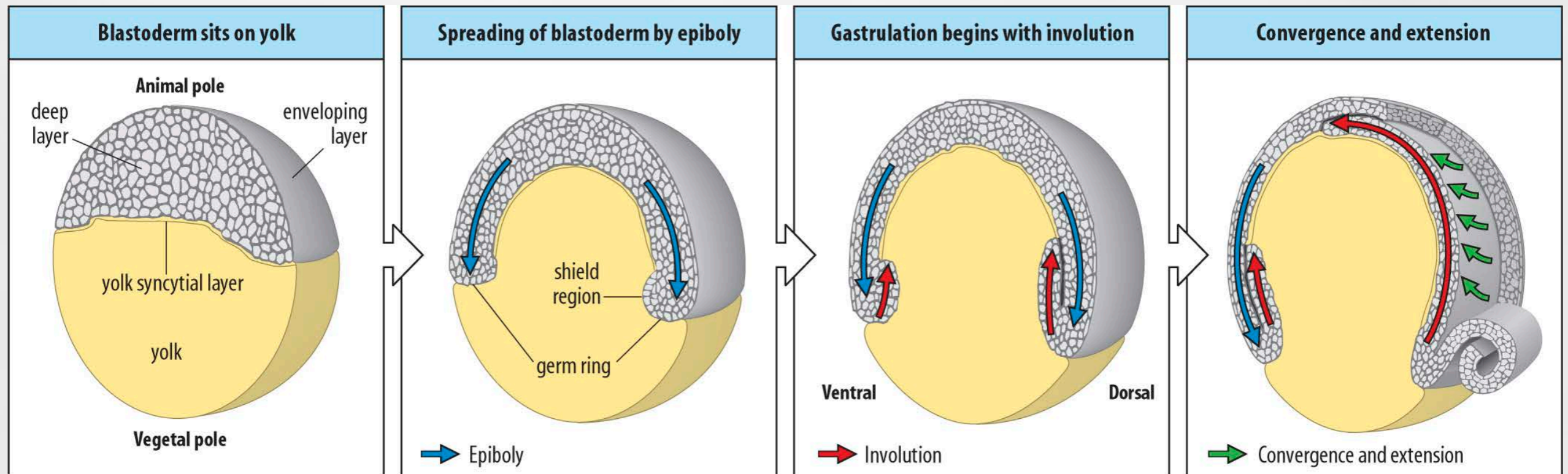
Desplazamiento coordinado de grupos celulares que generan un cambio de “forma” en el embrión

- este cambio puede ser global o restringido a un tejido -

Epibolia

Involución/Ingresión

Convergencia
extensión





Morfogénesis

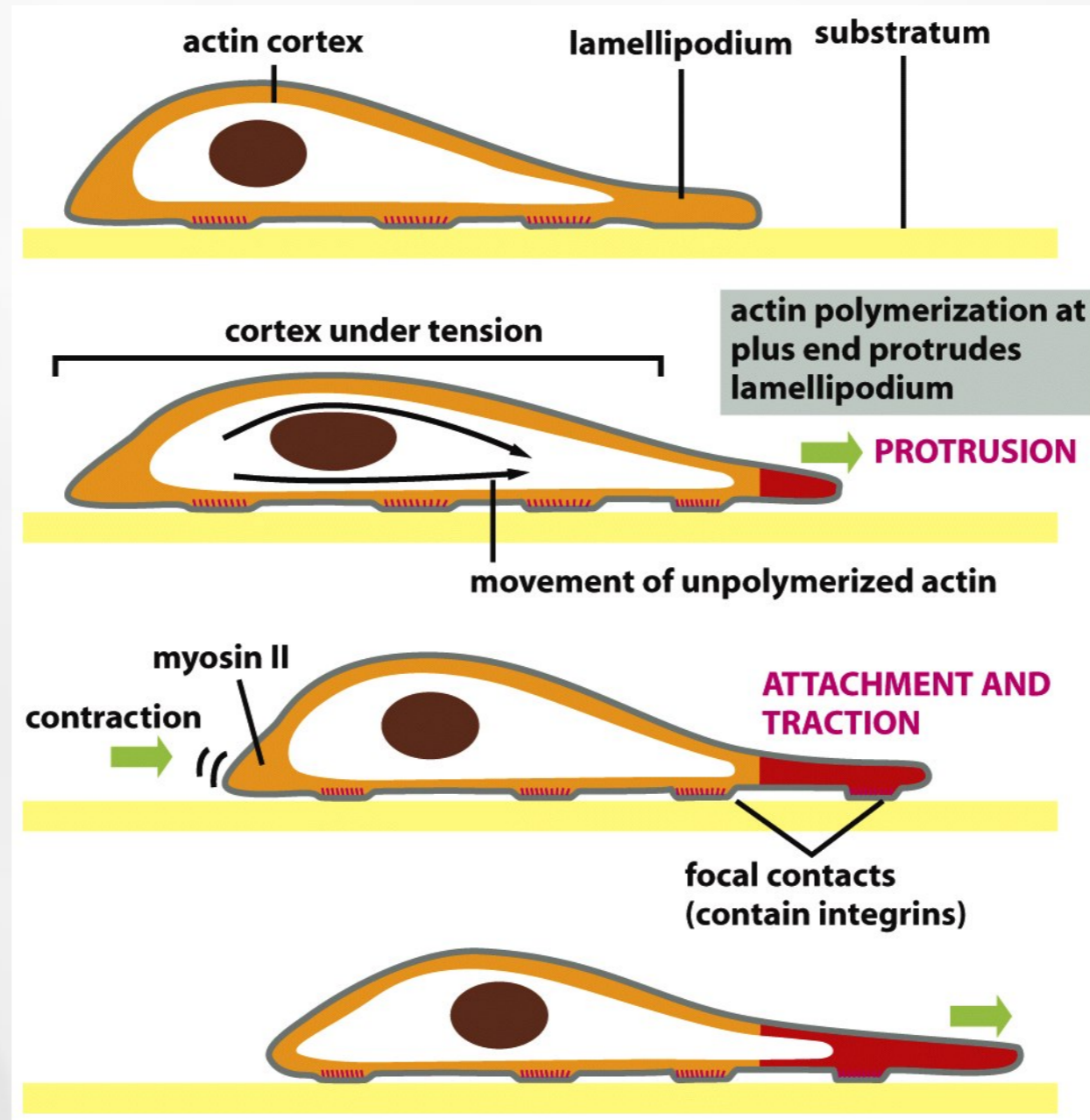
- Perspectiva histórica: Ontogenia y filogenia.
- Influencia de factores celulares, químicos y biofísicos.
- Gastrulación.

Migración celular

- Conceptos generales.
- Peces anuales como modelo de migración celular.



Movimiento celular in vitro: conducta de “gateo”





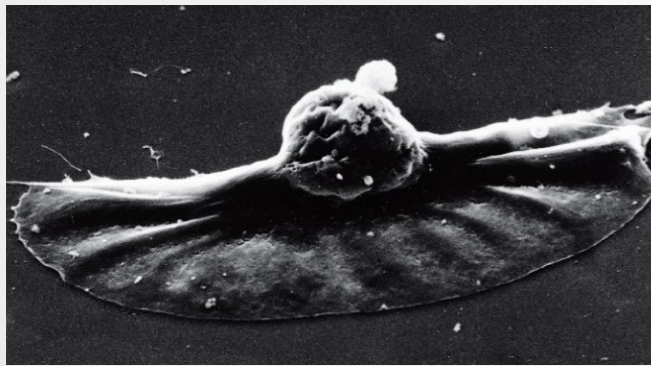
Migración de células individuales in vitro



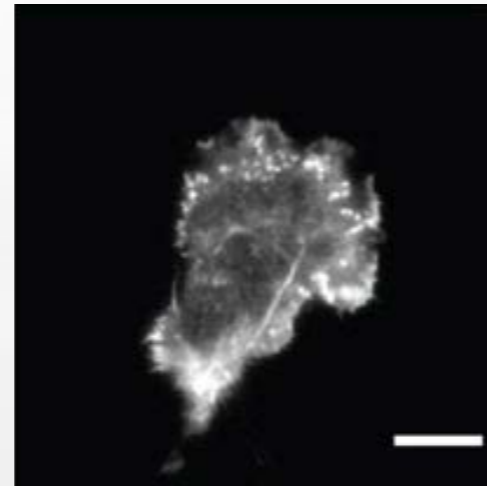


Procesos celulares asociados al movimiento celular

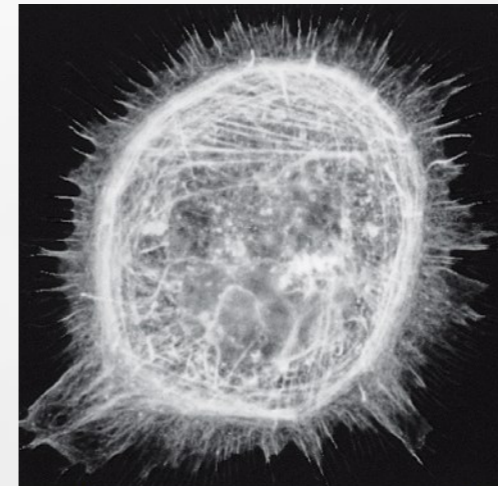
“aplanados”
lamelipodios



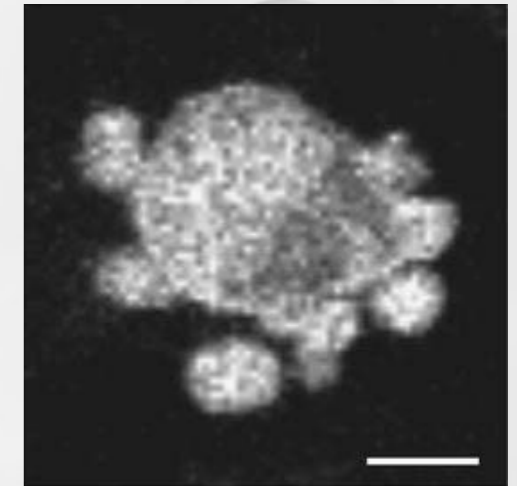
“gordos”
lobopodios



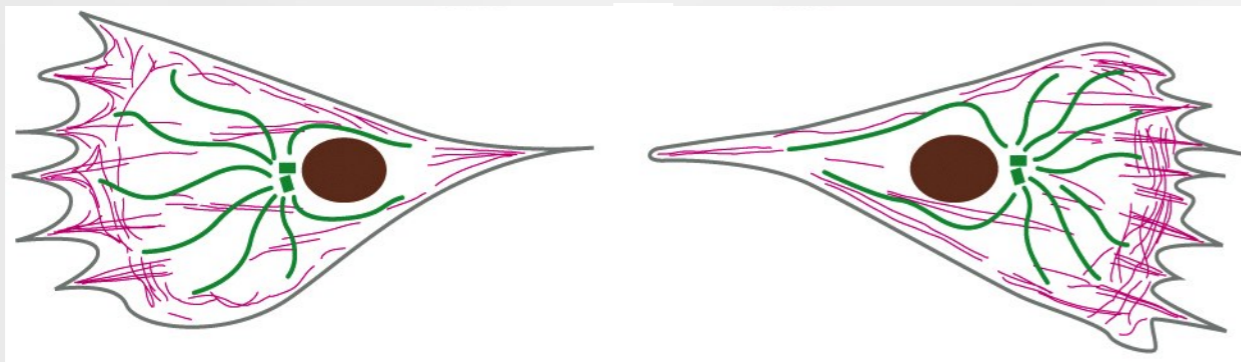
“finos”
filopodios



“burbujas”
blebs



Los procesos celulares dependen de la actividad del citoesqueleto.



● Microfilamentos (actina)

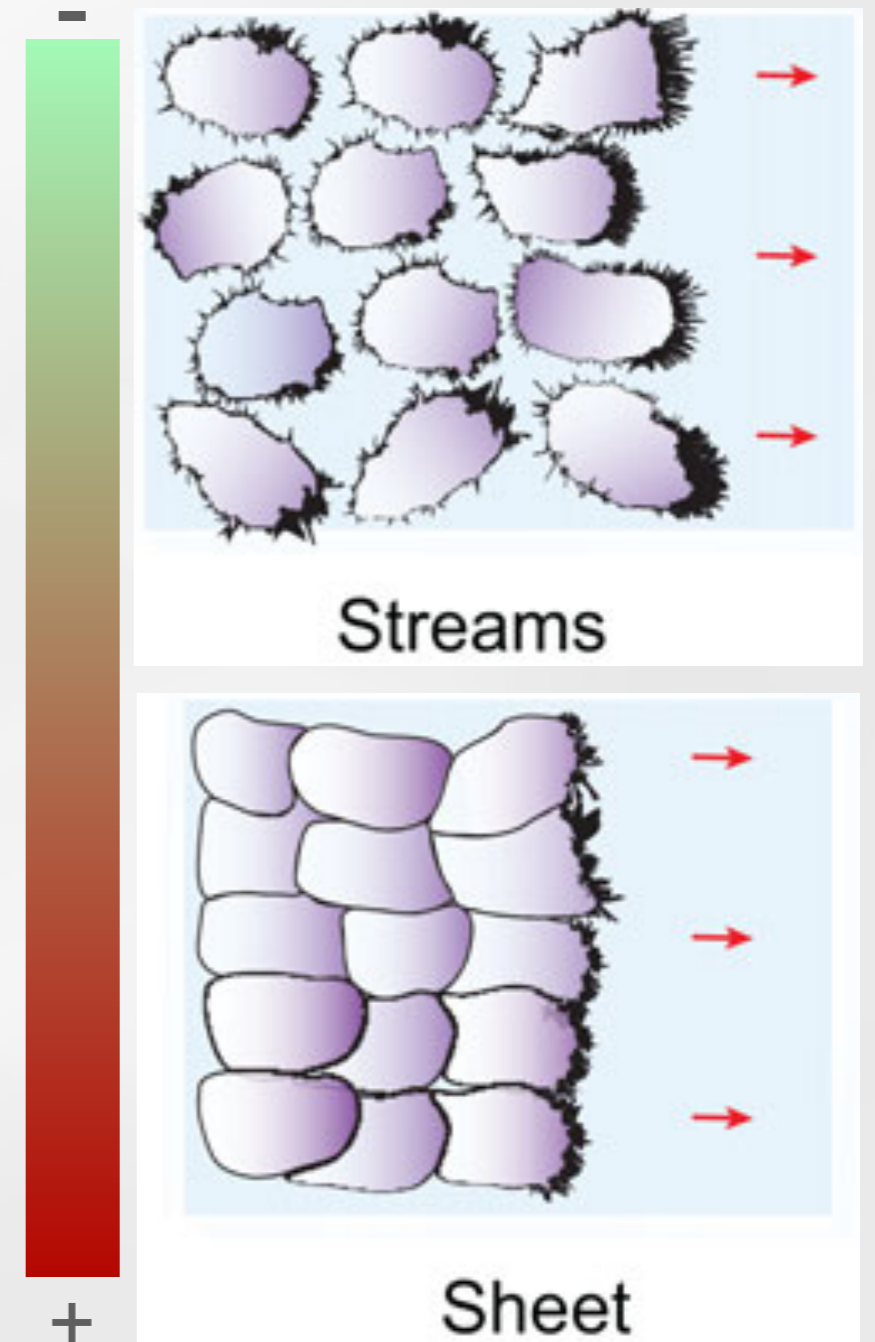
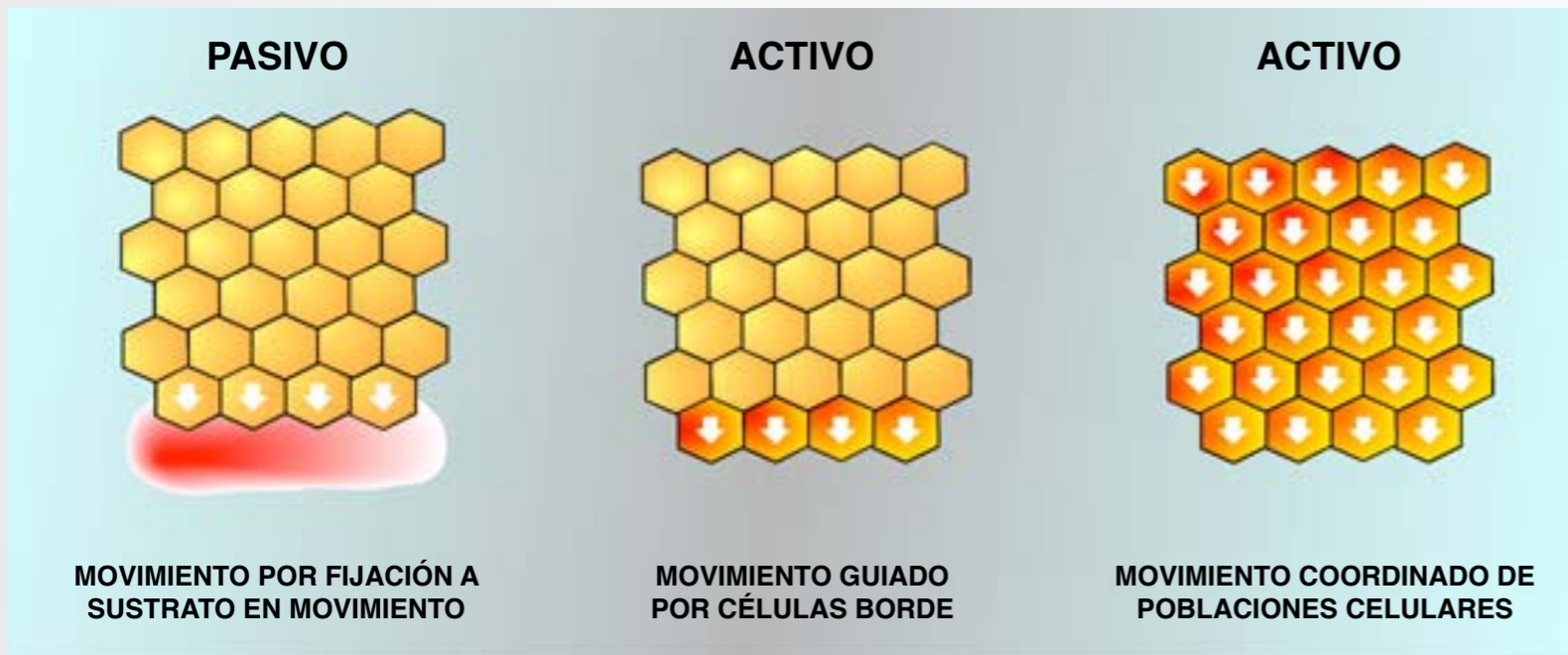
● Microtúbulos (tubulina)



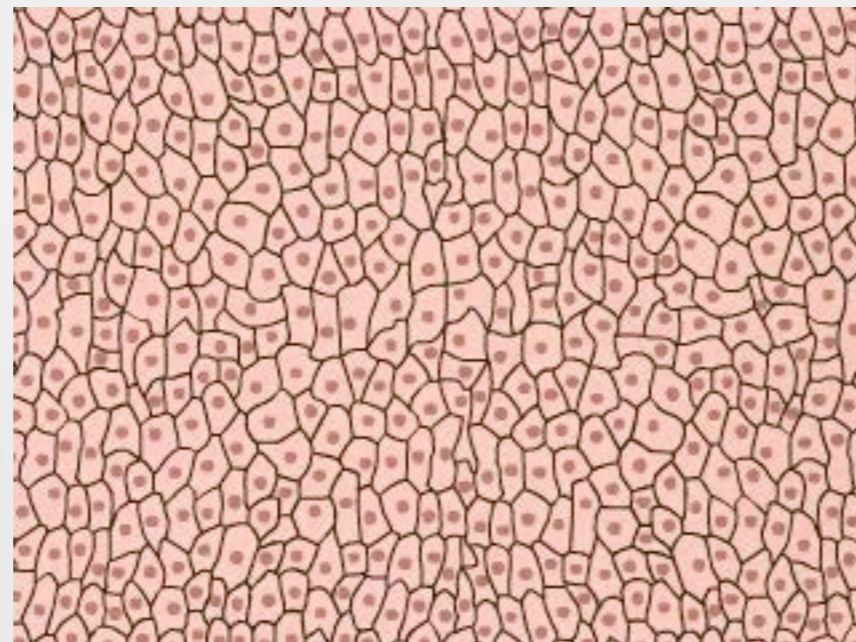
Las células también se pueden mover formando grupos con:

Distinta contribución de las células

Distinta compactación



Modelo in vitro
"wound healing"

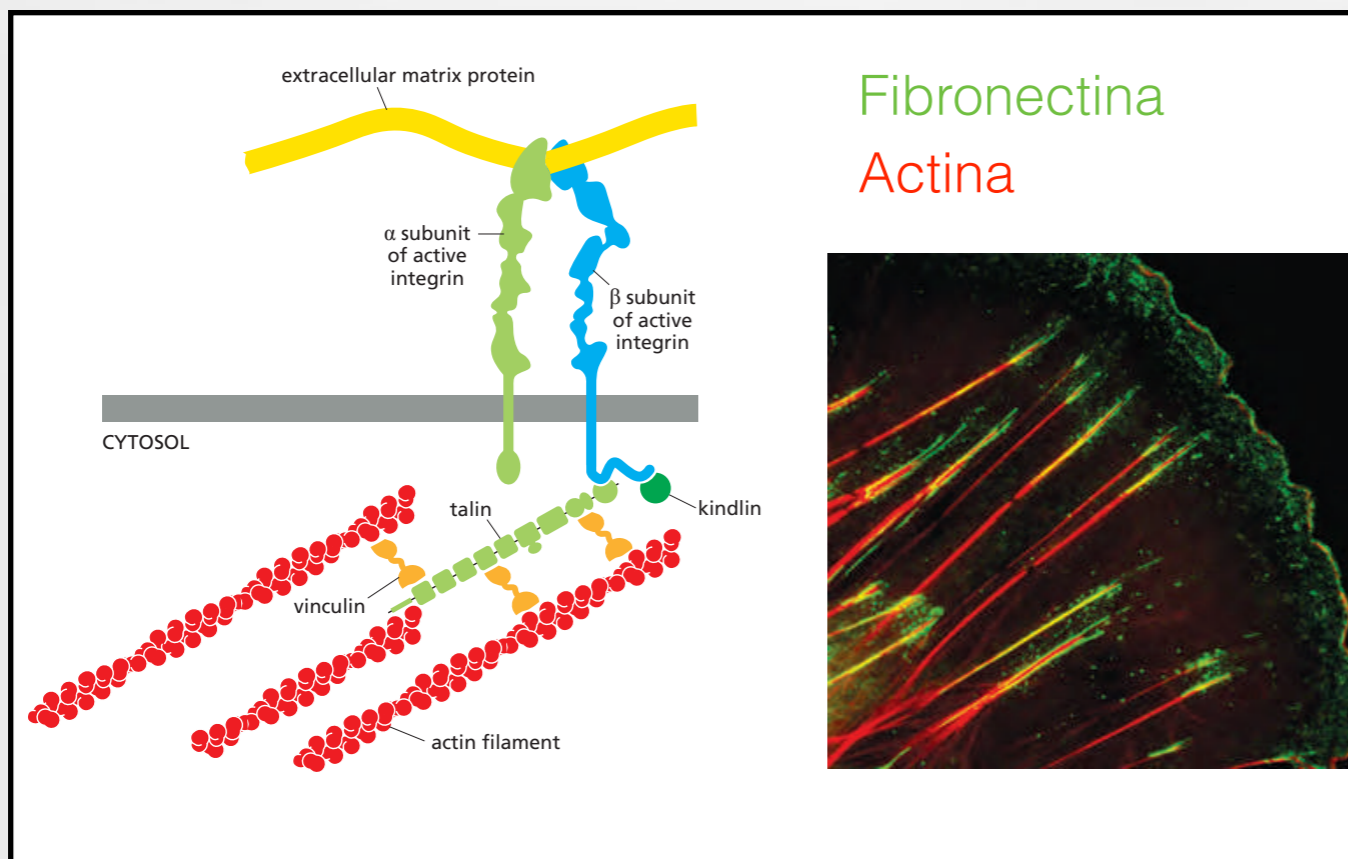
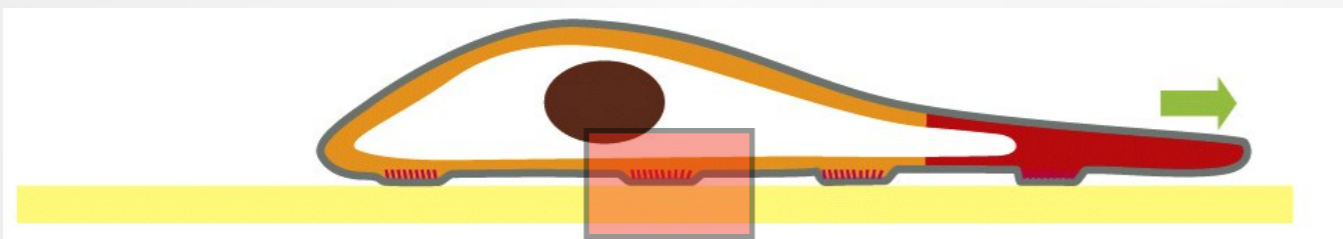




Los sustratos de migración celular son:

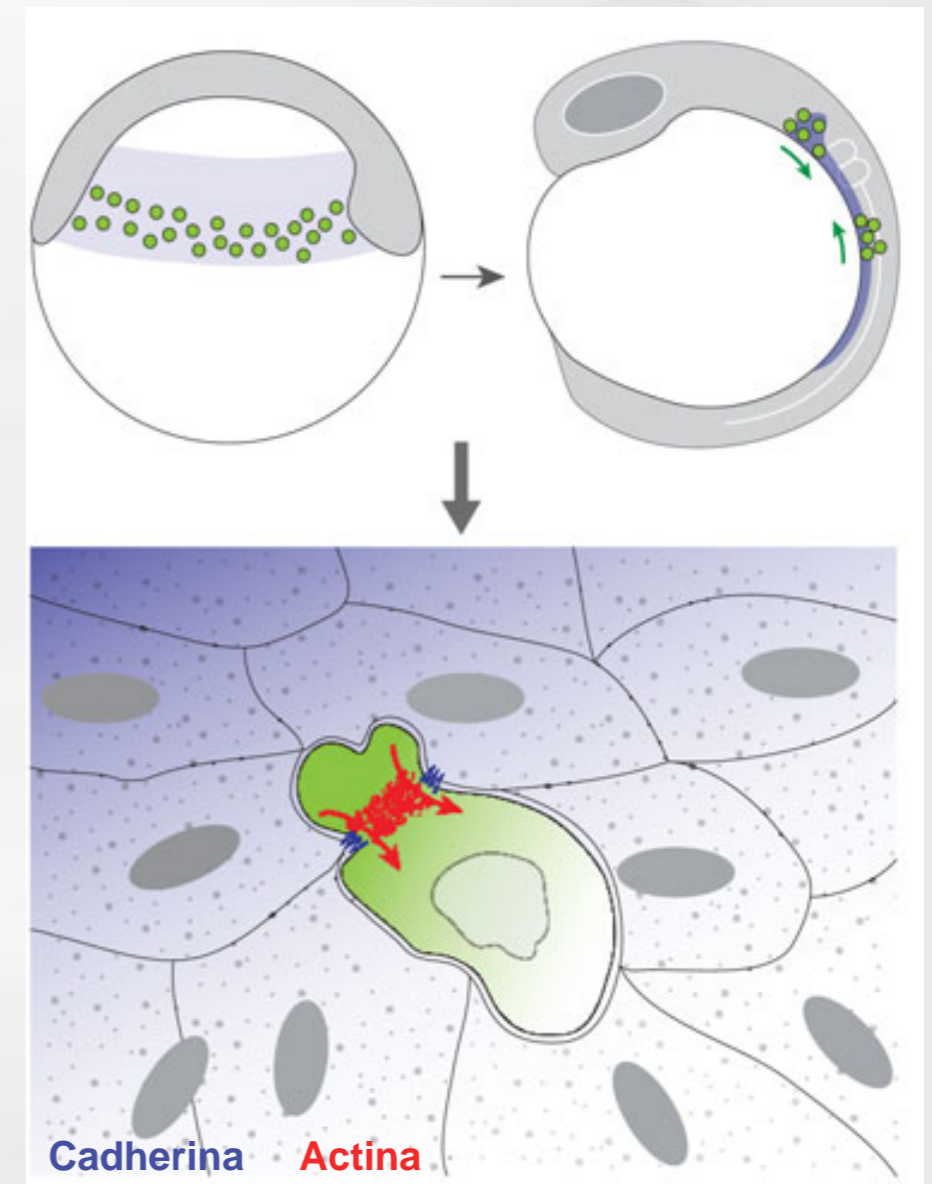
Matriz extracelular

- Mezcla de proteínas (colágeno, fibronectina), agua y polisacáridos.
- Interacción **célula-matriz** (integrinas-fibronectinas)



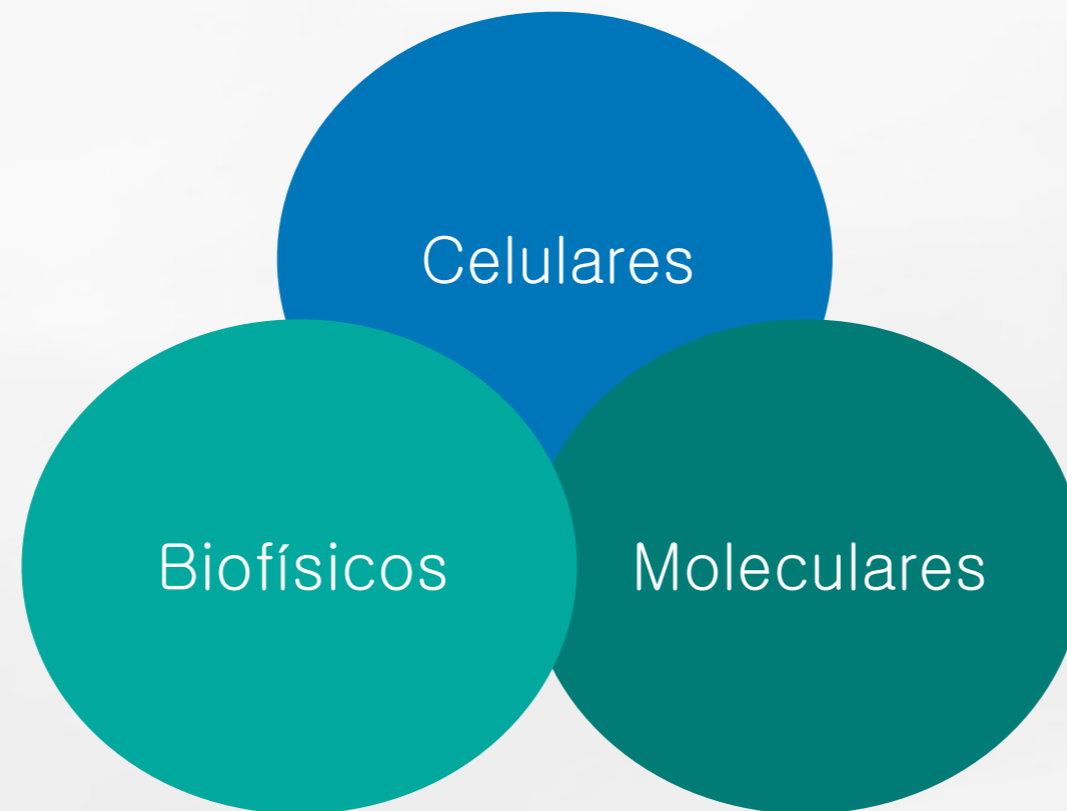
Otras células

Células germinales





¿Cómo estos factores se Inter-relacionan para la generación/mantenición de la forma embrionaria?



Visión Evo-Devo



Morfogénesis

- Perspectiva histórica: Ontogenia y filogenia.
- Influencia de factores celulares, químicos y biofísicos.
- Gastrulación.

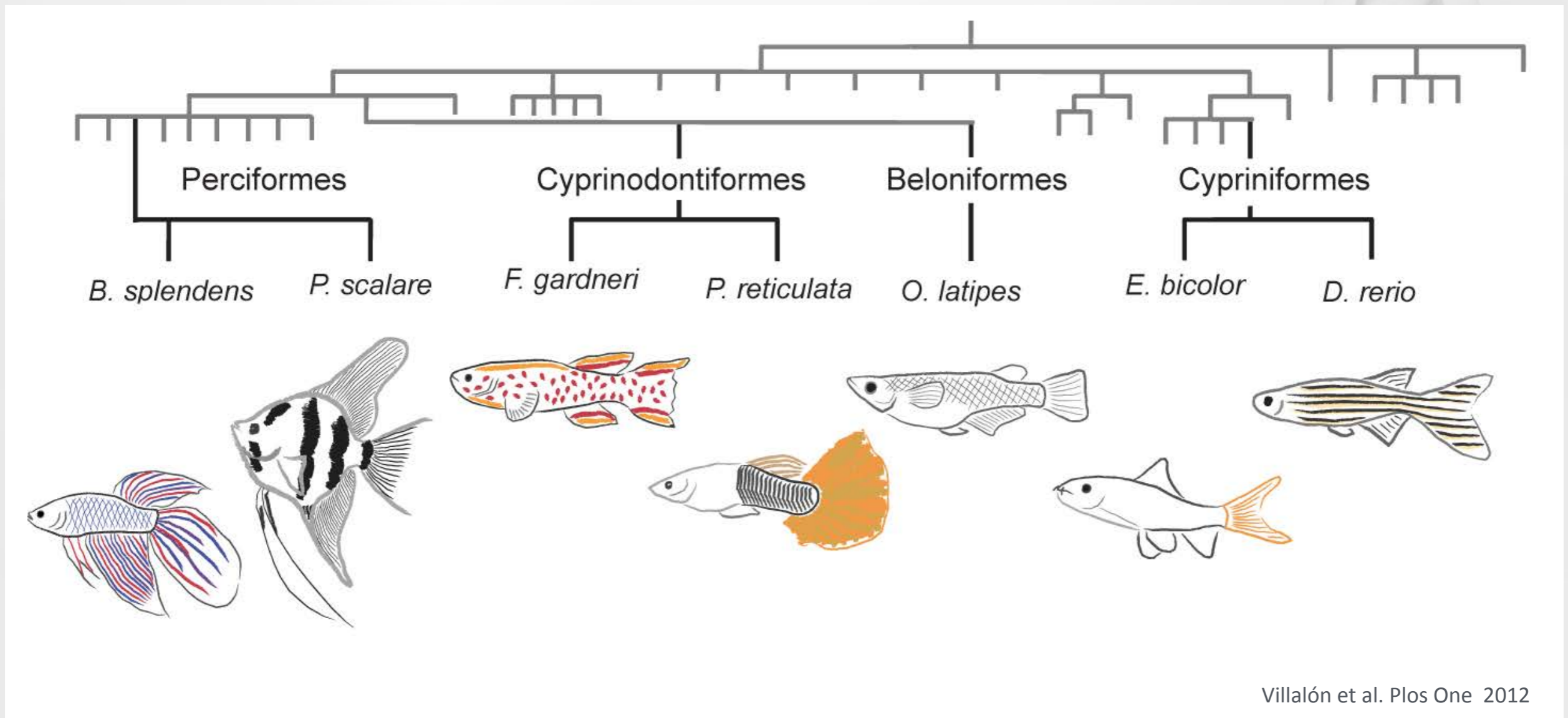
Migración celular

- Conceptos generales.
- Peces anuales como modelo de migración celular.

Peces teleósteos: modelo de estudio de la forma embrionaria



- En la actualidad existen alrededor de 27000 especies, lo cual corresponde a casi la mitad de los todos los vertebrados.
- Los ejemplares mas antiguos se corresponden al período triásico tardío.
- Extraordinaria variabilidad de habitats, estilos de vida y tipo de desarrollo embrionario.





La forma a través de los ojos de peces teleósteos





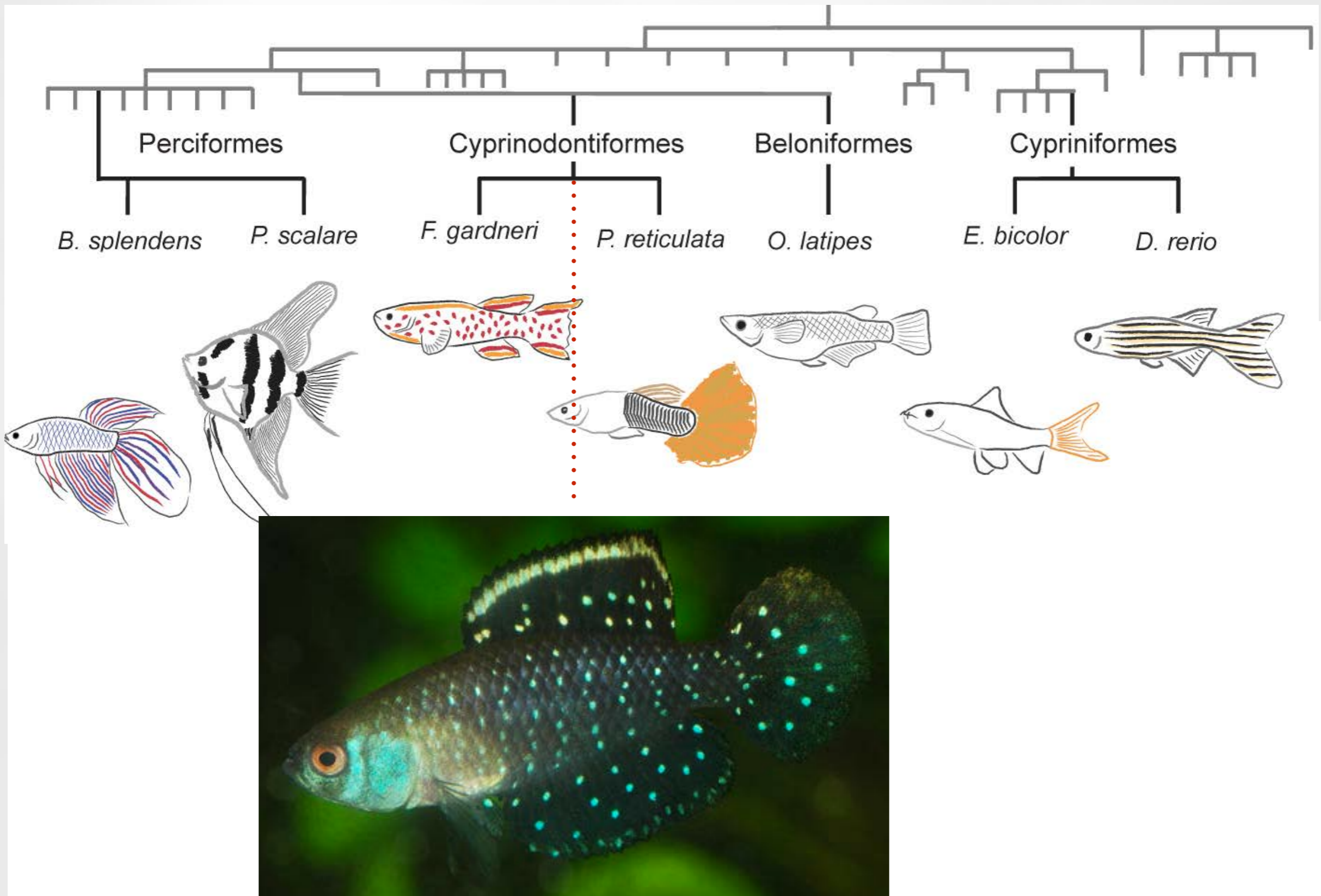
Desarrollo temprano en peces: conservación morfológica.



Los dominios extraembrionarios correspondientes a la capa envolvente (**EVL**) y capa sincicial vitelina (**YSL**) contactan a las células embrionarias (**DCL**)



Peces teleósteos anuales como modelo de estudio de epibolia

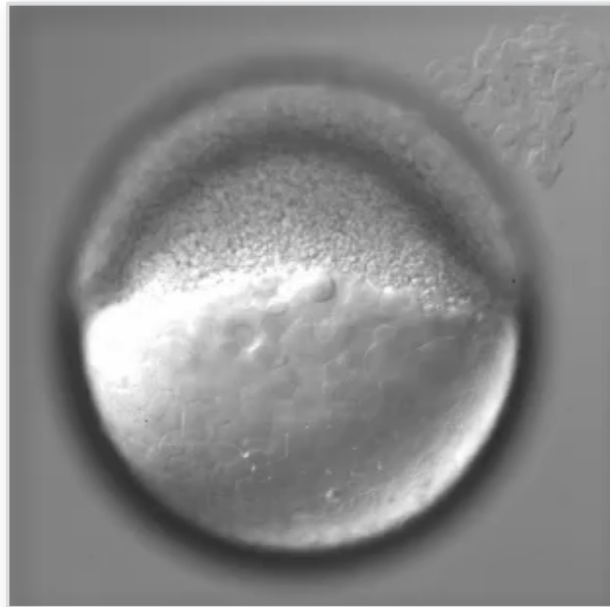


Austrolebias nigripinnis

Peces teleósteos anuales como modelo de estudio de epibolia



En los peces anuales la epibolia esta separada de la gastrulación



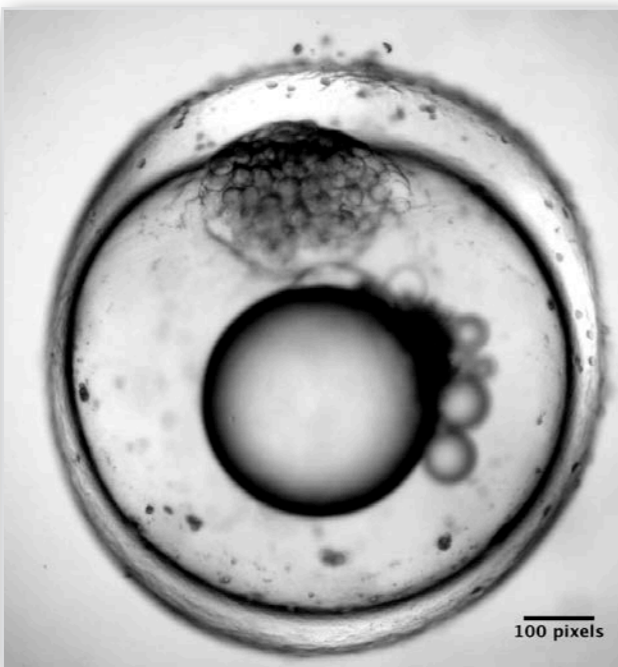
pez cebra



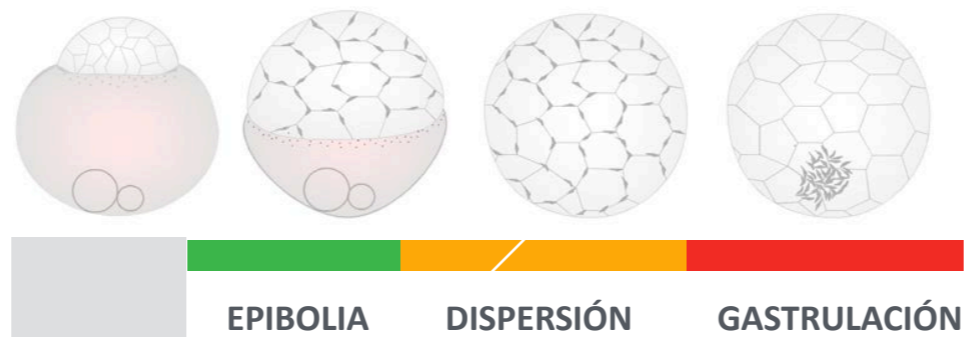
Desarrollo exo-útero

Embriones transparentes

Genómica



pez anual



Epibolia separada de la gastrulación

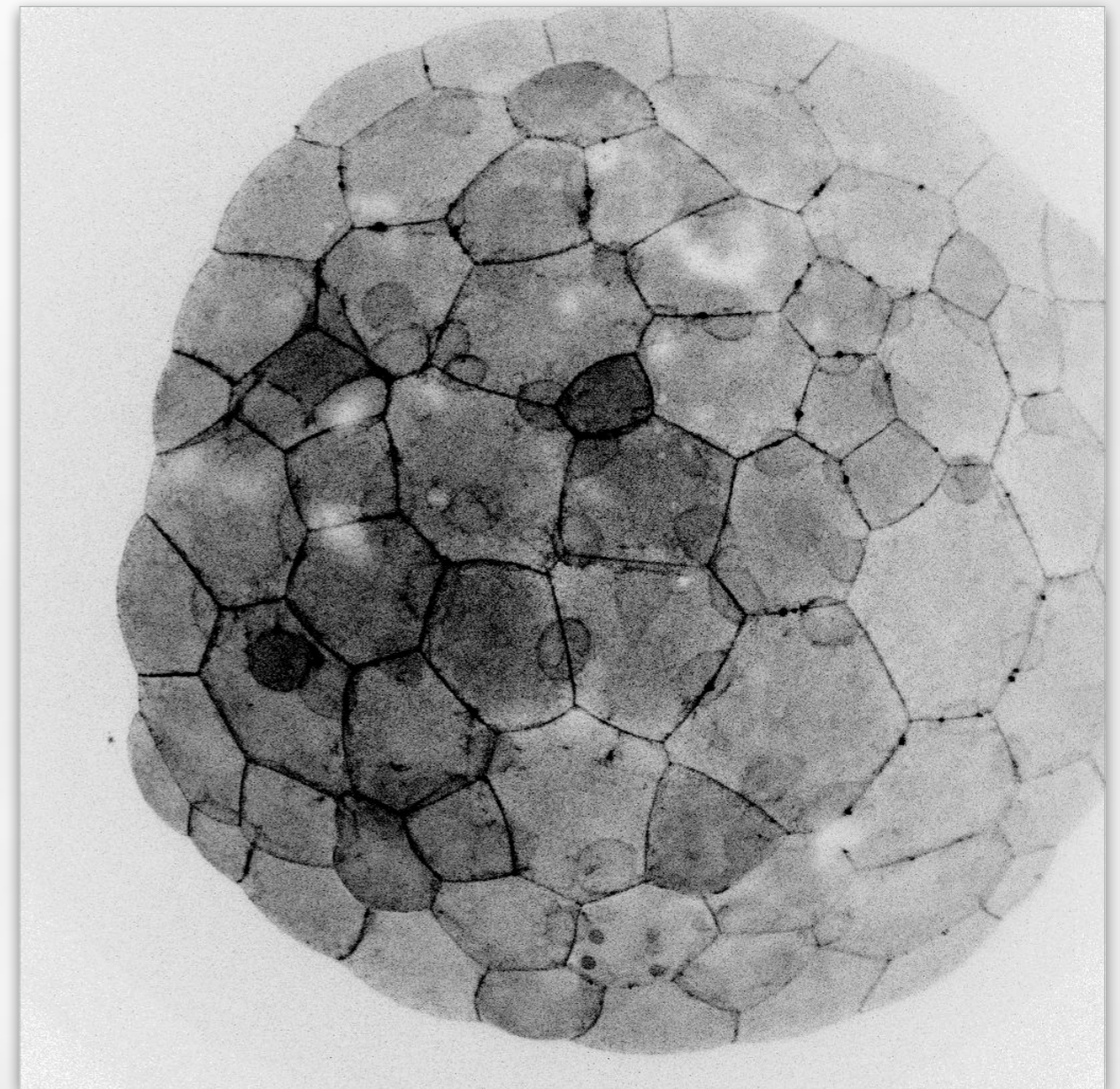
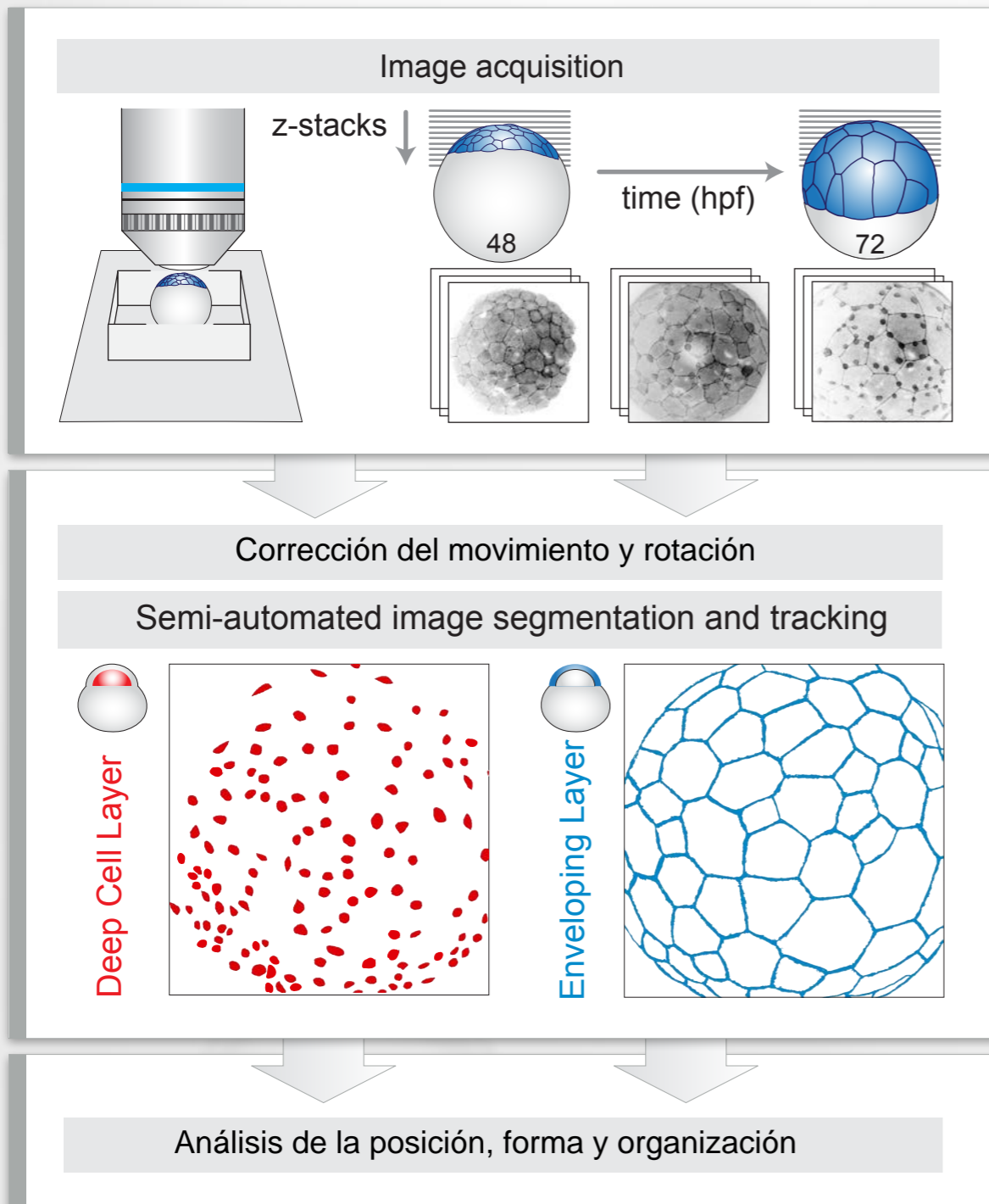
Baja densidad celular



Análisis de la epibolia en peces teleósteos anuales



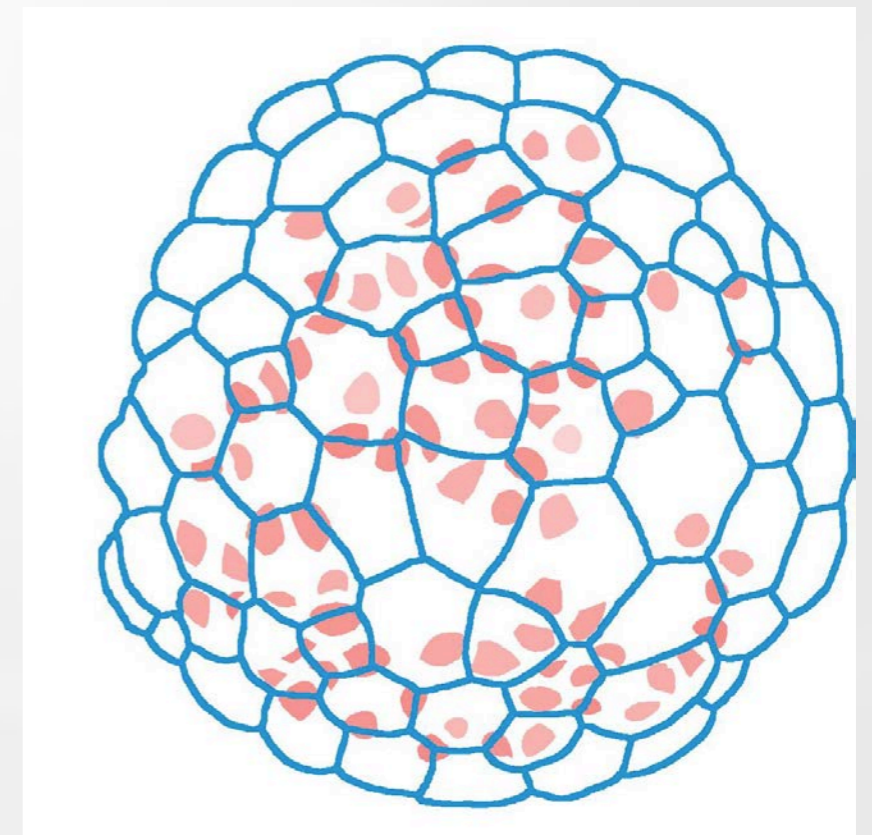
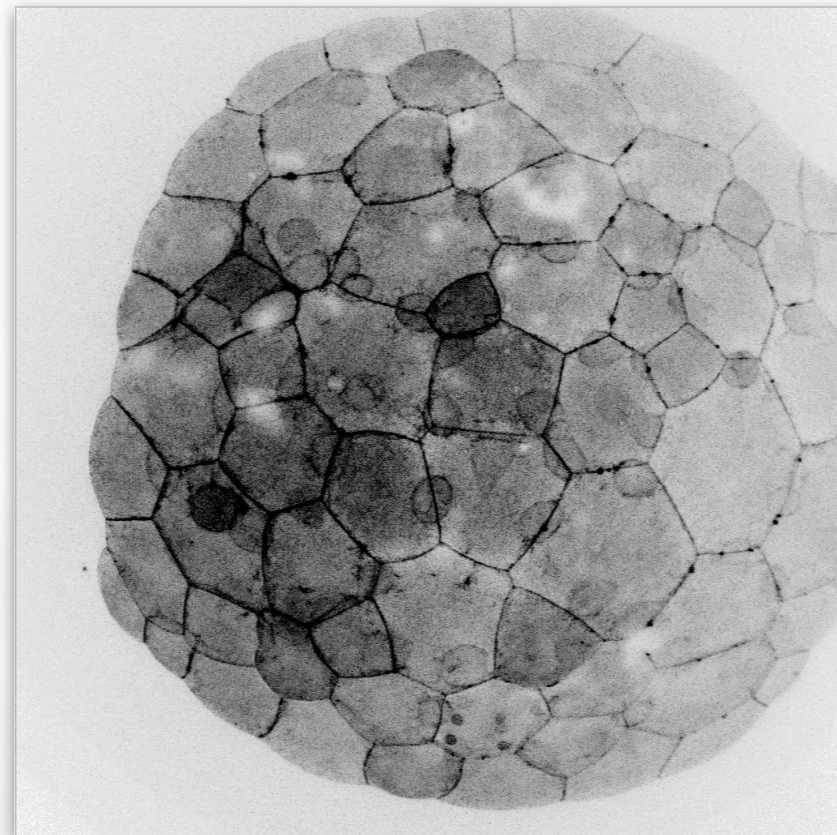
Diseño Experimental · desde la adquisición de imágenes hasta el análisis matemático de la conducta celular.



LifeACT-GFP (or GAP43-EGFP)



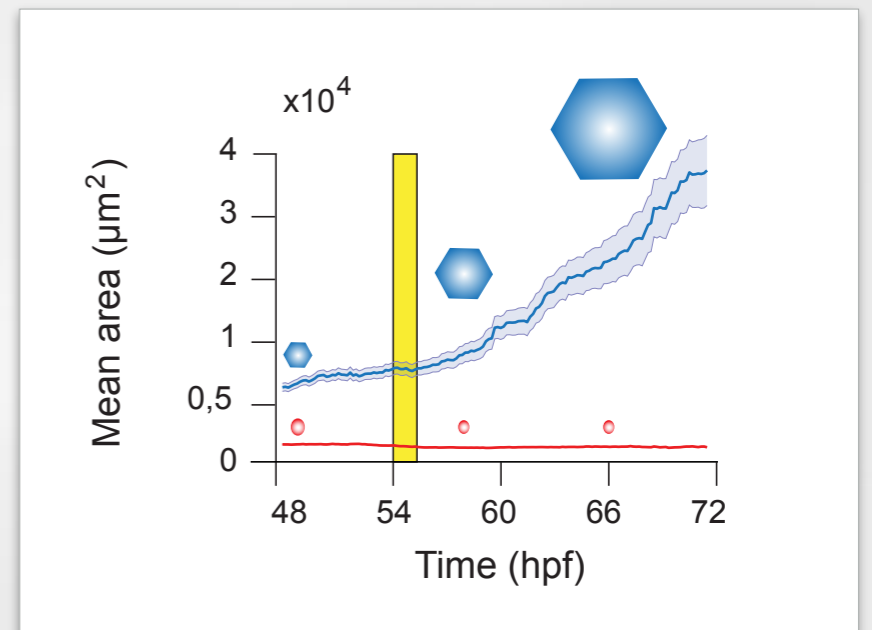
Epibolia del Epitelio • Expansión tisular sin división celular.



LifeACT-GFP (or GAP43-EGFP)

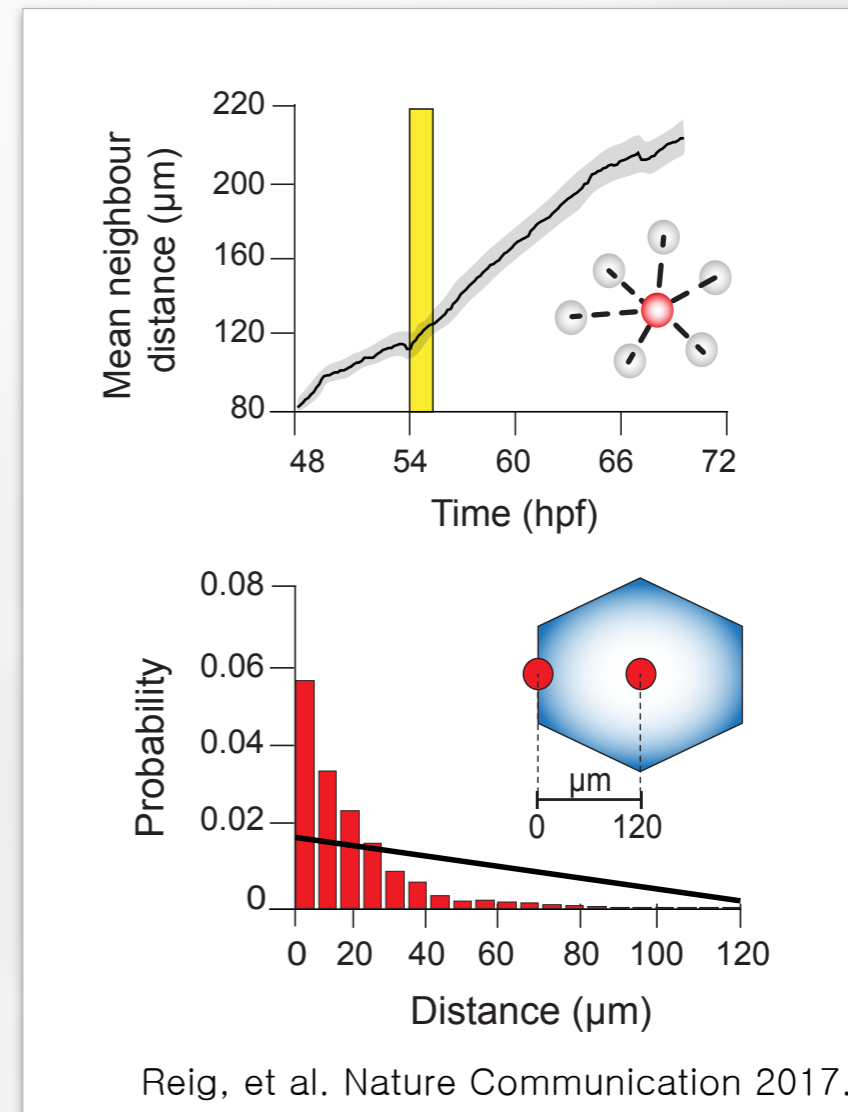
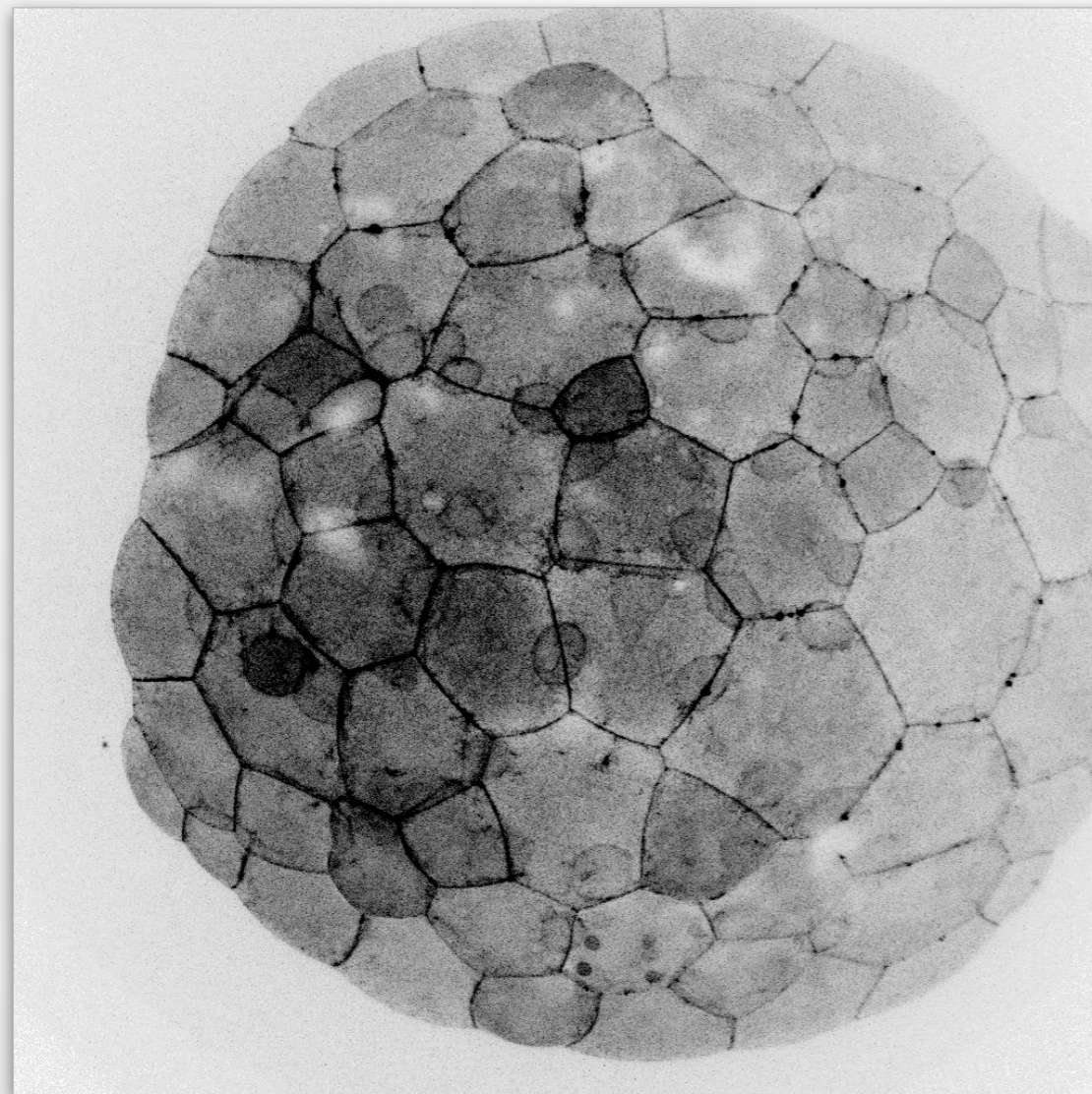
Epibolia del Epitelio

- No hay cambio del número de células.
- No se visualiza actividad de membrana en el borde del blastodermo.
- La tracción la ejerce la capa sincicial.





Epibolia del mesénquima • Movimiento celular autónomo.

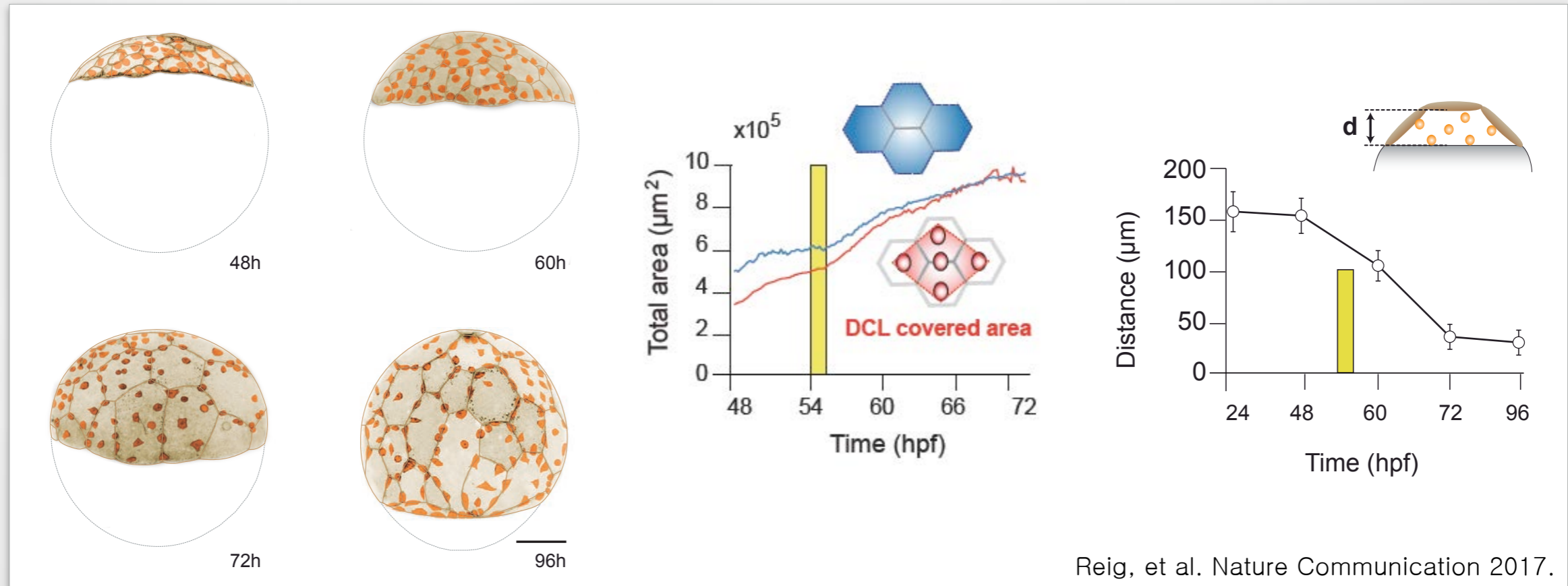


Epibolia del Mesénquima

- Se dispersan a lo largo del epitelio.
- Permanecen mas tiempo en los bordes de EVL.
- Es arrastrado por el epitelio.



Epibolia del blastodermo • contactos entre epitelio y mesénquima.



Reig, et al. Nature Communication 2017.

Epibolia del Blastodermo

- Existe un acoplamiento entre las epibolias del epitelio y el mesénquima
- El mesénquima se mueve entre EVL y la capa sincicial.

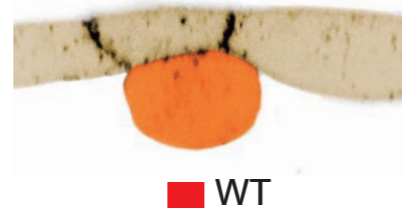


El blastodermo profundo interacciona con la EVL.



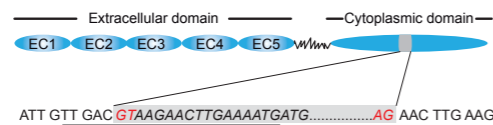
E-cadherina se requiere para establecer contacto entre el epitelio y el mesénquima.

Silvestre



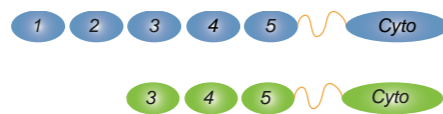
WT

Morfolino anti e-cadherina

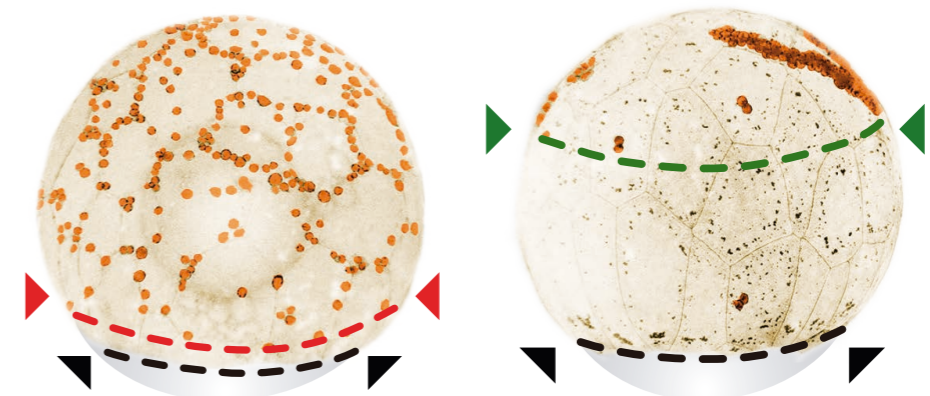
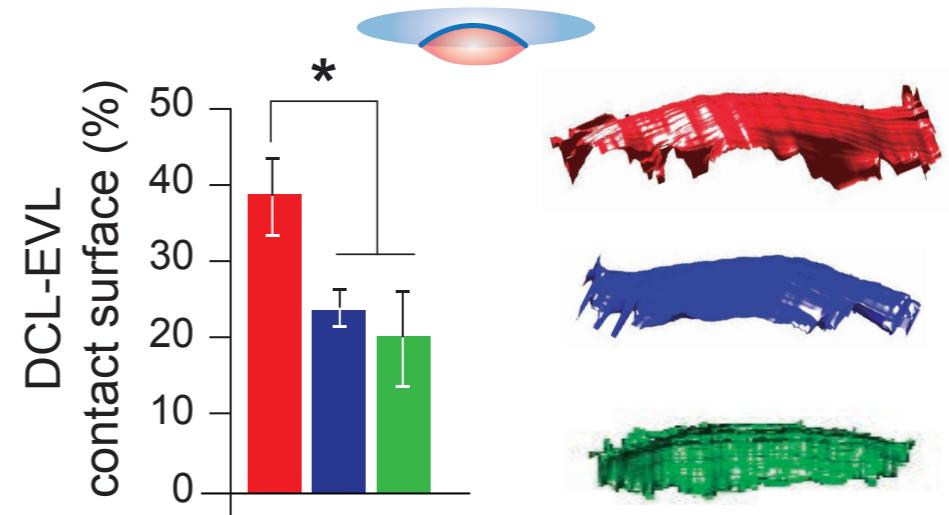


e-cad-MO

Dominante negativo de E-Cadherina



dn E-Cad



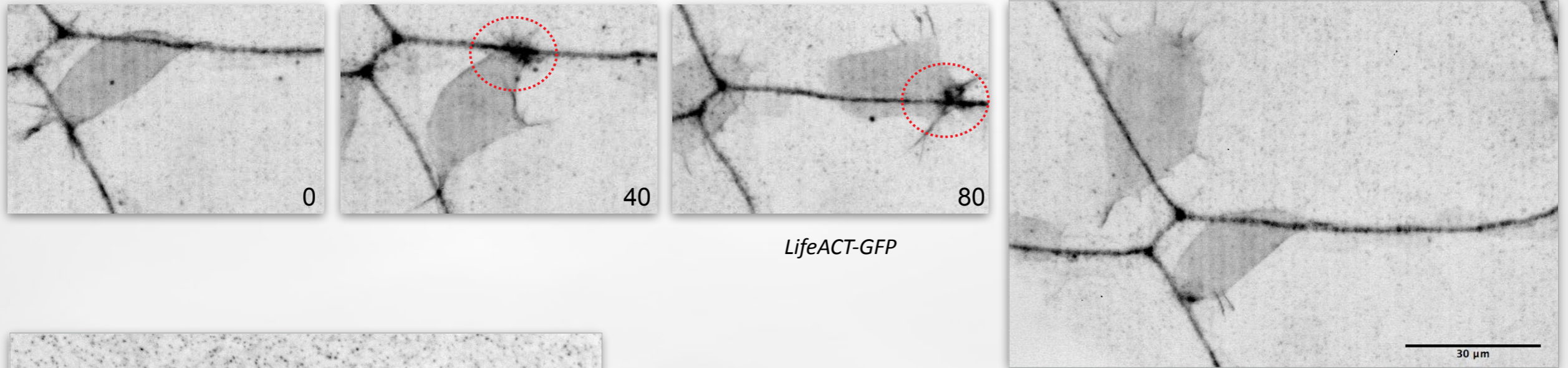
WT

dn E-Cad

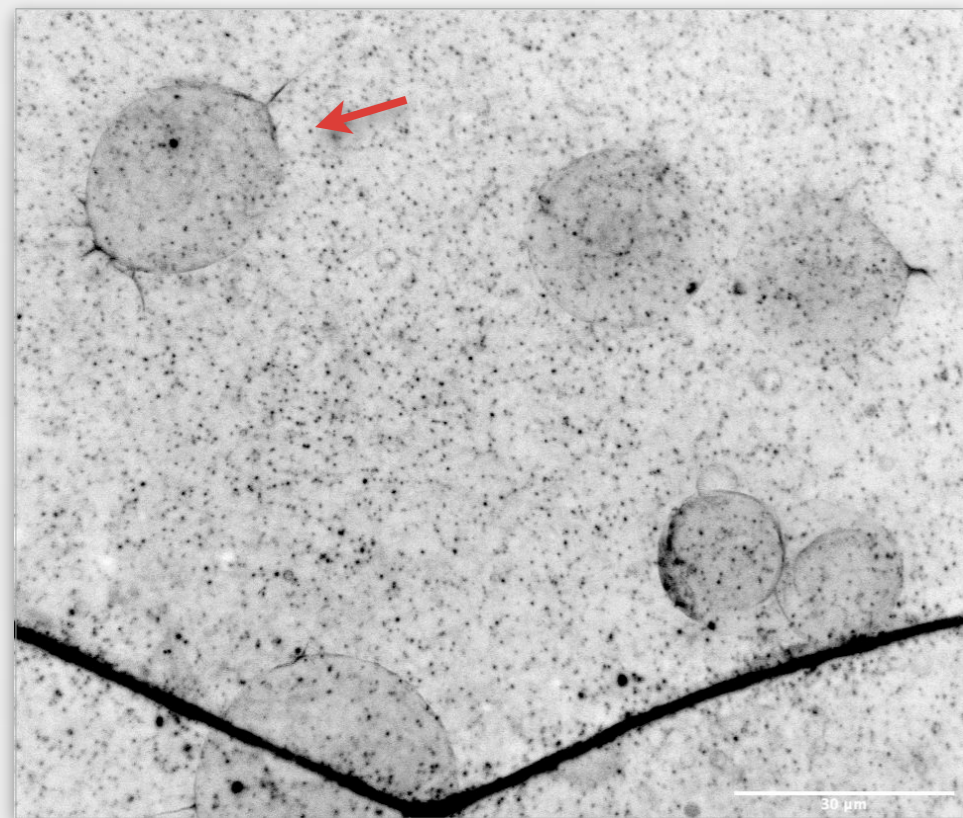
Los bordes de EVL funcionan como atractores de corto alcance



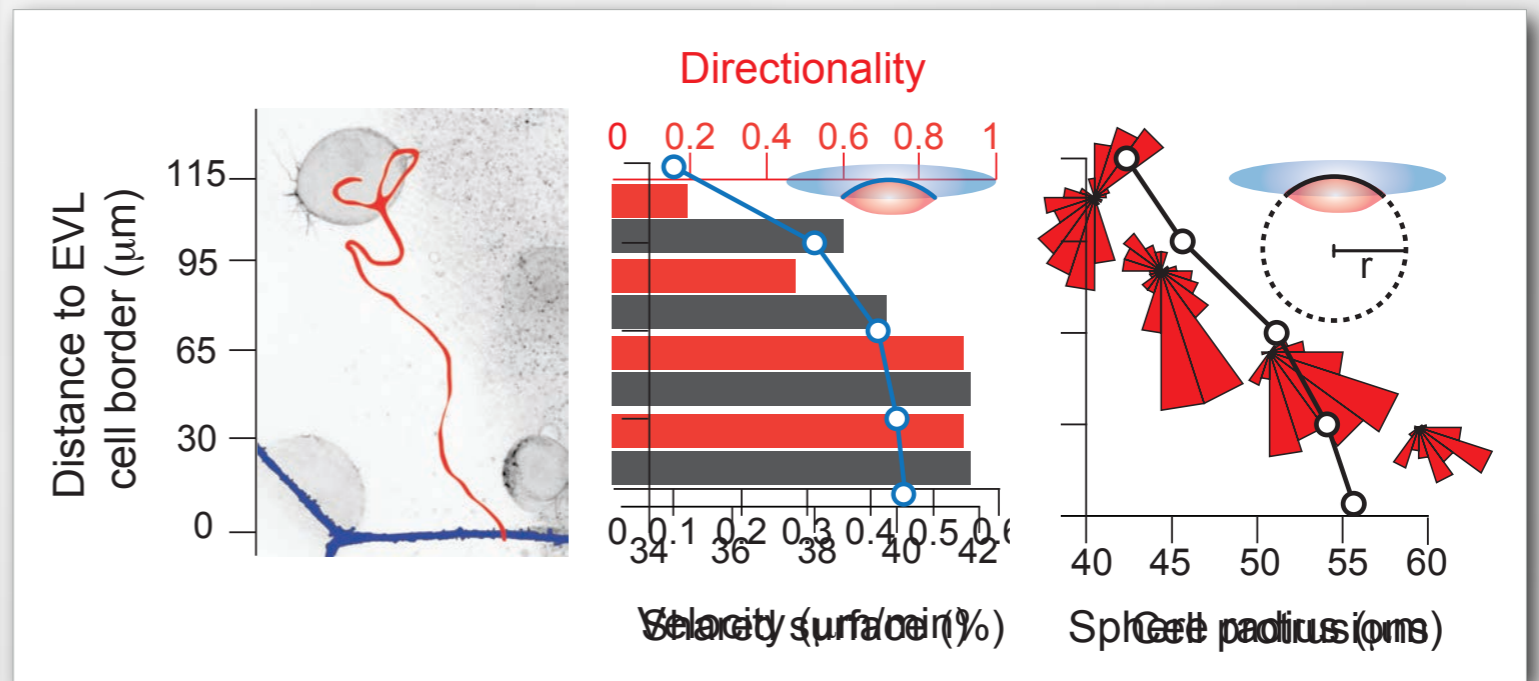
Las células del blastodermo profundo pueden “sentir” y direcciones sus movimientos hacia el borde de la EVL



LifeACT-GFP

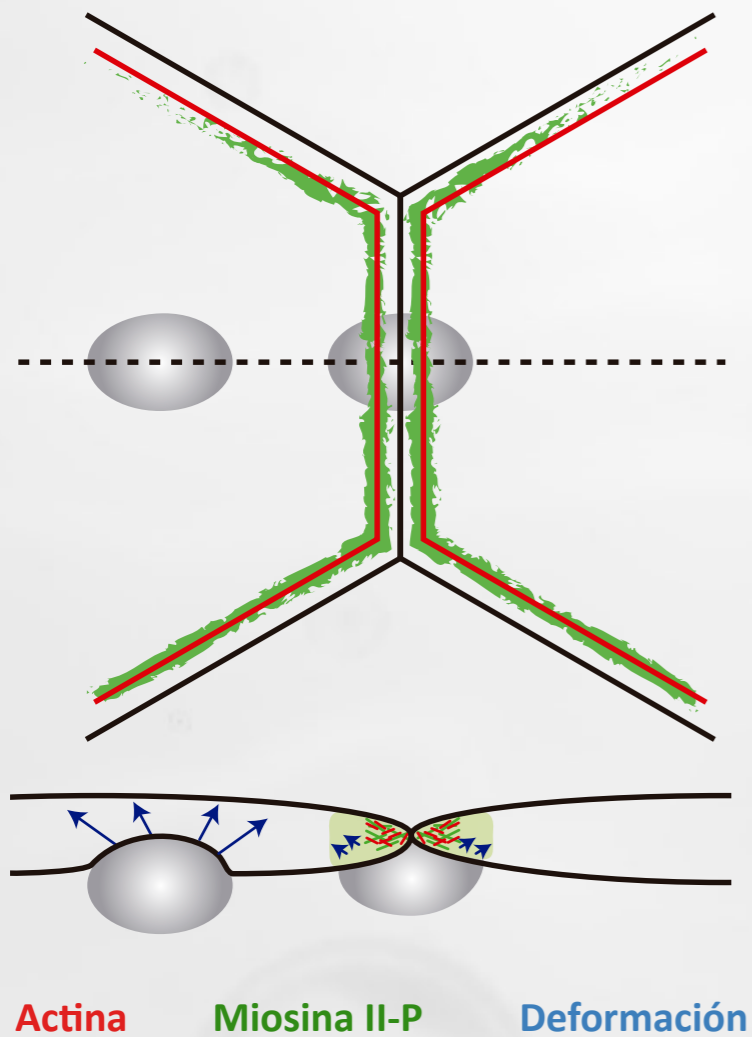


LifeACT-GFP

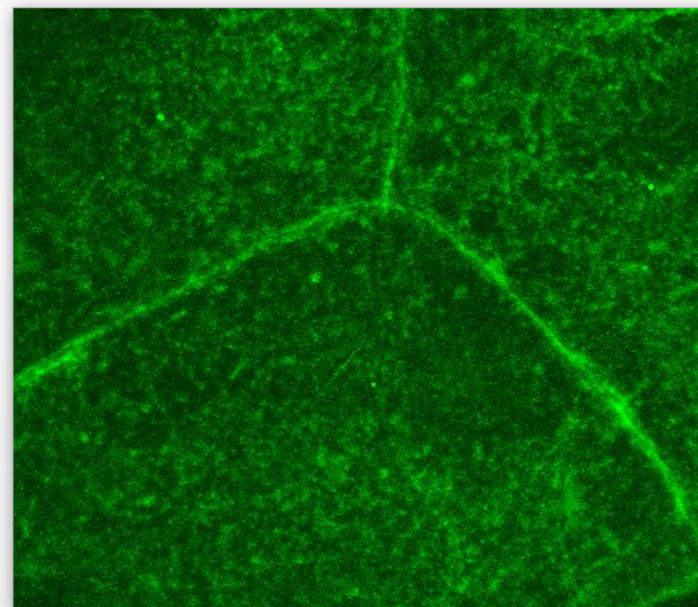


Los bordes de EVL tienen distintas propiedades físico-mecánicas

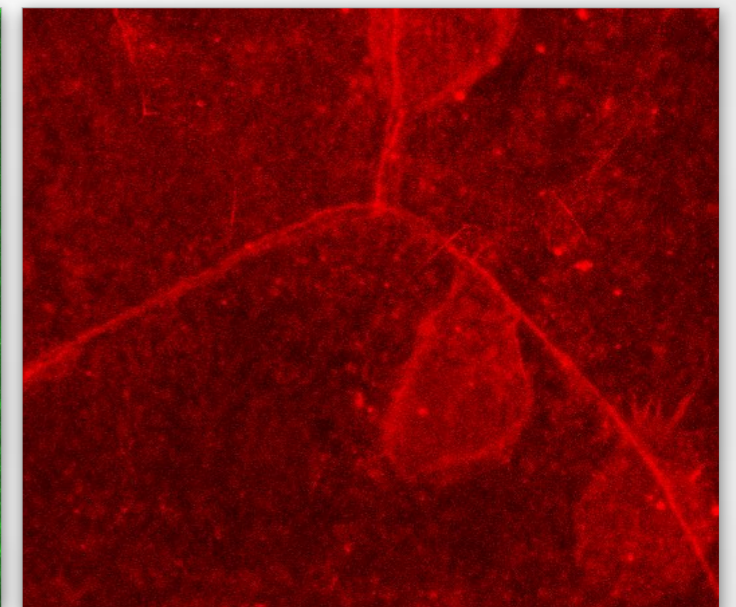
Los bordes de la EVL presentan mayor tensión cortical y menor deformabilidad que las regiones más centrales de la EVL.



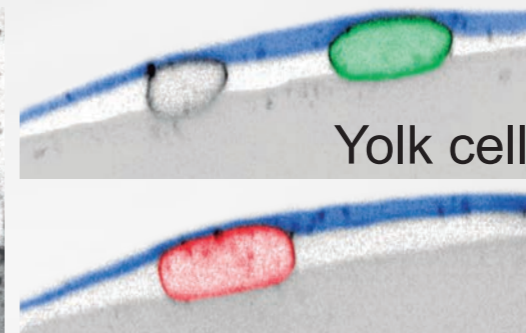
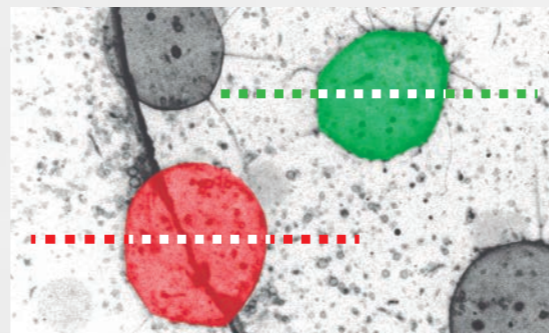
tensión cortical \approx deformabilidad



anti-fosfomiosina II



Faloidina

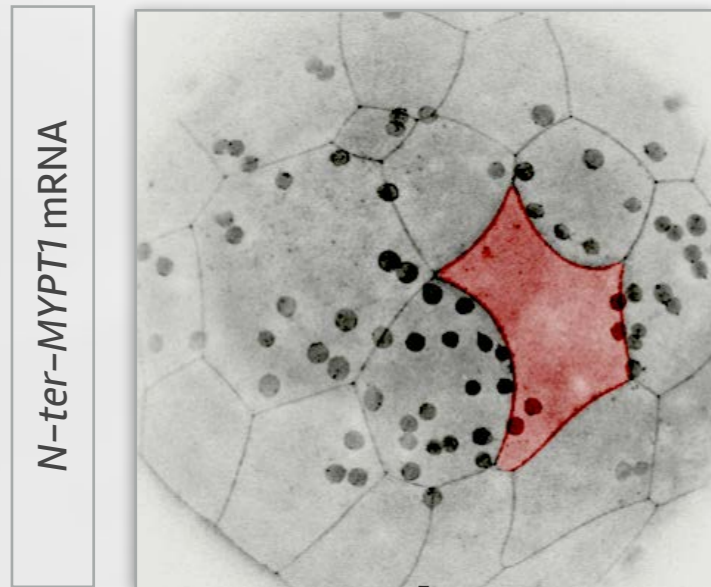
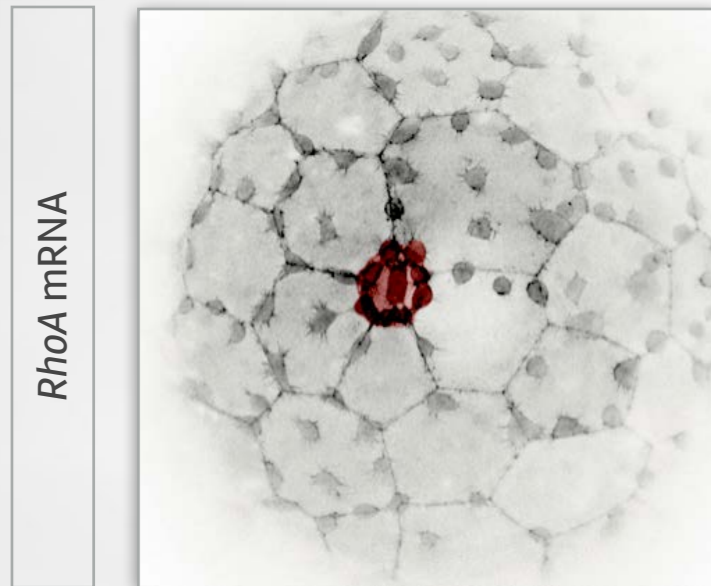




El blastodermo profundo y la tensión cortical de la EVL



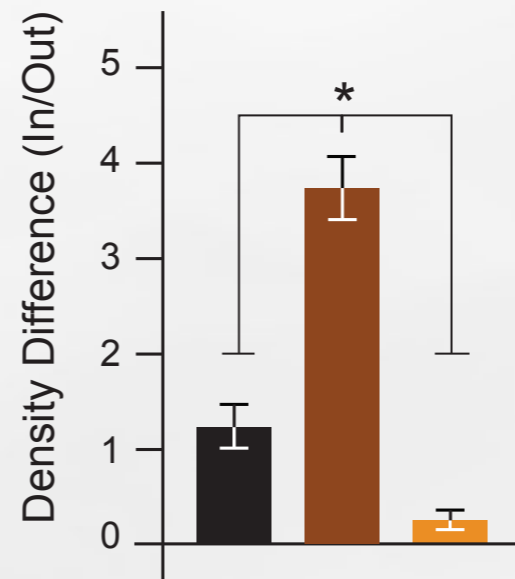
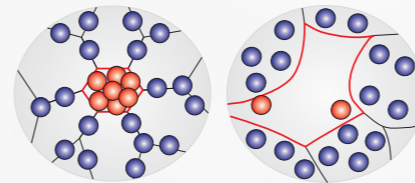
Cambios locales en la tensión de la EVL son transmitidos al blastodermo profundo lo cual provoca cambios en la conducta celular



Lifect-GFP

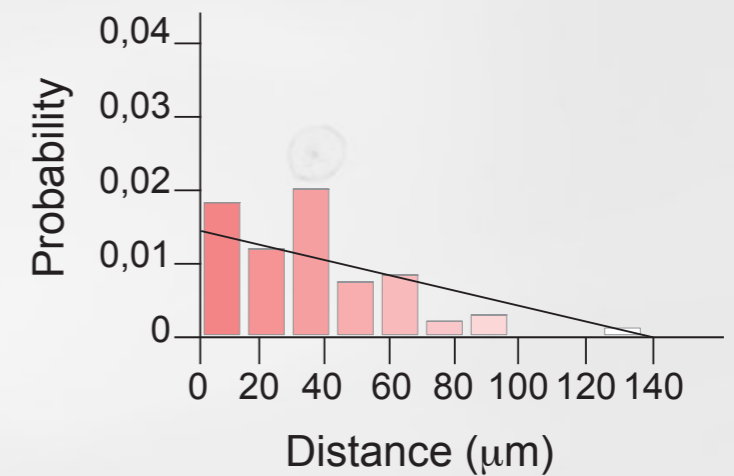
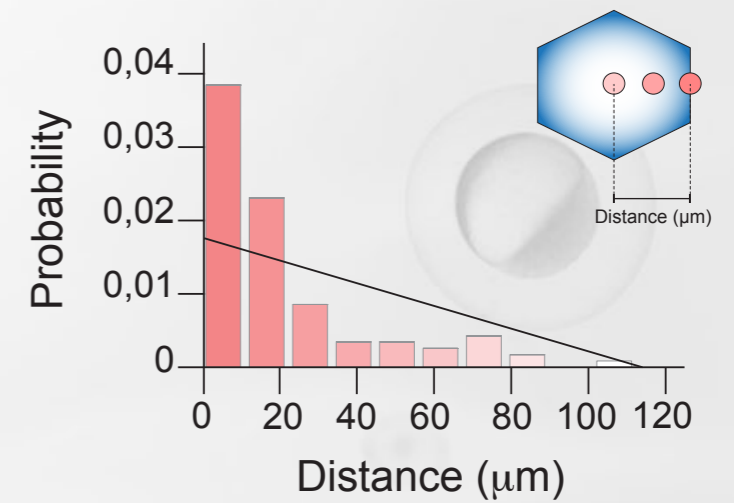
Célula inyectada

DENSIDAD CELULAR



- Control
- RhoA
- MYPT1

DISTRIBUCIÓN ESPACIAL





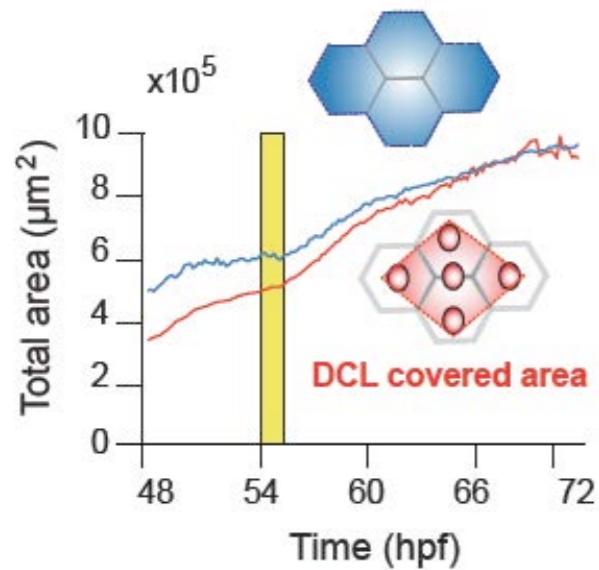
Conclusiones



1. Acoplamiento de expansión entre DC-EVL

2. Interacción física depende de E-Cadherina

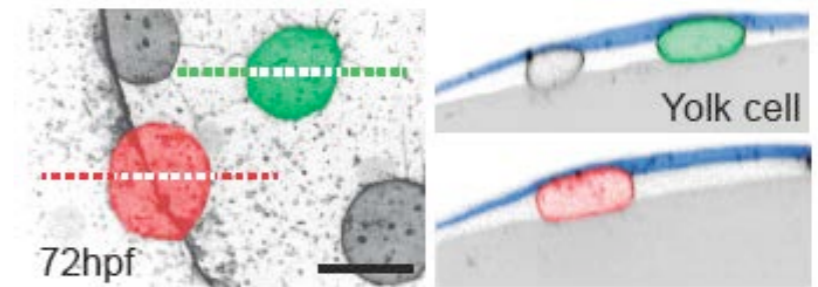
3. Aspectos mecánicos del sustrato favorecen la segregación hacia los bordes



WT



dn E-Cad



72hpf



Mecanismo en el cual existe una coordinación entre la expansión de la EVL, con el subsecuente cambio en las propiedades biofísicas del tejido, y la migración del blastodermo profundo.

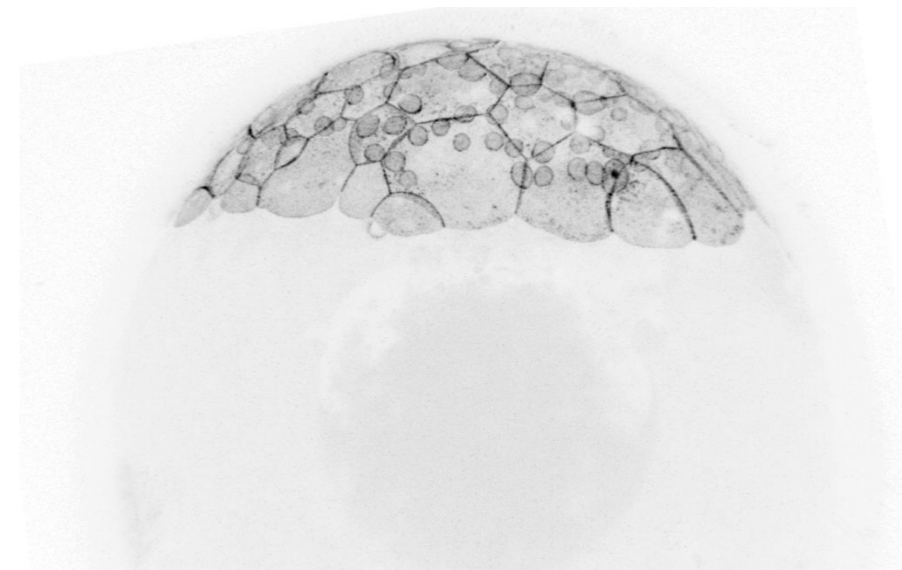
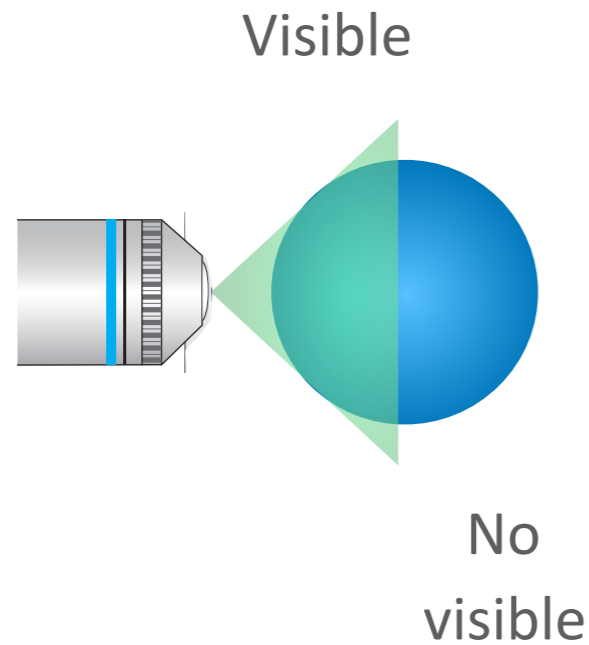
Biofísicos

Celulares

Moleculares

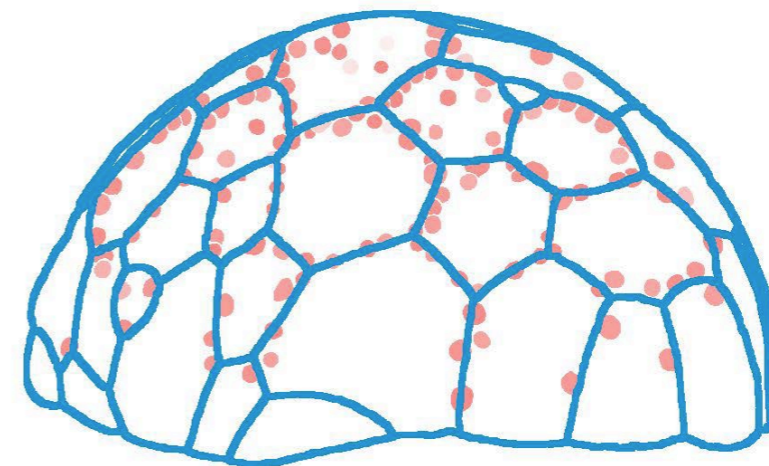


Microscopía confocal convencional • visualizando el lado oscuro de la luna.



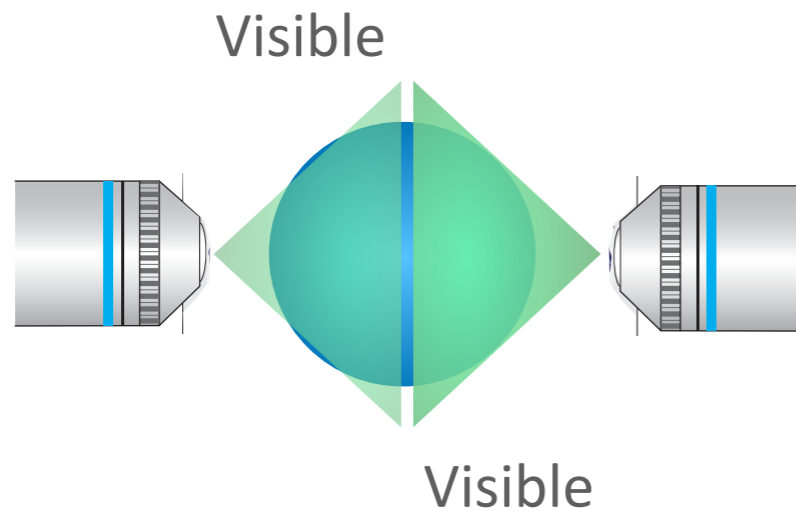
**Microscopía
Confocal
Convencional**

- Sólo es visible una “cara” del embrión



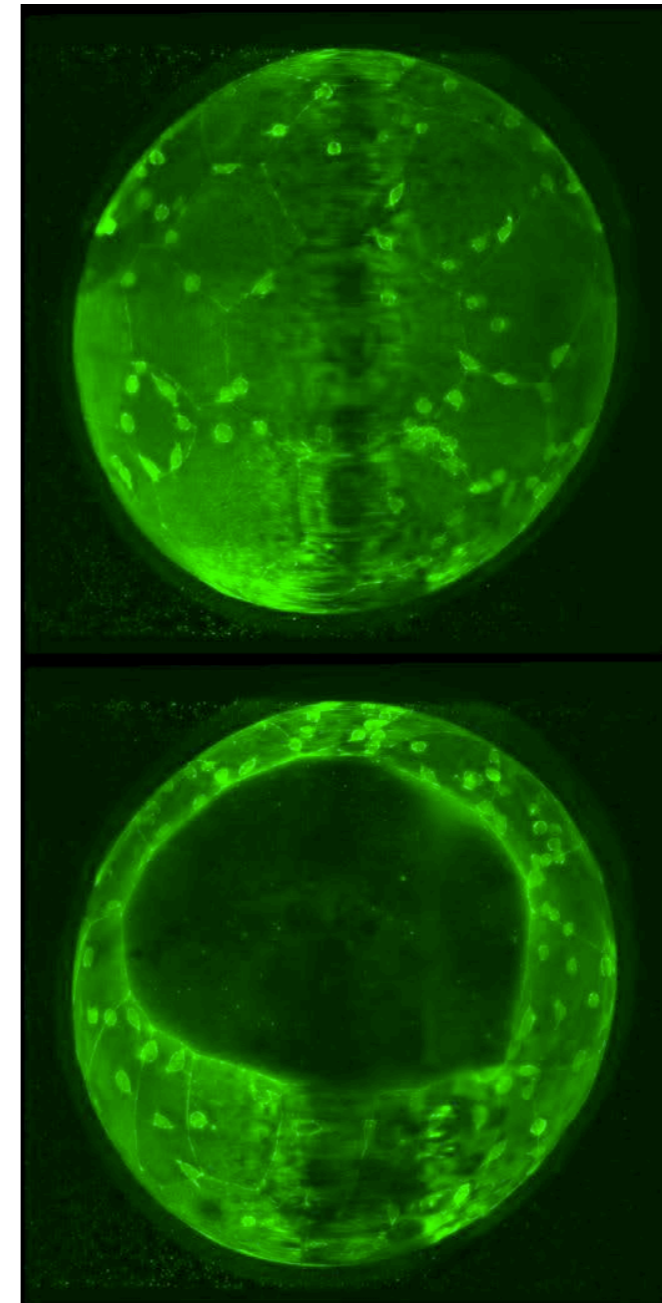


Microscopía de sábanas de luz • visualizando el lado oscuro de la luna.



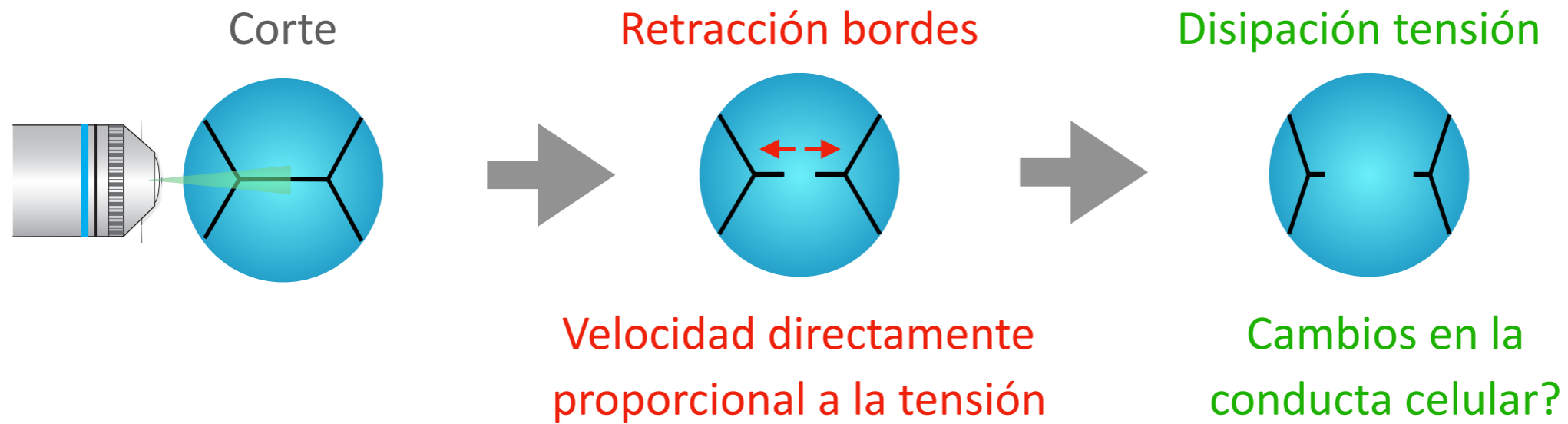
**Microscopía
Sábanas
De luz**

- Es posible visualizar el embrión completo



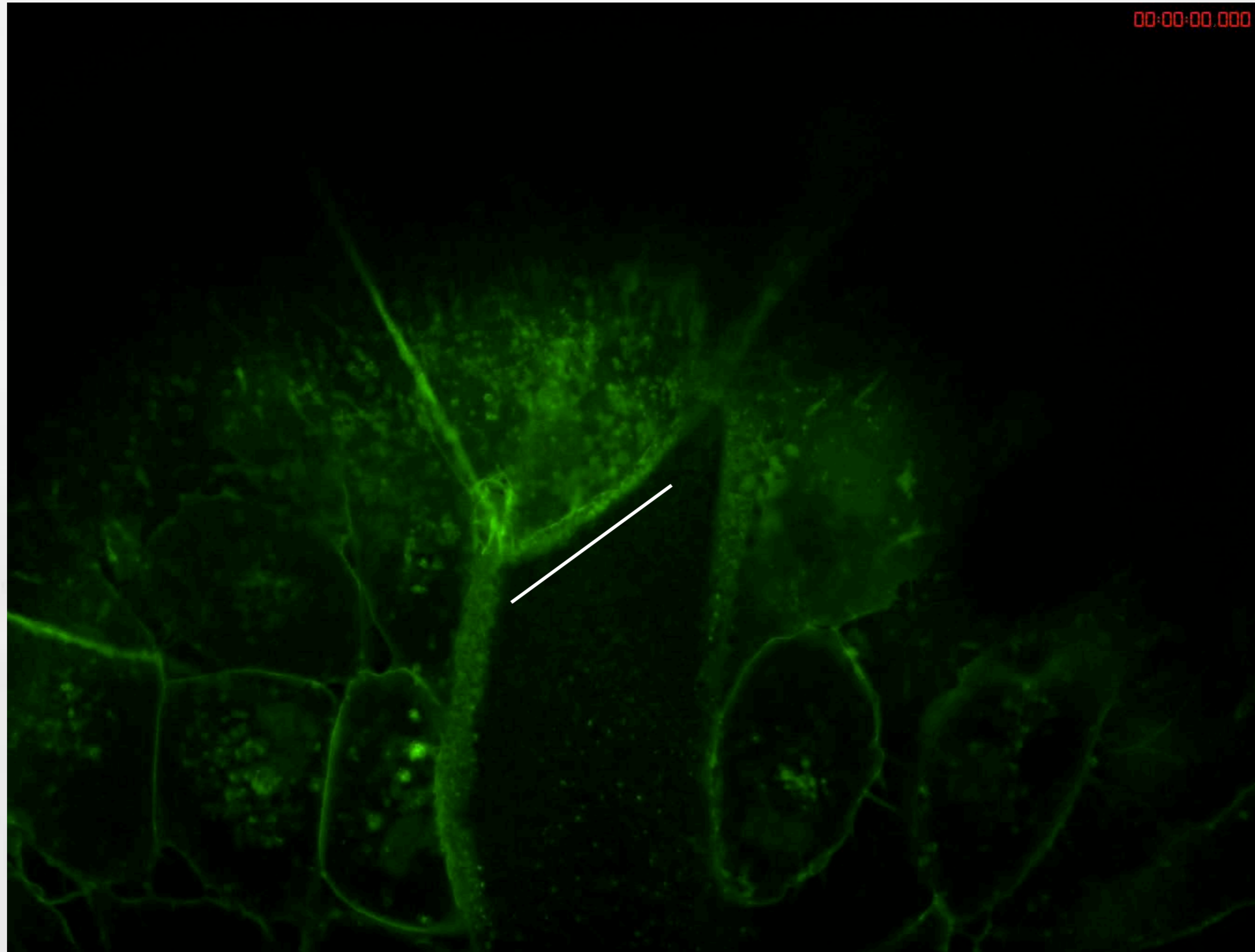


Corte láser · medición de tensión cortical *in vivo*.





Corte láser · medición de tensión cortical *in vivo*.





GRACIAS



GRACIAS

GRACIAS

GRACIAS