

Karoline Kobus

**EFEITO DA HOMOCISTEÍNA SOBRE OS MECANISMOS
CELULARES ENVOLVIDOS NA MORFOGÊNESE DA
MEDULA ESPINHAL E DO ESQUELETO AXIAL DE
EMBRIÕES DE *Gallus domesticus*: IMPLICAÇÕES NA GÊNESE
DOS DEFEITOS DO TUBO NEURAL**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento – PGBCD – da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – para a obtenção do Grau de Doutora em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Yara Maria Rauh Müller

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Evelise Maria Nazari

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Kobus, Karoline

Efeitos da homocisteína sobre os mecanismos celulares envolvidos na morfogênese da medula espinhal e do esqueleto axial de embriões de *Gallus domesticus*: implicações na gênese dos defeitos do tubo neural / Karoline Kobus ; orientadora, Yara Maria Rauh Müller ; co-orientadora, Evelise Maria Nazari. - Florianópolis, SC, 2013.

148 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. defeitos do tubo neural. 3. homocisteína. 4. ácido fólico. 5. embriões de galinha. I. Müller, Yara Maria Rauh. II. Nazari, Evelise Maria. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. IV. Título.

Karoline Kobus

**EFEITO DA HOMOCISTEÍNA SOBRE OS MECANISMOS CELULARES
ENVOLVIDOS NA MORFOGÊNESE DA MEDULA ESPINHAL E DO
ESQUELETO AXIAL DE EMBRIÕES DE *Gallus domesticus*:
IMPLICAÇÕES NA GÊNESE DOS DEFEITOS DO TUBO NEURAL**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento (PGBCD)

Florianópolis, 22 de março de 2013.

Prof.^a Yara Maria Rauh Müller, Dr.^a em Embriologia
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Yara Maria Rauh Müller, Dr.^a em Embriologia
Orientadora (UFSC)

Prof.^a Evelise Maria Nazari, Dr.^a em Ciências Morfológicas
Coorientadora (UFSC)

Prof. Luís Antônio Violin Dias Pereira, Dr. em Patologia (UNICAMP)
(Membro titular)

Prof.^a Lavinia Schüller Faccini, Dr.^a em Genética e Biologia Molecular (UFRGS)
(Membro titular)

Prof.^a Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro, Dr.^a em Odontologia (UFSC)
(Membro titular)

Prof. Paulo Fernando Dias, Dr. em Farmacologia (UFSC)
(Membro titular)

Prof. Dib Ammar, Dr. em Ciências Morfológicas (UFSC)
(Membro titular)

Prof. Sharbel Weidner Maluf, Dr. em Genética e Biologia Molecular (UFRGS)
(Membro suplente)

Prof. Ricardo Castilho Garcez, Dr. em Neurociências (UFSC)
(Membro suplente)

*A Deus, pois sabes tudo; e bem sabes
que te amo...*

*Aos meus pais, por toda dedicação e
amor...*

*Aos meus irmãos, pelas simples
demonstrações de carinho e
companheirismo...*

*Ao Rick, por ter entrado em minha
vida...*

AGRADECIMENTOS

Quero registrar aqui meus sinceros agradecimentos às pessoas e às instituições que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina, ao Centro de Ciências Biológicas e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, e em especial à Coordenação, a todos os professores e aos funcionários da Secretaria do Programa, que fazem da PGBCD uma realidade.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

À empresa Tyson do Brasil Alimentos, Ltda, localizada em São José, SC, pela doação do material biológico.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) e às servidoras Renata e Eliana, pelo auxílio durante a realização de metodologias e o uso de equipamentos que possibilitaram o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos Laboratórios Multiusuários de Estudos em Biologia (LAMEB 1 e 2) e sua equipe de trabalho, formada pelos dedicados servidores Chirle, Demétrio, Emily, Bibiana, Denis e Vanessa, que sempre me receberam com muita atenção, permitindo de forma rápida o acesso aos equipamentos, e por serem sempre tão atenciosos e prestativos.

À Prof.^a Dr.^a Alexandra Latini e toda a equipe do Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo, e em especial, aos acadêmicos Filipe, Débora e Paulo, pela colaboração nas análises bioquímicas; e aos demais, Viviane, Marcos e Gianni, por terem intermediado diversas vezes a colaboração entre os nossos laboratórios, pela troca de experiências, pela amizade, vocês são ótimos.

À Prof.^a Dr.^a Celia Regina Monte Barardi, responsável pelo Laboratório de Virologia Aplicada (LVA), por permitir o uso de equipamentos que possibilitaram a realização da metodologia de RT-PCR, e em especial, gostaria de agradecer à acadêmica Gislaíne, que me auxiliou durante a execução da metodologia, sendo sempre muito atenciosa.

À minha querida orientadora Prof.^a Dr.^a Yara Maria Rauh Müller, a quem gostaria de agradecer, não só pelo auxílio durante a execução deste trabalho, mas também pela amizade, e por toda a

dedicação e carinho a mim dispensados desde 2004, quando recém-formada em Fisioterapia, bati à porta do Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal com o desejo de iniciar o mestrado. Nesta ocasião, tive o prazer de conversar pela primeira vez com esta pessoa apaixonada pela Embriologia, pela Ciência, pelo Ensino, e, sem dúvida, pela vida. Ao tratar a todos sempre com respeito e de forma ao mesmo tempo profissional e materna, apostou em mim já durante o mestrado, e agora no doutorado, e certamente desempenhou um papel muito importante, não só na minha formação acadêmica, mas também pessoal.

De forma não menos especial, quero agradecer também à Prof.^a Dr.^a Evelise Maria Nazari, neste trabalho minha coorientadora, mas durante todo este tempo de laboratório, uma verdadeira parceira. Trabalhamos muito juntas e eu aprendi muitas, muitas coisas, e entendi o real significado dos verbos ensinar, perseguir e acreditar. Obrigada pela sua dedicação e, principalmente, pela sua paciência em me ensinar que na ciência precisamos ter persistência, que para se “fazer ciência” é necessário ter critério, zelo e amor, acreditar na nossa competência e ao mesmo tempo ter humildade para reconhecer nossos tropeços, e levantar pela manhã e começar tudo de novo.

Ao Dr. Dib Ammar, pela parceria atenta e discreta na bancada, orientando a realização das metodologias, discutindo dados, auxiliando sempre que possível em todas as rotinas do laboratório e, mais do que isso; pelo exemplo de dedicação e de vontade, por me fazer perceber, na prática, que o sucesso vem depois, bem depois, da realização de minucioso e criterioso trabalho.

Aos queridos colegas do Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal: Valquíria, Neide, Gilian, Manuela, Eliane, Fabiana, Luciane, Cláudia e Guilherme; e também à Aninha da extensão, pelo companheirismo, pela troca, pelo riso, pelo silêncio, pela convivência e por toda a ajuda.

À minha família, aos meus amigos e ao meu amor, por toda a paciência e compreensão que tiveram comigo durante esta fase. Vocês são parte desta conquista e são, de longe, a força que me impulsiona, que me faz olhar para frente e enxergar um futuro de realizações.

Muito obrigada.

“(…) De um modo assombroso, e tão maravilhoso fui feito; maravilhosas são as tuas obras, e a minha alma o sabe muito bem. (...) Os teus olhos viram o meu corpo ainda informe; e no teu livro todas estas coisas foram escritas; as quais iam sendo dia a dia formadas, quando nem ainda uma delas havia (...)”.

(Salmo 139, 500 aC)

RESUMO

O desequilíbrio no metabolismo do ácido fólico (AF) e da homocisteína (Hcy) está relacionado à ocorrência de defeitos do tubo neural (DTN). Os aspectos morfológicos e os mecanismos celulares envolvidos na gênese dos DTN provocados pelos elevados níveis de Hcy, ainda não foram adequadamente elucidados. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da Hcy sobre os mecanismos celulares envolvidos na morfogênese do tubo neural, com ênfase no desenvolvimento da medula espinhal e do esqueleto axial, utilizando embriões de *Gallus domesticus* como modelo experimental. Os embriões foram incubados (38°C), pré-tratados com 26 h e tratados com 48 h de incubação. Foram organizados quatro grupos experimentais: AF – pré-tratado com 50 µl de salina e tratado com 0,5 µg de AF / 50 µl de salina; Hcy – pré-tratado com 50 µl de salina e tratado com 20 µmol D,L-Hcy / 50 µl salina; AF+Hcy – pré-tratado com 0,5 µg AF / 50 µl salina e tratado com 20 µmol D,L-Hcy/50 µl salina; controle – pré-tratado e tratado com 50 µl de salina. Os embriões foram analisados em duas idades – E4 e E6. Foram encontradas diferentes categorias de DTN, acompanhadas de alterações na morfologia da medula espinhal e do esqueleto axial. A Hcy gerou estresse celular e oxidativo, reconhecidos pelo aumento da expressão da proteína de estresse HSP 70 induzível e da proteína anti-apoptótica Bcl 2, respectivamente. Além disso, houve aumento da carbonilação de proteínas e diminuição dos níveis de tióis não-proteicos (NPSH), indicando aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e redução das defesas antioxidantes. Alterações nos mecanismos de proliferação e diferenciação celulares nos tecidos neurais e mesenquimais foram evidenciadas por técnicas de imuno-histoquímica e RT-qPCR. A Hcy reduziu o número de células em proliferação e gerou danos ao DNA nas células dos tecidos neural e mesenquimal. A diferenciação neural foi comprometida pela Hcy, efeito evidenciado pela diminuição da expressão das proteínas p53 e β-tubulina III na medula espinhal. A Hcy levou à redução da expressão de Pax 1/9 e Sox 9 no mesênquima. Os resultados demonstraram importantes efeitos da Hcy sobre mecanismos celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento da medula espinhal e do esqueleto axial e a provável relação destes efeitos com a gênese dos DTN na medula espinhal.

Palavras-chave: defeitos do tubo neural, homocisteína, ácido fólico, medula espinhal, esqueleto axial, estresse celular e oxidativo, proliferação celular, dano no DNA, embriões de galinha.

ABSTRACT

The imbalance of the folic acid (FA) and homocysteine (Hcy) metabolism is related to the occurrence of neural-tube defects (NTD). The morphological and cellular aspects involved in the genesis of NTD caused by high Hcy levels, have not been totally understood. The aim of this study was to evaluate the effects of Hcy and AF on the cellular mechanisms involved in the morphogenesis of the neural tube, focusing on the development of the spinal cord and the axial skeleton, using embryos of *Gallus domesticus*. Embryos were incubated (38°C) and pretreated at 24 h and treated at 46 h of incubation. Four experimental groups were performed: FA – pretreated with 50 µl saline and treated with 0.5 µg FA / 50 µl saline; Hcy – pretreated with 50 µl saline and treated with 20 µmol D,L-Hcy / 50 µl saline; FA+Hcy – pretreated with 0.5 µg FA / 50 µl saline and treated with 20 µmol D,L-Hcy / 50 µl saline; control – pretreated and treated with 50 µl saline. Embryos were analyzed at two embryonic ages – E4 and E6. Different categories of NTD were registered, which were accompanied by changes in the morphology of the spinal cord and axial skeleton. Hcy treatment lead to oxidative and cellular stress, which were demonstrated by upregulation of the expression of stress-inducible HSP 70 protein and anti-apoptotic Bcl 2 protein, respectively. Additionally, an increase of the protein carbonylation rate and a decrease of non-protein thiols (NPSH) levels, indicating a generation of the reactive oxygen species (ROS) and a reduction of the antioxidant defenses. Changes on mechanisms of cell proliferation and differentiation in mesenchymal and neural tissues were observed by immunohistochemical techniques and Real-time quantitative RT-PCR assay (RT-qPCR). Hcy caused decrease of the proliferative cells and induced DNA damage in cells of the neural and mesenchymal tissues. Hcy changed neuronal differentiation and this effect was verified by decrease of the expression of proteins p53 and β -tubulin III in the spinal cord. During the development of the axial skeleton, Hcy reduced the expression of the Pax 1/9 and Sox 9 in the mesenchyme. The results demonstrated significant effects of Hcy on cellular and molecular mechanisms involved in the development of the spinal cord and axial skeleton, and the probable relationship of these effects to the genesis of NTDs in the spinal cord.

Keywords: neural tube defects, homocysteine, folic acid, spinal cord, axial skeleton, oxidative and cellular stress, cell proliferation, DNA damage, chicken embryos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagens de microscopia eletrônica de varredura do disco embrionário de galinha nos estágios 6 a 10+ HH (23 a 38 h).....	29
Figura 2. Representação esquemática do dobramento da placa neural em embriões de ave evidenciando as interações entre os tecidos embrionários.	31
Figura 3. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de embrião de galinha ilustrando a progressão da neurulação secundária.....	34
Figura 4. Esquemas ilustrando as diferentes categorias de DTN na medula espinha.....	36
Figura 5. Formação e regionalização dos somitos.....	46
Figura 6. Esquema ilustrando as partes que compõem a vértebra.....	47
Figura 7. Representação esquemática da sequência de diferenciação do esclerótomo em embriões de ave.	48
Figura 8. Resumo das três vias metabólicas envolvidas na eliminação da Hcy intracelular.	52
Figura 9. Metabolismo intracelular dos folatos.	55
Figura 10. Representação esquemática de ovo de <i>G. domesticus</i> no momento da postura e vista dorsal de embriões de galinha.....	62
Figura 11. Curvas de sobrevivência obtidas pelo método de Kaplan-Meier.....	70
Figura 12. DTN induzidos pelo tratamento com Hcy nos embriões em E4.....	72
Figura 13. DTN induzidos pelo tratamento com Hcy nos embriões em E6.....	73
Figura 14. Morfologia da medula espinhal de embriões em E4.....	75
Figura 15. Morfologia da medula espinhal de embriões em E6.....	76
Figura 16. Cortes transversais de embriões em E4 submetidos à coloração com azul de alcian.	78
Figura 17. Cortes transversais de embriões em E6 submetidos à coloração com azul de alcian.	79

- Figura 18.** Cortes transversais de embriões em E4 submetidos à imunohistoquímica com anticorpo anti-HSP 70.81
- Figura 19.** Cortes transversais de embriões em E4 submetidos à imunohistoquímica com anticorpo anti-Bcl 2.83
- Figura 20.** Concentração de carbonilas e de tióis não-proteicos (NPSH) expressos em nmol/ mg de proteína na medula espinhal e mesênquima dos embriões em E4.84
- Figura 21.** Cortes transversais de embriões em E4 submetidos à imunohistoquímica com anticorpo anti-fosfo-histona H3 exibindo células em proliferação na medula espinhal e no esclerótomo86
- Figura 22.** Cortes transversais de embriões em E6 submetidos à imunohistoquímica com anticorpo anti-fosfo-histona H3 exibindo células em proliferação na medula espinhal e nos elementos vertebrais em desenvolvimento.87
- Figura 23.** Cortes transversais de embriões em E4 submetidos à imunohistoquímica com anticorpo anti-PCNA exibindo células reativas na medula espinhal e no esclerótomo.89
- Figura 24.** Cortes transversais de embriões em E6 submetidos à imunohistoquímica com anticorpo anti-PCNA exibindo células positivas na medula espinhal.90
- Figura 25.** Cortes transversais de embriões em E4 submetidos à imunohistoquímica com os anticorpos anti-p 53 (verde) e anti- β -tubulina III (vermelho). Os núcleos das células foram corados com DAPI (azul).92
- Figura 26.** Cortes transversais de embriões em E6 submetidos à imunohistoquímica com os anticorpos anti-p 53 (verde) e anti- β -tubulina III (vermelho). Os núcleos foram corados com DAPI (azul).93
- Figura 27.** Expressão relativa de RNAm para Pax 1 e Pax 9 no esclerótomo dos embriões em E4.95
- Figura 28.** Cortes transversais de embriões em E4 submetidos à imunohistoquímica com anticorpo anti-Pax 1 exibindo células positivas no esclerótomo.96
- Figura 29.** Cortes transversais de embriões em E6 submetidos à imunohistoquímica com anticorpo anti-Pax 1 exibindo células positivas nos corpos vertebrais e nos arcos vertebrais em desenvolvimento97

- Figura 30.** Cortes transversais de embriões em E4 submetidos à imunohistoquímica com anticorpo anti-Pax 9 exibindo células positivas no esclerótomo.....98
- Figura 31.** Cortes transversais de embriões em E6 submetidos à imunohistoquímica com anticorpo anti-Pax 9 exibindo células positivas nos arcos vertebrais e corpos vertebrais.99
- Figura 32.** Cortes transversais de embriões em E4 submetidos à imunohistoquímica com anticorpo anti-Sox 9 exibindo células positivas no esclerótomo.....100
- Figura 33.** Cortes transversais de embriões em E6 submetidos à imunohistoquímica com anticorpo anti-Sox 9 exibindo células positivas nos corpos vertebrais e arcos vertebrais em desenvolvimento101
- Figura 34.** Sumário dos efeitos da dose elevada de Hcy nas células dos tecidos neural e mesenquimal de embriões de *G. domesticus*.....116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos iniciadores (<i>primers</i>) utilizados para realização da RT-qPCR.	69
Tabela 2. Alterações morfológicas externas observadas nos embriões dos grupos Hcy e AF + Hcy.	71
Tabela 3. Categorias de DTN observadas nos embriões dos grupos Hcy e AF + Hcy.	74
Tabela 4. Dados de sobrevivência de embriões de galinha expostos à Hcy....	104

LISTA DE ABREVIATURAS

AdoHcy	S-adenosilhomocisteína
AdoMet	S-adenosilmetionina
AF	ácido fólico
ANOVA	análise de variância
BHMT	betaína homocisteína-metiltransferase
BMPs	proteínas morfogenéticas ósseas (do inglês, <i>bone morphogenetic proteins</i>)
CBS	cistationa β -sintetase
CGL	cistationa γ -liase
DAB	3,3-diaminobenzidina
DAPI	4,6-diamidina-2-fenilindol
DLHP	ponto de dobra dorsolateral (do inglês, <i>dorsolateral hinge point</i>)
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNPH	2,4-dinitrofenilidrazina
DTN	defeitos do tubo neural
DTNB	5,5'-ditio-bis ácido 2-nitrobenzóico
E	dia embrionário
ERO	espécies reativas de oxigênio
FGFs	fatores de crescimento de fibroblastos (do inglês, <i>fibroblast growth factors</i>)
ForTHF	formiltetrahydrofolato
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GFAP	proteína ácida fibrilar da glia (do inglês, <i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GLAST	transportador de glutamato-aspartato (do inglês, <i>glutamate-aspartate transporter</i>)
GPx	glutationa peroxidase
GR	glutationa redutase
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
Hcy	homocisteína
HSP 70	proteína de choque térmico de 70 kDa (do inglês, <i>heat shock proteins</i>)
HSPs	proteínas de choque térmico
IgG	imunoglobulina
MAT	metionina adenosil-transferase
MeTHF	metiltetrahydrofolato
MetTHF	metilenotetrahydrofolato
Mfh1	proteína mesenquimal <i>forkhead 1</i>
MHP	ponto de dobra mediano (do inglês, <i>median hinge point</i>)
MS	metionina sintetase
MTHFD1	metilenotetrahydrofolato desidrogenase 1
NA	densidade numérica de células por área

NCAM	molécula de adesão celular neural (do inglês, <i>neural cell adhesion molecule</i>)
NGFs	fatores de crescimento neuronal (do inglês, <i>nerve growth factors</i>)
NPSH	níveis totais de tióis não-proteicos
O ₂ ⁻	superóxido
OH	hidroxila
PBS	tampão fosfato
PCNA	antígeno nuclear de proliferação celular (do inglês, <i>proliferating cell nuclear antigen</i>)
PCR	reação em cadeia da polimerase
qPCR	PCR quantitativa em tempo real
RFC	proteínas carreadoras de membrana (do inglês, <i>carrier-mediated systems</i>)
RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
RNA _t	ácido ribonucleico transportador
RT	transcrição reversa
SAH	s-adenosilhomocisteína hidrolase
Shh	Sonic hedgehog
SHMT	serina hidroximetiltransferase
SNC	sistema nervoso central
THF	tetrahidrofolato
TN	tubo neural
TS	timidilato sintetase
VEGF	fator de crescimento vascular endotelial (do inglês, <i>vascular endothelial growth factor</i>)

SUMÁRIO

ABSTRACT	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xix
LISTA DE ABREVIATURAS	xxi
1 INTRODUÇÃO	27
1.1 ORIGEM EMBRIONÁRIA DO SISTEMA NERVOSO	28
1.2 ALTERAÇÕES NO PROCESSO DE NEURULAÇÃO: OS DEFEITOS DO TUBO NEURAL (DTN).....	35
1.3 DESENVOLVIMENTO DA MEDULA ESPINHAL	39
1.4 DESENVOLVIMENTO DO ESQUELETO AXIAL: IMPORTÂNCIA DOS GENES PAX 1/9 E SOX9	44
1.5 HOMOCISTEÍNA, ÁCIDO FÓLICO E O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	51
1.5.1 Metabolismo da Homocisteína e do Ácido Fólico.....	51
1.5.2 Alterações no metabolismo da Homocisteína e do Ácido Fólico: impactos celulares	54
1.6 JUSTIFICATIVA DA PESQUISA	58
2 OBJETIVOS	60
2.1 OBJETIVO GERAL	60
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	60
3 METODOLOGIA	61
3.1 MODELO BIOLÓGICO EXPERIMENTAL	61
3.2 CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO DOS EMBRIÕES.....	61
3.3 PRÉ-TRATAMENTO E TRATAMENTO DOS EMBRIÕES.....	61
3.4 ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA DOS EMBRIÕES.....	63
3.5 MICROSCOPIA DE LUZ E DE FLUORESCÊNCIA	64
3.6 ANÁLISE QUANTITATIVA DAS MARCAÇÕES CELULARES.....	66
3.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	67

3.7.1 Determinação dos níveis de carbonilação de proteínas	67
3.7.2 Determinação dos níveis de tióis não-proteicos (NPSH).....	68
3.8 EXTRAÇÃO DE RNA E RT-PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (RT-qPCR)	68
3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	68
4 RESULTADOS	70
4.1 EFEITO DA HCY SOBRE A SOBREVIVÊNCIA E MORFOLOGIA EXTERNA DOS EMBRIÕES	70
4.2 EFEITO DA HCY SOBRE A MORFOGÊNESE DA MEDULA ESPINHAL E DO ESQUELETO AXIAL	74
4.3 HCY INDUZ ESTRESSE CELULAR NOS TECIDOS NEURAL E MESENQUIMAL	80
4.4 HCY INDUZ ESTRESSE OXIDATIVO NOS TECIDOS NEURAL E MESENQUIMAL	82
4.5 EFEITO DA HCY SOBRE OS MECANISMOS CELULARES ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO DA MEDULA ESPINHAL E DO ESQUELETO AXIAL	84
4.5.1 Efeito da Hcy sobre o ciclo celular: expressão de fosfo-histona H3 e PCNA	84
4.5.2 Efeito da Hcy sobre a diferenciação neuronal: expressão das proteínas p 53 e β-tubulina III.....	91
4.5.3 Efeito da Hcy sobre a diferenciação do esqueleto axial: expressão de Pax 1/9 e Sox 9	94
5 DISCUSSÃO.....	102
5.1 A HCY REDUZ A SOBREVIVÊNCIA DOS EMBRIÕES E ALTERA O PADRÃO DE MORFOGÊNESE DA MEDULA ESPINHAL E DO ESQUELETO AXIAL	103
5.2 A HCY INDUZ ESTRESSE CELULAR E OXIDATIVO NOS TECIDOS NEURAL E MESENQUIMAL DOS EMBRIÕES	107

5.3 A HCY ALTERA A PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR E A DIFERENCIAÇÃO NA MEDULA ESPINHAL E NO ESQUELETO AXIAL EM DESENVOLVIMENTO	109
REFERÊNCIAS	119
ANEXOS	145

1 INTRODUÇÃO

Desde 1976, quando Smithells e col. estabeleceram pela primeira vez a relação entre a ocorrência dos defeitos do tubo neural (DTN) e a deficiência materna de ácido fólico (AF), a importância dos DTN como um problema de saúde pública é evidente. A ação protetora do AF sobre os DTN passou a ser amplamente debatida a partir de então, e estudos epidemiológicos posteriores corroboraram a ideia de Smithells et al. (1976), comprovando definitivamente a relação entre a deficiência de AF e a ocorrência de DTN.

A partir da década de 90, programas desenvolvidos por organizações internacionais passaram a recomendar a ingestão diária de AF (400 µg) no período periconcepcional. Para alcançar este objetivo, órgãos ligados a ações de vigilância sanitária e controle da produção de alimentos em todo o mundo estipularam às indústrias, na forma de legislação, a fortificação das farinhas produzidas com AF. Estudos epidemiológicos realizados nos últimos anos revelam que estas ações reduziram de forma significativa a prevalência dos DTN nas populações, embora os mecanismos responsáveis pelos benefícios da suplementação com AF ainda permaneçam desconhecidos.

Estes ensaios epidemiológicos levaram à descoberta de que a deficiência de AF tinha como consequência direta o aumento da concentração de homocisteína (Hcy) no plasma sanguíneo. Fato que estimulou também a realização de ensaios experimentais utilizando diferentes modelos animais, incluindo mamíferos e aves, os quais vieram confirmar a associação epidemiológica existente entre a hiperhomocisteinemia materna e ocorrência de DTN; bem como, de outras anomalias congênitas, incluindo defeitos cardíacos e craniofaciais, e mais recentemente, anomalias dos membros. A partir destes estudos, tornou-se evidente o papel direto da Hcy na gênese das anomalias congênitas relacionadas à deficiência de AF.

Nota-se que questões relacionadas ao desenvolvimento do sistema nervoso e as anomalias congênitas a ele relacionadas, e também à ação nociva da Hcy e protetora do AF durante a embriogênese deste sistema, foram amplamente debatidas desde a década de 80. Entretanto, os mecanismos celulares e moleculares e os aspectos morfológicos envolvidos na morfogênese do tubo neural ainda não foram completamente elucidados, bem como a ação da Hcy e do AF sobre esses mecanismos. Portanto, apesar de todo o conhecimento construído até então, faz-se necessária a realização de estudos que investiguem quais mecanismos celulares e moleculares podem ser modificados

quando há desequilíbrio entre os níveis de AF e Hcy, a fim de elucidar o papel destas substâncias durante o desenvolvimento, bem como o motivo pelo qual elas estão diretamente envolvidas na etiologia dos DTN, o que corresponde ao objetivo geral deste trabalho de tese.

1.1 ORIGEM EMBRIONÁRIA DO SISTEMA NERVOSO

O evento do desenvolvimento definido como neurulação compreende um conjunto de movimentos morfogenéticos complexos e dinâmicos que resultam na formação do tubo neural (TN) – estrutura embrionária a partir da qual tem origem o sistema nervoso central (SNC) dos vertebrados – e das células da crista neural, estas se despreendem do TN durante a neurulação e iniciam um processo migratório, dando origem a tipos celulares variados, incluindo as células neurais do sistema nervoso periférico (SNP) (TEILLET; KALCHEIM; LE DOUARIN, 1987; GILBERT, 2010; WOLPERT e TICKLE, 2010).

Em vertebrados superiores (aves e mamíferos), este evento do desenvolvimento está estruturado em duas fases: a neurulação primária que inicia com a diferenciação do ectoderma dorsal do embrião, e é responsável pela formação do encéfalo e grande parte da medula espinhal; e a neurulação secundária, durante a qual os segmentos inferiores da medula espinhal são formados, através da cavitação de um cordão medular que forma-se na extremidade caudal do embrião – o botão caudal (do inglês, *tail bud*) (SCHOENWOLF; SMITH, 1990; LAWSON; ANDERSON; SCHOENWOLF, 2001; LADHER; SCHOENWOLF, 2005). Embora estas duas fases do processo de neurulação ocorram devido à ação de mecanismos morfogenéticos e moleculares distintos, ambas têm como resultado final a formação da mesma estrutura embrionária – o TN. Além destas duas fases distintas, sabe-se que, durante a neurulação, em aves, existe ainda uma zona de sobreposição (do inglês, *overlap zone*) e esta região é responsável pela formação dos segmentos lombares inferiores da medula espinhal, enquanto os segmentos sacrais são totalmente derivados do botão caudal (SCHOENWOLF, 1979; SCHOENWOLF; DELONGO, 1980).

A neurulação primária foi estudada em diferentes modelos animais (ave, coelho, anfíbio, porco, camundongo e humano) e, de forma geral, as etapas básicas deste processo de formação do TN são conservadas entre as espécies (SMITH; SCHOENWOLF, 1991; DAVIDSON; KELLER, 1999; PETERS et al., 1999; VAN STRAATEN et al., 2000; COPP, 2005; PYRGAKI et al., 2010). A formação da placa

neural a partir da diferenciação do ectoderma dorsal do embrião corresponde à primeira etapa da neurulação primária. Esta placa, constituída por um neuroepitélio, dará origem às células neurais e gliais; o restante do ectoderma, posteriormente à formação da placa neural, constitui o ectoderma superficial, que dará origem à epiderme. Após a formação da placa neural, uma série de movimentos morfogenéticos é responsável pelas etapas subsequentes da neurulação primária, já bem descritas na literatura, que incluem, após (1) a formação da placa neural: (2) o dobramento desta placa, (3) a formação do sulco e das pregas neurais e (4) a posterior elevação e fusão destas pregas na linha média dorsal do embrião, levando a formação do TN (SMITH; SCHOENWOLF, 1991; MOURY; SCHOENWOLF, 1995; COLAS; SCHOENWOLF, 2001; LAWSON; ANDERSON; SCHOENWOLF, 2001; LOWERY; SIVE, 2004) (Fig. 1).

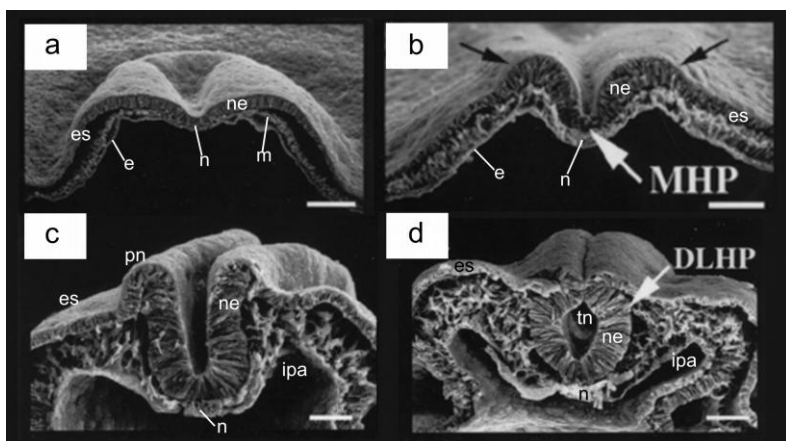


Figura 1. Imagens de microscopia eletrônica de varredura do disco embrionário de galinha nos estágios 6 a 10⁺ HH (23 a 38 h). (a) Início da formação da placa neural. (b) Formação do sulco e pregas neurais (setas pretas). (c, d) Aproximação e fusão das pregas neurais que leva ao fechamento do tubo neural. Abreviaturas: *es*, ectoderma superficial; *e*, endoderma; *ne*, neuroepitélio; *n*, notocorda; *m*, mesoderma; *pn*, prega neural; *ipa*, intestino primitivo anterior; *tn*, tubo neural; *MHP*, ponto de dobra mediano (do inglês, *median hinge point*); *DLHP*, ponto de dobra dorsolateral (do inglês, *dorsolateral hinge point*). Escala = 180 μ m. Fonte: modificado de Smith e Schoenwolf (1997).

Os movimentos morfogenéticos que ocorrem durante o dobramento da placa neural, levando a alterações na forma, posição e número das células neuroepiteliais, são essenciais para que ocorra a convergência das pregas neurais na linha média dorsal do embrião e o posterior fechamento do TN (MOURY; SCHOENWOLF, 1995). É bem estabelecido que estas mudanças no comportamento celular iniciam em um tecido com características de epitélio (ectoderma recém-formado) localizado na superfície do disco embrionário e terminam com a formação de um TN localizado na região dorsal do corpo do embrião, e que durante este processo, o embrião adquire uma forma tubular (SCHOENWOLF; SMITH, 1990). Porém, as etapas deste processo, e os movimentos morfogenéticos necessários para que a formação do TN se complete, apesar de serem muito conservados, apresentam pequenas variações entre as diferentes espécies de vertebrados, bem como entre os diferentes níveis rostrocaudais do TN em uma mesma espécie, o que leva à ocorrência de formatos variados de lúmen (LOWERY; SIVE, 2004).

Dentre os mecanismos morfogenéticos conhecidos da neurulação primária, o mais comum envolve a formação de pontos de dobra (do inglês, *hinge points*) na placa neural (MOURY; SCHOENWOLF, 1995). Um deles mediano, o MHP (do inglês, *median hinge point*), localizado próximo à notocorda, e outros dois pontos dorsolaterais, os DLHPs (do inglês, *dorsolateral hinge points*), localizados próximos ao ectoderma e mesoderma adjacentes ao TN (SMITH; SCHOENWOLF, 1997). Em embriões de galinha, o MHP está presente ao longo de todo o eixo rostrocaudal do TN, enquanto na região do encéfalo, dois DHLPs se desenvolvem durante o dobramento da placa neural. Como resultado destes diferentes mecanismos morfogenéticos, o lúmen do encéfalo de embrião de galinha logo após o fechamento do TN é mais largo e apresenta formato de diamante, enquanto nas regiões do TN responsáveis pela formação da medula espinhal o lúmen tem formato de fenda (SMITH; SCHOENWOLF, 1997).

Vale ressaltar que devido à proximidade destes pontos de dobra com os tecidos adjacentes, as interações entre placa neural, ectoderma superficial, mesoderma e notocorda também são responsáveis pela produção das forças morfogenéticas que coordenam o dobramento da placa neural durante a neurulação primária (MOURY; SCHOENWOLF, 1995; COLAS; SCHOENWOLF, 2001). Desta forma, forças extrínsecas ao neuroepitélio são necessárias para que ocorram a elevação, o dobramento e a convergência das pregas neurais na linha média do

embrião, de forma que alterações na interação entre estes tecidos embrionários podem levar ao atraso ou inibição das etapas da neurulação primária (SCHOENWOLF; SMITH, 1990; SMITH; SCHOENWOLF, 1997; LAWSON; ANDERSON; SCHOENWOLF, 2001) (Fig. 2).

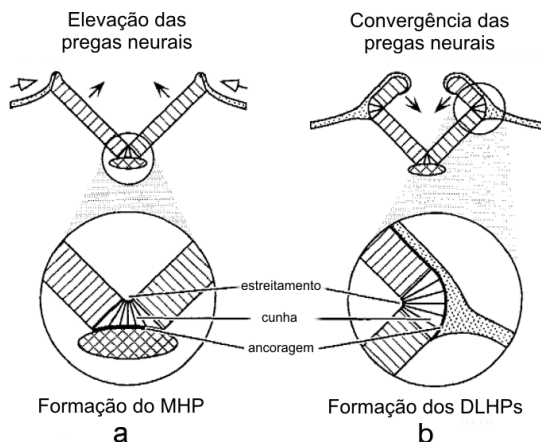


Figura 2. Representação esquemática do dobramento da placa neural em embriões de ave evidenciando as interações entre os tecidos embrionários. Ectoderma neural (linhas paralelas), ectoderma epidérmico (área pontilhada) e notocorda (linhas em cruz) visualizados em esquemas de cortes transversais. As setas indicam a direção dos dobramentos. **(a)** Elevação das pregas neurais é facilitada pela formação do MHP. **(b)** Formação dos DHLHPs evidenciando a aposição do neuroepitélio e do ectoderma não neural na base da prega neural, que confere estabilidade nesta região e permite a convergência das pregas neurais na linha média dorsal do embrião para a posterior fusão. *MHP*, ponto de dobra mediano (do inglês, *median hinge point*); *DLHPs*, pontos de dobra dorsolaterais (do inglês, *dorsolateral hinge points*). *Fonte:* modificado de Moury e Schoenwolf (1995).

As etapas do processo da neurulação primária não ocorrem simultaneamente ao longo de todo o eixo rostrocaudal do embrião, mas iniciam geralmente na região cefálica e/ou da medula cervical (SADLER, 2005; SUZUKI, 2007; PYRGAKI et al., 2010). Em embriões de ave, a fusão das pregas neurais inicia na altura da vesícula encefálica denominada mesencéfalo, entre 26 a 29 horas de desenvolvimento e avança na direção cefálica e caudal, até que em

ambas as extremidades do TN, somente pequenas áreas permaneçam abertas, os neuróporos. Em *Gallus domesticus*, o neuróporo rostral fecha-se entre 45 e 49 h de desenvolvimento e o caudal em torno de 55 horas, quando o embrião possui entre 26 e 28 somitos (HAMBURGER; HAMILTON, 1951).

Nos níveis espinhais inferiores ao neuróporo caudal, o TN é formado através do processo de neurulação secundária. Após o fechamento do neuróporo caudal, o botão caudal, formado por uma massa de células indiferenciadas derivadas da linha primitiva e do nó de Hensen, dará origem à porção final do TN através da neurulação secundária (SCHOENWOLF; DELONGO, 1980; CATALA; TEILLET; LE DOUARIN, 1995). Portanto, ao contrário do que foi estudado para a neurulação primária, em que a formação do TN inicia a partir da diferenciação de um conjunto de células com características epiteliais presentes no ectoderma dorsal do embrião; o processo de neurulação secundária tem início a partir de uma população de células com características mesenquimais. Estas populações celulares são bastante distintas, uma vez que tecidos epiteliais estão organizados em uma linha contínua de células poliédricas justapostas, as quais são aderidas firmemente umas as outras por meio de complexos juncionais formados por caderinas; enquanto as células definidas como mesenquimais apresentam-se frouxamente arranjadas em meio a grande quantidade de matriz extracelular (HAY, 2005; THIERY et al., 2009). Além da morfologia diferenciada, estes tipos celulares possuem origem embrionária totalmente distinta, mas ao final dos dois processos de neurulação, tem-se a formação da mesma estrutura – o TN.

A neurulação secundária inicia quando as células mesenquimais do botão caudal formam um cordão medular que é composto inicialmente por células mesenquimais. As células da região mais externa deste cordão alteram sua morfologia e passam por uma transição epitélio-mesenquimal, tornando-se polarizadas e alongando-se para formar um epitélio colunar pseudoestratificado, similar ao encontrado na placa neural. Após esta transição, ocorre a cavitação do cordão medular surgindo múltiplas neuroceles entre as células. Estas neuroceles coalescem para formar uma neurocele secundária única nos segmentos espinhais inferiores, que se unirá com a neurocele primária presente nas regiões mais rostrais do TN, constituindo um canal neural contínuo no TN recém-formado (SCHOENWOLF; SMITH, 1990; LADHER; SCHOENWOLF, 2005). Apesar das nítidas diferenças morfológicas entre os dois processos de neurulação, durante a neurulação secundária ocorrem mudanças na forma e comportamento celulares semelhantes as

que ocorrem durante a formação e dobramento da placa neural (CATALA et al., 1996; COLAS; SCHOENWOLF, 2001). De fato, ao final do processo de neurulação secundária, tem-se um TN semelhante ao formado através da neurulação primária, e embora a população de células que deu origem à estrutura, bem como a morfologia do evento embrionário seja nitidamente distinta, sabe-se atualmente que os mecanismos morfogenéticos envolvidos são muito similares (CHARRIER et al., 2005; OSORIO et al., 2009)

Em embriões de ave, como já foi mencionado anteriormente, existe ainda uma região de sobreposição (do inglês, *overlap zone*), onde o TN forma-se através dos dois processos de neurulação, que ocorrem simultaneamente na altura do corpo do embrião que posteriormente originará os segmentos lombares inferiores da medula espinhal e das vértebras (SCHOENWOLF; DELONGO, 1980). Nesta zona de sobreposição, ocorre o processo de neurulação primária na região dorsal, e de neurulação secundária na região ventral do embrião. Ao final do processo, as neuroceles primária e secundárias formadas coalescem dando origem a um canal neural único no TN, que dará origem posteriormente ao canal central único presente na medula espinhal (COLAS; SCHOENWOLF, 2001; YANG et al., 2003) (Fig. 3).

A neurulação secundária também já foi descrita em humanos, nestes embriões, o botão caudal é denominado eminência caudal. A estrutura demonstrou ser conservada entre as espécies, e foi definida como uma massa de células mesenquimais pluripotentes coberta por ectoderma que é derivada, em parte, diretamente do epiblasto, mas principalmente da linha primitiva, e dá origem a estruturas semelhantes às derivadas dos três folhetos embrionários nas regiões mais rostrais do embrião (MÜLLER; O'RAHILLY, 1987). Semelhante ao descrito primeiramente em aves, após o fechamento do neuróporo posterior em humanos, que ocorre na altura do segmento sacral superior do embrião com cerca de 30 dias de desenvolvimento (21 a 29 somitos), inicia a fase de neurulação secundária (MULLER; O'RAHILLY, 2004). Devido ao lento crescimento da medula espinhal em relação aos elementos vertebrais, a região limítrofe entre o TN primário e secundário está localizada na região lombossacral da coluna vertebral em neonatos (O'RAHILLY; MÜLLER, 2003). A existência de uma zona de sobreposição, onde o TN é formado a partir dos dois processos de neurulação simultaneamente, não foi descrita em embriões humanos. Morfologicamente, na região limítrofe entre a neurulação primária e secundária, o processo de neurulação no embrião humano assemelha-se ao que ocorre no embrião de camundongo, em que as neuroceles

primária e secundária são contínuas e não há região de sobreposição (NIEVELSTEIN et al., 1994). Quanto à cavitação do cordão medular através da formação de múltiplas neuroceles, que ocorre nos embriões de ave durante a neurulação secundária, esta também foi descrita em embriões humanos (SAITSU et al., 2004; PYTEL; BRUSKA; WOZNIAK, 2007). Mas apesar do conhecimento existente, os estudos sobre o desenvolvimento da eminência caudal são controversos, de forma que o desenvolvimento do TN na região caudal em embriões humanos ainda não foi totalmente descrito e compreendido (GRIFFITH; WILEY; SANDERS, 1992; MULLER; O'RAHILLY, 2004).

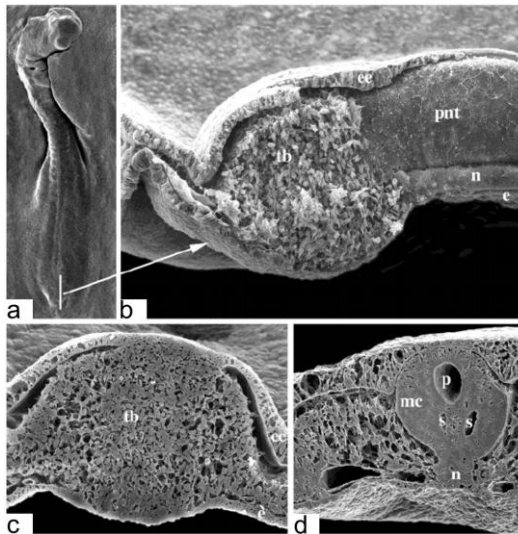


Figura 3. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de embrião de galinha inteiro (a), em corte parasagital no estágio 12 a 13 HH (45 – 49 a 48 – 52h) (b) e criofraturas em seções transversais ilustrando a progressão da neurulação secundária (c, d). A linha branca em (a) indica a região da secção parasagital visualizada em (b). (c) Condensação de células mesenquimais no interior do botão caudal. (d) Formação de múltiplas neuroceles no cordão medular, neste estágio as células já passaram pelo processo de transição epitélio-mesenquimal. e, endoderma; ee, ectoderma epidérmico; mc, cordão medular durante o processo de cavitação; n, notocorda; p, neurocele primária formada através do sulco neural na região de sobreposição (do inglês, *overlap zone*); pnt, porção caudal do tubo neural primário; s, neuroceles secundárias formadas através da cavitação do cordão medular; tb, botão caudal (do inglês, *tail bud*). Fonte: modificado de Schoenwolf (2009).

1.2 ALTERAÇÕES NO PROCESSO DE NEURULAÇÃO: OS DEFEITOS DO TUBO NEURAL (DTN)

Nas últimas décadas, pesquisas nas áreas de biologia do desenvolvimento, epidemiológica e clínica voltaram a atenção para o processo de neurulação, procurando compreender a origem de um conjunto de anomalias congênicas do SNC que foram denominadas coletivamente defeitos do tubo neural (DTN) (VAN AERTS, 1995; AFMAN et al., 2003; KALTER, 2003; BROUNS et al., 2005; HARRIS; JURILOFF, 2007; SAYED et al., 2008; BLOM, 2009; CRIDER; BAILEY; BERRY, 2011).

Os DTN podem afetar o encéfalo e/ou a medula espinhal, por isso são considerados anomalias congênicas graves. Este conjunto de anomalias foi classificado clinicamente em três categorias: (1) os DTN “verdadeiros” ou “abertos”, nestes casos, o defeito é resultado da falha no fechamento do TN durante o processo de neurulação primária, por isso o tecido nervoso afetado encontra-se exposto ao ambiente; (2) os DTN “císticos” ou “fechados”, quando alterações no desenvolvimento do mesênquima axial levam à malformação óssea e os arcos vertebrais são incompletos ou ausentes, ocorrendo a herniação do tecido nervoso e/ou das meninges, nestes casos, forma-se uma bolsa (cisto) no local do defeito e esta é coberta por pele; (3) outra categoria de DTN “fechado” inclui aqueles em que a mesma alteração óssea nos arcos vertebrais está presente, também é coberta por pele, mas não há formação de bolsa. Neste último caso, a anomalia pode ou não envolver o tecido nervoso, e alterações no desenvolvimento do botão caudal podem estar envolvidas na gênese destes DTN (ALLES; SULIK, 1993; SUZUKI, 2007; COPP; GREENE, 2013).

Os DTN propriamente ditos representam a forma mais grave destas anomalias congênicas e incluem a anencefalia e a mielosquise. Estes são resultado de falhas na fusão das pregas neurais na região cefálica ou espinhal do TN, respectivamente (O’RAHILLY; MÜLLER, 2005; MOORE; PERSAUD, 2008). Nos DTN denominados císticos, ou seja, quando o defeito é coberto por pele formando uma bolsa que contém os tecidos herniados, estes podem ser graves se afetarem o encéfalo, como ocorre na encefalocele. Porém, quando estes afetam a medula espinhal, como nos casos de mielomeningocele/meningocele (espinhas bífidas císticas), os graus de comprometimento são variados, porque o defeito pode afetar o tecido nervoso ou somente as meninges. Já nos casos em que não há herniação de tecidos, somente está presente o defeito ósseo, o indivíduo não possui nenhum comprometimento

clínico e/ou funcional, por isso muitas vezes esta anomalia só é descoberta na vida adulta, e é denominada espinha bífida oculta (Fig.4).

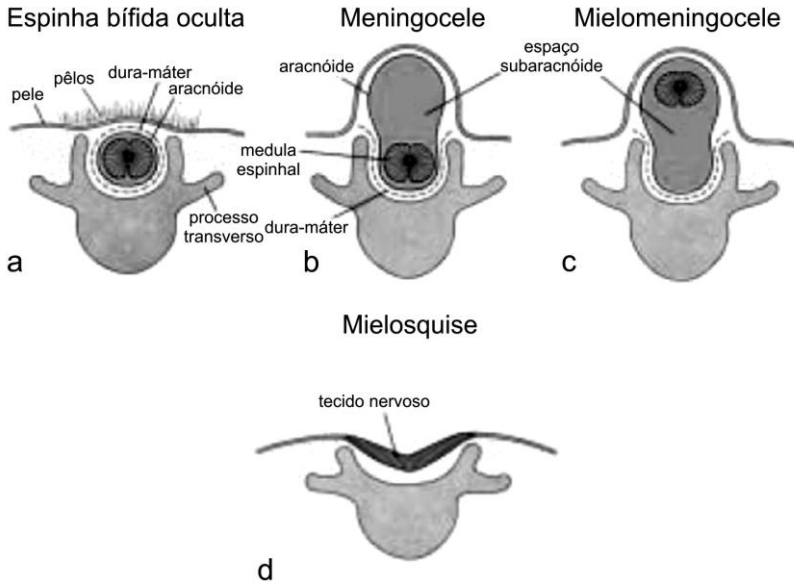


Figura 4. Esquemas ilustrando as diferentes categorias de DTN na medula espinhal. **(a)** Na espinha bífida oculta o defeito atinge somente o arco vertebral, sem herniação do tecido nervoso e meninges. **(b, c)** Espinhas bífidas císticas, em que o defeito ósseo é o mesmo presente na espinha bífida oculta, mas há também herniação somente das meninges **(b)** ou das meninges e da medula espinhal **(c)**. **(d)** Forma mais grave de defeito, em que há exposição do tecido nervoso. *Fonte:* modificado de Sadler (2009).

Ainda dentro deste contexto, a “síndrome da regressão caudal” ou “disgenesia caudal” é uma anomalia congênita complexa, e envolve diferentes anomalias, incluindo defeitos urogenitais, gastrointestinais, da coluna lombossacral e dos membros inferiores (PAPPAS et al., 1989; ALLES; SULIK, 1993). A síndrome da regressão caudal é resultado de alterações na formação de estruturas embrionárias derivadas do botão caudal. Portanto, alterações no processo de neurulação secundária, podem estar envolvidas na gênese destes defeitos (INAGAKI et al., 2000; SUZUKI, 2007). Esta anomalia também é considerada grave e, frequentemente, erros no desenvolvimento da medula espinhal também

estão presentes (NIEVELSTEIN et al., 1994). A regressão caudal é uma anomalia rara (1 – 2,5 casos por 100.000), mas, semelhante ao observado nos casos de espinha bífida cística, os indivíduos acometidos também podem apresentar variados graus de comprometimentos clínicos e funcionais e, em alguns casos, dependendo das anomalias viscerais presentes, a sobrevivência extra-uterina não é possível (PADMANABHAN; NARUSE; SHIOTA, 1999; THOTTUNGAL et al., 2010).

Embora não se tenha total conhecimento acerca dos mecanismos que levam a ocorrência de DTN, há consenso na literatura de que em todas as categorias de DTN, estes mecanismos envolvem tecidos neurais e mesenquimais, uma vez que são visíveis alterações em tecidos neurais (encéfalo e medula) e também nos tecidos ósseos que envolvem estas estruturas do SNC – caixa craniana e vértebras (SADLER, 2005). Seguindo esta linha, duas grandes categorias de mecanismos foram propostas como causa de espinha bífida: falhas nos movimentos morfogenéticos que culminam no fechamento do TN e anormalidades no mesênquima adjacente responsável pela formação das vértebras (SUZUKI, 2007; COPP; GREENE, 2013).

DTN são mais freqüentes em embriões do que em neonatos porque cerca de 90% dos embriões afetados são espontaneamente abortados (O'RAHILLY; MÜLLER, 2005). Embora apenas em média 10% das anomalias congênitas afetem o SNC, os DTN estão entre as anomalias mais relacionadas à mortalidade infantil e ao comprometimento funcional da criança (VAN DER PAL-DE BRUIN et al., 2003). Segundo dados do ECLAMC/SC (Estudo Colaborativo Latino – Americano de Malformações Congênitas em Santa Catarina), referentes aos neonatos com anomalias congênitas nascidos nas Maternidades Carmela Dutra e do Hospital Universitário (HU-UFSC), ambas localizadas em Florianópolis, durante o período de 1999 a 2004, o número de neonatos com anencefalia foi de 3,7 casos e de espinha bífida foi de 13,6 casos para cada 10.000 nascimentos (SOUZA, 2006). Estima-se que 300.000 neonatos por ano sejam afetados por anencefalia e espinha bífida em todo mundo (CHRISTIANSON; HOWSON; MODELL, 2006). A anencefalia é uma anomalia congênita incompatível com a vida, uma vez que os neonatos afetados podem sobreviver apenas cerca de algumas horas após o nascimento. As crianças com espinha bífida sobrevivem, mas podem apresentar anomalias graves do SNC associadas, como a hidrocefalia, que pode levar a deficiências cognitivas. Além disto, as crianças com espinha bífida possuem graves disfunções, incluindo variados graus de paralisia

dos membros inferiores e de incontinência urinária e fecal, as quais geram incapacidades importantes que persistirão por toda a vida do indivíduo (O'RAHILLY; MÜLLER, 2005; SADLER, 2009).

Os DTN possuem uma etiologia multifatorial em que há a combinação de fatores tanto genéticos quanto ambientais. Estudos evidenciam que índices plasmáticos elevados de Hcy materna, decorrentes da deficiência de AF – vitamina B₉ – estão associados ao aumento na prevalência de DTN (KIRKE; MILLS; SCOTT, 1997; DE LA CALLE et al., 2003; MATTSON; SHEA, 2003; BRAUER; TIERNEY, 2004; ZHANG et al., 2008; VAN MIL; OOSTERBAAN; STEEGERS-THEUNISSEN, 2010). O uso periconcepcional do AF têm sido associado à redução do risco de DTN desde 1976 quando, por meio de estudos realizados com gestantes na Inglaterra, foi demonstrada pela primeira vez a relação entre níveis reduzidos de AF na corrente sanguínea materna e a ocorrência de DTN (SMITHELLS; SHEPPARD; SCHORAH, 1976). Na década de 90, o *Medical Research Council* concluiu que a suplementação com AF deveria ser recomendada, ainda no período periconcepcional, a todas as mulheres que tivessem histórico de gestações afetadas por DTN (*MRC Vitamin Study Research Group*, 1991). Posteriormente, diversos programas pertencentes a organizações internacionais, como a Organização Mundial de Saúde e a *Food and Drug Administration (FDA)*, passaram a recomendar a ingestão diária de 400 µg de AF no período periconcepcional a todas as mulheres. Estes programas têm levado à redução expressiva da prevalência de DTN (VAN MIL; OOSTERBAAN; STEEGERS-THEUNISSEN, 2010), embora os mecanismos responsáveis pelos efeitos benéficos do AF não tenham sido elucidados.

Políticas públicas com o objetivo de adequar a ingestão do AF a toda a população por meio da fortificação de alimentos foram implementadas a partir da década de 90 nos países desenvolvidos. Devido a essas políticas, esses países apresentaram uma redução na prevalência de DTN nas últimas décadas (CORNEL; ERICKSON, 1997; KALTER, 2003; MOLLOY, 2005; DE WALS et al., 2007; SAYED et al., 2008). No Brasil, somente a partir de dezembro de 2002, o Ministério da Saúde determinou que todas as farinhas de trigo e milho fabricadas no país ou importadas fossem enriquecidas com ferro e AF, segundo resolução nº 344 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004). Mas a partir da publicação da lei, as empresas ainda tiveram prazo até junho de 2004 para se adequar a esta norma, portanto, podemos considerar que a adequação efetiva da ingestão diária de AF recomendada à população é ainda muito recente no Brasil. Deste modo,

é precoce para o país falar em redução da prevalência de DTN em decorrência da fortificação das farinhas com AF, o que se sabe por ora, é que os dados existentes até o momento colocam o Brasil ao lado do México no patamar dos países com as mais altas taxas de DTN na América Latina (SANTOS; PEREIRA, 2007; LIMA et al., 2009; BARBOSA et al., 2011).

1.3 DESENVOLVIMENTO DA MEDULA ESPINHAL

A formação de estruturas complexas presentes no SNC dos vertebrados a partir de uma estrutura primordial relativamente simples – a placa neural – envolve diversos mecanismos de desenvolvimento simultâneos e interdependentes, incluindo: movimentos morfogenéticos, o estabelecimento de identidades posicionais e um processo complexo de histogênese (LENT, 2002; WOLPERT; TICKLE, 2010).

A formação deste sistema em vertebrados é subdividida em etapas bem definidas, a saber: a determinação da identidade neural no ectoderma, a indução neural; a subdivisão do SNC em regiões com propriedades distintas ao longo dos eixos rostrocaudal e dorsoventral do embrião, a regionalização do SNC; a série de transformações morfogenéticas responsáveis pela formação do TN, a neurulação; a divisão celular controlada de células precursoras, por meio de divisões simétricas que geram novas células precursoras, a proliferação; a migração e posterior diferenciação destas células precursoras em neurônios e glia; o estabelecimento de conexões no SNC, a sinaptogênese, que ocorre simultaneamente à eliminação programada de células e circuitos extranumerários por apoptose; e o estabelecimento de conexões entre o SNC e o sistema nervoso periférico, a axogênese (STRÄHLE; BLADER, 1994; BOYAN et al., 1995; GÖTZ; HUTTNER, 2005; KALAM AL-AZAD et al., 2011).

Inicialmente, uma vez que o tecido neural é induzido, ele precisa ser especificado ao longo do eixo rostrocaudal para formar as diferentes regiões do SNC. Desde o início da formação do sistema nervoso, ainda na placa neural, esta informação posicional é adquirida, e é essencial ao sucesso das etapas posteriores do desenvolvimento deste sistema (GATO et al., 2005; WOLPERT; TICKLE, 2010). Durante o desenvolvimento, a medula espinhal inicialmente alonga-se progressivamente em direção rostrocaudal. Como já visto anteriormente, a morfogênese desta estrutura, em vertebrados, ocorre devido a dois eventos do desenvolvimento que são temporal e espacialmente distintos,

a neurulação primária e secundária; responsáveis pela formação das regiões cérvico-torácica e lombossacral da medula espinhal, respectivamente (SCHOENWOLF; DELONGO, 1980; SCHOENWOLF; SMITH, 1990; LE DOUARIN; TEILLET; CATALA, 1998). Em embriões de ave, a morfogênese inicial da medula espinhal tem início no estágio de 6 a 10 somitos. Neste estágio, a placa neural situa-se posteriormente ao nó de Hensen – região sinalizadora localizada em frente à linha primitiva –, o sulco neural é anterior ao nó e, o TN em fechamento está situado ao nível do último par individualizado de somitos (CATALA et al., 1996).

O destino neural das células da medula espinhal é logo reprogramado por fatores extrínsecos, que orientam o destino final destas células. Várias classes de moléculas secretadas estão implicadas nesta sinalização, entre elas: os fatores de crescimento de fibroblasto (FGFs, do inglês, *fibroblast growth factors*), o ácido retinóico, os membros da família Wnt (do inglês, *wingless*) e a própria atividade caudalizante do mesoderma paraxial – os somitos (GODSAVE; DURSTON, 1997; KIECKER; NIEHRS, 2001; LEWIS; EISEN, 2003; MADEN, 2006). A especificação inicial ocorre ainda na placa neural, pois essas moléculas sinalizadoras estão presentes já na linha primitiva e, posteriormente, no mesoderma paraxial, de forma que a exposição das células com destino neural aos FGFs derivados da linha primitiva e, posteriormente, à atividade sinalizadora do mesoderma paraxial, que envolve a expressão de ácido retinóico, impõe um padrão caudal às células com destino neural (STOREY et al., 1998; MUHR et al., 1999).

A placa neural é formada por uma camada única de células neuroepiteliais. O TN recém-formado é constituído por essas células, que são consideradas as células-tronco neurais, pois possuem intensa atividade proliferativa e são multipotentes, portanto, capazes de originar os diferentes tipos de neurônios presentes no SNC e, também, as diferentes células gliais – astrócitos e oligodendrócitos (MCDERMOTT; BARRY; MCMAHON, 2005; WOLPERT; TICKLE, 2010). As células neuroepiteliais possuem características típicas de células epiteliais, sendo altamente polarizadas ao longo do eixo ápico-basal, o que é óbvio quando se observa a organização da membrana plasmática destas células, sendo marcante a presença de junções celulares na porção apical da membrana (WODARZ; HUTTNER, 2003). Aparentemente, esta camada neuroepitelial parece estratificada, por isso este tecido é denominado pseudoestratificado. Isso acontece porque, durante o ciclo celular, o núcleo das células neuroepiteliais migra ao longo do eixo

ápico basal da célula, o que é conhecido como migração nuclear intercinética (GÖTZ; HUTTNER, 2005).

Durante a histogênese do tecido nervoso, a atividade proliferativa intensa das células neuroepiteliais leva rapidamente a um aumento acentuado no número de células precursoras. Com a posterior diferenciação destas células precursoras em neurônios – neurogênese – estabelece-se uma linha de células secundária ao TN original, transformando o tecido neuroepitelial anteriormente constituído por uma camada única de células. Na medula espinhal, esta nova camada celular é denominada camada do manto ou intermediária, e o neuroepitélio proliferativo localizado próximo à luz do TN é então denominado camada endimária (GATO et al., 2005; WOLPERT; TICKLE, 2010). Durante a fase de diferenciação, ocorre primeiramente a diferenciação das células em neurônios – a neurogênese – e, posteriormente a gliogênese – formação das células gliais (PANCHISION; MCKAY, 2002).

Após o início da neurogênese, as células neuroepiteliais originam as células da glia radial, que exibem características tanto de células neuroepiteliais, como de células gliais (GÖTZ; HUTTNER, 2005). Essas células possuem processos radiais que se expandem da superfície apical à superfície pial do TN e expressam marcadores de células gliais como: o transportador de glutamato-aspartato (GLAST, do inglês, *glutamate-aspartate transporter*), a proteína S100, a proteína ácida fibrilar da glia (GFAP, do inglês, *glial fibrillary acidic protein*) e a proteína vimentina (LEVITT; RAKIC, 1980; KRIEGSTEIN; GÖTZ, 2003). Estas células servem como guia durante a migração dos neurônios, tanto no encéfalo, quanto na medula espinhal, e foram visualizadas primeiramente pelo método de impregnação de Golgi, sendo esta técnica importante para a história da glia radial (BENTIVOGLIO; MAZZARELLO, 1999). Suas propriedades astrogliais, no entanto, não foram descobertas antes da década de 80, quando os métodos imuno-histoquímicos permitiram identificar a expressão da proteína GFAP nos processos radiais das células encontradas no córtex cerebral de primatas (LEVITT; RAKIC, 1980). Adicionalmente, as células da glia radial também mantêm propriedades de células neuroepiteliais, que incluem: a expressão de marcadores de células neuroepiteliais, como a proteína de filamento intermediário nestina, a manutenção da polaridade ápico basal da célula através da presença de junções celulares de membrana, e a manutenção do contato celular com a lâmina basal (HARTFUSS et al., 2001; GÖTZ; HUTTNER, 2005).

As células da glia radial correspondem ao primeiro fenótipo distinto das células neuroepiteliais observados na medula espinhal embrionária. A glia radial presente nesta estrutura do SNC exibe uma morfologia bipolar e possui um corpo celular em formato oval localizado na camada ependimária. Estas células estendem um longo processo desde a camada ependimária até a superfície pial, e um pequeno processo até a lâmina basal, dispendo-se perpendicularmente ao longo do eixo do canal neural da medula espinhal (MCDERMOTT; BARRY; MCMAHON, 2005). Após o término da neurogênese e da migração neuronal, algumas células da glia radial alteram sua função e fenótipo, perdendo as características de células neuroepiteliais e diferenciando-se em astrócitos, sendo, portanto, consideradas progenitores gliais (CULICAN et al., 1990; RAKIC, 2003).

Durante a neurogênese, as células precursoras migram através da glia radial estabelecendo a camada do manto na medula espinhal, região onde as células diferenciam para dar origem aos neurônios presentes na substância cinzenta. Os neurônios imaturos passam por uma série de mudanças para se tornarem funcionais, adquirindo uma morfologia que confere a habilidade de sintetizar neurotransmissores e conduzir sinais elétricos (RAY; GAGE, 1994; RICHARDS et al., 1995). As moléculas responsáveis pelo início dessa diferenciação são as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs, do inglês, *bone morphogenetic proteins*) e o Shh (do inglês, *Sonic hedgehog*). A distribuição destas moléculas obedece a um gradiente ao longo do eixo dorsoventral da medula espinhal, levando à formação de diferentes classes de neurônios – motoneurônios, interneurônios e neurônios sensoriais – e orientando o crescimento axonal destes, permitindo o estabelecimento de conexões apropriadas (KALYANI et al., 1998; KALAM AL-AZAD et al., 2011).

A notocorda é considerada a fonte principal de sinalização envolvida primeiro na indução neural e, posteriormente, no estabelecimento do padrão dorsoventral na medula espinhal (TEILLET; LAPOINTE; LE DOUARIN, 1998). Sinais provenientes da notocorda levam à formação de um centro sinalizador conhecido como placa do assoalho (do inglês, *floor plate*); enquanto a sinalização proveniente do ectoderma dorsal leva à formação de outra região sinalizadora – a placa do teto (do inglês, *roof plate*) (WOLPERT; TICKLE, 2010). A molécula de Shh secretada pela notocorda e pela placa do assoalho coordena à indução de motoneurônios e de algumas classes de interneurônios (YAMADA et al., 1993; ROELINK et al., 1994), enquanto as BMPs presentes dorsalmente e na placa do teto sinalizam à diferenciação em neurônios sensoriais (LIEM et al., 1995). Esse processo de

desenvolvimento é finamente regulado e o sucesso deste garante à medula espinhal realizar as suas duas principais funções: transmitir ao encéfalo as informações sensoriais provenientes do meio externo, e integrar as informações sensoriais proprioceptivas às respostas motoras. Para tanto, estes dois sistemas são altamente segregados anatomicamente, de forma que os neurônios e circuitos que processam as informações sensoriais estão concentrados na região dorsal, enquanto os circuitos relacionados à propriocepção e ao controle motor são restritos à região ventral da medula espinhal (JESSELL, 2000).

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, ocorre um balanço dinâmico envolvendo a sobrevivência e a morte celular, e também a proliferação e a diferenciação, o que permite gerar um tecido nervoso maduro funcional. Tem sido demonstrado que o fator de transcrição e supressor de tumor p 53 tem um papel importante nesses eventos moleculares, atuando como regulador destes processos, contribuindo para dirigir os neurônios a um fenótipo específico durante o desenvolvimento (SOLA et al., 2011; VUONG; CONLEY; AL-UBAIDI, 2012).

A p 53 é considerada um supressor de tumor porque sua função principal consiste em ativar mecanismos de checagem (do inglês, *checkpoints*) do ciclo celular e, conseqüentemente, induzir o reparo do DNA ou a apoptose (STEWART; PIETENPOL, 2001). Entretanto, existe a evidência de que a p 53 possui outras funções durante o desenvolvimento neuronal (TEDESCHI; DI GIOVANNI, 2009; MOLCHADSKY et al., 2010). Entre estas funções estão: a indução de sinais anti-proliferativos nos neurônios em diferenciação, a ativação de receptores para fatores de crescimento neuronal como os NGFs (do inglês, *nerve growth factors*) e a indução de apoptose durante a maturação final dos circuitos neurais (EIZENBERG et al., 1996; ZHANG; YAN; CHEN, 2006; ARMESILLA-DIAZ et al., 2009; QIN et al., 2009).

A atividade de p 53 é expressiva durante a diferenciação neuronal e ocorrem mudanças na localização subcelular, bem como nos níveis desta proteína durante os estágios de diferenciação e maturação neuronal (EIZENBERG et al., 1996; QIN et al., 2009). Durante a diferenciação, a p 53 é translocada para o núcleo, e em células já diferenciadas, ela é expressa principalmente no citoplasma (TEDESCHI; DI GIOVANNI, 2009; MOLCHADSKY et al., 2010; VUONG; CONLEY; AL-UBAIDI, 2012). Altos níveis de expressão da proteína são encontrados nos axônios em crescimento dos neurônios e a inibição

da p 53 neste estágio de maturação neuronal leva ao colapso destas estruturas (QIN et al., 2009).

1.4 DESENVOLVIMENTO DO ESQUELETO AXIAL: IMPORTÂNCIA DOS GENES PAX 1/9 E SOX9

O esqueleto axial dos vertebrados é composto pelo crânio, a coluna vertebral, as costelas e o esterno. A coluna vertebral é a estrutura óssea que protege a medula espinhal, e confere suporte e ao mesmo tempo mobilidade ao corpo dos vertebrados. É também uma das estruturas mais visivelmente segmentadas no corpo, juntamente com as costelas e os nervos espinhais (MONSORO-BURQ, 2005).

Nos embriões de vertebrados, o esqueleto axial, bem como a musculatura esquelética dorsal juntamente com a derme da região do tronco, originam-se de estruturas embrionárias denominadas somitos. Estas estruturas metamerizadas formam-se a partir da diferenciação do mesoderma paraxial adjacente ao TN e à notocorda, que está localizado nos níveis posteriores ao mesoderma não segmentado presente na região cefálica (BRENT; TABIN, 2002; STAFFORD et al., 2011). Os somitos são estruturas pares, dispostas de cada lado do TN e correspondem às primeiras estruturas segmentares visíveis no desenvolvimento embrionário, constituindo a base do padrão segmentar do corpo dos vertebrados. Os somitos não somente originam estruturas metamerizadas como as vértebras, os discos intervertebrais, a musculatura, tendões e ligamentos da região dorsal do tronco, e as costelas, mas também são responsáveis por determinar o padrão de segmentação de tecidos adjacentes como, nervos periféricos, gânglios da raiz dorsal e vasos sanguíneos (TEILLET; KALCHEIM; LE DOUARIN, 1987; KEYNES et al., 1990; WILTING; EICHMANN; CHRIST, 1997; CHRIST et al., 1998). O metamerismo dos somitos é pré-requisito para a habilidade em realizar movimentos rotacionais que o corpo dos vertebrados adquiriu.

O termo somito foi introduzido por Balfour em 1881 para caracterizar essas unidades segmentadas do mesoderma paraxial, anteriormente descritas por Ramak em 1850 como protovértebras, sendo a primeira descrição detalhada dos somitos de embriões de galinha feita por Williams em 1910 (CHRIST; HUANG; SCAAL, 2004). Os somitos surgem progressivamente como pares de esferas epiteliais que brotam a partir do mesoderma paraxial pós-cranial, seguindo uma direção rostrocaudal. Estas estruturas são formadas de maneira precisamente coordenada durante o desenvolvimento embrionário e o tempo

necessário ao surgimento de cada par de somitos é bem determinado e específico de cada espécie. Em embriões de ave, o surgimento ocorre a cada 90 minutos (PALMEIRIM et al., 1998; CHRIST; HUANG; WILTING, 2000). Em embriões humanos, formam-se cerca de três pares de somitos por dia, o que equivale a um par de somitos a cada 8 horas (SADLER, 2005).

Os somitos recém-formados correspondem a estruturas esféricas que possuem uma região dorsal e uma região ventral, ambas formadas por células epiteliais, e um lúmen que contém células mesenquimais – a somitocèle. Uma vez formado, e em resposta à sinalização celular proveniente de tecidos vizinhos como a notocorda, o TN e o ectoderma superficial, rapidamente se distinguem dois compartimentos celulares no somito: o esclerótomo e o dermomiótomo (BALLING; NEUBÜSER; CHRIST, 1996; BRENT; TABIN, 2002). Ocorre uma regionalização do somito e, durante este processo, as células da região ventral passam por uma transição epitélio-mesenquimal, originando o esclerótomo, enquanto na região dorsal, as células mantêm a característica epitelial, originando o dermomiótomo. Com o decorrer do desenvolvimento, as células presentes na borda do dermomiótomo passam por um processo de delaminação e migram pelo somito estabelecendo o terceiro compartimento celular desta estrutura – o miótomo – localizado entre o esclerótomo e o dermomiótomo. O esclerótomo origina o esqueleto e a cartilagem do tronco, o miótomo contém células precursoras de tecido músculo-esquelético do tronco e membros e o dermomiótomo contém células que contribuem para a formação da derme e da musculatura dorsal do tronco (ORDAHL; LE DOUARIN, 1992; CHRIST; ORDAHL, 1995; STAFFORD et al., 2011) (Fig. 5).

O esclerótomo é a região do somito responsável pela formação das vértebras. As vértebras são as unidades anatômicas que compõem a coluna vertebral e consistem de elementos repetidos que variam em tamanho e morfologia de acordo com sua posição ao longo do eixo rostrocaudal. Cada vértebra, com exceção do atlas (1ª vértebra cervical), é formada por uma porção ventral, denominada corpo vertebral, que se desenvolve em torno da notocorda, e por um par de arcos vertebrais ou neurais, que se desenvolvem lateralmente à medula espinhal, formando os pedículos, lâminas e os processos transversos, que, por sua vez, fundem-se dorsalmente próximo à pele – formando os processos espinhosos das vértebras (MONSORO-BURQ; LE DOUARIN, 2000; O'RAHILLY et al., 2008) (Fig.6).

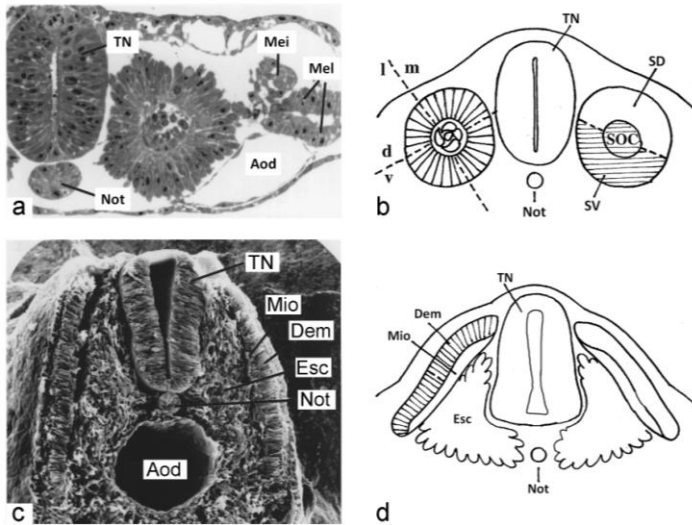


Figura 5. Formação e regionalização dos somitos. **(a)** Secção transversal da região cervical de embrião de galinha com 2 dias. **(b)** O esquema ilustra a formação inicial do somito visualizada em **a**, neste estágio o somito corresponde a uma esfera de tecido epitelizado que contém células mesenquimais em seu interior. **(c)** Imagem em microscopia de varredura de embrião de galinha com 3 dias (criofratura, secção transversal). **(d)** O esquema evidencia a compartimentalização do somito em três regiões visualizada em **c**. *Aod*, aorta dorsal; *d*, dorsal; *Dem*, dermomiótomo; *Esc*, esclerótomo; *l*, lateral *m*, medial; *Mei*, mesoderma intermediário; *Mel*, mesoderma lateral; *Mio*, miótomo; *Not*, notocorda; *SD*, somito dorsal; *SOC*, somitocela; *SV*, somito ventral; *TN*, tubo neural; *v*, ventral. *Fonte:* modificado de Balling, Neubüser e Christ (1996).

O termo esclerótomo foi proposto pelo anatomista Hatschek em 1980. Como mencionado anteriormente, as células que fazem parte desta estrutura provêm da região ventral do somito epitelizado e das células mesenquimais presentes na somitocela (CHRIST; ORDAHL, 1995). Após a transição epitélio-mesenquimal que ocorre com as células da região ventral dos somitos, as células localizadas na porção medial do esclerótomo migram e proliferam em torno da notocorda e condensam para iniciar a formação da vértebra. Estas células mesenquimais darão origem aos corpos das vértebras e aos discos intervertebrais; enquanto as células posicionadas na porção mais lateral do esclerótomo darão origem ao mesênquima que formará os pedículos e a lâmina dos arcos vertebrais, bem como as costelas. Os processos espinhosos são formados

a partir das células localizadas inicialmente na região dorso-ventral do esclerótomo (CHRIST; WILTING, 1992; CHRIST; HUANG; WILTING, 2000). Após a formação dessas condensações de células mesenquimais, estas células se diferenciam em condroblastos, constituindo o molde cartilaginoso que será subsequentemente substituído por tecido ósseo durante o processo de ossificação endocondral, originando a coluna vertebral (RODRIGO, 2003; CHRIST; HUANG; SCAAL, 2004) (Fig. 7).

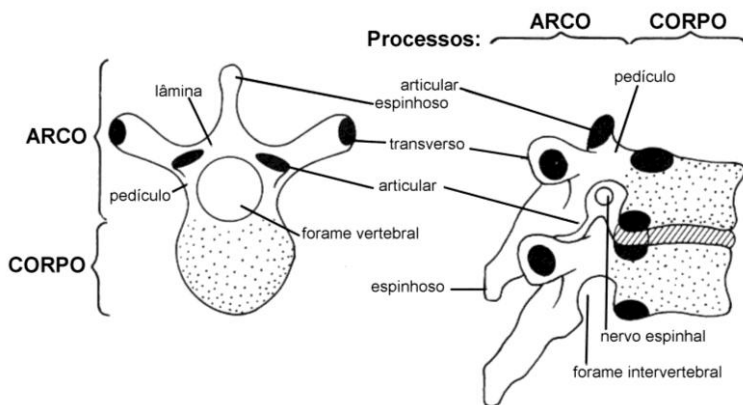


Figura 6. Esquema ilustrando as partes que compõem a vértebra: arco e corpo vertebral com seus respectivos processos. Vértebra torácica em vista dorsal (à esquerda) e lateral direita (à direita). Fonte: O’Rahilly et al. (2008). Disponível em: http://www.dartmouth.edu/~humananatomy/figures/chapter_39/39-2.HTM.

A transição epitélio-mesenquimal que ocorre na região ventral do somito é controlada principalmente por sinalizações oriundas da notocorda, como os genes *Shh* e *Noggin* (CHRIST; HUANG; WILTING, 2000). Estas sinalizações induzem a expressão dos genes *Pax 1* e *Pax 9* nas células do esclerótomo, desta forma, o esclerótomo é definido não apenas pela presença de células mesenquimais, mas também pela expressão destes marcadores celulares específicos (KOSEKI et al., 1993; PETERS; DOLL; NIESSING, 1995; DIETRICH; SCHUBERT; LUMSDEN, 1997). Nos embriões de galinha no estágio de 3 – 4 somitos, que equivale a 23 a 29 horas de desenvolvimento, as células da parede ventral da somitocela já são positivas para *Pax 1* (EBENSPERGER et al., 1995). Portanto, a expressão de *Pax 1* na região

ventral do somito precede a transição epitélio-mesenquimal que corresponde à manifestação morfológica da formação do esclerótomo. Já o gene Pax 9 não é expresso no somito de embriões de galinha até que o mesênquima do esclerótomo esteja formado nos estágios de 4 – 5 somitos (MULLER et al., 1996).

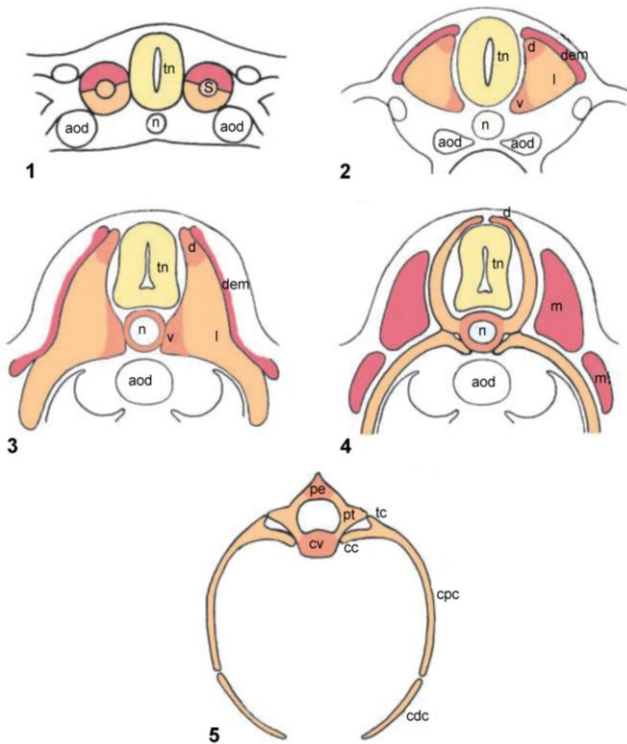


Figura 7. Representação esquemática da sequência de diferenciação do esclerótomo em embriões de ave (1 a 5). *Aod*, aorta dorsal; *cc*, cabeça da costela; *cdc*, corpo distal da costela; *cpc*, corpo proximal da costela; *cv*, corpo da vértebra; *d*, dorsal; *dem*, dermomiótomo; *l*, lateral; *m*, musculatura; *n*, notocorda; *pe*, processo espinhoso; *pt*, processo transversal; *S*, somitocelele; *tc*, tubérculo da costela; *tn*, tubo neural; *v*, ventral. *Fonte:* modificado de Christ, Huang e Wilting (2000).

Portanto, a expressão de Pax 1 precede à de Pax 9 nas células do esclerótomo. Pax 1 é expresso inicialmente em todas as células do

esclerótomo, porém, em estágios subsequentes do desenvolvimento, a expressão torna-se mais intensa no compartimento ventromedial. Já Pax 9 é expresso posteriormente e no compartimento ventrolateral do esclerótomo. Pax 1 é predominantemente expresso na região de formação dos “futuros” corpos vertebrais e discos intervertebrais, enquanto a expressão de Pax 9 estende-se mais lateralmente, predominando na região do mesênquima que originará os arcos vertebrais e a parte proximal das costelas (WALLIN et al., 1994; CHRIST; ORDAHL, 1995; NEUBÜSER; KOSEKI; BALLING, 1995; CHRIST; HUANG; SCAAL, 2004). Porém, em estágios subsequentes do desenvolvimento, a expressão de Pax 1/9 foi encontrada em todos os elementos vertebrais em desenvolvimento, incluindo a região do corpo da vértebra e também dos arcos vertebrais em embriões de galinha (LECLAIR; BONFIGLIO; TUAN, 1999). Devido à expressão precoce de Pax 1, este é considerado o marcador ideal destas células, porém, sabe-se que ambos os genes, Pax 1 e Pax 9, possuem um papel importante no desenvolvimento dos elementos vertebrais a partir do esclerótomo (BALLING; NEUBÜSER; CHRIST, 1996; RODRIGO, 2003).

Os genes Pax 1 e Pax 9 pertencem à família de genes *Paired box* (Pax). A família é composta por nove membros (Pax 1 a Pax 9) que codificam fatores de transcrição e são caracterizados pela presença de um domínio conservado de ligação ao DNA localizado na porção terminal NH₂ – o *paired box* (NOLL, 1993; MANSOURI; GOUDREAU; GRUSS, 1999). Os genes Pax foram descritos pela primeira vez em *Drosophila* (BOPP et al., 1986), e, posteriormente, estes foram encontrados em muitas espécies de vertebrados como camundongo, *zebrafish*, anfíbio, galinha e humanos (KRAUSS et al., 1991; WALTHER et al., 1991; STAPLETON et al., 1993; PETERS; DOLL; NIESSING, 1995; HIRSCH; HARRIS, 1997). Os genes da família Pax possuem este domínio de ligação ao DNA conservado entre as espécies e, algumas vezes, estes genes apresentam um padrão de expressão que se sobrepõe e se complementa durante o desenvolvimento (DAHL; KOSEKI; BALLING, 1997).

Entre os membros da família Pax, os genes Pax 1 e Pax 9 são os únicos expressos no esclerótomo (WALTHER et al., 1991; WALLIN et al., 1994). Estudos utilizando camundongos *knock-out*, demonstraram que estes genes são essenciais ao desenvolvimento das vértebras, uma vez que os fenótipos dos camundongos com diferentes mutações no gene Pax 1 exibiram anomalias graves das vértebras, incluindo a ausência ou importantes deformidades nos corpos vertebrais, e a perda

dos discos intervertebrais; além disso, estes animais possuíam as partes proximais das costelas malformadas. As anomalias vertebrais são ainda mais graves quando há mutações também no gene Pax 9 e, nos camundongos *knock-out* para Pax 1/9, os arcos neurais chegam a se formar, mas são unidos por elementos de cartilagem ectópica. A gravidade dos defeitos não é a mesma ao longo do eixo rostrocaudal, sendo as anomalias mais graves encontradas nas regiões da coluna lombar e da cauda (KOSEKI et al., 1993; WALLIN et al., 1994; PETERS et al., 1999).

Há pouco conhecimento sobre a função dos genes Pax 1/9 durante o desenvolvimento das vértebras. Sabe-se que estes são necessários para manter a proliferação celular no esclerótomo inicial, bem como para a formação dos centros de condificação que ocorre em estágios posteriores de diferenciação das vértebras (WILTING et al., 1994; PETERS et al., 1999; RODRIGO, 2003). Pax1 coopera com a proteína mesenquimal *forkhead-1* (*Mfh1*), presente no esclerótomo sob a influência de Shh. O domínio de expressão de *Mfh1* estende-se mais dorsalmente e lateralmente do que o domínio da expressão de Pax 1, e uma das funções descritas para esta proteína é manter a atividade proliferativa das células do esclerótomo (FURUMOTO et al., 1999). Em relação à condrogênese, outros genes são requeridos neste processo e são expressos sob a influência de Pax 1/9 durante a diferenciação das células mesenquimais em cartilagem, como o gene *Col 2a*, que codifica o colágeno do tipo II, bem como fator de transcrição que é capaz de ativar a sua expressão – o Sox 9 (HEALY; UWANOGHO; SHARPE, 1999; BI et al., 2001; LEUNG et al., 2011). A expressão de Pax1 e Pax 9 é reduzida no início da formação dos moldes cartilagosos, porém, as células do pericôndrio e dos discos intervertebrais mantêm a expressão destes genes em estágios de maior diferenciação dos tecidos mesenquimais (KOSEKI et al., 1993; WALLIN et al., 1994; BALLING; NEUBÜSER; CHRIST, 1996; PETERS et al., 1999).

O fator de transcrição Sox 9 é essencial à formação dos moldes cartilagosos das vértebras, regulando os estágios iniciais da condrogênese no mesênquima, controlando a proliferação e a expressão de genes da matriz cartilaginosa dos condrocitos (DE CROMBRUGGHE; LEFEBVRE; NAKASHIMA, 2001; IKEGAMI et al., 2011). Especialmente nas cartilagens destinadas à ossificação endocondral, a expressão dos produtos do gene Sox 9 é intensa nos condrocitos em repouso e em proliferação, com o máximo de expressão sendo visualizada em condrocitos pré-hipertróficos e, desaparecendo completamente nas zonas hipertróficas (NG et al., 1997; ZHAO et al.,

1997). Adicionalmente, mutações no gene Sox 9 estão associadas com anomalias esqueléticas em humanos, na qual as anormalidades das estruturas ósseas são atribuídas a alterações no programa de diferenciação condrogênica (KWOK et al., 1995; PFEIFER et al., 1999; SOCK, 2003).

1.5 HOMOCISTEÍNA, ÁCIDO FÓLICO E O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

1.5.1 Metabolismo da Homocisteína e do Ácido Fólico

A deficiência nutricional de AF (vitamina B₉) tem como consequência direta o aumento dos níveis intracelulares de Hcy (DE LA CALLE et al., 2003; BRAUER; TIERNEY, 2004). A Hcy é um aminoácido sulfurado que não está presente na dieta e também não é utilizado na síntese proteica, mas é produzido nas células a partir da desmetilação do aminoácido metionina (SELHUB, 1999). Posteriormente, a Hcy pode ser convertida de forma reversível em outros metabólitos que participam de reações celulares, ou pode ser convertida irreversivelmente a cisteína e ser eliminada do organismo, o que ocorre através de três vias metabólicas principais: a remetilação, a transmetilação e a transsulfuração (HAGUE, 2003).

No ciclo metabólico de remetilação, a conversão da Hcy é reversível, e está ligada ao metabolismo do AF, por isso as reações celulares são catalizadas por enzimas que utilizam vitaminas do complexo B como cofatores, incluindo as vitaminas B₁₂ (cobalamina) e B₆ (piridoxina). A enzima responsável pela conversão da Hcy em metionina, utilizando o grupamento metil presente no AF, é a metionina sintetase (MS), que é amplamente expressa em todas as células (VAN DER PUT et al., 2001) e utiliza como cofator a vitamina B₁₂. Outra enzima encontrada no fígado e nos rins, a betaína homocisteína-metiltransferase (BHMT) é capaz de remetilizar a Hcy utilizando um grupo metil derivado da betaína, esta reação é responsável por cerca de 50% da remetilação da Hcy que ocorre no fígado (ULREY et al., 2005).

A reação de transmetilação é catalizada pela enzima metionina adenosil-transferase (MAT), que liga um grupamento ATP à metionina, formando a S-adenosilmetionina (AdoMet) (KOTB et al., 1997). A AdoMet é um composto altamente energético devido à presença de uma ligação sulfônica, e é também o doador universal de grupos metil nas células (MUDD; CANTONI, 1958). Existem duas isoformas diferentes

desta enzima, uma hepática – MAT 1A – e outra encontrada nos tecidos extra-hepáticos – MAT 2A (MATO et al., 1997). Mais de 100 reações de transmetilação transferem o grupo metil da AdoMet para uma grande variedade de substratos, incluindo proteínas, RNA, DNA e lipídeos (VAN DER PUT et al., 2001). Durante esta transferência de grupamentos metil, forma-se a S-adenosilhomocisteína (AdoHcy), que é um potente inibidor das reações de transmetilação e deve ser convertida à Hcy e adenosina pela ação da enzima s-adenosilhomocisteína hidrolase (SAH), que é amplamente expressa em todos os tecidos (BLOM, 2009).

A Hcy é mantida nas células através das reações de remetilação e transmetilação, pois a conversão da Hcy a metionina é reversível e as diversas reações de transmetilação convertem a AdoMet a AdoHcy, gerando Hcy de forma cíclica a partir da metionina. Já durante a reação de transsulfuração, a Hcy é convertida de forma irreversível a cisteína, sendo, portanto, eliminada do organismo da seguinte maneira: primeiramente a Hcy é convertida à cistationa pela ação da enzima cistationa β -sintetase (CBS) e, numa reação subsequente, a cistationa é reduzida a cisteína pela ação da enzima cistationa γ -liase (CGL). As duas enzimas utilizam a vitamina B₆ como cofator (Fig. 8).

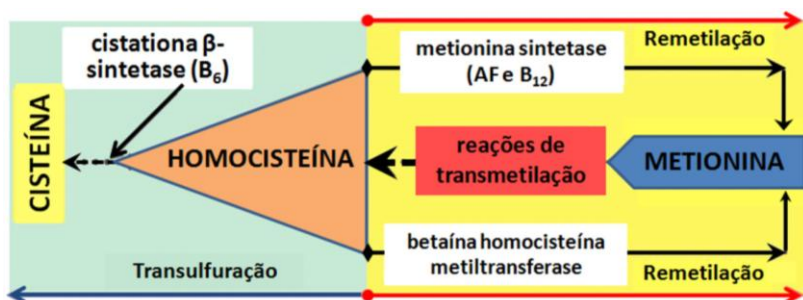


Figura 8. Resumo das três vias metabólicas envolvidas na eliminação da Hcy intracelular. A Hcy pode ser remetilada e convertida à metionina pela ação das enzimas metionina sintetase (MS) ou betaína-Hcy metiltransferase (BHMT) (vias de remetilação). As reações de transmetilação também estão envolvidas na eliminação da Hcy proveniente da conversão da AdoMet em AdoHcy pela ação da enzima metionina-adenosil-transferase (MAT). A Hcy também pode ser irreversivelmente convertida à cisteína pela ação da enzima cistationa β -sintetase (CBS) na presença de vitamina B₆ (via de transsulfuração). *Fonte:* modificado de Ulrey et al. (2005).

A cisteína é gerada nas reações de transsulfuração, portanto, não é um aminoácido essencial, embora desempenhe duas funções muito importantes no organismo: a oxidação do enxofre da cisteína, permitindo que este seja eliminado na forma de sulfato e, além disso, a cisteína é convertida também a glutatona – um potente antioxidante (HAGUE, 2003; BLOM, 2009). A enzima CBS está presente somente no fígado e nos rins, e cerca de 70% do enxofre proveniente da metionina é excretado pelos rins na forma de sulfato inorgânico, por esse motivo esta via metabólica é tão importante (FOWLER, 1997).

Este conjunto de reações metabólicas permite que o organismo mantenha os níveis normais de Hcy que, em humanos, estão em torno de 5 – 15 μM no plasma sanguíneo (UELAND et al., 1993).

O AF é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B obtida na dieta – vitamina B₉. O nome ácido fólico é derivado do latim – *folium* – que significa folha. Ele foi isolado pela primeira vez de folhas de espinafre em 1941. Muitos alimentos são ricos em AF, incluindo, além de vegetais folhosos, como o espinafre e a couve, batatas, laranja, feijão, leveduras e órgãos como fígado. O nome químico do AF é ácido pteroilglutâmico. Na sua forma sintética, o AF apresenta-se como monoglutamato, forma mais ativa da vitamina, que é rapidamente absorvida (LUCOCK, 2000).

O termo genérico folato inclui todos os tipos de poliglutamatos encontrados nas fontes naturais e também a forma sintética presente nos complexos vitamínicos, comprimidos e alimentos fortificados – que é denominada AF. O termo folato é bastante utilizado para designar as diversas apresentações químicas da vitamina (PITKIN, 2007). O AF natural, presente nos alimentos, corresponde ao 5-metiltetrahydrofolato (5-MeTHF) e 10-formiltetrahydrofolato (10-ForTHF) que fazem parte da composição dos derivados de poliglutamato. Estes devem ser hidrolizados a monoglutamatos antes de serem absorvidos pelo intestino e transportados às células através do plasma sanguíneo (BEAUDIN; STOVER, 2007).

O transporte dos folatos através das membranas celulares é feito por dois mecanismos: transporte via receptor específico e via proteínas carreadoras de membrana, do inglês, *carrier-mediated systems* (RFC) (ANTONY, 1996). Os receptores de membrana do AF possuem alta afinidade por todas as formas de folato e foram descritas três isoformas, duas amplamente distribuídas nos tecidos e uma que é específica da placenta e está envolvida no transporte de folatos para o embrião/feto durante o desenvolvimento. O transporte do tipo RFC possui afinidade

muita mais alta pelas formas reduzidas dos folatos e ocorre através de transporte ativo envolvendo a participação de íons (FOWLER, 2001).

O 5-MeTHF funciona como doador de metil na reação de remetilação da Hcy à metionina, catalizada pela enzima MS na presença de vitamina B₁₂. Durante a remetilação, o 5-MeTHF é convertido em tetrahidrofolato (THF), que pode ser diretamente convertido em 5,10-metilenotetrahidrofolato (5,10 - MetTHF), pela ação da enzima serina hidroximetiltransferase (SHMT). O 5,10 - MetTHF doa o grupo metil para conversão da base pirimídica uracila em timina, atuando como cofator da enzima timidilato sintetase (TS), esta reação está implicada na síntese e reparo do DNA (DUTHIE et al., 2002). O THF pode ser convertido de forma indireta em 5,10-MetTHF, via formação de outros dois metabólitos: 10-ForTHF e 5,10-metenilTHF, essa conversão indireta é catalizada pela enzima metilenotetrahidrofolato desidrogenase 1 (MTHFD1). Os dois metabólitos gerados nesta reação são capazes de doar unidades de carbono que são utilizadas na biossíntese de purinas (APPLING, 1991; VAN DER PUT et al., 2001) (Fig.9).

Dentro da célula, os folatos funcionam como coenzimas na transferência reversível de unidades de carbono em uma grande variedade de reações, como a conversão da serina em glicina, o catabolismo da histidina, a síntese de timidilato, metionina e purina (LUCOCK, 2000; BEAUDIN; STOVER, 2007). As unidades de carbono são obtidas a partir de reações mediadas pelos folatos, de forma que processos celulares vitais dependem deste metabolismo, tais como a síntese de ácidos nucleicos, proteínas, aminoácidos, a geração de grupamentos metil, o metabolismo de vitaminas e a remetilação da Hcy a metionina (BLOM, 2009).

1.5.2 Alterações no metabolismo da Homocisteína e do Ácido Fólico: impactos celulares

Os folatos, direta ou indiretamente, estão envolvidos em funções celulares muito importantes, como a remetilação da Hcy, a transferência de grupamentos metil via formação de AdoMet e a síntese e reparo do DNA. Dentre estas funções, a transferência de grupamentos metil via formação de AdoMet é necessária a uma diversidade de processos biológicos, entre eles a metilação do DNA, essencial à expressão gênica (BLOM, 2009).

Considerando estas reações, nota-se que baixos níveis de folatos podem ter como consequência alterações na síntese de DNA, uma vez

que estes atuam como cofatores em reações importantes para a biossíntese das bases nitrogenadas que constituem a molécula – purinas e pirimidinas (LUCOCK, 2000). As alterações vão desde a redução na síntese, à incorporação de uracila à fita de DNA, esta é por si só mutagênica, bem como pode levar à quebra da molécula durante a tentativa de reparo por excisão de nucleotídeo, tendo como consequência a instabilidade do DNA (BLOUNT et al., 1997; DUTHIE et al., 2002).

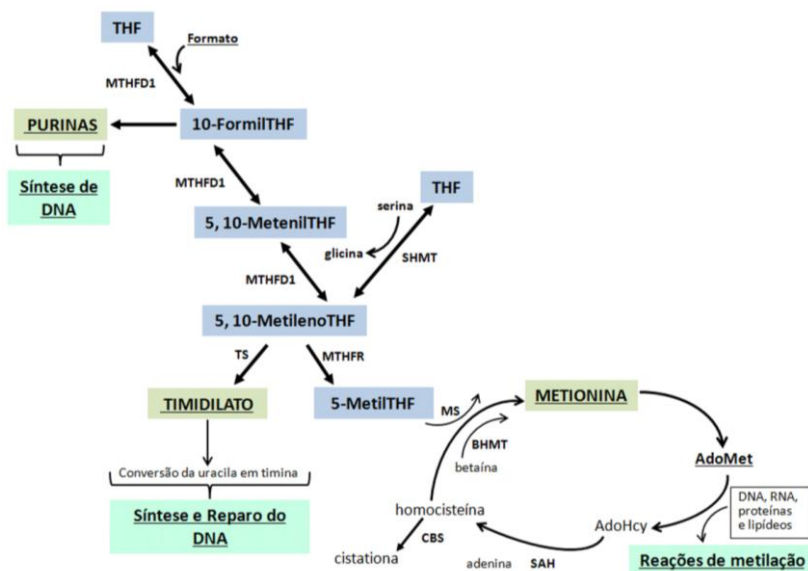


Figura 9. Metabolismo intracelular dos folatos: transferência de unidades de carbono. O grupamento hidroximetil do aminoácido serina é a maior fonte de unidades de carbono que são geradas dentro da mitocôndria ou no citoplasma das células pela ação da enzima SHMT. A enzima MS utiliza a vitamina B₁₂, e as enzimas CBS e SHMT utilizam a vitamina B₆ como cofatores. *AdoMet*, S-adenosilmetionina; *AdoHcy*, S-adenosilhomocisteína; *BHMT*, enzima betaína homocisteína-metiltransferase; *CBS*, enzima cistationa β-sintetase; *MS*, enzima metionina sintetase; *MTHFD1*, enzima metilenotetrahydrofolato desidrogenase; *MTHFR*, enzima metilenoTHF redutase; *SAH*, S-adenosilhomocisteína hidrolase; *SHMT*, serina hidroximetiltransferase; *THF*, tetrahydrofolato; *TS*, enzima timidilato sintetase. *Fonte:* modificado de Beaudin e Stover (2007).

Por todas estas funções, o AF é essencial ao funcionamento celular e, especialmente durante o desenvolvimento, o AF é importante para garantir a viabilidade das células em proliferação, de forma que a redução na síntese de DNA e de AdoMet em decorrência da sua deficiência, podem alterar a progressão do ciclo celular, modificando mecanismos celulares essenciais ao desenvolvimento embrionário, como a proliferação e a diferenciação celulares (BEAUDIN; STOVER, 2007; FENECH, 2012).

Além dos folatos serem importantes para a manutenção de processos celulares vitais, a sua deficiência tem como consequência direta o aumento dos níveis plasmáticos de Hcy, que pode levar ao acúmulo intracelular deste aminoácido a ponto deste se tornar citotóxico de diversas maneiras, o que não possui relação com as vias metabólicas de remetilação e transmetilação, nas quais os folatos e a Hcy participam (JAMES et al., 2002; BRAUER; TIERNEY, 2004; VAN MIL; OOSTERBAAN; STEEGERS-THEUNISSEN, 2010). Um destes mecanismos de citotoxicidade envolve a conversão da Hcy intracelular a Hcy-tiolactona pela ação da enzima metionil-RNAt sintetase. A Hcy-tiolactona constitui um metabólito reativo, e pode provocar mudanças na expressão e funcionalidade de proteínas devido à homocisteinilação de resíduos do aminoácido lisina, alterando as propriedades físico-químicas das proteínas, modificando a sua atividade biológica e podendo até inativá-las (JAKUBOWSKI, 1997; 2000). Neste contexto, fica evidente que altos níveis de Hcy podem modificar o padrão de expressão não só de genes, mas também de proteínas durante o desenvolvimento embrionário.

O excesso de Hcy pode ter como efeito também a ocorrência de estresse oxidativo (PERLA-KAJAN; TWARDOWSKI; JAKUBOWSKI, 2007; MALINOWSKA; KOLODZIEJCZYK; OLAS, 2012). O estresse oxidativo é resultado do desequilíbrio entre a quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de enzimas antioxidantes responsáveis pela sua eliminação, como a catalase, a superóxido desmutase e a glutationa peroxidase (SCHULZ et al., 2000). As ERO são produtos do metabolismo celular, sendo geradas principalmente pelas mitocôndrias, e incluem radicais como os ânions superóxido (O_2^-) e hidroxila (OH^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (DEAN et al., 1997; SCHULZ et al., 2000). Estes compostos precisam ser eliminados das células de forma rápida, porque seu excesso é altamente prejudicial ao funcionamento e sobrevivência celulares, causando danos irreversíveis a todas as biomoléculas, atingindo desde proteínas e lípideos até a molécula de DNA, e podem levar à morte

celular programada (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984; DALLE-DONNE et al., 2003).

A capacidade da Hcy de induzir estresse oxidativo é um fenômeno bem descrito em células endoteliais e também no tecido nervoso adulto (STARKEBAUM; HARLAN, 1986; UPCHURCH et al., 1997; TYAGI et al., 2005; TANG et al., 2011; WANG et al., 2012). Isso porque a hiperhomocisteinemia está relacionada ao aumento do risco de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (ANDERSON et al., 2000; SESHADRI et al., 2002; ZHUO; WANG; PRATICO, 2011; FOWDAR et al., 2012). O mecanismo pelo qual o excesso de Hcy levaria ao aumento das ERO seria devido à presença do grupo tiol, que pode ser rapidamente oxidado na corrente sanguínea, formando Hcy e o radical H_2O_2 (SHARMA et al., 2006). Um segundo mecanismo seria através do comprometimento da transcrição, tradução e atividade de enzimas antioxidantes como a glutatona peroxidase e a superóxido desmutase (HANDY; ZHANG; LOSCALZO, 2005; LUBOS; LOSCALZO; HANDY, 2007).

Os embriões são altamente sensíveis ao estresse oxidativo porque no estágio embrionário os organismos geralmente possuem uma capacidade antioxidante reduzida (UFER; WANG, 2011). Além disso, a embriogênese compreende uma série de eventos simultâneos que envolvem processos celulares básicos, que incluem proliferação, diferenciação e apoptose. A regulação precisa destes eventos celulares corresponde à base para o estabelecimento das estruturas embrionárias e para a posterior organogênese. Sendo assim, os efeitos deletérios das ERO podem induzir não só anormalidades no desenvolvimento, mas provocar também a morte dos embriões (THOMPSON; AL-HASAN, 2012).

Dentro dos parâmetros bioquímicos mais utilizados para avaliar a indução de estresse oxidativo estão: a carbonilação de proteínas, utilizada como marcador de oxidação de proteínas (DALLE-DONNE et al., 2006); e a determinação dos níveis totais de tióis não-proteicos (NPSH), estes últimos são constituídos principalmente por glutatona (cerca de 90%) (COOPER; KRISTAL, 1997). A glutatona é um tripeptídeo que atua como um importante antioxidante intracelular e possui múltiplas funções, entre elas: serve como substrato para as enzimas antioxidantes, atua diretamente na quebra dos radicais OH^{\cdot} e O_2^{\cdot} e também está envolvida na reciclagem de antioxidantes com a vitamina E (KIDD, 1997; SCHULZ et al., 2000). A carbonilação de proteínas é o tipo mais frequente de modificação que ocorre nas proteínas em resposta ao estresse oxidativo, estas modificações são

irreversíveis, induzindo a degradação das proteínas (WONG et al., 2008).

Além das ERO causarem danos a todas as biomoléculas celulares, a mitocôndria é o principal alvo destes radicais porque o DNA desta organela é desprovido de histonas e possui poucos mecanismos de reparo quando comparado ao DNA nuclear (AON et al., 2006). As proteínas da família Bcl 2 estão presentes na mitocôndria e atuam na sobrevivência celular por impedir a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citoplasma das células (KLUCK et al., 1997). Por isso, o aumento da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl 2 nas células pode ocorrer em resposta ao estresse oxidativo e o efeito protetor da Bcl 2 pode inibir a morte celular por apoptose nestas situações (KAUFMANN; BICKFORD; TAGLIALATELA, 2001; LEE et al., 2001; SUSNOW et al., 2009).

As células frequentemente respondem de forma rápida ao estresse sintetizando um grupo de proteínas denominadas coletivamente de proteínas de choque térmico (HSPs, do inglês, *heat shock proteins*) (SAGARA et al., 1998). Estas proteínas são altamente conservadas entre as espécies e foram encontradas em todas as células do organismo (WHITLEY; GOLDBERG; JORDAN, 1999). Grande parte das proteínas desta família, que também atuam como chaperonas, são proteínas constitutivas que participam da homeostase celular, sendo responsáveis pelo enovelamento e transporte de proteínas dentro das células (WANG et al., 2004). Um tipo de HSP induzível – a proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP 70) – é expressa como resultado do estresse oxidativo e é capaz de prevenir os danos celulares causados por essa condição, possuindo um efeito citoprotetor (HUNTER-LAVIN et al., 2004; GUO et al., 2007).

1.6 JUSTIFICATIVA DA PESQUISA

Diante deste panorama, o presente trabalho de tese justifica-se, considerando que, embora seja conhecido o efeito protetor do AF sobre os DTN, os mecanismos celulares responsáveis por esse efeito ainda não foram estabelecidos. O uso da Hcy no tratamento dos embriões possibilitou simular a situação de deficiência de AF neste modelo experimental, por gerar a condição de hiperhomocisteinemia decorrente da falta de folatos no organismo. O estudo propôs a investigação dos possíveis mecanismos celulares envolvidos na morfogênese do TN, incluindo a participação dos tecidos neural e mesenquimal, e

caracterizou o efeito da dose elevada de Hcy sobre esses mecanismos, utilizando o *G. domesticus* como modelo experimental.

Considerando a importância dos DTN na medula espinhal como um problema de saúde pública, uma vez que as crianças afetadas possuem sérios comprometimentos físicos, além de apresentarem, não raro, anomalias associadas como a hidrocefalia, que pode levar a graves deficiências cognitivas; e também a falta de conhecimento acerca dos mecanismos biológicos envolvidos na gênese destas anomalias congênitas, bem como sobre o efeito nocivo da Hcy e o papel protetor do AF neste processo, justifica-se a proposta científica desta tese. Neste contexto, este estudo visa contribuir para o melhor entendimento dos efeitos do AF na prevenção dos DTN, bem como para a maior compreensão dos mecanismos celulares envolvidos na gênese desses defeitos na medula espinhal.

Resultados obtidos no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal – BEG/CCB/UFSC – evidenciaram alterações na organização celular do telencéfalo e da medula espinhal de embriões de ave tratados com Hcy e redução na proliferação celular e na expressão da molécula de adesão celular neural (NCAM, do inglês, *neural cell adhesion molecule*) na medula espinhal e mesênquima de embriões tratados com Hcy, efeitos que foram prevenidos pela administração de AF (KOBUS, 2007; KOBUS; NAZARI; MÜLLER, 2009; MÜLLER; KOBUS; NAZARI, 2013). No presente trabalho de tese, investigou-se se alterações nos mecanismos de proliferação e diferenciação celulares de tecidos neurais e mesenquimais estão envolvidas na gênese dos DTN. Adicionalmente, foi testada a hipótese de que a Hcy induz estresse celular e oxidativo nos tecidos neural e mesenquimal e de que estes também podem estar envolvidos na gênese dos DTN.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito de dose elevada de Hcy, típico da hiperhomocisteinemia, sobre os mecanismos celulares envolvidos na morfogênese da medula espinhal e do esqueleto axial, que estão relacionados à gênese dos DTN.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

– Caracterizar o efeito da Hcy sobre a sobrevivência e o padrão morfológico externo, e sobre a morfogênese da medula espinhal e do esqueleto axial dos embriões;

– Avaliar se a Hcy induz a ocorrência de estresse celular através da análise da expressão das proteínas HSP 70 e Bcl 2 na medula espinhal e mesênquima axial;

– Investigar se a Hcy induz a carbonilação de proteínas e a redução da glutationa na medula espinhal e mesênquima axial;

– Reconhecer o efeito da Hcy sobre a proliferação celular durante a morfogênese da medula espinhal e do esqueleto axial através da análise da expressão de proteínas do ciclo celular;

– Reconhecer o efeito da Hcy sobre a expressão gênica e proteica de Pax 1/9 e Sox 9 durante a diferenciação do esqueleto axial;

– Reconhecer o efeito da Hcy sobre a diferenciação neuronal na medula espinhal;

– Verificar se a administração de AF previne os efeitos celulares da dose elevada de Hcy durante o desenvolvimento da medula espinhal e do esqueleto axial de embriões de *G. domesticus*.

3 METODOLOGIA

3.1 MODELO BIOLÓGICO EXPERIMENTAL

Ovos fertilizados da espécie *G. domesticus* foram doados pela Empresa Tyson do Brasil Alimentos Ltda – São José/SC, transportados ao Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal/BEG/CCB em bandejas apropriadas, confeccionadas com papel reciclável, que possuem acomodações individuais, o que dificulta a movimentação dos ovos durante o trajeto. A amostra consistiu de ovos homogêneos, de coloração bege e peso médio de 65g. Todos os procedimentos realizados com os embriões neste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFSC – sob o nº 23080.025620/2009-51/UFSC.

3.2 CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO DOS EMBRIÕES

Os ovos fertilizados foram estocados a um intervalo de temperatura entre 15 e 20°C, por um período médio de 96 h (Magaldi, 1974). Em laboratório, os ovos foram limpos, numerados e tiveram a massa aferida em balança de precisão (0,01g). Após estes procedimentos, os ovos foram incubados em posição vertical (90°), em incubadora apropriada, a temperatura (38°C) e umidade relativa (65%) constantes (DIAS; MÜLLER, 1998).

Iniciada a incubação, foi estabelecido um período de cerca de 2 h para que os embriões retomassem o desenvolvimento, sendo então determinadas as características do desenvolvimento embrionário de acordo com o descrito por Hamburger e Hamilton (1951) para a espécie *G. domesticus*. A idade dos embriões foi descrita em dias embrionários, correspondendo um dia embrionário (E) a 24 h de desenvolvimento.

3.3 PRÉ-TRATAMENTO E TRATAMENTO DOS EMBRIÕES

Após 26 h de incubação (E1) os ovos foram retirados da incubadora para realização do pré-tratamento dos embriões. Utilizando um estilete de extremidade rombóide, a câmara de ar do ovo foi percutida e efetuou-se um orifício (1 cm de diâmetro) para possibilitar a administração das substâncias e o acompanhamento do desenvolvimento do embrião. As substâncias foram administradas via câmara de ar,

utilizando uma micropipeta para aplicação das substâncias sobre a membrana interna da casca (Fig. 10a). Concluída a manipulação, a abertura na casca foi fechada com filme PVC transparente atóxico e o ovo recolocado na estufa. O desenvolvimento dos embriões foi acompanhado diariamente através da abertura.

Os embriões foram submetidos a um pré-tratamento com 26 h de incubação (E1) e a um tratamento com 48 h de incubação (E2). Os embriões foram manipulados nestas idades porque durante o intervalo de tempo entre o pré-tratamento e o tratamento, o processo de neurulação ainda não se completou. Na figura 10b, está representado um embrião de ave com aproximadamente 24 h de desenvolvimento (E1), correspondente à idade de pré-tratamento; e na figura 10c está representado um embrião de ave com aproximadamente 46 h de desenvolvimento (E2), correspondente à idade do tratamento.

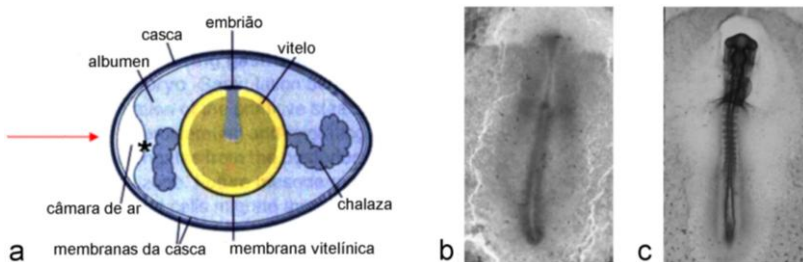


Figura 10. (a) Esquema didático de ovo de *G. domesticus* no momento da postura. A seta (→) indica o local onde será efetuada a abertura para realização do pré-tratamento e tratamento, e o asterisco (*) indica o local da administração das substâncias. (b) Vista dorsal de embrião de galinha com 23 – 25 h de desenvolvimento (E1). (c) Vista dorsal de embrião de galinha com 42 – 46 h de desenvolvimento (E2). Fontes: Wolpert e Tickle (2010) e http://www.swarthmore.edu/NatSci/sgilber1/DB_lab/Chick/chick_stage.html.

Para contemplar os objetivos propostos, foram constituídos 4 grupos experimentais:

- Grupo AF – pré-tratado com 50 µl de solução salina e tratado com 0,5 µg AF diluído em 50 µl de solução salina;
- Grupo Hcy – pré-tratado com 50 µl de solução salina e tratado com 20 µmol de D,L-Hcy diluída em 50 µl de solução salina;

- Grupo AF+Hcy – pré-tratado com 0,5 µg AF diluído em 50 µl de solução salina e tratado com 20 µmol de D,L-Hcy diluída em 50 µl de solução salina;
- Grupo controle – os embriões foram pré-tratados e tratados com 50 µl de solução salina.

Foram realizadas 21 incubações no período compreendido entre março de 2009 a outubro de 2012, totalizando 487 embriões: $n = 74$ para o grupo controle, $n = 77$ para o grupo AF, $n = 223$ para o grupo Hcy e $n = 113$ para o grupo AF + Hcy. O n corresponde ao total de embriões incubados para realizar todos os procedimentos metodológicos. Deste total, cada grupo experimental foi subdividido em dois lotes, de forma que parte dos embriões foi mantida em incubação até 52 h após o tratamento (E4) e parte permaneceu na estufa por 98 h após o tratamento (E6). Nestas idades, os embriões foram crioadestesiados (4°C por 15 min), removidos do ovo e das membranas extra-embriônicas, lavados em solução salina e analisados ao estereomicroscópio (Olympus SHZ 10; zoom de 7 – 70 X), para verificar o estágio de desenvolvimento e a presença de alterações na morfologia externa.

As doses de AF e Hcy utilizadas foram estabelecidas com base em estudos anteriores (ROSENQUIST; RATASHAK; SELHUB, 1996; EPELDEGUI et al., 2002; KOBUS; NAZARI; MÜLLER, 2009) e após a realização de experimentos piloto no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal – BEG / CCB / UFSC. Nestes experimentos, os embriões tratados com a dose de 40 µmol de D,L-Hcy não sobreviveram até a primeira idade de análise – E4.

3.4 ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA DOS EMBRIÕES

Após serem realizados o pré-tratamento e o tratamento, o número de embriões vivos foi diariamente registrado durante todo o período de incubação (E6). Os embriões eram considerados vivos quando era possível visualizar os batimentos cardíacos ao estereomicroscópio. Para construção das curvas de sobrevivência, foram utilizados dados obtidos a partir de 5 incubações: controle ($n = 23$), AF ($n = 26$), Hcy ($n = 69$) e AF + Hcy ($n = 35$). O valor de n corresponde ao número total de embriões incubados para cada tratamento.

3.5 MICROSCOPIA DE LUZ E DE FLUORESCÊNCIA

Os embriões, em E4 e E6 ($n = 4$ para cada idade, realizadas em triplicatas), foram fixados em formaldeído 10% por cerca de 20h e conservados em solução de álcool 70% à temperatura ambiente até a posterior dissecação da região do tronco (KOBUS; NAZARI; MÜLLER, 2009). O tronco dos embriões foi desidratado em série alcoólica crescente 70° - 100° GL e diafanizado em xilol, incluído em parafina e seccionado (6 μm , para análise por microscopia de luz e fluorescência e 12 μm , para análise por microscopia confocal). Os cortes foram desparafinizados em xilol e hidratados em série alcoólica decrescente 100° - 70° GL para posterior realização das colorações com azul de toluidina (1), azul de alcian (2) e marcações por imuno-histoquímica (3):

1) Coloração com azul de toluidina: utilizada como controle histológico e para análise da morfologia da medula espinhal e do mesênquima axial. Após desparafinização e hidratação, os cortes foram lavados em água destilada e incubados em solução de azul de toluidina 5% (60°C por 10 minutos). Após, os cortes foram lavados em água destilada, seguida de lavagem em água corrente, desidratação em série alcoólica crescente 100° - 70° GL e diafanização em xilol, antes da montagem das lâminas com Entellan[®] (Merck, Millipore);

2) Coloração com azul de alcian: utilizada para verificar a distribuição das células do esclerótomo, e posteriormente, a presença de centros de condrificação nos elementos vertebrais. Os procedimentos são iguais aos descritos para a coloração de azul de toluidina, excetuando-se a incubação dos cortes em solução de azul de alcian por 30 minutos a temperatura ambiente;

3) Marcações por imuno-histoquímica: utilizadas para identificar proteínas específicas relacionadas aos mecanismos celulares investigados:

– Para avaliar a indução de estresse celular na medula espinhal e no mesênquima axial foi verificada a expressão da proteína HSP 70 induzível (anticorpo desenvolvido em camundongo anti-HSP 70 IgG[®], Abcam) e da proteína Bcl 2 (anticorpo desenvolvido em camundongo anti-Bcl 2 IgG[®], Chemicon);

– Para avaliar a proliferação na medula espinhal e no mesênquima axial, foi utilizado o anticorpo desenvolvido em coelho

anti-fosfo-histona H3 IgG[®] (Upstate) que liga-se à proteína histona H3 fosforilada. A fosforilação da histona H3 inicia na fase G2 do ciclo celular, ou seja, ocorre quando a cromatina condensa, mas precisamente na fase G2 e no momento da entrada da célula na fase M do ciclo celular. A desfosforilação da proteína inicia na anáfase, e só termina quando ocorre a descondensação dos cromossomos, ao final da mitose; por esse motivo, o anticorpo é considerado um marcador específico de mitose (HENDZEL et al., 1997);

– Para avaliar possíveis alterações no ciclo celular em decorrência de danos ao DNA, foi utilizado o anticorpo desenvolvido em coelho anti-PCNA IgG[®] (Santa Cruz Biotechnology). O PCNA – antígeno nuclear de proliferação celular (do inglês, *proliferating cell nuclear antigen*) – é uma proteína de *checkpoint* requerida tanto para a replicação quanto para o reparo da molécula de DNA, por isso, modificações na expressão desta proteína podem indicar a presença de danos na molécula (KELMAN, 1997; MAGA; HUBSCHER, 2003);

– Para verificar alterações na diferenciação do mesênquima axial foi verificada a expressão de proteínas envolvidas no desenvolvimento deste tecido (Pax 1/9 e Sox 9) utilizando o anticorpo desenvolvido em cabra anti-Pax 1 IgG[®] (Santa Cruz Biotechnology), o anticorpo desenvolvido em coelho anti-Pax 9 IgG[®] (Sigma) e o anticorpo desenvolvido em camundongo anti-Sox 9 IgG_{2a}[®] (Santa Cruz Biotechnology);

– Para avaliar a diferenciação neuronal na medula espinhal, foram verificadas a expressão das proteínas p 53 (anticorpo desenvolvido em coelho anti-p 53 IgG[®], Santa Cruz Biotechnology) e β -tubulina III (anticorpo desenvolvido em camundongo anti- β -tubulina III IgG[®], Promega). A proteína tubulina, em suas diferentes isoformas, é a proteína constituinte dos microtúbulos citoplasmáticos, sendo a isoforma β -tubulina III específica de neurônios. Por isso, a proteína é considerada um marcador de células neuronais (LEE; REBHUN; FRANKFURTER, 1990; ROSKAMS; CAI; RONNETT, 1998).

Para realização das marcações imuno-histoquímicas, os cortes foram lavados em tampão fosfato (PBS 0,1M, pH 7,4) e a atividade das peroxidases endógenas foi bloqueada utilizando H₂O₂ (0,3%) em metanol (1:1). Após, os cortes foram lavados em PBS + Triton X-100 (0,3%) e incubados com soro fetal bovino a 5% para posterior incubação a 4°C por cerca de 12 h com os seguintes anticorpos primários: anti-

fosfo-histona H3, anti-PCNA, anti-Pax 9 e anti-p 53, desenvolvidos em coelho; anti-Sox9, anti- β -tubulina III, anti-HSP 70 e anti-Bcl 2, desenvolvidos em camundongo. Após, os cortes foram lavados em PBS e incubados a 25°C por 90 min com os seguintes anticorpos secundários: anti-cabra IgG[®] (Abcam), anti-coelho IgG[®] (Sigma), anti-camundongo IgG[®] (Sigma), anti-camundongo IgG_{2a}[®] (Abcam), todos eles conjugados à peroxidase. Para revelação, e posterior análise em microscopia de luz, os cortes foram lavados em PBS e tratados com solução contendo 3,3-diaminobenzidina (DAB) e H₂O₂ (1mg de DAB e 5 ul de H₂O₂ para cada ml de solução). Para as análises em microscópio de fluorescência (Olympus – Modelo Bx41) e confocal (Confocal Scanner TCSSP5, Leica), foram utilizados os seguintes anticorpos secundários: anti-cabra IgG Alexa Fluor 488[®] (Molecular Probes), anti-coelho IgG Alexa Fluor 488[®] (Sigma), anti-coelho IgG Alexa Fluor 633[®] (Molecular Probes), e anti-camundongo IgG_{2a} Alexa Fluor 633[®] (Molecular Probes). Para as análises de fluorescência, os cortes foram lavados e incubados com 4,6-diamidina-2-fenilindol[®] (DAPI, Sigma) por 3 minutos a temperatura ambiente. Os controles negativos foram tratados da mesma maneira descrita acima, exceto pela incubação com os anticorpos primários, que foram substituídos por PBS. Os procedimentos de montagem de lâminas aplicados às técnicas imuno-histoquímicas para análise em microscopia de luz foram os mesmos aplicados para as colorações. Para as lâminas analisadas em fluorescência, utilizou-se um meio de montagem aquoso – Gelmount[®] (Sigma).

3.6 ANÁLISE QUANTITATIVA DAS MARCAÇÕES CELULARES

Para quantificar as células marcadas através da técnica de microscopia de luz foi realizada análise estereológica dos cortes utilizando a grátula de Weibel Nº 2 (Tonbridge, England) (1000X). A grátula é formada por um sistema que contém 21 linhas (d) e 42 pontos numa área de teste equivalente a 36,36 d^2 (WEIBEL; KISTLER; SCHERLE, 1966). A densidade numérica de células marcadas por área (NA) foi determinada em uma área de 14.544 μm^2 . As células foram contadas em 4 campos alternados na medula espinhal (3 cortes por embrião, 6 embriões por grupo, 72 campos por grupo) e 5 campos alternados no mesênquima axial (3 cortes por embrião, 6 embriões por grupo, 90 campos por grupo) (KOBUS; NAZARI; MÜLLER, 2009).

Para quantificar a densidade integrada de pixels por área nas imagens de fluorescência, foi realizada a análise destas imagens

utilizando o software Image J (NIH Image). Primeiramente as imagens foram convertidas em escala de cinza (formato 8-bit) e se definiu a variação de intensidade do fluorocromo (0 a 255). Após, determinou-se a escala da imagem e a densidade integrada de pixels foi calculada em uma área de $3.826,71 \mu\text{m}^2$. Foi analisada a área total de cada imagem de fluorescência, a qual foi dividida em 4 campos (2 cortes por embrião, 6 embriões por grupo, 48 campos por grupo) (INMAN et al., 2005; COOPER; ALBERTSON, 2008). A região da medula espinhal escolhida para análise foi a camada do manto localizada na região ventral, onde ocorre a diferenciação de neurônios motores.

3.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Para verificar se o tratamento com Hcy induz estresse oxidativo e/ou altera as defesas antioxidantes na medula espinhal e mesênquima axial, foram realizadas as seguintes análises bioquímicas: determinação dos níveis de carbonilação de proteínas e dos níveis de tióis não-proteicos (NPSH). O tronco dos embriões foi homogeneizado a 4°C em tampão carbonil e PBS 20mM, respectivamente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 1.000 g por 10 minutos (4°C) e o sobrenadante obtido foi utilizado para as análises. Foram utilizados os embriões em E4 ($n = 3$ para cada grupo, realizadas em triplicatas).

3.7.1 Determinação dos níveis de carbonilação de proteínas

A quantidade de grupos carbonil foi mensurada através da marcação dos complexos proteína-hidrazona recém-formados, derivados da reação com 2,4- dinitrofenilidrazina (DNPH). Estes derivados foram extraídos utilizando ácido tricloroacético a 10%, seguido do tratamento com solução de etanol/etilacetato (1:1) e posterior re-extração com ácido tricloroacético a 10%. O precipitado resultante foi dissolvido em cloridrato de uréia 6 M. A diferença de espectro entre a amostra de proteína branca para DNHP foi utilizada para calcular a quantidade em nmol de DNPH incorporado por mg de proteína. A incorporação foi mensurada pela absorvância da amostra lida a 370 nm com espectrofotômetro (SILVEIRA et al., 2011). Os resultados foram expressos em nmol de DNPH incorporado por mg de proteína.

3.7.2 Determinação dos níveis de tióis não-proteicos (NPSH)

Os níveis de tióis não-proteicos (NPSH), os quais são constituídos principalmente por glutathiona (cerca de 90%) (COOPER; KRISTAL, 1997), foram determinados a partir da fração obtida após tratamento do sobrenadante com ácido tricloroacético a 10%, conforme descrito por Ellman (1959). Após centrifugação, uma alíquota do sobrenadante foi diluída em tampão fosfato (800 mM, pH 7,4), e foi adicionado 500 µm de 5,5'- ditio-bis ácido 2-nitrobenzóico (DTNB). A formação da cor é resultado da reação entre o DTNB e os tióis, a qual ocorre em cerca de 5 minutos e é estável por mais de 30 minutos. A absorbância foi lida após 10 minutos a 412 nm com espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em nmol de NPSH por mg de proteína.

3.8 EXTRAÇÃO DE RNA E RT-PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

O desenvolvimento dos embriões foi interrompido em E4 ($n = 3$ para cada grupo, realizado em triplicatas) e procedeu-se à extração do RNA total dos embriões, *in vivo*, utilizando o reagente BRAzol[®] (Labtrade). Após a extração do RNA, o cDNA foi sintetizado utilizando o sistema *GoTaq[®] 2-Step RT-qPCR* (Promega). Para realização da PCR quantitativa em tempo real (qPCR), foi utilizado o *SYBR Green PCR master mixture[®]* (Promega). A RT-qPCR foi realizada no equipamento *HT 7900 Fast Real-Time PCR System[®]* (Applied Biosystems). As sequências de iniciadores (*primers*) utilizadas para amplificação dos genes Pax 1, Pax 9, β-actina e GAPDH foram descritas anteriormente por Sanzo e Tuan (1998) (Tabela 1). Os genes β-actina e GAPDH foram utilizados como controle da reação. Os resultados foram expressos em nível de expressão relativa ao gene controle. O $\Delta\Delta C_t$ foi calculado para cada amostra e a expressão relativa do gene foi determinada utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para estimar e comparar a probabilidade de sobrevivência dos embriões controle e tratados foi aplicado o método de Kaplan-Meier. O teste de Log-rank foi aplicado para verificar a existência de diferenças significativas entre os grupos ($p \leq 0,05$) (RICH et al., 2010).

Tabela 1. Sequências dos iniciadores (*primers*) dos genes alvo e controle utilizados para realização da RT-qPCR a temperatura de anelamento de 58°C.

Gene	Nº GenBank	Sequência dos Primers (5' – 3')^a	Produto da PCR (pb)^b
Pax 1	U22046	GACACGTTACCTCCATCGGATC TGGCTTATTTGTCCATTTACACTCC	206
Pax 9	X82443	CCCGTGGAAACTTGTATAAACTCC TCAATAGCAGTGGATCGCATAACC	233
β-actin	X00182	CACGGTATTGTCACCAACTGGG AGATGGGCACAGTGTGGGTAAC	279
GAPDH	JJ00849	AGTCATCCCTGAGCTGAATG AGGATCAAGTCCACAACACG	330

^a A primeira linha corresponde à sequência senso e a segunda linha corresponde à sequência anti-senso. Todas as sequências são encontradas no GenBank e foram utilizadas anteriormente por Sanzo e Tuan (1998).

^b Tamanho do produto da PCR em pares de base (pb).

A frequência de DTN na medula espinhal corresponde a uma variável categórica e não apresentou uma distribuição normal. Por isso estes dados foram expressos em porcentagem e avaliados pela análise de variância (ANOVA) não-paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn (SOKAL; ROHLF, 1994).

Os dados quantitativos obtidos a partir das análises das lâminas histológicas, das imagens de fluorescência (Image J), das análises por RT-qPCR e bioquímicas apresentaram distribuição normal e foram apresentados como média (\pm erro padrão). Diferenças significativas entre os grupos foram avaliadas através da ANOVA de duas-vias, seguida do teste de Duncan ou Tukey HSD para n desigual ($p \leq 0,05$). Para determinar o efeito independente do AF e da Hcy, bem como testar a interação entre essas variáveis, foi aplicada ANOVA de duas-vias (SIDIA, 2003).

Para realização das análises estatísticas acima descritas, foram utilizados os programas GraphPad Prisma[®] versão 4.0 e Statistica[®] versão 6.0 para Windows.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DA HCY SOBRE A SOBREVIVÊNCIA E MORFOLOGIA EXTERNA DOS EMBRIÕES

Os embriões dos grupos controle e AF exibiram taxas mais altas de sobrevivência em comparação com os grupos Hcy e AF + Hcy. As curvas de sobrevivência obtidas através do método de Kaplan-Meier revelaram que, 24 h após o tratamento dos embriões, em E3, cerca de 36% dos embriões do grupo Hcy sobreviveram *versus* 76% do grupo controle, 69% do grupo AF e 63% do grupo AF + Hcy (Fig. 11). Ao final do experimento, em E6, a sobrevivência dos embriões do grupo Hcy caiu para aproximadamente 25%. O teste de Log-rank revelou que o tratamento com Hcy afetou significativamente a taxa de sobrevivência dos embriões durante todo o período de incubação ($\chi^2 = 11,16$; $df = 3$; $p = 0,0109$).

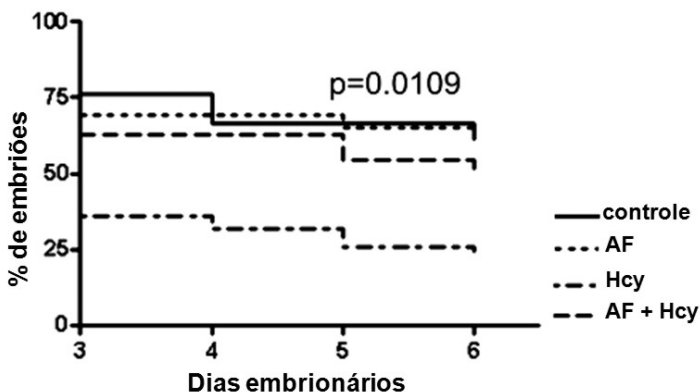


Figura 11. Curvas de sobrevivência obtidas pelo método de Kaplan-Meier evidenciam a redução significativa na taxa de sobrevivência (%) dos embriões do grupo Hcy. $P < 0.05$ após o teste de Log-rank.

Os embriões dos grupos controle e AF não exibiram alterações na morfologia externa em ambas as idades de análise. Já os embriões dos grupos Hcy e AF + Hcy apresentaram alterações na morfologia externa que foram classificadas em categorias, conforme listado na Tabela 2, a saber: DTN, assimetria das vesículas ópticas, falha no desenvolvimento das estruturas faciais, falha no desenvolvimento dos

brotos dos membros posteriores, presença de bolhas na superfície do epitélio e falha no fechamento da parede anterior do corpo.

Tabela 2. Alterações morfológicas externas observadas nos embriões dos grupos Hcy e AF + Hcy.

Alterações morfológicas	Idade embrionária			
	E4		E6	
	Frequência (%)			
	Hcy	AF + Hcy	Hcy	AF + Hcy
Defeitos do tubo neural (DTN)	44*	27,3	50*	23,1
Assimetria de vesículas ópticas	8,0	14,0	11,0	----
Falha no desenvolvimento de estruturas faciais	4,0	----	11,0	----
Falha no desenvolvimento dos brotos dos membros posteriores	4,0	9,1	11,0	----
Presença de bolhas na superfície do epitélio	8,0	----	5,6	----
Falha no fechamento da parede anterior do corpo	----	4,5	22,0	----
Total	68	54,9	60,6	23,1
	(n = 25)	(n = 22)	(n = 18)	(n = 13)

Hcy = grupo homocisteína; AF + Hcy = grupo ácido fólico + homocisteína. *n* = número de embriões analisados.

* indica diferenças significativas quando comparados ao grupo controle pelo teste de Dunn ($p < 0.05$).

Alguns embriões exibiram uma ou mais categorias de alterações morfológicas. Nestes casos, a assimetria de vesículas ópticas era acompanhada de falha no desenvolvimento de estruturas faciais, e os

DTN eram acompanhados de falhas no desenvolvimento dos brotos dos membros ou da presença de bolhas na superfície do epitélio (Figs. 12 – 13). O pré-tratamento com AF nem sempre preveniu estes eventos, uma vez que os embriões do grupo AF + Hcy muitas vezes exibiram as mesmas categorias de erros no desenvolvimento. Entretanto, é provável que estas alterações tenham sido induzidas pelo tratamento com Hcy, já que os embriões do grupo AF não apresentaram alterações na morfologia externa.

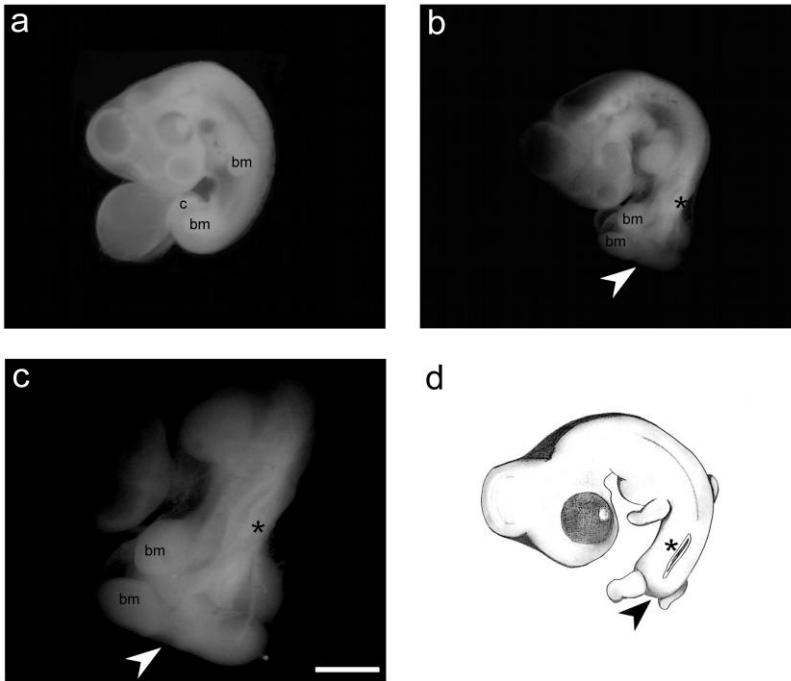


Figura 12. DTN induzidos pelo tratamento com Hcy nos embriões em E4. (a) Embrião do grupo controle exibindo morfologia externa normal. (b) Embrião tratado com Hcy apresenta espinha bífida (asterisco) e regressão caudal acompanhada da posição alterada dos brotos dos membros (cabeça de seta branca). Em (c), imagem em maior aumento do embrião visualizado em (b). (d) Esquema representativo de embrião com espinha bífida (asterisco) e regressão caudal (cabeças de seta preta). *bm*, broto do membro; *c*, cauda. Escalas em **a** = 3 mm; em **b** = 2,5 mm; em **c** = 1,5 mm.

Nas duas idades de análise, os DTN corresponderam à categoria de alteração morfológica externa mais frequente (Tabela 2). Após realizar a análise morfológica externa e microscópica dos embriões, os DTN foram classificados em 3 categorias: espinha bífida, espinha bífida oculta e regressão caudal (Tabela 3; Figs. 12 – 15).

Nos embriões em E4, a espinha bífida (20%) e a espinha bífida oculta (16%) foram os DTN mais frequentes no grupo Hcy, seguidas pela regressão caudal (8%). Em E6, a alteração morfológica registrada com maior frequência nos embriões foi a regressão caudal (38,9%) seguida pela falha no fechamento da parede anterior do corpo (22 %) (Tabelas 2 e 3).

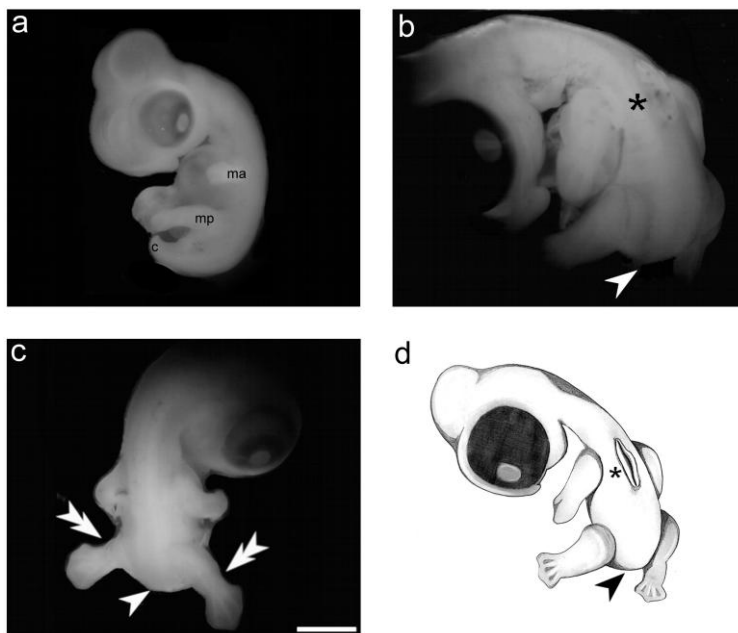


Figura 13. DTN induzidos pelo tratamento com Hcy nos embriões em E6. (a) Embrião controle exibindo morfologia normal. (b) Embrião tratado com Hcy com espinha bífida (asterisco) e regressão caudal (cabeça de seta branca). (c) Embrião tratado com Hcy exibindo regressão caudal (cabeça de seta branca) acompanhada da posição alterada dos brotos dos membros posteriores (cabeças de seta duplas brancas). (d) Esquema representativo de embrião com espinha bífida (asterisco) e regressão caudal (cabeças de seta preta). *c*, cauda; *ma*, membro anterior; *mp*, membro posterior. Escalas em **a** = 3,5 mm; em **b** = 1 mm; em **c** = 3 mm.

O pré-tratamento com AF nem sempre preveniu a ocorrência de DTN, porque os embriões do grupo AF + Hcy também apresentaram DTN em ambas as idades de análise. Entretanto, a ocorrência destes defeitos foi mais baixa nos embriões do grupo AF + Hcy quando comparados aos embriões do grupo Hcy. Além disso, o pré-tratamento com AF também não provocou DTN nos embriões.

Tabela 3. Categorias de DTN observadas nos embriões dos grupos Hcy e AF + Hcy.

Categorias de DTN	Idade embrionária			
	E4		E6	
	Frequência (%)			
	Hcy	AF + Hcy	Hcy	AF + Hcy
Espinha bífida	20,0*	9,1	11,1	7,7
Espinha bífida oculta	16,0	9,1	5,6	---
Regressão caudal	8,0	9,1	38,9	15,4
Total	44* (n = 25)	27,3 (n = 22)	50* (n = 18)	23,1 (n = 13)

Hcy = grupo homocisteína; AF + Hcy = grupo ácido fólico + homocisteína. *n* = números de embriões analisados.

* indica diferenças significativas quando comparados ao grupo controle pelo teste de Dunn ($p < 0.05$).

4.2 EFEITO DA HCY SOBRE A MORFOGÊNESE DA MEDULA ESPINHAL E DO ESQUELETO AXIAL

A Hcy induziu alterações da morfogênese da medula espinhal nas duas idades embrionárias analisadas. Os embriões dos grupos controle e AF não exibiram DTN. Já para os embriões tratados com Hcy, diferentes categorias de DTN foram registradas, conforme apresentado na Tabela 3.

Os DTN foram observados na região tóraco-lombar dos embriões em E4 e E6 (Figs. 14 – 15). Nos embriões em E4, a espinha bífida foi histologicamente visível na medula espinhal dos embriões, acompanhada de alteração na morfologia e posição dos gânglios da raiz dorsal (Figs. 14c – d). Nestes embriões, o tecido neuroepitelial

apresentava-se exposto ao ambiente externo e a organização das camadas celulares da medula espinal foi modificada.

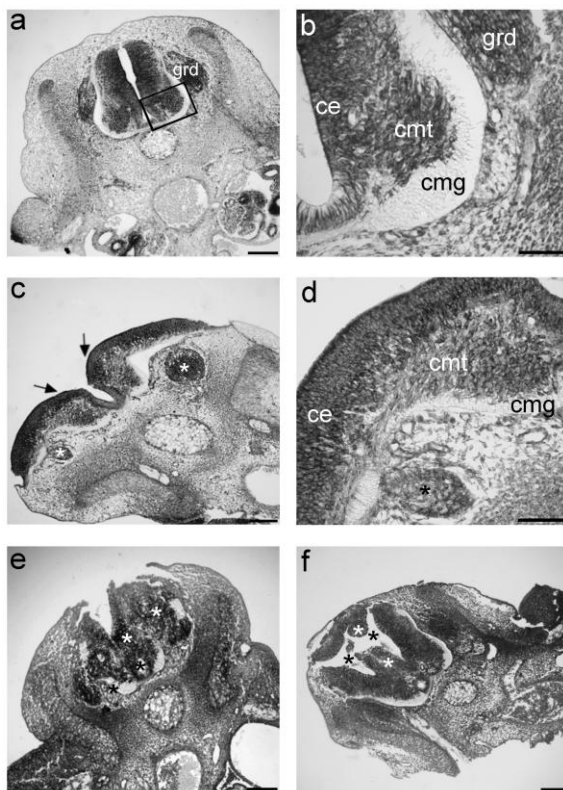


Figura 14. Morfologia da medula espinal de embriões E4 (coloração com azul de toluidina). **(a)** Controle exibindo medula espinal com morfologia normal. **(b)** Maior aumento da região delimitada em **a** evidenciando a organização das camadas celulares. **(c)** Embrião do grupo Hcy exibindo espinha bífida com tecido neuroepitelial exposto (setas) e gânglios espinais com morfologia e posicionamento alterados (asteriscos). **(d)** Em maior aumento observa-se a modificação na organização das camadas celulares. **(e)** Espinha bífida com múltiplas neuroceles (asteriscos pretos) e massas celulares desorganizadas (asteriscos brancos). **(f)** Espinha bífida oculta com canal neural duplo (asteriscos pretos) e excesso de células neuroepiteliais (asteriscos brancos). *ce*, camada ependimária; *cmg*, camada marginal; *cmt*, camada do manto; *grd*, gânglio da raiz dorsal. Escalas em **a**, **c**, **e**, **f** = 100 µm; em **b**, **d** = 50 µm.

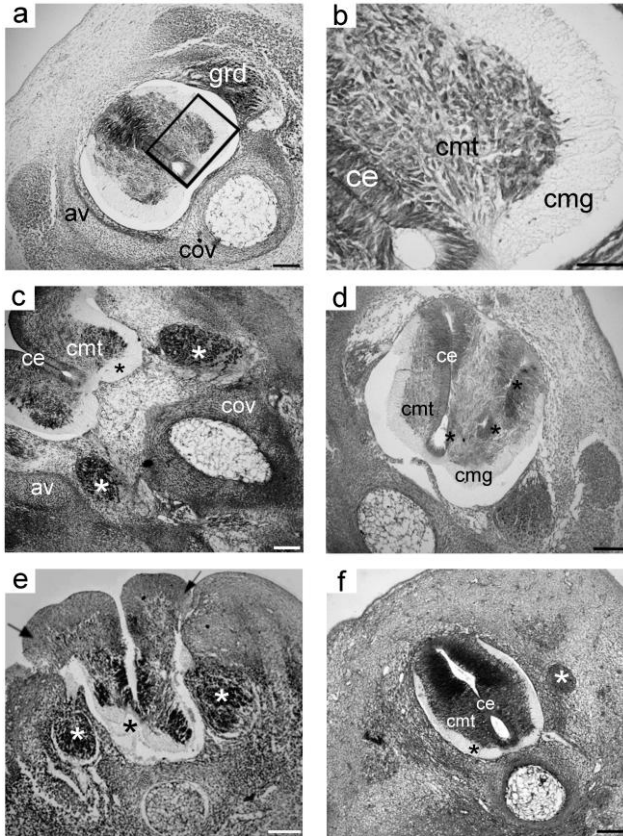


Figura 15. Morfologia da medula espinal de embriões E6 (coloração com azul de toluidina). **(a)** Controle exibindo morfologia normal. **(b)** Maior aumento da região delimitada em **a** evidenciando a organização das camadas celulares. **(c)** Embrião do grupo Hcy exibindo espinha bífida com tecido neuroepitelial exposto, gânglios espinhais e elementos vertebrais com morfologia e posicionamento alterados (asteriscos brancos); o asterisco preto indica a camada marginal. **(d)** Embrião do grupo Hcy com espinha bífida oculta apresentando múltiplas neuroceles (asteriscos pretos) e desorganização das camadas celulares na medula espinal. **(e)** Embrião do grupo Hcy exibindo espinha bífida com tecido neuroepitelial exposto (setas), alteração na morfologia dos gânglios espinhais (asteriscos brancos) e desorganização das camadas celulares (asterisco preto). **(f)** Embrião do grupo Hcy com regressão caudal exibindo hipoplasia da medula espinal, redução do tamanho do gânglio espinhal (asterisco branco) e ausência de elementos vertebrais. *av*, arco vertebral; *ce*, camada ependimária; *cmg*, camada marginal; *cmt*, camada do manto; *cov*, corpo da vértebra; *grd*, gânglio da raiz dorsal. Escalas em **a – f** = 100 μ m.

Alguns embriões apresentaram anormalidades na formação do canal neural da medula espinhal, exibindo mais de uma neurocele e excesso de tecido neuroepitelial desorganizado, não apresentando o padrão de estabelecimento de camadas celulares encontrado na medula espinhal neste estágio de desenvolvimento – camadas ependimária, do manto e marginal (Fig. 14 e). Os embriões em E4 do grupo Hcy, com DTN do tipo espinha bífida oculta, também apresentaram morfologia anormal da medula espinhal com canal neural duplicado e excesso de células neuroepiteliais que se expandiam para dentro do canal neural (Fig. 14f).

Os embriões em E6 tratados com Hcy também apresentaram espinha bífida e espinha bífida oculta, com morfologia similar à apresentada pela medula espinhal dos embriões em E4 (Fig. 15c – e). Os embriões em E6 que apresentaram regressão caudal exibiram hipoplasia da medula espinhal lombar e diminuição significativa no tamanho dos gânglios da raiz dorsal (Fig. 15f). Tanto a espinha bífida oculta, quanto a regressão caudal, foram observadas na análise morfológica externa e microscópica e foram reconhecidas como DTN, de acordo com as classificações existentes na literatura (ALLES; SULIK, 1993; INAGAKI et al., 2000; SUZUKI, 2007).

O tratamento dos embriões com Hcy também provocou modificações na morfogênese do esqueleto axial em ambas as idades de análise (Figs. 16 – 17). Os embriões em E4 dos grupos controle e AF exibiram uma distribuição regular das células do esclerótomo, revelada pela coloração com azul de alcian, a qual evidenciou o início do processo de condrificação nestas estruturas. Estes embriões apresentaram marcação com azul de alcian no esclerótomo lateral e ventral, a coloração foi mais intensa principalmente junto à notocorda (Fig. 16 a – c). Em contraste, os embriões do grupo Hcy, que possuíam espinha bifida, apresentaram distribuição irregular das células do esclerótomo, revelando alterações na morfogênese desta estrutura (Fig. 16 d – e).

Os embriões em E6 dos grupos controle e AF apresentaram desenvolvimento normal dos elementos vertebrais, exibindo condensações celulares no mesênquima dos arcos e corpos vertebrais, revelada pela intensa coloração com azul de alcian, a qual evidenciou a deposição de cartilagem nestas estruturas (Fig. 17 a – c). Novamente, o tratamento com Hcy provocou modificações na morfogênese das estruturas do esqueleto axial.

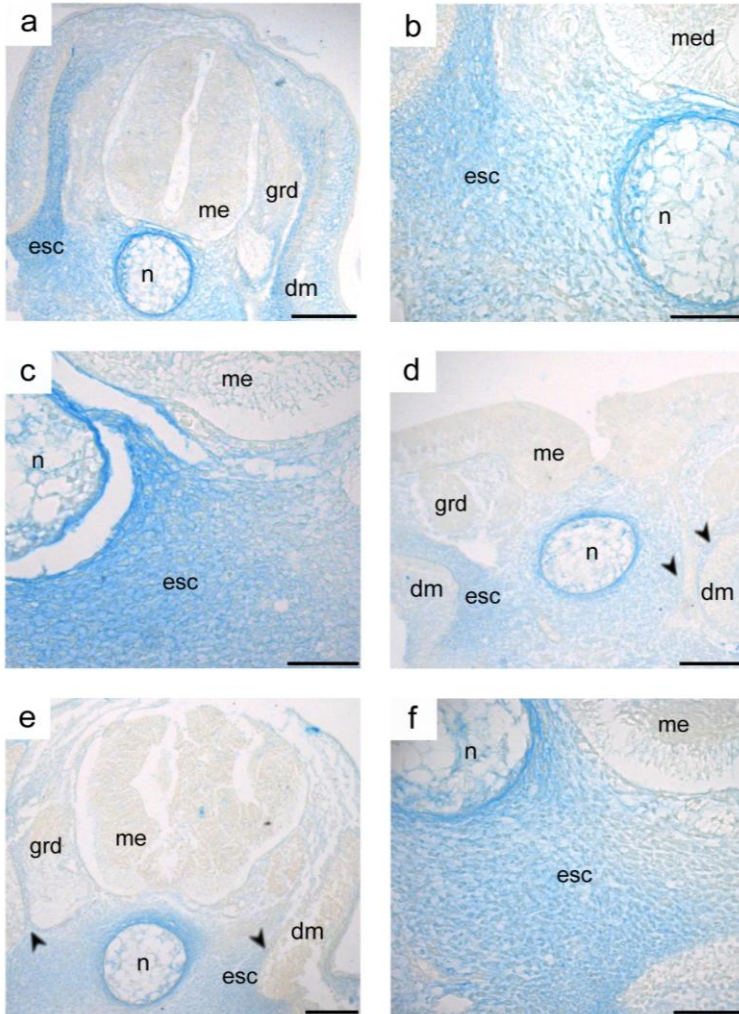


Figura 16. Cortes transversais de embriões E4 submetidos à coloração com azul de alcian. Embriões controle (**a**, **b**) e do grupo AF (**c**) exibindo marcação com azul de alcian no esclerótomo e na notocorda. Embriões com espinha bifida e tecido neuroepitelial exposto (**d**) e com múltiplos na medula espinhal (**e**), ambos exibindo distribuição irregular do esclerótomo (cabeças de seta). (**f**) Embriões do grupo AF + Hcy exibindo marcação para azul de alcian no esclerótomo e dentro da notocorda. *dm*, dermomiótomo; *esc*, esclerótomo; *grd*, gânglio da raiz dorsal; *me*, medula espinhal; *n*, notocorda. Escalas em **a**, **d**, **e** = 100 μ m; em **b**, **c**, **f** = 50 μ m.

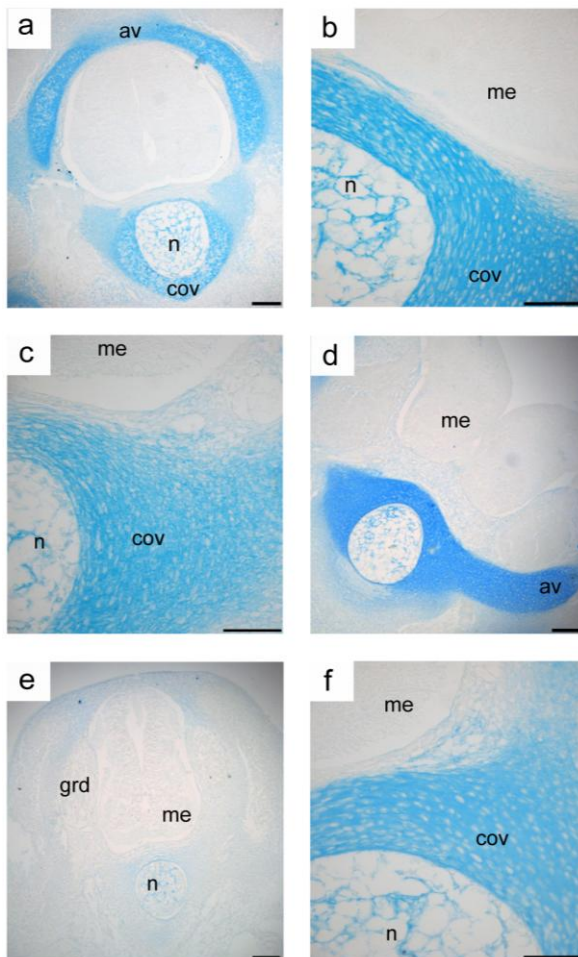


Figura 17. Cortes transversais de embriões E6 submetidos à coloração com azul de alcian. Embriões controle (**a, b**) e do grupo AF (**c**) exibindo marcação com azul de alcian dentro da notocorda e nos elementos vertebrais em desenvolvimento. Embriões do grupo Hcy com espinha bifida (**d**) e regressão caudal (**e**). (**d**) Embrião exibindo falha na fusão dos arcos vertebrais na região dorsal acompanhada de rotação lateral. (**e**) Embrião com ausência de elementos vertebrais. (**f**) Embrião do grupo AF + Hcy exibindo marcação com azul de alcian dentro da notocorda e nos elementos vertebrais em desenvolvimento. *av*, arco vertebral; *cov*, corpo da vértebra; *grd*, gânglio da raiz dorsal; *me*, medula espinal; *n*, notocorda. Escala em **a, b, d** = 100 μm ; em **c, e, f** = 50 μm .

Os embriões em E6 tratados com Hcy, que possuíam espinha bífida, exibiram falha na fusão dos arcos vertebrais na linha média dorsal, acompanhada de desvio no posicionamento destes arcos, estes apresentaram rotação lateral (Fig. 17 d). Os embriões tratados com Hcy, que exibiram regressão caudal, não possuíam elementos vertebrais na região lombar inferior da medula espinhal, o que foi confirmado pela ausência de coloração com azul de alcian, indicando falha na formação de centros de condrificação nestas estruturas neste estágio de desenvolvimento (Fig. 17 e).

Os embriões do grupo AF + Hcy, que não apresentaram alterações na morfogênese da medula espinhal, exibiram distribuição regular das células do esclerótomo em E4, semelhante ao padrão observado para os embriões controle e do grupo AF, exibindo marcação com azul de alcian no esclerótomo e na notocorda. Nos embriões em E6, foi verificada a presença de centros de condrificação, formados pela condensação de células mesenquimais nos arcos e corpos vertebrais em desenvolvimento, similar ao que foi observado nos embriões dos grupos controle e AF neste estágio de desenvolvimento, após a realização da coloração com azul de alcian (Figs. 16 f e 17f).

4.3 HCY INDUZ ESTRESSE CELULAR NOS TECIDOS NEURAL E MESENQUIMAL

Para avaliar se a Hcy induzia estresse celular nos tecidos neurais e mesenquimais dos embriões, foi avaliada a expressão das proteínas HSP 70 e Bcl 2 por meio da análise imuno-histoquímica destes tecidos em E4. A presença destas duas proteínas foi verificada na medula espinhal e no mesênquima dorsal e lateral, localizados próximo à região dorsal da medula espinhal e aos gânglios espinhais, respectivamente (Figs. 18 e 19).

Os embriões do grupo Hcy exibiram a maior densidade de células por área (NA) positivas para HSP 70 na medula espinhal ($205,32 \pm 8,54 \text{ mm}^2$), diferindo significativamente do grupo controle ($p < 0,0001$). A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo do tratamento com Hcy ($F_{(1,284)} = 14,84$; $p < 0,001$) e da interação AF X Hcy ($F_{(1,284)} = 31,49$; $p < 0,0001$), demonstrando que a Hcy induziu um aumento significativo na expressão da HSP 70 e que o pré-tratamento com AF preveniu este efeito na medula espinhal dos embriões em E4 (Fig. 18).

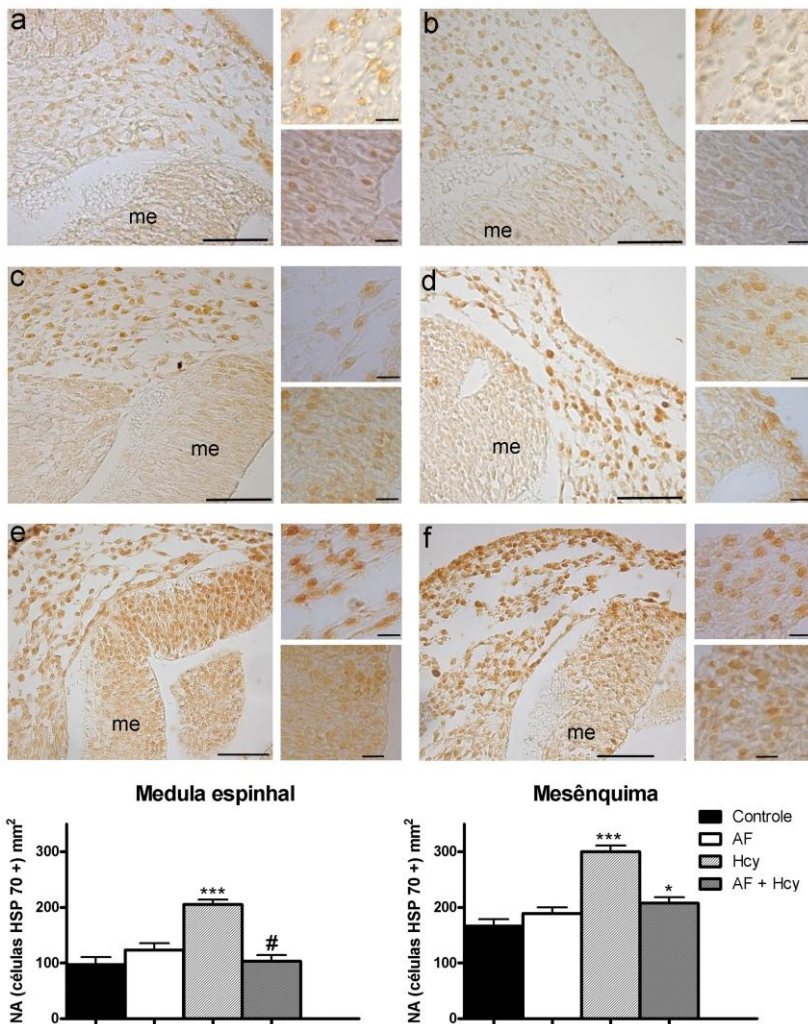


Figura 18. Cortes transversais de embriões em E4 submetidos à imunohistoquímica com anticorpo anti-HSP 70 exibindo células positivas na medula espinal (detalhe no canto inferior) e no mesênquima dorsal e lateral (detalhe no canto superior). Embriões dos grupos controle (a), AF (b), Hcy (c) e AF + Hcy (d) que apresentaram morfologia normal. (e, f) Embriões do grupo Hcy com espinha bífida oclusa. *me*, medula espinal. Escalas em a - f = 50 μ m; nos detalhes = 10 μ m. Os gráficos apresentam o efeito da Hcy sobre a NA de células positivas para HSP 70. * ($p < 0,05$), *** ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo controle. # representa o efeito protetor do AF.

No tecido mesenquimal dos embriões do grupo Hcy, também foi encontrada a maior NA de células positivas para HSP 70 ($300,24 \pm 10,83 \text{ mm}^2$), a qual diferiu significativamente do controle ($166,54 \pm 11,80 \text{ mm}^2$). A NA de células positivas para HSP 70 no mesênquima dos embriões do grupo AF + Hcy também foi maior do que a registrada no grupo controle ($207,80 \pm 9,83 \text{ mm}^2$, $p < 0,05$). Portanto, a Hcy induziu aumento da expressão da proteína HSP 70 no mesênquima dos embriões em E4, mas o pré-tratamento com AF não preveniu este efeito (Fig. 18).

A proteína Bcl 2 foi localizada na medula espinhal dos embriões em E4 controle e tratados. Os embriões do grupo Hcy apresentaram a maior NA de células marcadas com anticorpo anti-Bcl 2, a qual diferiu significativamente do grupo controle ($178,58 \pm 10,14 \text{ mm}^2$, $p < 0,0001$). A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo da interação AF x Hcy ($F_{(1,284)} = 14,77$; $p < 0,001$), indicando que o pré-tratamento com AF preveniu o aumento na expressão da proteína Bcl 2 induzido pela Hcy (Fig. 19).

No tecido mesenquimal dos embriões, o tratamento com Hcy também levou ao aumento significativo na expressão da proteína Bcl 2 ($301,00 \pm 9,50 \text{ mm}^2$, $p < 0,0001$). A ANOVA de duas vias indicou efeito significativo do tratamento com Hcy ($F_{(1,284)} = 25,73$; $p < 0,0001$) e da interação AF x Hcy ($F_{(1,284)} = 43,59$; $p < 0,0001$), revelando que a Hcy induziu o aumento da expressão de Bcl 2 e o pré-tratamento com AF preveniu este efeito também no mesênquima dos embriões em E4 (Fig. 19).

4.4 HCY INDUZ ESTRESSE OXIDATIVO NOS TECIDOS NEURAL E MESENQUIMAL

Para avaliar se a Hcy induziu estresse oxidativo nos tecidos neural e mesenquimal dos embriões, os seguintes parâmetros foram verificados: conteúdo de carbolinas e de tióis não proteicos (NPSH). Ambos determinados na medula espinhal e tecido mesenquimal dos embriões em E4 controle e tratados.

A carbonilação de proteínas aumentou significativamente no grupo Hcy em comparação com o grupo controle ($4,23 \pm 0,75 \text{ nmol/mg}$, $p < 0,001$). A ANOVA de duas vias indicou efeito significativo do tratamento com Hcy ($F_{(1,18)} = 21,69$; $p < 0,001$) e da interação AF x Hcy ($F_{(1,18)} = 36,86$; $p < 0,0001$), revelando que o tratamento com Hcy induziu o aumento da carbonilação de proteínas na medula espinhal e

tecido mesenquimal dos embriões em E4, e que o pré-tratamento com AF preveniu este efeito.

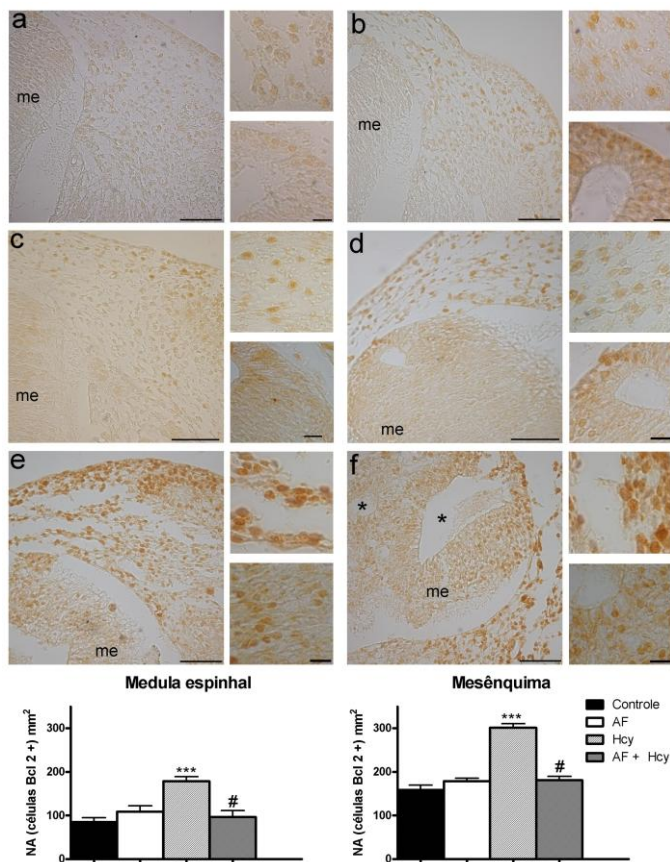


Figura 19. Cortes transversais de embriões em E4 submetidos à imunohistoquímica com anticorpo anti-Bcl 2 exibindo células positivas na medula espinal (detalhe no canto inferior) e no mesênquima dorsal e lateral (detalhe no canto superior). Embriões dos grupos controle (a), AF (b), Hcy (c) e AF + Hcy (d) que apresentaram morfologia normal. (e, f) Embriões do grupo Hcy com espinha bífida oculta com presença de múltiplos canais (*). *me*, medula espinal. Escalas em a - f = 50 μ m; nos detalhes = 10 μ m. Os gráficos apresentam o efeito da Hcy sobre a NA de células positivas para Bcl 2. ***($p < 0,001$) quando comparado ao grupo controle. # representa o efeito protetor do AF.

Quando determinadas as concentrações de NPSH, foi evidenciada uma queda no conteúdo tiólico dos embriões do grupo Hcy ($67,67 \pm 0,75$ nmol/mg $0,59$, $p < 0,05$). A ANOVA de duas vias indicou efeito significativo do tratamento com Hcy ($F_{(1,8)} = 20,36$; $p < 0,01$), mas não da interação AF x Hcy ($F_{(1,8)} = 1,15$; $p > 0,05$), revelando que a Hcy induziu queda no conteúdo tiólico na medula espinhal e tecido mesenquimal dos embriões em E4 e que o pré-tratamento com AF não preveniu este efeito (Fig. 20).

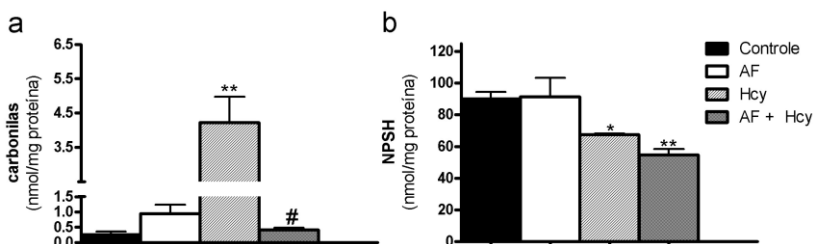


Figura 20. (a) Concentração de carbonilas e de (b) tióis não-preteicos (NPSH) expressos em nmol/ mg de proteína na medula espinhal e mesênquima dos embriões em E4. Os dados correspondem a média (\pm erro padrão). * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo controle. # representa o efeito protetor do AF.

4.5 EFEITO DA HCY SOBRE OS MECANISMOS CELULARES ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO DA MEDULA ESPINHAL E DO ESQUELETO AXIAL

4.5.1 Efeito da Hcy sobre o ciclo celular: expressão de fosfo-histona H3 e PCNA

Células em proliferação, marcadas com anticorpo anti-fosfo-histona H3, foram visualizadas na camada ependimária da medula espinhal e nas células mesenquimais do esclerótomo e dos elementos vertebrais em desenvolvimento dos embriões controle e tratados (Figs. 21 e 22).

Os embriões em E4 do grupo Hcy exibiram a menor NA de células em proliferação na medula espinhal ($29,60 \pm 4,04$ mm²) diferindo significativamente do grupo controle ($p < 0,0001$). A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo do tratamento com Hcy ($F_{(1,284)} = 116,99$; $p < 0,0001$) e não da interação AF x Hcy ($F_{(1,284)} = 0,0135$; p

$<0,9075$), demonstrando que a Hcy reduziu a proliferação celular na medula espinhal dos embriões em E4 e que o pré-tratamento com AF não preveniu este efeito (Fig. 21).

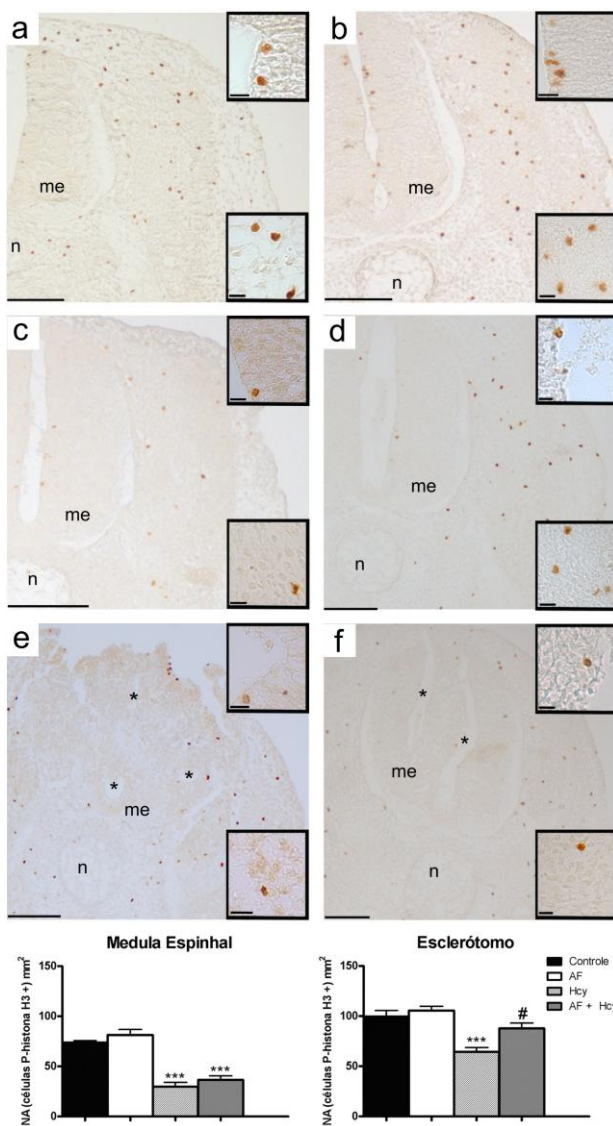


Figura 21. Cortes transversais de embriões em E4 submetidos à imunohistoquímica com anticorpo anti-fosfo-histona H3 exibindo células em proliferação na medula espinhal (detalhe no canto superior) e no esclerótomo (detalhe no canto inferior). Embriões dos grupos controle (**a**), AF (**b**), Hcy (**c**) e AF + Hcy (**d**) com morfologia normal. Embriões do grupo Hcy com espinha bifida (**e**) exibindo múltiplas neuroceles na medula espinhal (*), e com espinha bifida oclusa (**f**) exibindo canal neural duplo na medula espinhal (*). *me*, medula espinhal; *n*, notocorda. Escalas em **a - f** = 100 μm ; nos detalhes = 10 μm . Os gráficos apresentam o efeito da Hcy sobre a NA de células positivas para fosfo-histona H3. ***($p < 0,001$) quando comparado ao grupo controle. # representa o efeito protetor do AF.

Células em proliferação foram visualizadas no esclerótomo dos embriões em E4 controle e tratados (Fig. 21). Nesta idade, a mais baixa NA foi registrada no grupo Hcy ($64,17 \pm 4,45 \text{ mm}^2$), e a análise *post hoc* revelou diferença significativa quando este foi comparado ao grupo controle ($p < 0,001$). A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo da interação AF x Hcy ($F_{(1,284)} = 16,79$; $p < 0,0001$), demonstrando que o pré-tratamento com AF preveniu a diminuição na proliferação celular induzida pela Hcy no esclerótomo dos embriões.

Novamente, os embriões em E6 do grupo Hcy apresentaram a menor NA de células em proliferação na medula espinhal ($51,57 \pm 5,84 \text{ mm}^2$), a qual diferiu significativamente da NA registrada para os grupos controle ($74,49 \pm 6,15 \text{ mm}^2$; $p < 0,05$) e AF + Hcy ($80,22 \pm 7,27 \text{ mm}^2$; $p < 0,05$) (Fig. 19). A ANOVA de duas vias indicou efeito significativo da interação AF x Hcy ($F_{(1,284)} = 6,49$; $p < 0,05$), sugerindo que o pré-tratamento com AF foi capaz de prevenir a importante redução na proliferação celular induzida pela Hcy na medula espinhal dos embriões em E6.

Nos embriões em E6, foram também observadas células em proliferação nos arcos e corpos vertebrais em desenvolvimento, bem como no tecido mesenquimal próximo a estas estruturas (Fig. 19). Novamente, os embriões do grupo Hcy apresentaram a menor NA de células em proliferação ($59,59 \pm 4,50 \text{ mm}^2$; $p < 0,0001$), a qual diferiu significativamente em comparação com o grupo controle ($p < 0,0001$). A ANOVA de duas vias indicou efeito significativo do tratamento com Hcy ($F_{(1,284)} = 4,61$; $p < 0,05$). Portanto, a Hcy induziu uma importante redução na proliferação celular nos elementos vertebrais em desenvolvimento e o pré-tratamento com AF não foi capaz de prevenir este efeito em E6.

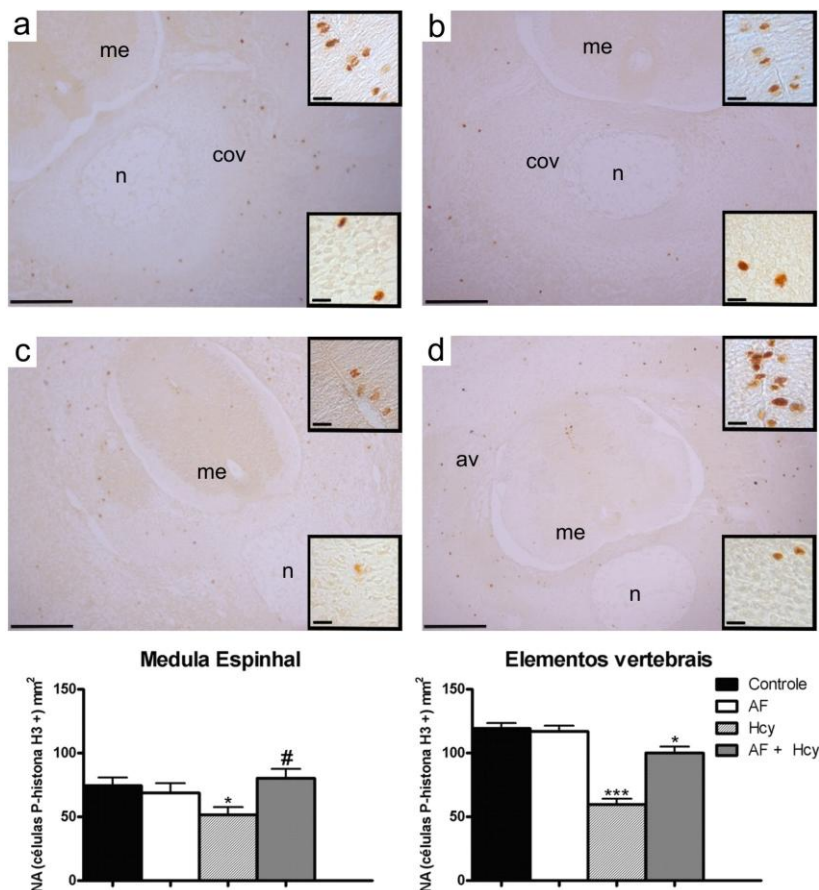


Figura 22. Cortes transversais de embriões em E6 submetidos à imunohistoquímica com anticorpo anti-fosfo-histona H3 exibindo células em proliferação na medula espinal (detalhe no canto superior) e nos elementos vertebrais em desenvolvimento (detalhe no canto inferior). Embriões dos grupos controle (a), AF (b) e AF + Hcy (d) com morfologia normal. (c) Embrião do grupo Hcy com regressão caudal. *av*, arco vertebral; *cov*, corpo da vértebra; *me*, medula espinal; *n*, notocorda. Escalas em a - d = 100 μ m; nos detalhes = 10 μ m. Os gráficos apresentam o efeito da Hcy sobre a NA de células positivas para fosfo-histona H3. *($p < 0,05$) e ***($p < 0, 001$) quando comparado ao grupo controle. # representa o efeito protetor do AF.

Para estabelecer relações entre a redução na proliferação celular induzida pela Hcy e a gênese da espinha bífida, os dados de proliferação

celular dos embriões com esta categoria de DTN foram analisados separadamente. Esta categoria de DTN é considerada a forma mais grave destes defeitos na medula espinhal e os embriões do grupo Hcy que possuíam este DTN apresentaram redução significativa no número de células em proliferação no mesênquima ($48,13 \pm 10,11 \text{ mm}^2$, $p < 0,0001$) e na medula espinhal ($30,08 \pm 8,81 \text{ mm}^2$, $p < 0,001$) em E4 (Fig. 21e). Para as outras duas categorias de DTN descritas aqui – espinha bífida oculta e regressão caudal – a redução na NA de células mesenquimais em proliferação também foi significativa, sendo os valores de $61,88 (\pm 9,86) \text{ mm}^2$ para os embriões do grupo Hcy com espinha bífida oculta em E4, e de $13,75 (\pm 7,36) \text{ mm}^2$ para os embriões do grupo Hcy com regressão caudal em E6 ($p < 0,0001$). Na medula espinhal, a redução na proliferação celular também foi significativa para os embriões com espinha bífida oculta em E4 ($28,80 \pm 8,30 \text{ mm}^2$, $p < 0,001$), mas não para os embriões com regressão caudal em E6 ($40,11 \pm 13,28 \text{ mm}^2$, $p > 0,05$) (Figs. 21f e 22c).

A imuno-histoquímica com anticorpo anti-PCNA revelou a presença do antígeno na medula espinhal dos embriões controle e tratados. A marcação foi visualizada principalmente nas células da camada endimária, mas algumas células localizadas no limite entre a camada endimária e a do manto também exibiram marcação positiva. No mesênquima, as células do esclerótomo também expressaram PCNA, enquanto pouca ou nenhuma expressão do antígeno foi observada nos elementos vertebrais em desenvolvimento dos embriões controle e tratados (Figs. 23 e 24).

Os embriões em E4 do grupo Hcy exibiram a maior NA de células marcadas com anticorpo anti-PCNA na medula espinhal ($177,62 \pm 11,83 \text{ mm}^2$), diferindo significativamente do grupo controle ($p < 0,0001$). A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo do tratamento com Hcy ($F_{(1,284)} = 15,44$; $p < 0,001$) e da interação AF x Hcy ($F_{(1,284)} = 39,10$; $p < 0,0001$), demonstrando que a Hcy induziu um aumento significativo na expressão de PCNA na medula espinhal dos embriões em E4 e que o pré-tratamento com AF preveniu este efeito.

Células expressando PCNA também foram visualizadas no esclerótomo dos embriões em E4 e a mais alta NA foi registrada no grupo Hcy ($289,54 \pm 10,33 \text{ mm}^2$), quando comparado ao grupo controle ($p < 0,0001$). A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo da interação AF x Hcy ($F_{(1,284)} = 65,68$; $p < 0,0001$), demonstrando que o pré-tratamento com AF preveniu o aumento da expressão de PCNA induzida pela Hcy no esclerótomo dos embriões em E4 (Fig. 23).

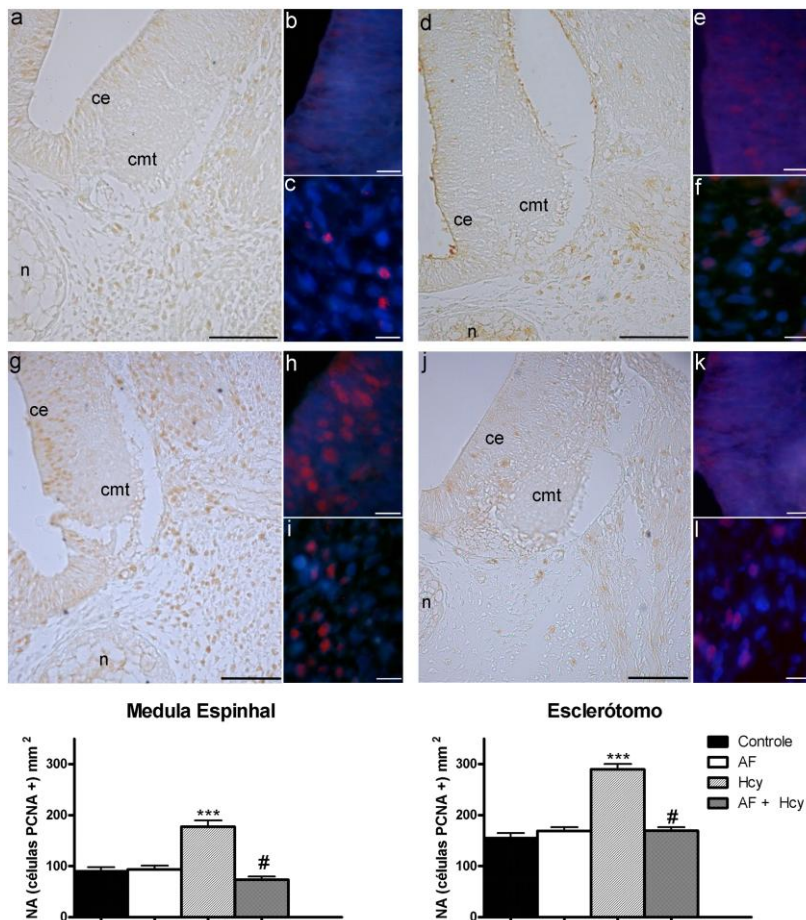


Figura 23. Cortes transversais de embriões em E4 submetidos à imunohistoquímica com anticorpo anti-PCNA exibindo células reativas na medula espinhal e no esclerótomo. Embriões dos grupos controle (a - c), AF (d - f), Hcy (g - i) e AF + Hcy (j - l). As imagens de fluorescência evidenciam a marcação para PCNA no núcleo das células (vermelho) da medula espinhal (b, e, h, k) e do esclerótomo (c, f, i, l). Os núcleos das células foram corados com DAPI (azul). *ce*, camada endimária; *cmt*, camada do manto; *n*, notocorda. Escalas em a, d, e, j = 50 μ m; em b, c, e, f, h, i, k, l = 10 μ m. Os gráficos apresentam o efeito da Hcy sobre a NA de células positivas para PCNA. ***($p < 0,001$) quando comparado ao grupo controle. # representa o efeito protetor do AF.

Nos embriões em E6, a Hcy também induziu aumento significativo na expressão de PCNA na medula espinhal ($139,42 \pm 11,77 \text{ mm}^2$), quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo do tratamento com Hcy ($F_{(1,284)} = 15,24$, $p < 0,01$), mas não da interação AF x Hcy ($F_{(1,284)} = 0,46$, $p > 0,05$), demonstrando que a Hcy induziu aumento da expressão de PCNA na medula espinhal dos embriões e que o pré-tratamento com AF não preveniu este efeito em E6 (Fig. 24).

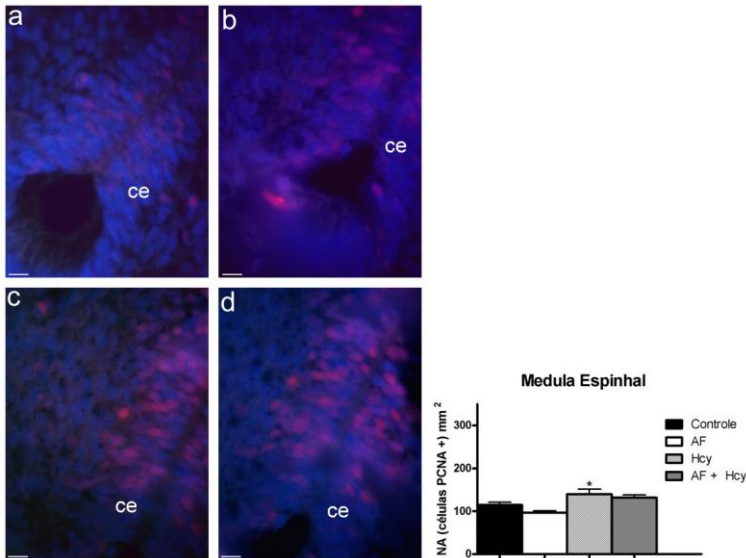


Figura 24. Cortes transversais de embriões em E6 submetidos à imunohistoquímica com anticorpo anti-PCNA exibindo células positivas na medula espinhal (vermelho). Os núcleos das células foram corados com DAPI (azul). Embriões dos grupos controle (a), AF (b), Hcy (c) e AF + Hcy (d). ce, camada endimária. Escalas em a - d = 10 μ m. O gráfico apresenta o efeito da Hcy sobre a NA de células positivas para PCNA. *($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle.

Através da marcação para PCNA, observou-se que o tratamento com Hcy induziu alteração no ciclo celular das células da medula espinhal dos embriões em E4 e E6 e também do esclerótomo dos embriões em E4, aumentando de forma significativa a expressão do antígeno nestes tecidos. Este aumento na NA das células marcadas com

PCNA pode ser um indicativo da ocorrência de dano ao DNA destas células.

4.5.2 Efeito da Hcy sobre a diferenciação neuronal: expressão das proteínas p 53 e β -tubulina III

Através da técnica de imuno-histoquímica, observamos a expressão e colocalização das proteínas p 53 e β -tubulina III na região ventral da camada do manto da medula espinhal, onde ocorre a diferenciação neuronal. Esta expressão colocalizada foi observada nas medulas dos embriões em E4 e E6 controle e tratados (Figs. 25 e 26).

Nos embriões em E4, a menor expressão da proteína p 53 foi observada nos embriões do grupo Hcy ($23.337,5 \pm 1.428,16 \mu\text{m}^2$), diferindo significativamente do grupo controle ($p < 0,0001$). A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo do tratamento com Hcy ($F_{(1,188)} = 22,45$; $p < 0,0001$), sugerindo que a Hcy reduziu significativamente a expressão da proteína p 53 durante a diferenciação neuronal na região ventral da medula espinhal e que o pré-tratamento com AF não preveniu este efeito.

Já com relação à expressão da β -tubulina III, esta também foi reduzida nos embriões do grupo Hcy ($13.441,76 \pm 1.168,47 \mu\text{m}^2$), diferindo significativamente do grupo controle ($p < 0,0001$). A ANOVA de duas vias indicou efeito significativo do tratamento com Hcy ($F_{(1,284)} = 8,39$; $p < 0,05$) e da interação AF x Hcy ($F_{(1,188)} = 30,51$; $p < 0,0001$), demonstrando que a Hcy reduziu a expressão da β -tubulina III e que o pré-tratamento com AF preveniu este efeito em E4 (Fig. 25). Adicionalmente, nos embriões do grupo Hcy com espinha bífida, a localização das proteínas p 53 e β -tubulina III também foi alterada, uma vez que não era restrita à região da camada do manto, estendendo-se para a região próxima à camada endimária da medula espinhal em E4 (Fig. 25 e).

Na medula espinhal dos embriões em E6, a expressão de ambas as proteínas, p 53 e β -tubulina III foi maior em todos os grupos, quando comparada a expressão observada em E4. Isto era esperado, uma vez que com o decorrer do desenvolvimento, a diferenciação neuronal progride. Como observado nos embriões em E4, a expressão da proteína p 53 foi reduzida nos embriões do grupo Hcy ($28.123,15 \pm 1.547,59 \mu\text{m}^2$) e esta diferença foi significativa quando comparada ao grupo controle ($p < 0,0001$). A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo do tratamento com Hcy ($F_{(1,188)} = 8,69$, $p < 0,01$) e da

interação AF x Hcy ($F_{(1,188)} = 15,81$; $p < 0,001$), demonstrando que a Hcy levou à redução significativa na expressão de p 53 e que o pré-tratamento com AF preveniu este efeito em E6 (Fig. 26).

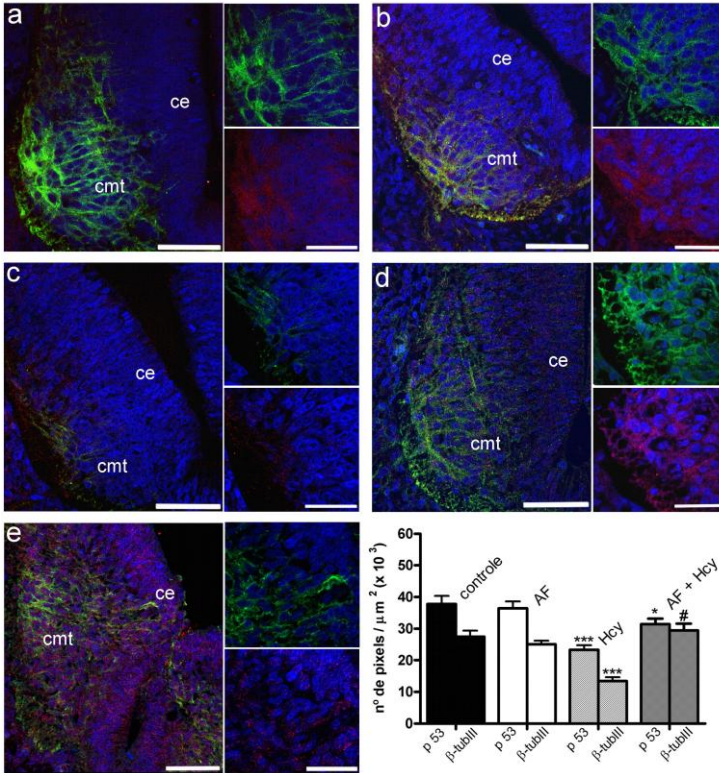


Figura 25. Cortes transversais de embriões em E4 submetidos à imunohistoquímica com os anticorpos anti-p 53 (verde) e anti-β-tubulina III (vermelho). Os núcleos das células foram corados com DAPI (azul). Embriões dos grupos controle (a), AF (b), Hcy (c) e AF + Hcy (d) exibindo células positivas na medula espinhal. Em maior aumento os detalhes evidenciam a marcação para p 53 (acima) e para β-tubulina III (abaixo) na camada do manto. (e) Embrião do grupo Hcy com espinha bífida exibindo alteração na localização das proteínas p 53 e β-tubulina III na medula espinhal. *ce*, camada ependimária; *cmt*, camada do manto; *β-tubIII*, β-tubulina III. Escalas em a – e = 50 μm; nos detalhes = 30 μm. O gráfico apresenta o efeito da Hcy sobre a densidade integrada de pixels por área de p 53 e β-tubulina III. ***($p < 0,0001$) e *($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle. # representa o efeito protetor do AF.

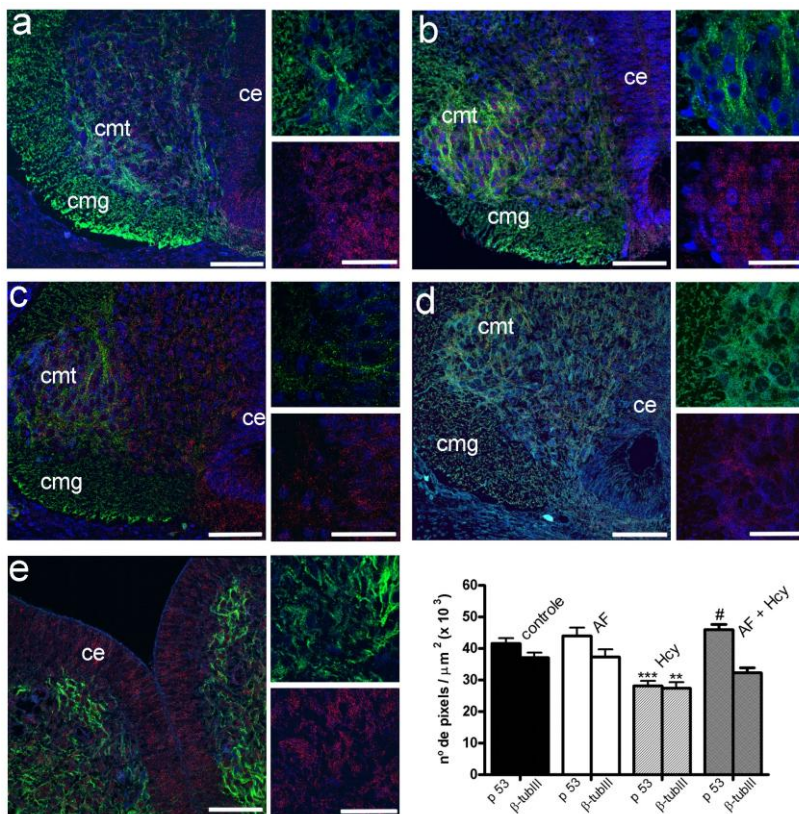


Figura 26. Cortes transversais de embriões em E6 submetidos à imunohistoquímica com os anticorpos anti-p 53 (verde) e anti- β -tubulina III (vermelho). Todos os núcleos foram corados com DAPI (azul). Embriões dos grupos controle (a), AF (b), Hcy (c) e AF + Hcy (d) exibindo células positivas na medula espinal. Em maior aumento os detalhes evidenciam a marcação para p53 (acima) e para β -tubulina III (abaixo) na camada do manto. (e) Embrião do grupo Hcy com espinha bífida exibindo alteração na localização das proteínas p 53 e β -tubulina III na medula espinal. *ce*, camada ependimária; *cmt*, camada marginal; *cmt*, camada do manto. Escalas em a – e = 50 μm ; nos detalhes = 30 μm . O gráfico apresenta o efeito da Hcy sobre a densidade integrada de pixels por área de p 53 e β -tubulina III. ***($p < 0,0001$) e *($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle. # representa o efeito protetor do AF.

A expressão da proteína β -tubulina III também foi reduzida nos embriões em E6 do grupo Hcy ($27.377,69 \pm 1.901,08 \mu\text{m}^2$), quando

comparada à expressão no grupo controle ($p < 0,001$). A ANOVA de duas vias indicou efeito significativo do tratamento com Hcy ($F_{(1,188)} = 15,37$; $p < 0,001$), mas não da interação AF x Hcy ($F_{(1,188)} = 1,56$; $p > 0,05$), sugerindo que a Hcy induziu uma importante redução na expressão de β -tubulina III em E6 e que o pré-tratamento com AF não preveniu este efeito (Fig. 26). De fato, com relação à expressão das proteínas p 53 e β -tubulina III nos embriões em E6 com espinha bífida, a localização de ambas as proteínas foi alterada, de forma que células próximas à camada ependimária exibiram marcação positiva para p 53 e β -tubulina III (Fig. 26 e).

Quando avaliamos separadamente a expressão de p 53 e β -tubulina III na medula espinhal dos embriões que apresentaram espinha bífida, obtivemos resultados importantes. Em E4, estes embriões também apresentaram expressão reduzida de p 53 ($23.382, 80 \pm 3.332,49 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$) e de β -tubulina III ($13.160,97 \pm 2.373,38 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$) quando comparados ao grupo controle. Em E6, nas medulas com espinha bífida, a expressão de p 53 também foi reduzida ($26.299,1 \pm 2.945,67 \mu\text{m}^2$) em comparação com o grupo controle ($p < 0,001$) e, mais ainda, a expressão da β -tubulina III foi significativamente menor quando comparada a expressão encontrada na medula espinhal dos embriões do grupo controle e dos embriões do grupo Hcy com morfologia normal ($10.510,4 \pm 1.732,1 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Portanto, observou-se que nos embriões com espinha bífida, a diferenciação neuronal na região ventral da medula espinhal é fortemente prejudicada, uma vez que a expressão de β -tubulina III é significativamente reduzida nestes embriões.

4.5.3 Efeito da Hcy sobre a diferenciação do esqueleto axial: expressão de Pax 1/9 e Sox 9

A expressão relativa dos genes Pax 1 e Pax 9 foi verificada através da análise por RT-qPCR do esclerótomo dos embriões em E4. A análise revelou que a expressão do RNAm para Pax 1 foi significativamente reduzida nos embriões do grupo Hcy ($0,022 \pm 0,003$), quando comparada ao grupo controle ($p < 0,01$). A ANOVA de duas vias indicou efeito significativo do tratamento com Hcy ($F_{(1,20)} = 7,57$; $p < 0,05$) e da interação AF x Hcy ($F_{(1,20)} = 5,90$; $p < 0,05$), revelando que a Hcy induziu redução significativa na expressão do gene Pax 1 e que o pré-tratamento com AF preveniu este efeito (Fig. 27). Adicionalmente, a análise por RT-qPCR revelou que o RNAm para Pax

9 foi expresso no esclerótomo dos embriões em E4 controle e tratados. E novamente, semelhante ao resultado obtido para a expressão do gene Pax 1, o tratamento com Hcy provocou a redução significativa na expressão relativa do gene Pax 9 ($0,031 \pm 0,004$), quando comparado ao grupo controle ($p < 0,01$). A ANOVA de duas vias indicou efeito significativo do tratamento com Hcy ($F_{(1,20)} = 7,41$; $p < 0,05$) e da interação AF x Hcy ($F_{(1,20)} = 6,12$; $p < 0,05$). Portanto, o pré-tratamento com AF foi capaz de prevenir a redução na expressão gênica de Pax 9 induzida pela Hcy no esclerótomo dos embriões em E4 (Fig. 27).

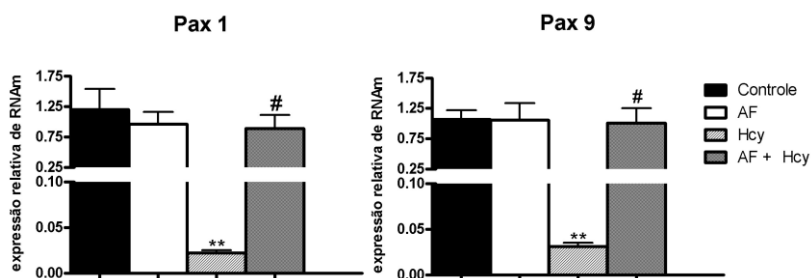


Figura 27. Expressão relativa de RNAm para Pax 1 (à esquerda) e Pax 9 (à direita) no esclerótomo dos embriões em E4. β -actina e GAPDH foram utilizados como genes controle. Os dados foram expressos com média (\pm erro padrão). ** ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo controle. # representa o efeito protetor do AF.

A proteína Pax 1 foi localizada através de imuno-histoquímica no esclerótomo dos embriões em E4 controle e tratados. A proteína foi expressa no núcleo das células mesenquimais. Os embriões em E4 do grupo Hcy exibiram a menor NA de células positivas para Pax 1 ($105,43 \pm 6,97 \text{ mm}^2$), a qual diferiu significativamente do grupo controle ($p < 0,0001$). A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo do tratamento com Hcy ($F_{(1,356)} = 59,47$; $p < 0,0001$), sugerindo que a Hcy induziu uma redução significativa na expressão da proteína Pax 1 no esclerótomo dos embriões e que o pré-tratamento com AF não preveniu este efeito (Fig. 28).

A expressão da proteína Pax 1 foi verificada também nos elementos vertebrais em desenvolvimento, bem como no tecido mesenquimal localizado próximo a estas estruturas dos embriões em E6 controle e tratados. Os produtos gênicos do Pax 1 foram expressos no

núcleo das células mesenquimais. Mais uma vez, os embriões do grupo Hcy exibiram a menor NA de células positivas para Pax 1 ($113,07 \pm 11,71 \text{ mm}^2$), diferindo significativamente do grupo controle ($p < 0,0001$). A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo do tratamento com Hcy ($F_{(1,356)} = 27,24$; $p < 0,0001$), sugerindo que a Hcy induziu uma redução significativa na expressão da proteína Pax 1 nas células mesenquimais dos embriões e que o pré-tratamento com AF não preveniu este efeito em E6 (Fig. 29).

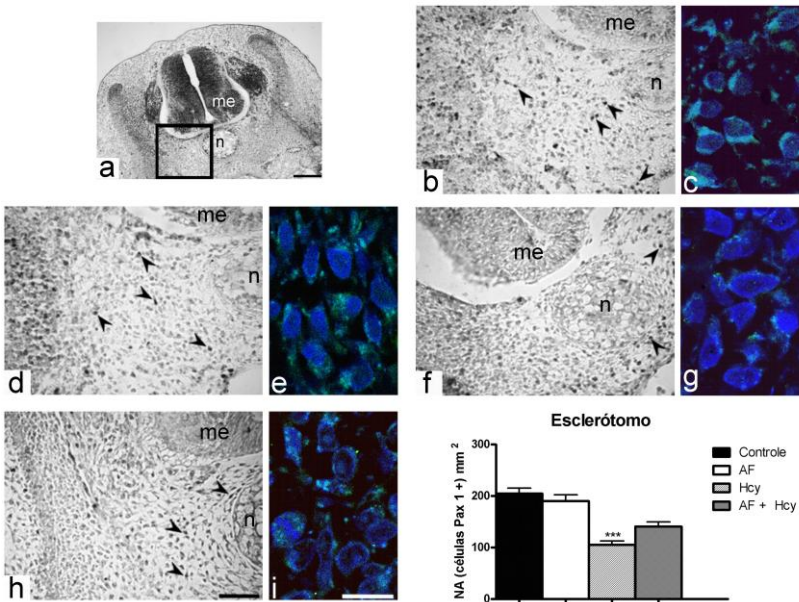


Figura 28. Cortes transversais de embriões em E4 submetidos à imunohistoquímica com anticorpo anti-Pax 1 exibindo células positivas no esclerótomo. Corte transversal indicando a região visualizada em **b**, **d**, **f** e **h**. Embriões controle (**b – c**), dos grupos AF (**d – e**), Hcy (**f – g**) e AF + Hcy (**h – i**). As imagens de microscopia confocal (**c**, **e**, **g**, **i**) revelam a localização nuclear da proteína (verde). Todos os núcleos foram corados com DAPI (azul). *me*, medula espinhal; *n*, notocorda. Escalas em **a** = 100 μm ; em **b**, **d**, **f**, **h** = 50 μm ; em **c**, **e**, **g**, **i** = 10 μm . O gráfico apresenta o efeito da Hcy sobre a NA de células positivas para Pax 1. *** ($p < 0,0001$) quando comparado ao controle.

A proteína Pax 9 foi imunolocalizada no esclerótomo dos embriões em E4 controle e tratados. A expressão foi verificada no

núcleo das células mesenquimais. O grupo Hcy apresentou a mais baixa NA de células positivas para Pax 9 ($115,36 \pm 8,88 \text{ mm}^2$), quando comparado ao grupo controle ($p < 0,0001$). A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo do tratamento com Hcy ($F_{(1,356)} = 70,07$; $p < 0,0001$), indicando que a Hcy reduziu a expressão da proteína e que o pré-tratamento com AF não preveniu este efeito em E4 (Fig. 30).

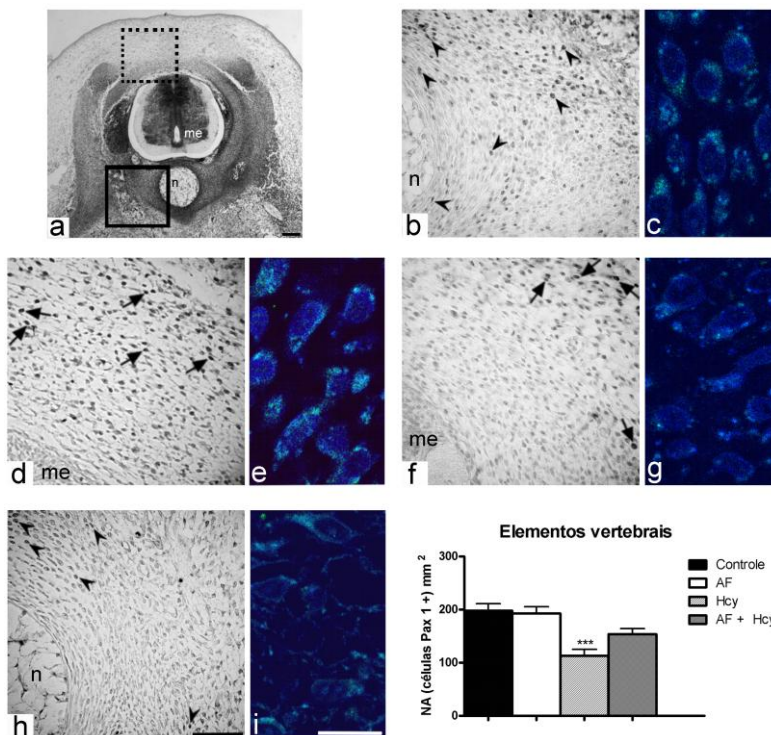


Figura 29. Cortes transversais de embriões em E6 submetidos à imunohistoquímica com anticorpo anti-Pax 1 exibindo células positivas nos corpos vertebrais (b – c, h – i) e nos arcos vertebrais (d – e, f – g) em desenvolvimento. Corte transversal indicando as regiões visualizadas em b e h (quadrado sólido) e em d e f (quadrado pontilhado) e em. Embriões controle (b – c), dos grupos AF (d – e), Hcy (f – g) e AF + Hcy (h – i). As imagens de microscopia confocal (c, e, g, i) revelam a localização nuclear da proteína (verde). Todos os núcleos foram corados com DAPI (azul). *me*, medula espinhal; *n*, notocorda. Escalas em a = 100 μm ; em b, d, f, h = 50 μm ; em c, e, g, i = 10 μm . O gráfico apresenta o efeito da Hcy sobre a NA de células positivas para Pax 1. *** ($p < 0,0001$) quando comparado ao controle.

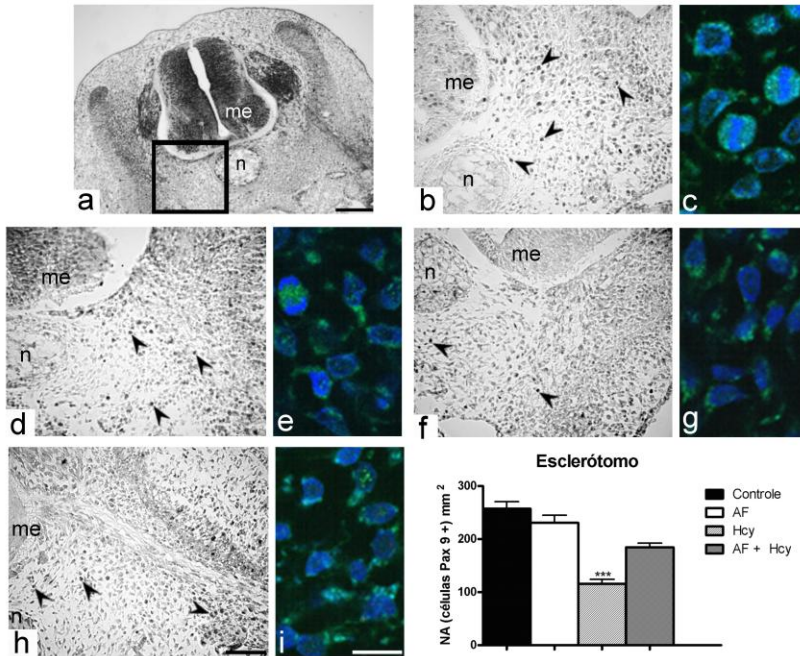


Figura 30. Cortes transversais de embriões em E4 submetidos à imunohistoquímica com anticorpo anti-Pax 9 exibindo células positivas no esclerótomo. Corte tranversal indicando a região visualizada em **b**, **d**, **f** e **h**. Embriões controle (**b – c**), dos grupos AF (**d – e**), Hcy (**f – g**) e AF + Hcy (**h – i**). As imagens de microscopia confocal (**c**, **e**, **g**, **i**) revelam a localização nuclear da proteína (verde). Todos os núcleos foram corados com DAPI (azul). *me*, medula espinhal; *n*, notocorda. Escalas em **a** = 100 μ m; em **b**, **d**, **f**, **h** = 50 μ m; em **c**, **e**, **g**, **i** = 10 μ m. O gráfico apresenta o efeito da Hcy sobre a NA de células positivas para Pax 9. *** ($p < 0,0001$) quando comparado ao controle.

Nos embriões em E6, células positivas para Pax 9 foram encontradas nos elementos vertebrais em desenvolvimento de todos os embriões. Novamente, a proteína estava presente no núcleo das células mesenquimais e a menor NA de células expressando Pax 9 foi encontrada nos embriões do grupo Hcy ($100,84 \pm 13,44 \text{ mm}^2$), diferindo significativamente do grupo controle ($p < 0,0001$). Mais uma vez, o pré-tratamento com AF não preveniu este efeito, pois a ANOVA de duas vias não indicou efeito significativo da interação AF x Hcy ($F_{(1,356)} = 3,71$; $p > 0,05$) (Fig. 31).

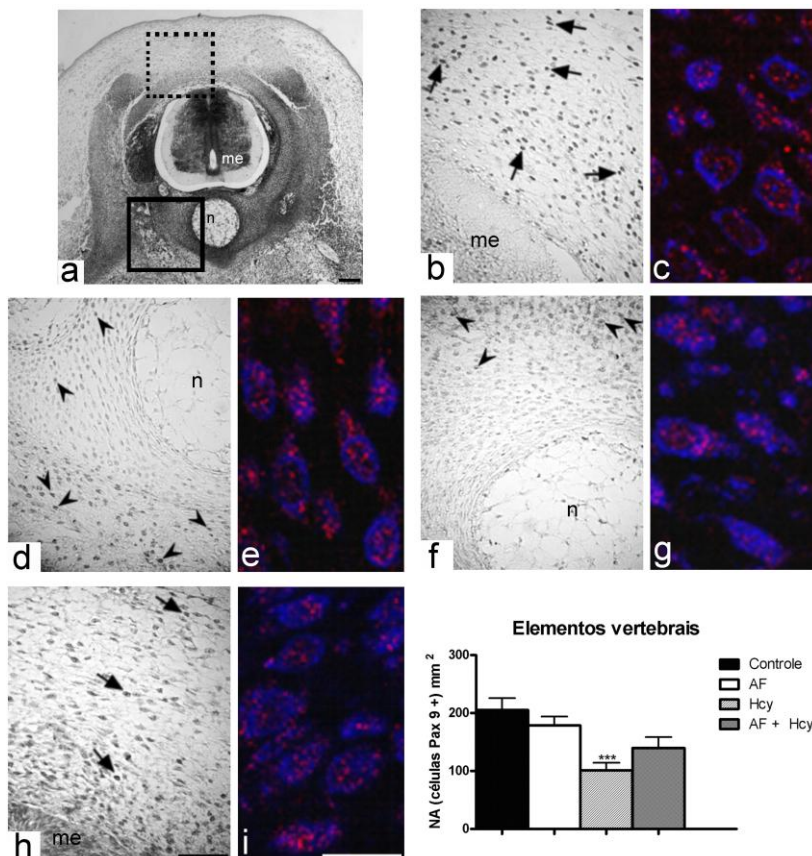


Figura 31. Cortes transversais de embriões em E6 submetidos à imuno-histoquímica com anticorpo anti-Pax 9 exibindo células positivas nos arcos vertebrais (b – c, h – i) e corpos vertebrais (d – e, f – g) em desenvolvimento. Corte tranversal indicando as regiões visualizadas em b e h (quadrado pontilhado) e em d e f (quadrado sólido). Embriões controle (b – c), dos grupos AF (d – e), Hcy (f – g) e AF + Hcy (h – i). As imagens de microscopia confocal (c, e, g, i) revelam a localização nuclear da proteína (vermelho). Todos os núcleos foram corados com DAPI (azul). *me*, medula espinhal; *n*, notocorda. Escalas em a = 100 µm; em b, d, f, h = 50 µm; em c, e, g, i = 10 µm. O gráfico apresenta o efeito da Hcy sobre a NA de células positivas para Pax 9. *** ($p < 0,0001$) quando comparado ao controle.

A proteína Sox 9 foi localizada por imuno-histoquímica no esclerótomo dos embriões em E4 controle e tratados. A proteína estava

presente no núcleo das células mesenquimais. A menor NA de células positivas para Sox 9 foi observada nos embriões do grupo Hcy ($135,99 \pm 10,30 \text{ mm}^2$), diferindo significativamente do grupo controle ($p < 0,0001$). A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo do tratamento com Hcy ($F_{(1,356)} = 65,63$; $p < 0,0001$), indicando que a Hcy induziu redução significativa na expressão da proteína e que o pré-tratamento com AF não preveniu este efeito em E4 (Fig. 32).

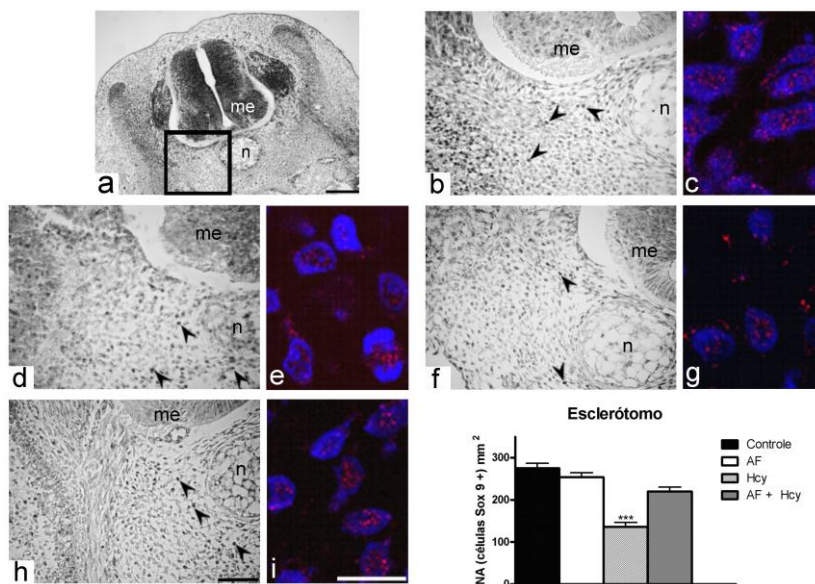


Figura 32. Cortes transversais de embriões em E4 submetidos à imunohistoquímica com anticorpo anti-Sox 9 exibindo células positivas no esclerótomo. Corte transversal indicando a região visualizada em **b**, **d**, **f** e **h**. Embriões controle (**b – c**), dos grupos AF (**d – e**), Hcy (**f – g**) e AF + Hcy (**h – i**). As imagens de microscopia confocal (**c**, **e**, **g**, **i**) revelam a localização nuclear da proteína (vermelho). Todos os núcleos foram corados com DAPI (azul). *me*, medula espinhal; *n*, notocorda. Escalas em **a** = 100 μm ; em **b**, **d**, **f**, **h** = 50 μm ; em **c**, **e**, **g**, **i** = 10 μm . O gráfico apresenta o efeito da Hcy sobre a NA de células positivas para Sox 9. *** ($p < 0,0001$) quando comparado ao controle.

A expressão de Sox 9 também foi encontrada nas células mesenquimais dos elementos vertebrais em desenvolvimento, bem como no mesênquima localizado próximo a estas estruturas dos embriões em

E6 controle e tratados. A marcação para Sox 9 foi verificada no núcleo das células. Os embriões do grupo Hcy apresentaram a mais baixa NA de células positivas para Sox 9 ($194,81 \pm 13,04 \text{ mm}^2$), a qual diferiu significativamente do grupo controle ($p < 0,0001$). A ANOVA de duas vias indicou efeito significativo da interação AF x Hcy ($F_{(1,356)} = 7,02$; $p < 0,05$) (Fig. 33). Portanto, o tratamento com Hcy reduziu significativamente o número de células positivas para Sox 9 no mesênquima dos embriões e o pré-tratamento com AF preveniu este efeito em E6.

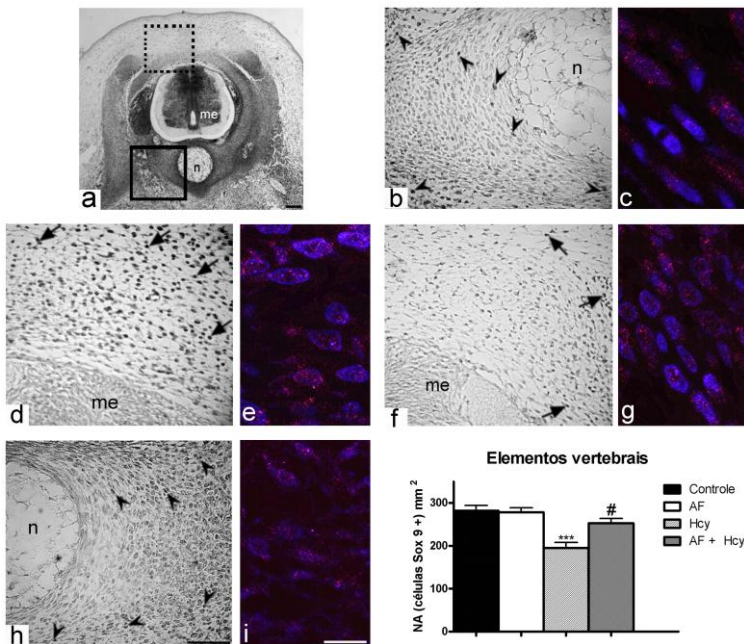


Figura 33. Cortes transversais de embriões em E6 submetidos à imunohistoquímica com anticorpo anti-Sox 9 exibindo células positivas nos corpos vertebrais (b – c, h – i) e arcos vertebrais (d – e, f – g) em desenvolvimento. Corte transversal indicando as regiões visualizadas em b e h (quadrado sólido) e em d e f (quadrado pontilhado). Embriões controle (b – c), dos grupos AF (d – e), Hcy (f – g) e AF + Hcy (h – i). As imagens de microscopia confocal (c, e, g, i) revelaram a localização nuclear da proteína (vermelho). Todos os núcleos foram corados com DAPI (azul). *me*, medula espinhal; *n*, notocorda. Escalas em a = 100 μm ; em b, d, f, h = 50 μm ; em c, e, g, i = 10 μm . O gráfico apresenta o efeito da Hcy sobre a NA de células positivas para Sox 9. *** ($p < 0,0001$) quando comparado ao controle. # representa o efeito protetor do AF.

5 DISCUSSÃO

A eficácia da ingestão materna de AF, durante o período periconcepcional, na prevenção dos DTN é um fenômeno bem descrito na literatura (SMITHELLS; SHEPPARD; SCHORAH, 1976; MRC *Vitamin Study Research Group*, 1991; KALTER, 2003; CHRISTIANSON; HOWSON; MODELL, 2006; VAN MIL; OOSTERBAAN; STEEGERS-THEUNISSEN, 2010). Desde que foi descoberta que a deficiência de AF leva à hiperhomocisteinemia, condição que corresponde ao aumento da concentração de Hcy no plasma sanguíneo, esta tem sido apontada entre as etiologias mais importantes de DTN em humanos (STEEGERS-THEUNISSEN et al., 1995; KIRKE; MILLS; SCOTT, 1997; HAGUE, 2003; BLOM; SMULDERS, 2011).

Nesta linha, estudos experimentais realizados em embriões de camundongo e galinha, demonstraram o papel teratogênico da Hcy, evidenciando a incidência não só de DTN induzidos pela Hcy, mas também de outras anomalias congênitas como defeitos cardíacos, na formação da face, olhos, membros, além de distúrbios na formação de vasos sanguíneos (ROSENQUIST; RATASHAK; SELHUB, 1996; LIMPACH et al., 2000; EPELDEGUI et al., 2002; DE LAS CASAS et al., 2003; BOOT et al., 2004; TIERNEY et al., 2004; BROUNS et al., 2005; LATACHA; ROSENQUIST, 2005; DUNLEVY et al., 2006; HAN et al., 2009; KOBUS; NAZARI; MÜLLER, 2009; MALDONADO et al., 2011; OOSTERBAAN; STEEGERS; URSEM, 2012). Estudos epidemiológicos também confirmam o efeito protetor do AF sobre estas e outras anomalias congênitas (BOTTO; OLNEY; ERICKSON, 2004; GOH et al., 2006; CZEIZEL, 2009).

Entretanto, apesar do amplo conhecimento existente acerca da relação entre o desequilíbrio AF / Hcy materno e a ocorrência de DTN, os mecanismos celulares e moleculares através dos quais o AF confere proteção aos embriões, bem como os efeitos nocivos da Hcy sobre os mecanismos celulares e moleculares da embriogênese, ainda não foram elucidados.

Os resultados apresentados neste trabalho de tese revelaram que o tratamento *in ovo* com Hcy reduz a sobrevivência dos embriões e induz a ocorrência de diferentes categorias de DTN, que incluem importantes modificações na morfogênese da medula espinhal e do esqueleto axial. As alterações morfológicas induzidas pela Hcy foram acompanhadas de efeitos celulares e moleculares como: (1) estresse celular e oxidativo, revelados pelas análises da expressão das proteínas

HSP 70 induzível e Bcl 2, e pela mensuração dos níveis de carbonilação de proteínas e de NPSH; (2) alterações no ciclo celular evidenciadas pela redução do número de células em proliferação e pela ocorrência de danos no DNA evidenciados pela presença do antígeno PCNA; (3) modificações no padrão de diferenciação neuronal verificadas através das análises de expressão das proteínas p 53 e β -tubulina III; (4) e modificações no padrão de diferenciação do esqueleto axial evidenciadas pela redução na expressão gênica e / ou proteica de Pax 1/9 e Sox 9.

5.1 A HCY REDUZ A SOBREVIVÊNCIA DOS EMBRIÕES E ALTERA O PADRÃO DE MORFOGÊNESE DA MEDULA ESPINHAL E DO ESQUELETO AXIAL

De acordo com estudos anteriores, que investigaram o efeito da Hcy sobre a sobrevivência de diferentes modelos animais no período embrionário (VAN AERTS et al., 1993; ROSENQUIST; RATASHAK; SELHUB, 1996; LIMPACH et al., 2000; EPELDEGUI et al., 2002; MILLER et al., 2003), nossos dados revelaram que o tratamento com Hcy reduz a taxa de sobrevivência dos embriões. No presente trabalho de tese, a administração da dose de 20 μ mol de D,L-Hcy em E2 reduziu significativamente a sobrevivência para cerca de 25% em E6, revelando o efeito letal da Hcy sobre os embriões. Adicionalmente, em experimentos piloto, verificou-se que nenhum dos embriões tratados com a dose de 40 μ mol de D,L-Hcy permaneceu vivo até E4 (dados não apresentados).

A literatura revela que o tratamento com Hcy, nas suas diferentes apresentações químicas, diminui a sobrevivência dos embriões de galinha. Entretanto, os resultados acerca das taxas de sobrevivência são variáveis, como ilustrado na Tabela 4. Desta forma, muitas vezes é difícil estabelecer comparações entre estes dados, uma vez que diversos fatores precisam ser considerados nesta análise, entre eles: a estrutura química da Hcy utilizada, a idade embrionária de administração da Hcy, a duração entre a idade de exposição e a análise dos embriões, e o método de tratamento empregado. Independentemente da variabilidade de resultados e metodologias, sabe-se que a Hcy reduz de maneira significativa a sobrevivência dos embriões de galinha e que este efeito pode ser considerado dose-dependente (ROSENQUIST; RATASHAK; SELHUB, 1996; LIMPACH et al., 2000; EPELDEGUI et al., 2002; MILLER et al., 2003).

Tabela 4. Dados de sobrevivência de embriões de galinha expostos à Hcy.

<i>Estrutura Química</i>	<i>Dose (μmol)</i>	<i>Método de exposição</i>	<i>Idade de exposição (h)</i>	<i>Idade de análise (h/dias)</i>	<i>TS (%)</i>	<i>Ref.</i>
D,L-Hcy	5 – 7.5	sobre a	0, 24 e 48	53 h	$\geq 85\%$	1
	10	membrana interna da casca *			$\geq 85\%$	
	15	casca *			$\leq 25\%$	
	5	injeção na câmara de ar **	0, 24 e 48	11 dias	$\sim 50\%$	2
	10				$\sim 30\%$	
	15				$\sim 40\%$	
L-Hcy tiolactona	3.5	sobre a	72	6 dias	$\sim 50\%$	3
	4.5	membrana interna da casca *			$\sim 40\%$	
	5	casca *			$< 20\%$	
	10				100%	
	20	sobre o embrião *	29 – 33	3 – 4 ^{1/2} dias	$\sim 75\%$	4
	40				$\sim 55\%$	

* estes métodos utilizam micropipeta. ** este método utiliza seringa de insulina. TS, taxa de sobrevivência; Ref., referências. ¹ROSENQUIST; RATASHAK; SELHUB (1996); ²MILLER et al. (2003); ³LIMPACH et al. (2000); ⁴EPELDEGUI et al. (2002). Fonte: modificado de MÜLLER; KOBUS; NAZARI, 2013.

Os resultados demonstraram que a sobrevivência dos embriões foi reduzida para cerca de 36% em E3, chegando a 25% ao final do período de incubação em E6, evidenciando que a queda mais expressiva na taxa de sobrevivência ocorreu 24 horas após a exposição dos embriões à Hcy. Um possível mecanismo que pode explicar este efeito letal da Hcy é o já conhecido efeito desta substância sobre a vascularização extra-embriônica dos embriões de ave.

De acordo com Latacha e Rosenquist (2005) e Oosterbaan et al. (2012), a exposição dos embriões de galinha à Hcy no início do desenvolvimento é extremamente tóxica, por impedir o desenvolvimento da vascularização extra-embriônica que irá garantir a sobrevivência e o desenvolvimento normal destes embriões. Segundo estes autores, um dos mecanismos responsáveis por esse efeito seria a redução na expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF, do inglês, *vascular endothelial growth factor*), o qual é necessário à formação dos vasos. De fato, neste trabalho de tese, foi observada desde uma importante redução até a ausência completa da vascularização extra-

embrionária nos embriões que não sobreviveram após as 24 horas de tratamento com Hcy (dados não apresentados).

Estudos experimentais utilizando embriões de galinha expostos à Hcy confirmam a relação existente entre a hiperhomocisteinemia e a incidência de DTN, embora as frequências destes defeitos sejam variáveis e poucos estudos tenham feito uma descrição e análise morfológica detalhada destas anomalias (ROSENQUIST; RATASHAK; SELHUB, 1996; ROSENQUIST; SCHNEIDER; MONAGHAN, 1999; EPELDEGUI et al., 2002; DE LAS CASAS et al., 2003; KOBUS; NAZARI; MÜLLER, 2009; MÜLLER; KOBUS; NAZARI, 2013). Aqui, o tratamento com uma dose única de 20 μmol de D,L-Hcy induziu a incidência de diferentes categorias de DTN nos embriões de galinha, incluindo espinha bífida, espinha bífida oculta e regressão caudal. Embora os embriões do grupo AF + Hcy também tenham apresentado DTN, exibindo modificações na morfologia da medula espinhal e do tecido mesenquimal, provavelmente, esse efeito foi induzido pela Hcy, uma vez que os embriões tratados somente com AF exibiram morfologia normal, semelhante aos embriões do grupo controle.

Epeldegui et al. (2002) expuseram embriões de galinha com 30 horas de incubação a dose de 20 μmol de L-Hcy tiolactona, registrando uma taxa de incidência de DTN de aproximadamente 27%. O estudo de Rosenquist, Ratashak e Selhub (1996) revelou a frequência de cerca de 35% de DTN na medula espinhal após a exposição dos embriões a dose 15 μmol de L-Hcy tiolactona. Neste trabalho de tese, o tratamento dos embriões de galinha com a dose de 20 μmol de D,L-Hcy induziu DTN do tipo espinha bífida, espinha bífida oculta e regressão caudal. Nos embriões em E4, a espinha bífida foi a categoria de DTN observada com maior frequência; enquanto nos embriões em E6, foi a regressão caudal. A incidência de regressão caudal após a exposição dos embriões à Hcy foi registrada pela primeira vez neste estudo. E em geral, os estudos de outros autores consideram somente os DTN do tipo espinha bífida e, algumas vezes, os DTN do tipo espinha bífida oculta, para estabelecer estas frequências.

As diferentes categorias de DTN observados na medula espinhal dos embriões nos permitem especular que a Hcy pode afetar os processos de neurulação primária e secundária independentemente, bem como na região de sobreposição presente nos embriões de galinha. Essa observação baseia-se principalmente na análise microscópica da organização do canal neural e das camadas celulares da medula espinhal embrionária. Por exemplo, na espinha bífida, o tecido neuroepitelial está exposto como resultado da falha na fusão e adesão das pregas

neurais na linha média dorsal do embrião durante a neurulação primária. Nesta situação, foi observada redução na expressão da NCAM na medula espinhal (KOBUS; NAZARI; MÜLLER, 2009), que pode ter contribuído para a gênese deste tipo de DTN. Por outro lado, a persistência de múltiplas neuroceles e de canal neural duplo na medula espinhal dos embriões com espinha bífida oculta indica que houve falha durante o processo de coalescência das múltiplas neuroceles formadas no TN durante o processo de neurulação secundária (SCHOENWOLF, 1979; SCHOENWOLF; DELONGO, 1980). Além disso, o DTN do tipo regressão caudal observado aqui, confirma a interferência da Hcy sobre a neurulação secundária, uma vez que esta anomalia ocorre na região do botão caudal, que é responsável por originar a porção final da medula espinhal, que é formada inteiramente pelo processo de neurulação secundária (COLAS; SCHOENWOLF, 2001).

Vale lembrar que as anormalidades na medula espinhal foram acompanhadas de alterações também no desenvolvimento do tecido mesenquimal. Em E4, as análises dos embriões tratados com Hcy revelaram modificações na distribuição das células do esclerótomo e, posteriormente, em E6, evidenciaram graves erros no desenvolvimento dos elementos vertebrais, principalmente dos arcos vertebrais. As alterações na morfogênese do esqueleto axial observadas aqui constituem um dado interessante, uma vez que defeitos no esqueleto axial sempre acompanham os DTN. Por esse motivo, as alterações na morfogênese do esqueleto axial são consideradas nas hipóteses que procuram explicar as causas dos DTN.

Uma destas hipóteses segue a teoria de desordem no processo de neurulação, onde alterações nos mecanismos celulares envolvidos na formação do TN poderiam também estar envolvidas com os defeitos no esqueleto axial. Outra hipótese sugere que a anomalia do sistema nervoso é sempre acompanhada de uma alteração óssea nos casos de DTN, não estando ainda estabelecido se há um defeito primário, ou se as causas genéticas e/ou ambientais interferem simultaneamente no desenvolvimento dos tecidos neural e mesenquimal (SUZUKI, 2007). Neste estudo, conforme discutiremos mais adiante, as evidências obtidas desde a análise morfológica inicial, confirmam a hipótese de que o desequilíbrio entre os níveis de AF e Hcy é capaz de modificar o desenvolvimento de ambos os tecidos.

Embora os DTN identificados nesse trabalho tenham sido organizados em categorias, constataram-se em uma mesma categoria diferentes graus de comprometimento dos tecidos neural e mesenquimal. No entanto, ao contrário do tecido neuroepitelial, o tecido mesenquimal

foi comprometido em todas as categorias de DTN. Alterações do tecido mesenquimal e, conseqüentemente na morfogênese do esqueleto axial, podem contribuir de forma significativa para a gênese dos DTN na medula espinhal. Dessa forma, os DTN nem sempre são decorrentes de falhas no processo de neurulação, uma vez que o próprio termo espinha bífida denota uma alteração na formação das vértebras. Em nosso estudo foi evidente em todas as categorias de DTN a presença de alterações de vértebra, o que pode ter sido a causa primária das anomalias observadas.

5.2 A HCY INDUZ ESTRESSE CELULAR E OXIDATIVO NOS TECIDOS NEURAL E MESENQUIMAL DOS EMBRIÕES

Através da análise imuno-histoquímica, foi demonstrado neste trabalho, que a exposição dos embriões à Hcy provocou aumento na expressão da proteína HSP 70 induzível nos tecidos neurais e mesenquimais dos embriões de galinha em E4. Esse aumento foi verificado tanto nos tecidos dos embriões com morfologia normal, quanto naqueles que apresentaram espinha bífida. Este resultado é importante, uma vez que a expressão de HSP 70 é reconhecidamente um indicativo de estresse celular e tem sido relacionada à ocorrência de anomalias congênitas como fendas lábio-palatinas e DTN, e pode, portanto, possuir um papel significativo na patogênese destas anomalias (CHILD et al., 2006).

Adicionalmente, existe uma relação entre a expressão de HSP 70 e a ocorrência de estresse oxidativo, sendo esta proteína capaz de aumentar a atividade de enzimas antioxidantes como a glutationa peroxidase e a glutationa redutase, atuando como um agente citoprotetor (ARYA; MALLIK; LAKHOTIA, 2007; GUO et al., 2007). Entretanto, apesar do aumento da expressão de HSP 70 observado nos tecidos neural e mesenquimal dos embriões tratados com Hcy, foi verificada a condição de estresse oxidativo nos tecidos destes embriões. A análise dos parâmetros de estresse oxidativo revelou que a Hcy induziu esta condição nos tecidos embrionários, aumentando cerca de 15 vezes os níveis de carbonilação de proteínas em E4. Os níveis de defesas antioxidantes, avaliados através da mensuração de NPSH, reduziram, embora em menor proporção, e esta redução também foi significativa.

A indução de estresse oxidativo pela Hcy já foi demonstrada principalmente em células endoteliais, por meio da geração de ERO como o H_2O_2 , e pela diminuição da atividade da enzima glutationa peroxidase (UPCHURCH et al., 1997; HANDY; ZHANG;

LOSCALZO, 2005). A relação do estresse oxidativo com a ocorrência de anomalias congênitas induzidas pela deficiência de AF e/ou pela hiperhomocisteinemia, como fendas lábio-palatinas, defeitos cardíacos e DTN, foi estabelecida em estudos epidemiológicos (MARTIN et al., 2004; HOBBS et al., 2005; ZHAO et al., 2006), sendo escassa a literatura experimental sobre o assunto (KNOTT et al., 2003; WEIL et al., 2004; NACHMANY et al., 2006), o que torna difícil a discussão destes dados.

Existe uma relação bem estabelecida entre níveis elevados de Hcy, a deficiência de AF e indução de estresse oxidativo (MALINOWSKA; KOLODZIEJCZYK; OLAS, 2012). Estudos sobre a ocorrência de doenças cardiovasculares revelaram que a suplementação com AF diminui os níveis plasmáticos de Hcy, responsável pela geração de ERO, e aumenta os níveis de glutatona (HUNTER-LAVIN et al., 2004). Nossos resultados demonstraram que a Hcy reduziu de forma significativa os níveis de glutatona nos embriões em E4, porém, o pré-tratamento com AF não preveniu este efeito. Em contrapartida, o efeito da Hcy sobre a carbonilação de proteínas, que leva a modificações irreversíveis na estrutura das proteínas e pode levar a sua inativação (DALLE-DONNE et al., 2006), foi muito mais significativo e foi prevenido pelo AF. Semelhante aos nossos resultados, o estudo de Koz et al. (2010) avaliou a indução de estresse oxidativo no encéfalo de ratos recém-nascidos de fêmeas com hiperhomocisteinemia e encontrou aumento expressivo da peroxidação lipídica, outro parâmetro bioquímico utilizado para avaliar se há aumento de ERO. Porém, a depleção nos níveis de defesas antioxidantes, no caso, da glutatona, não foi significativa.

O desequilíbrio da homeostase do estado de oxi-redução celular pode induzir o atraso no desenvolvimento, anomalias congênitas e até levar a morte dos embriões (THOMPSON; AL-HASAN, 2012). Isso porque, além desta homeostase de certa forma ser responsável por controlar o destino das células do embrião, a atividade das enzimas antioxidantes é muito menor nos embriões em comparação com os organismos adultos, o que faz os organismos muito mais suscetíveis aos danos decorrentes do estresse oxidativo durante o curso do seu desenvolvimento (UFER; WANG, 2011).

Modificações no estado de oxi-redução celular podem ter importantes implicações durante o desenvolvimento embrionário. Isso porque o balanço entre os níveis de ERO e de antioxidantes é extremamente regulado durante os diferentes estágios de desenvolvimento dos organismos, de forma que flutuações no estado de

oxi-redução levam a modificações no destino das células (HANSEN, 2006). Sabe-se que o estado de redução é importante para a proliferação, a oxidação leve leva à diferenciação e a alta oxidação leva à apoptose das células embrionárias (DENNERY, 2010). Nossos resultados apontaram para alterações na proliferação e diferenciação dos tecidos neurais e mesenquimais dos embriões tratados com Hcy, que podem ter tido como causa, além de outros fatores que serão discutidos mais adiante, o desequilíbrio do estado de oxi-redução celular verificado nos tecidos destes embriões.

Outro dado relevante deste trabalho foi o aumento da expressão da proteína Bcl 2 nos tecidos dos embriões tratados com Hcy. A Bcl 2 é uma proteína presente na mitocôndria que protege as células de diversas condições de estresse (LEE et al., 2001). Seu papel na preservação da integridade das membranas mitocondriais, impedindo a liberação do citocromo c e evitando assim a ocorrência de apoptose via ativação de caspases é um fenômeno bem descrito (KOWALTOWSKI; FISKUM, 2005; SUSNOW et al., 2009). Além desta importante função, a Bcl 2 participa também do mecanismo antioxidante, protegendo as células do estresse oxidativo (SAGARA et al., 1998; KAUFMANN; BICKFORD; TAGLIALATELA, 2001; CHEN; DUNIGAN; DICKMAN, 2003).

Já foi demonstrado que em células que super-expressam Bcl 2, ocorre aumento nos níveis de glutatona, aumentando à resistência das células à apoptose (RIMPLER et al., 1999; LEE et al., 2001). Além disso, foi demonstrado que a Bcl 2 pode regular a quantidade de glutatona presente nas mitocôndrias dos neurônios, fornecendo uma fonte altamente localizada de glutatona na membrana mitocondrial, por estabelecer uma ligação direta à proteína, diminuindo a susceptibilidade das proteínas da membrana mitocondrial à oxidação, protegendo a organela (ZIMMERMANN et al., 2007). Como os embriões expostos à Hcy exibiram aumento na expressão de Bcl 2, estes efeitos antioxidantes da Bcl 2 podem explicar, em parte, a queda não tão significativa dos níveis de glutatona verificada nestes embriões através da mensuração da quantidade de NPSH.

5.3 A HCY ALTERA A PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR E A DIFERENCIAÇÃO NA MEDULA ESPINHAL E NO ESQUELETO AXIAL EM DESENVOLVIMENTO

O acúmulo de Hcy decorrente da deficiência de AF pode comprometer a síntese de ácidos nucleicos, que é necessária à

manutenção da proliferação celular intensa, bem como à síntese e expressão de genes e proteínas que ocorre durante a embriogênese.

Este trabalho de tese investigou o efeito da Hcy sobre o ciclo celular por meio das análises imuno-histoquímicas com os anticorpos anti-fosfo-histona H3 e PCNA. Foi verificado que o tratamento com a dose de 20 μmol de D,L-Hcy reduziu a expressão da proteína fosfo-histona H3 nos tecidos neurais e mesenquimais, indicando que a taxa de proliferação celular nestes tecidos foi reduzida pela Hcy em ambas as idades de análise – E4 e E6. Este mesmo efeito tinha sido verificado em estudo anterior, após o tratamento dos embriões em E1 com a dose de 10 μmol de D,L-Hcy (KOBUS; NAZARI; MÜLLER, 2009).

A redução da proliferação celular em tecidos neurais durante o desenvolvimento do sistema nervoso foi reportada anteriormente por Craciunescu et al. (2004). Estes autores demonstraram que a deficiência de AF leva à redução da proliferação e ao aumento da apoptose em progenitores neurais do encéfalo de fetos de camundongos, utilizando como marcadores a fosfo-histona H3 e a incorporação de bromodioxiuridina (BrdU). Outros estudos demonstraram *in vitro*, através da análise de crescimento das culturas e da incorporação de BrdU, que o tratamento com Hcy modifica o padrão de proliferação e diferenciação de células neuroepiteliais e da crista neural em embriões de ave (BOOT et al., 2003; TIERNEY et al., 2004).

A redução da proliferação nos tecidos mesenquimais, em decorrência da exposição à Hcy, foi também avaliada. Van Aerts et al. (1993) evidenciaram a redução significativa na densidade celular do mesênquima cefálico de embriões após à exposição à L-Hcy *in vitro*. Dunlevy et al. (2006) avaliaram a densidade celular no mesênquima cefálico de embriões de camundongo, após exposição *in vitro* a inibidores do ciclo de metilação, o que levou ao aumento dos níveis de SAH nas culturas embrionárias, caracterizando, portanto, um quadro de hiperhomocisteinemia. Esta redução na densidade celular foi associada à ocorrência de anencefalia nestes embriões.

Neste estudo, foi avaliada separadamente, a expressão da proteína fosfo-histona H3 nos tecidos neurais e mesenquimais dos embriões com DTN. Esta análise revelou que a redução na proliferação celular induzida pela Hcy, principalmente no mesênquima, pode estar relacionada à gênese dos DTN na medula espinhal. Isso porque, em todas as categorias de DTN registradas, desde a espinha bífida à regressão caudal, foi verificada redução significativa no número de células em proliferação no tecido mesenquimal – esclerótomo e elementos vertebrais em desenvolvimento. Vale lembrar que os

embriões com DTN apresentaram modificações importantes na morfogênese do esqueleto axial, que podem, entre outros fatores que serão discutidos mais adiante, ser resultado desta redução significativa na proliferação celular durante o desenvolvimento. Adicionalmente, em E6, o pré-tratamento com AF não preveniu a redução no número de células em proliferação induzida pela Hcy no mesênquima dos embriões, o que pode explicar, em parte, a elevada incidência de regressão caudal, DTN acompanhado da ausência dos elementos vertebrais, verificada nos embriões em E6 dos grupos Hcy e AF + Hcy.

Para a marcação da PCNA, foi observado o efeito oposto: a Hcy levou ao aumento da expressão deste antígeno na medula espinhal em E4 e E6, e no esclerótomo dos embriões em E4. Células marcadas com PCNA foram localizadas principalmente na camada endimária da medula espinhal, enquanto no esclerótomo, células expressando PCNA foram dispersas por toda a estrutura. Este aumento das células marcadas com PCNA pode ser um indicativo de atraso no ciclo celular, que pode justificar a redução na proliferação observada através da marcação com fosfo-histona H3. Adicionalmente, este atraso no ciclo celular pode se dever à ocorrência de dano ao DNA destas células, uma vez que o PCNA está envolvido tanto no controle da progressão do ciclo celular, quanto na execução de mecanismos de reparo (KELMAN, 1997; MAGA; HUBSCHER, 2003; SCOVASSI; PROSPERI, 2006; ZHANG et al., 2011). Tierney et al. (2004) demonstraram que o tratamento das células progenitoras da crista neural com Hcy reduz a proliferação por inibir a progressão do ciclo celular destes progenitores ou a entrada na fase de síntese do ciclo celular. Portanto, o aumento da expressão de PCNA nas células mesenquimais e neurais dos embriões tratados com Hcy é um indicativo da presença de danos no DNA, que podem ter sido provocados de forma direta, por todos os efeitos conhecidos da Hcy sobre a síntese e reparo do DNA; ou indiretamente, devido à condição de estresse oxidativo que também foi observada nestes tecidos embrionários, e pode, igualmente, causar danos ao DNA das células.

A indução de dano ao DNA leva à parada do ciclo celular para recrutamento de vias de reparo da molécula. Por esse motivo, alterações no ciclo celular podem reduzir a taxa de proliferação num determinado estágio do desenvolvimento, e ter como consequência o atraso no mecanismo de diferenciação das células. Neste trabalho, foi verificado que o tratamento com Hcy reduziu a expressão de β -tubulina III e p 53 na região ventral da camada do manto na medula espinhal em ambas as idades embrionárias, onde ocorre a diferenciação dos neurônios. A proteína tubulina está presente nos microtúbulos citoplasmáticos, e a

isoforma β -tubulina III é típica de neurônios, sendo considerada um marcador específico destas células (ROSKAMS; CAI; RONNETT, 1998). Portanto, a redução na sua expressão indica redução no número de neurônios. A proteína p 53, por sua vez, exerce um papel importante durante o desenvolvimento do sistema nervoso, dirigindo os neurônios a um fenótipo específico durante o desenvolvimento (SOLA et al., 2011; VUONG; CONLEY; AL-UBAIDI, 2012). As principais funções da p 53 durante o desenvolvimento do sistema nervoso incluem: a indução de sinais anti-proliferativos nos neurônios em diferenciação, a ativação de receptores para fatores de crescimento como os NGFs e a indução de apoptose que ocorre durante a maturação final dos circuitos neurais (EIZENBERG et al., 1996; ZHANG; YAN; CHEN, 2006; ARMESILLA-DIAZ et al., 2009; QIN et al., 2009). Através da análise imuno-histoquímica em microscopia confocal, foi verificada a colocalização das proteínas β -tubulina III e p 53 no citoplasma das células, o que era esperado, já que durante a diferenciação neuronal, a proteína p 53 é translocada para o núcleo, porém em células já diferenciadas, ela é expressa principalmente no citoplasma (TEDESCHI; DI GIOVANNI, 2009; VUONG; CONLEY; AL-UBAIDI, 2012). A expressão da proteína foi observada também na camada marginal da medula espinhal, região onde estão localizados os axônios, o que também era esperado, uma vez que altos níveis de expressão de p 53 são encontrados nos axônios em crescimento. O tratamento com Hcy levou à redução na expressão de p 53 em ambas as camadas medulares – manto e marginal – evidenciando seu efeito nocivo sobre a diferenciação dos neurônios na medula espinhal, uma vez que a inibição da p 53 neste estágio de maturação neuronal pode levar ao colapso dos cones de crescimento axonais (QIN et al., 2009).

Esses resultados corroboram dados anteriores, que evidenciaram alterações na organização das camadas celulares da medula espinhal após à exposição dos embriões à dose de 10 μ mol de D,L-Hcy (KOBUS; NAZARI; MÜLLER, 2009). Foi observada redução na espessura das camadas do manto e marginal da medula espinhal de embriões em E4, a qual pode estar relacionada à redução no número de neurônios diferenciados, tendo em vista os resultados obtidos no presente trabalho, através da análise das marcações com p 53 e β -tubulina III na medula espinhal dos embriões em E4 e E6, após exposição ao dobro da dose de D,L-Hcy. Neste sentido, alterações na diferenciação de células da crista neural após exposição à Hcy em cultura foram reportadas anteriormente por Boot et al. (2003). Estes autores não observaram nenhuma diferenciação das células da crista

neural em tecido nervoso após a exposição à Hcy, que foi evidenciada pela ausência de formação de axônios nas culturas celulares. Além da redução na expressão das proteínas p 53 e β -tubulina III na medula espinhal dos embriões tratados com Hcy, foi observado que, naqueles embriões com espinha bífida, a localização da expressão destas proteínas também se alterou, de forma que células próximas à camada endimária exibiram marcação positiva para ambas as proteínas (Figs. 25 e 26). Este também é um resultado importante, pois considerando que logo após o fechamento do TN, as células neuroepiteliais iniciam a saída do ciclo celular e logo entram no estágio de diferenciação neural, o equilíbrio adequado entre a proliferação e o início da diferenciação neural pode ser crítico para o fechamento do TN.

A diferenciação do tecido mesenquimal, necessária à morfogênese do esqueleto axial também foi modificada pelo tratamento com Hcy. Considerando que o desenvolvimento das vértebras é controlado por um número limitado de genes, incluindo Pax 1/9 e Sox 9 (BRENT; TABIN, 2002; MONSORO-BURQ, 2005; HATTORI et al., 2010), o padrão de expressão dos genes e/ou dos produtos destes genes foi avaliado por meio das análises de RT-qPCR e imuno-histoquímicas, demonstrando que o desequilíbrio entre AF e Hcy altera a expressão de Pax 1/9 e Sox 9 durante o desenvolvimento do esqueleto axial.

A expressão de Pax 1/9 é essencial à formação dos centros de condificação, e nossos resultados revelaram que a Hcy é capaz de reduzir significativamente a expressão dos produtos gênicos de Pax 1/9 durante o desenvolvimento do esqueleto axial. Adicionalmente, foi observada redução significativa na expressão destas proteínas nos embriões com espinha bífida, considerada a categoria mais grave de DTN, que afeta ambos os tecidos, neural e mesenquimal, causando graves modificações na morfologia dos elementos vertebrais.

Neste trabalho, foi também verificada a redução na expressão do RNAm para Pax 1/9 no esclerótomo dos embriões em E4. Estes dados também são importantes porque demonstraram que a Hcy altera a dinâmica de expressão de Pax 1/9, que são evidenciados inicialmente no esclerótomo dos embriões em E4 e, mais tarde, nos elementos vertebrais em desenvolvimento em E6. O AF não altera a expressão dos produtos gênicos de Pax 1/9 em ambas as idades embrionárias, mas também não previne a redução destas proteínas no mesênquima dos embriões tratados com Hcy. Em contraste, o tratamento com Hcy reduziu significativamente a expressão do RNAm para Pax 1/9 e o pré-tratamento com AF preveniu este efeito em E4. Desta forma, fica evidente que alterações na expressão gênica de Pax 1/9 induzidas pela

Hcy são prevenidas pelo pré-tratamento com AF, porém, a expressão das proteínas Pax 1/9 não é recuperada pelo AF. Portanto, nós hipotetizamos que as alterações na expressão de Pax 1/9 podem estar relacionadas à gênese dos DTN na medula espinhal dos embriões de galinha, já que estes exibiram anormalidades na morfogênese das vértebras.

Os genes Pax 1/9 são necessários para manutenção das altas taxas de proliferação observadas durante uma fase restrita do desenvolvimento do esclerótomo, e estes genes são normalmente expressos em tecidos com altos níveis de proliferação celular (CHRIST; HUANG; SCAAL, 2004). Nossos resultados revelaram que o tratamento com Hcy reduziu significativamente a expressão de Pax 1/9 e o número de células mesenquimais em proliferação. A redução na proliferação destas células foi observada anteriormente, quando os embriões foram expostos à metade da dose de Hcy aplicada no presente estudo (KOBUS; NAZARI; MÜLLER, 2009). Após o tratamento com a dose de 20 μmol de D,L-Hcy, foi demonstrado que em todas as categorias de DTN, o número de células em proliferação no mesênquima axial foi reduzido, indicando a relação entre a redução na proliferação celular mesenquimal e a gênese dos DTN. Além disso, os embriões tratados com Hcy que exibiram espinha bífida, também apresentaram uma distribuição irregular das células do esclerótomo, e, nos embriões com regressão caudal, foi observada a perda de centros de condificação em torno da notocorda e da medula espinhal. Sendo assim, os dados deste trabalho fortemente sugerem que a Hcy pode modificar mecanismos celulares envolvidos no desenvolvimento do esqueleto axial, e que estas alterações podem causar anormalidades nos elementos vertebrais, as quais estão presentes nos embriões tratados com Hcy que exibiram DTN na medula espinhal.

Alterações na expressão dos produtos gênicos de Sox 9 também foram encontradas durante o desenvolvimento do esqueleto axial dos embriões de galinha tratados com Hcy. Similar ao resultado encontrado para a expressão das proteínas Pax 1/9, o tratamento com Hcy reduziu a expressão de Sox 9 em ambas as idades embrionárias, sendo esta redução ainda mais expressiva nos embriões com espinha bífida. Este efeito da Hcy é um dado importante, porque a expressão de Sox 9 é necessária para que ocorra a condensação do tecido mesenquimal antes do início da condrogênese, e de acordo com Hattori et al. (2010) e Leung et al. (2011), a condificação não ocorre na ausência de Sox 9, causando anormalidades esqueléticas relacionadas a falhas na diferenciação dos tecidos mesenquimais em cartilagem. As

deformidades esqueléticas, bem como a ausência de elementos vertebrais observadas nos embriões em E4 e E6 com DTN, sugerem que as alterações na expressão do Sox 9 também podem ter contribuído para os fenótipos anormais. Neste contexto, sabe-se que o excesso de Hcy pode alterar a funcionalidade de proteínas através da homocisteinilação do aminoácido lisina (JAKUBOWSKI, 1997; 2000). Alterações no processo de condricificação podem ser explicadas por modificações na funcionalidade da enzima lisina oxidase, que é responsável pela produção da matriz extracelular de tecidos conjuntivos e pode ser irreversivelmente inativada pela Hcy (LIU; NELLAIAPPAN; KAGAN, 1997; RAPOSO et al., 2004).

Por fim, os efeitos celulares e moleculares da dose elevada de Hcy sobre a morfogênese dos tecidos neural e mesenquimal de embriões de *G. domesticus*, bem como a provável relação destes efeitos com a ocorrência de DTN na medula espinhal, estão sumarizados na figura 34.

A dose elevada de Hcy modificou o equilíbrio da homeostase de oxi-redução celular, o que foi evidenciado pelo aumento da carbonilação de proteínas, pela redução dos níveis de NPSH e pelo aumento da expressão de Bcl 2 nos tecidos neurais e mesenquimais dos embriões tratados com Hcy. O aumento da expressão da proteína HSP 70 induzível também revelou a geração de estresse celular nestes tecidos. Tanto o aumento da expressão de Bcl 2, quanto da HSP 70, sugere uma possível resposta da célula à condição de estresse oxidativo e, uma tentativa de proteger à célula da apoptose, que seria a consequência final dos danos provocados por esta condição, que não foi investigada neste estudo. Pode-se especular que a condição de estresse oxidativo pode ter sido produzida também por alterações na expressão e / ou atividade de enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione reductase (GR), as quais também não foram avaliadas.

A dose elevada de Hcy alterou a progressão do ciclo celular, reduzindo a proliferação e induzindo aumento da expressão de PCNA, que corresponde a um indicativo de ocorrência de danos ao DNA das células dos tecidos neurais e mesenquimais. A Hcy também modificou o padrão de diferenciação neural e mesenquimal, o que foi revelado pela análise da expressão de genes e proteínas envolvidos no desenvolvimento destes tecidos.

O conjunto de alterações celulares e moleculares verificadas em ambos os tecidos embrionários – neural e mesenquimal – após o tratamento dos embriões com Hcy, pode estar implicado nas modificações da morfogênese da medula espinhal e do esqueleto axial observadas nos embriões com DTN, estando, portanto, relacionado à

gênese destes defeitos na medula espinal dos embriões de *G. domesticus*.

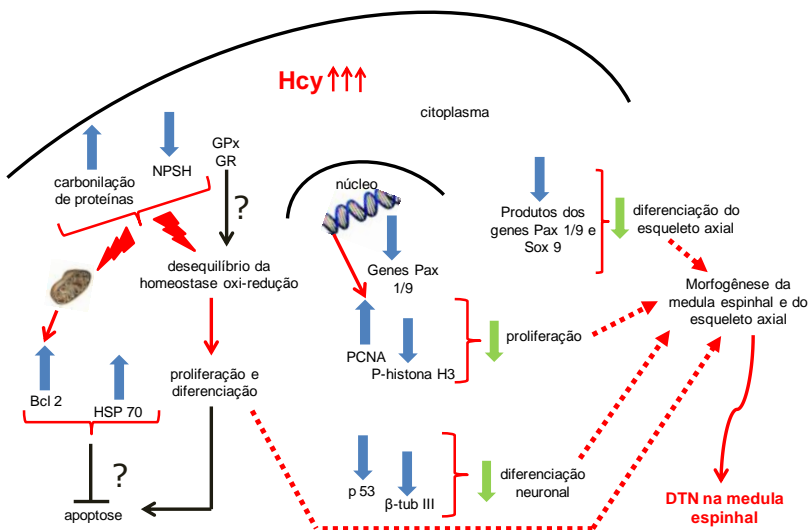


Figura 34. Sumário dos efeitos da dose elevada de Hcy nas células dos tecidos neural e mesenquimal de embriões de *G. domesticus*: geração de estresse oxidativo, revelada pelo aumento da carbonilação de proteínas, pela redução dos níveis de NPSH e pelo aumento da expressão da proteína Bcl 2, esta última sugere a presença de dano mitocondrial; geração de estresse celular revelado pelo aumento da expressão de HSP 70 induzível; redução da proliferação celular revelada pela diminuição da expressão da proteína fosfo-histona H3; indicativo de dano no DNA revelado pelo aumento da expressão do antígeno PCNA; modificação do padrão de diferenciação do esqueleto axial revelado pela diminuição da expressão de Pax 1/9 e Sox 9; modificação do padrão de diferenciação neuronal na medula espinal revelado pela diminuição da expressão de p 53 e β -tubulina III. As linhas e setas pretas indicam possíveis efeitos celulares que não foram avaliados neste estudo. GPx, glutatona peroxidase; GR, glutatona redutase; NPSH, níveis totais de tóis não-proteicos; PCNA, antígeno nuclear de proliferação celular; P-histona H3, fosfo-histona H3; β -tub III, β -tubulina III; HSP 70, proteína de choque térmico de 70 kDa.

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho permitiram a melhor compreensão dos efeitos da Hcy sobre os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento dos tecidos neural e mesenquimal, e sua possível correlação com a gênese dos DTN na medula espinhal, sendo aceitas as hipóteses previamente propostas neste trabalho, considerando a experimentação com elevados níveis de Hcy durante o desenvolvimento de embriões de *G. domesticus*. As principais conclusões obtidas são:

– Redução da sobrevivência e alteração do padrão morfológico externo, bem como da morfogênese da medula espinhal e do esqueleto axial dos embriões tratados com Hcy;

– Geração de estresse celular e oxidativo na medula espinhal e mesênquima axial dos embriões tratados com Hcy, efeito reconhecido pelo aumento da expressão das proteínas HSP 70 e Bcl 2, da carbonilação de proteínas e pela redução dos níveis de NPSH nestes tecidos;

– Ocorrência de atraso no ciclo celular e redução da atividade proliferativa dos tecidos neural e mesenquimal dos embriões tratados com Hcy, evidenciados pela análise da expressão da proteína fosfo-histona H3 e do antígeno PCNA;

– A elevada expressão de PCNA verificada nas células neurais e mesenquimais dos embriões tratados com Hcy corresponde a um indicativo de ocorrência de danos ao DNA destas células;

– Modificação no padrão de diferenciação neuronal na medula espinhal, reduzindo a expressão de p 53 e β -tubulina III nos embriões tratados com Hcy;

– Redução na expressão dos genes e dos produtos dos genes Pax 1/9, responsáveis pela diferenciação inicial do esclerótomo, e, posteriormente, dos elementos vertebrais nos embriões tratados com Hcy;

– Comprometimento da formação dos moldes cartilagosos durante o desenvolvimento do esqueleto axial, reduzindo a expressão da

proteína Sox 9 no esclerótomo e nos elementos vertebrais em desenvolvimento dos embriões tratados com Hcy;

– O pré-tratamento com AF nem sempre preveniu os efeitos celulares e moleculares induzidos pela dose elevada de Hcy durante o desenvolvimento da medula espinhal e do esqueleto axial;

– Os efeitos celulares e moleculares observados nos tecidos neurais e mesenquimais dos embriões após o tratamento com Hcy foram, de maneira geral, intensificados nos embriões com DTN; portanto, estes efeitos podem estar relacionados com a gênese dos DTN na medula espinhal nos embriões de *G. domesticus*.

REFERÊNCIAS

- AFMAN, L. A. et al. Homocysteine interference in neurulation: a chick embryo model. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v. 67, n. 6, p. 421-8, 2003.
- ALLES, A. J.; SULIK, K. K. A review of caudal dysgenesis and its pathogenesis as illustrated in an animal model. **Birth Defects: Original Article Series**, v. 29, n. 1, p. 83-102, 1993.
- ANDERSON, J. L. et al. Plasma Homocysteine Predicts Mortality Independently of Traditional Risk Factors and C-Reactive Protein in Patients With Angiographically Defined Coronary Artery Disease. **Circulation**, v. 102, n. 11, p. 1227-1232, 2000.
- ANTONY, A. C. Folate receptors. **Annu Rev Nutr**, v. 16, p. 501-21, 1996.
- ANVISA. Recentes resoluções da Anvisa. **Rev. Saúde Pública**, v. 38, n. 4, p. 613-614, 2004.
- AON, M. A. et al. Mitochondrial criticality: a new concept at the turning point of life or death. **Biochim Biophys Acta**, v. 1762, n. 2, p. 232-40, 2006.
- APPLING, D. R. Compartmentation of folate-mediated one-carbon metabolism in eukaryotes. **FASEB J**, v. 5, n. 12, p. 2645-51, 1991.
- ARMESILLA-DIAZ, A. et al. p53 regulates the self-renewal and differentiation of neural precursors. **Neuroscience**, v. 158, n. 4, p. 1378-89, 2009.
- ARYA, R.; MALLIK, M.; LAKHOTIA, S. C. Heat shock genes - integrating cell survival and death. **J Biosci**, v. 32, n. 3, p. 595-610, 2007.
- BALLING, R.; NEUBÜSER, A.; CHRIST, B. Pax genes and sclerotome development. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 7, n. 1, p. 129-136, 1996.

BARBOSA, L. et al. Factors associated with folic acid use during pregnancy. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 33, n. 9, p. 246-51, 2011.

BEAUDIN, A. E.; STOVER, P. J. Folate-mediated one-carbon metabolism and neural tube defects: balancing genome synthesis and gene expression. **Birth Defects Res C Embryo Today**, v. 81, n. 3, p. 183-203, 2007.

BENTIVOGLIO, M.; MAZZARELLO, P. The history of radial glia. **Brain Res Bull**, v. 49, n. 5, p. 305-15, 1999.

BI, W. et al. Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 12, p. 6698-703, 2001.

BLOM, H. J. Folic acid, methylation and neural tube closure in humans. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 85, n. 4, p. 295-302, 2009.

BLOM, H. J.; SMULDERS, Y. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. **J Inherit Metab Dis**, v. 34, n. 1, p. 75-81, 2011.

BLOUNT, B. C. et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 7, p. 3290-5, 1997.

BOOT, M. J. et al. Cardiac outflow tract malformations in chick embryos exposed to homocysteine. **Cardiovasc Res**, v. 64, n. 2, p. 365-73, 2004.

BOOT, M. J. et al. Folic acid and homocysteine affect neural crest and neuroepithelial cell outgrowth and differentiation in vitro. **Dev Dyn**, v. 227, n. 2, p. 301-8, 2003.

BOPP, D. et al. Conservation of a large protein domain in the segmentation gene paired and in functionally related genes of *Drosophila*. **Cell**, v. 47, n. 6, p. 1033-40, 1986.

BOTTO, L. D.; OLNEY, R. S.; ERICKSON, J. D. Vitamin supplements and the risk for congenital anomalies other than neural tube defects. **Am J Med Genet C Semin Med Genet**, v. 125C, n. 1, p. 12-21, 2004.

BOYAN, G. et al. Axogenesis in the embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*: an identified cell analysis of early brain development. **Development**, v. 121, n. 1, p. 75-86, 1995.

BRAUER, P. R.; TIERNEY, B. J. Consequences of elevated homocysteine during embryonic development and possible modes of action. **Curr Pharm Des**, v. 10, n. 22, p. 2719-32, 2004.

BRENT, A. E.; TABIN, C. J. Developmental regulation of somite derivatives: muscle, cartilage and tendon. **Curr Opin Genet Dev**, v. 12, n. 5, p. 548-57, 2002.

BROUNS, M. R. et al. Morphogenetic movements during cranial neural tube closure in the chick embryo and the effect of homocysteine. **Anat Embryol (Berl)**, v. 210, n. 2, p. 81-90, 2005.

CATALA, M.; TEILLET, M.-A.; LE DOUARIN, N. M. Organization and development of the tail bud analyzed with the quail-chick chimaera system. **Mech Dev**, v. 51, n. 1, p. 51-65, 1995.

CATALA, M. et al. A spinal cord fate map in the avian embryo: while regressing, Hensen's node lays down the notochord and floor plate thus joining the spinal cord lateral walls. **Development**, v. 122, n. 9, p. 2599-610, 1996.

CHARRIER, J. B. et al. Cellular dynamics and molecular control of the development of organizer-derived cells in quail-chick chimeras. **Int J Dev Biol**, v. 49, n. 2-3, p. 181-91, 2005.

CHEN, S.-R.; DUNIGAN, D. D.; DICKMAN, M. B. Bcl-2 family members inhibit oxidative stress-induced programmed cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 10, p. 1315-1325, 2003.

CHILD, D. F. et al. Birth defects and anti-heat shock protein 70 antibodies in early pregnancy. **Cell Stress Chaperones**, v. 11, n. 1, p. 101-5, 2006.

CHRIST, B.; HUANG, R.; SCAAL, M. Formation and differentiation of the avian sclerotome. **Anat Embryol (Berl)**, v. 208, n. 5, p. 333-350, 2004.

CHRIST, B.; HUANG, R.; SCAAL, M. Formation and differentiation of the avian sclerotome. **Anat Embryol (Berl)**, v. 208, n. 5, p. 333-50, 2004.

CHRIST, B.; HUANG, R.; WILTING, J. The development of the avian vertebral column. **Anat Embryol (Berl)**, v. 202, n. 3, p. 179-94, 2000.

CHRIST, B.; ORDAHL, C. P. Early stages of chick somite development. **Anat Embryol (Berl)**, v. 191, n. 5, p. 381-96, 1995.

CHRIST, B. et al. Segmentation of the vertebrate body. **Anat Embryol (Berl)**, v. 197, n. 1, p. 1-8, 1998.

CHRIST, B.; WILTING, J. From somites to vertebral column. **Ann Anat**, v. 174, n. 1, p. 23-32, 1992.

CHRISTIANSON, A.; HOWSON, C. P.; MODELL, B. **March of Dimes global report on birth defects: the hidden toll of dying and disabled children**. New York: March of Dimes Birth Defects Foundation, White Plains, 2006. 85.

COLAS, J. F.; SCHOENWOLF, G. C. Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. **Dev Dyn**, v. 221, n. 2, p. 117-45, 2001.

COOPER, A. J.; KRISTAL, B. S. Multiple roles of glutathione in the central nervous system. **Biol Chem**, v. 378, n. 8, p. 793-802, 1997.

COOPER, W. J.; ALBERTSON, R. C. Quantification and variation in experimental studies of morphogenesis. **Dev Biol**, v. 321, n. 2, p. 295-302, 2008.

COPP, A. J. Neurulation in the cranial region – normal and abnormal. **Journal of Anatomy**, v. 207, n. 5, p. 623-635, 2005.

COPP, A. J.; GREENE, N. D. E. Neural tube defects-disorders of neurulation and related embryonic processes. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 2, n. 2, p. 213-227, 2013.

CORNEL, M. C.; ERICKSON, J. D. Comparison of national policies on periconceptional use of folic acid to prevent spina bifida and anencephaly (SBA). **Teratology**, v. 55, n. 2, p. 134-7, 1997.

CRACIUNESCU, C. N. et al. Folic Acid Deficiency During Late Gestation Decreases Progenitor Cell Proliferation and Increases Apoptosis in Fetal Mouse Brain. **J Nutr**, v. 134, n. 1, p. 162-166, 2004.

CRIDER, K. S.; BAILEY, L. B.; BERRY, R. J. Folic Acid Food Fortification—Its History, Effect, Concerns, and Future Directions. **Nutrients**, v. 3, n. 3, p. 370-384, 2011.

CULICAN, S. M. et al. Cortical radial glia: identification in tissue culture and evidence for their transformation to astrocytes. **J Neurosci**, v. 10, n. 2, p. 684-92, 1990.

CZEIZEL, A. E. Periconceptional folic acid and multivitamin supplementation for the prevention of neural tube defects and other congenital abnormalities. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v. 85, n. 4, p. 260-8, 2009.

DAHL, E.; KOSEKI, H.; BALLING, R. Pax genes and organogenesis. **Bioessays**, v. 19, n. 9, p. 755-65, 1997.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **J Cell Mol Med**, v. 10, n. 2, p. 389-406, 2006.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, n. 1-2, p. 23-38, 2003.

DAVIDSON, L. A.; KELLER, R. E. Neural tube closure in *Xenopus laevis* involves medial migration, directed protrusive activity, cell intercalation and convergent extension. **Development**, v. 126, n. 20, p. 4547-4556, 1999.

DE CROMBRUGGHE, B.; LEFEBVRE, V.; NAKASHIMA, K. Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 13, n. 6, p. 721-728, 2001.

DE LA CALLE, M. et al. Homocysteine, folic acid and B-group vitamins in obstetrics and gynaecology. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 107, n. 2, p. 125-134, 2003.

DE LAS CASAS, C. M. et al. High exogenous homocysteine modifies eye development in early chick embryos. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 67, n. 1, p. 35-40, 2003.

DE WALS, P. et al. Reduction in Neural-Tube Defects after Folic Acid Fortification in Canada. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 2, p. 135-142, 2007.

DEAN, R. T. et al. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. **Biochem J**, v. 324 (Pt 1), p. 1-18, 1997.

DENNERY, P. A. Oxidative stress in development: nature or nurture? **Free Radic Biol Med**, v. 49, n. 7, p. 1147-51, 2010.

DIAS, P. F.; MÜLLER, Y. M. R. Características do desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus domesticus*, em temperaturas e períodos diferentes de incubação. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 35, n. 5, p. 233-235, 1998.

DIETRICH, S.; SCHUBERT, F. R.; LUMSDEN, A. Control of dorsoventral pattern in the chick paraxial mesoderm. **Development**, v. 124, n. 19, p. 3895-908, 1997.

DUNLEVY, L. P. et al. Integrity of the methylation cycle is essential for mammalian neural tube closure. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v. 76, n. 7, p. 544-52, 2006.

DUTHIE, S. J. et al. Impact of folate deficiency on DNA stability. **J Nutr**, v. 132, n. 8 Suppl, p. 2444S-2449S, 2002.

EBENSPERGER, C. et al. Pax-1, a regulator of sclerotome development is induced by notochord and floor plate signals in avian embryos. **Anat Embryol (Berl)**, v. 191, n. 4, p. 297-310, 1995.

EIZENBERG, O. et al. p53 plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of central nervous system-associated cells. **Mol Cell Biol**, v. 16, n. 9, p. 5178-85, 1996.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**, v. 82, n. 1, p. 70-77, 1959.

EPELDEGUI, M. et al. Homocysteine modifies development of neurulation and dorsal root ganglia in chick embryos. **Teratology**, v. 65, n. 4, p. 171-179, 2002.

FENECH, M. Folate (vitamin B9) and vitamin B12 and their function in the maintenance of nuclear and mitochondrial genome integrity. **Mutat Res**, v. 733, n. 1-2, p. 21-33, 2012.

FOWDAR, J. Y. et al. Investigation of homocysteine-pathway-related variants in essential hypertension. **Int J Hypertens**, v. 2012, p. 2-9, 2012.

FOWLER, B. Disorders of homocysteine metabolism. **J Inherit Metab Dis**, v. 20, n. 2, p. 270-85, 1997.

_____. The folate cycle and disease in humans. **Kidney Int Suppl**, v. 78, p. S221-9, 2001.

FURUMOTO, T. A. et al. Notochord-dependent expression of MFH1 and PAX1 cooperates to maintain the proliferation of sclerotome cells during the vertebral column development. **Dev Biol**, v. 210, n. 1, p. 15-29, 1999.

GATO, A. et al. Embryonic cerebrospinal fluid regulates neuroepithelial survival, proliferation, and neurogenesis in chick embryos. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol**, v. 284, n. 1, p. 475-84, 2005.

GILBERT, S. F. **Developmental Biology**. 9. Sunderland: Sinauer Associates, 2010. 711.

GODSAVE, S. F.; DURSTON, A. J. Neural induction and patterning in embryos deficient in FGF signaling. **Int J Dev Biol**, v. 41, n. 1, p. 57-65, 1997.

GOH, Y. I. et al. Prenatal multivitamin supplementation and rates of congenital anomalies: a meta-analysis. **J Obstet Gynaecol Can**, v. 28, n. 8, p. 680-9, 2006.

GÖTZ, M.; HUTTNER, W. B. The cell biology of neurogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 10, p. 777-88, 2005.

GRIFFITH, C. M.; WILEY, M. J.; SANDERS, E. The vertebrate tail bud: three germ layers from one tissue. **Anat Embryol (Berl)**, v. 185, n. 2, p. 101-113, 1992.

GROUP, M. V. S. R. Prevention of neural tube defects: Results of the Medical Research Council Vitamin Study. **The Lancet**, v. 338, n. 8760, p. 131-137, 1991.

GUO, S. et al. Heat shock protein 70 regulates cellular redox status by modulating glutathione-related enzyme activities. **Cell Stress Chaperones**, v. 12, n. 3, p. 245-54, 2007.

HAGUE, W. M. Homocysteine and pregnancy. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 17, n. 3, p. 459-69, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochem J**, v. 219, n. 1, p. 1-14, 1984.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, v. 88, n. 1, p. 49-92, 1951.

HAN, M. et al. Folate rescues lithium-, homocysteine- and Wnt3A-induced vertebrate cardiac anomalies. **Disease Models & Mechanisms**, v. 2, n. 9-10, p. 467-478, 2009.

HANDY, D. E.; ZHANG, Y.; LOSCALZO, J. Homocysteine down-regulates cellular glutathione peroxidase (GPx1) by decreasing translation. **J Biol Chem**, v. 280, n. 16, p. 15518-25, 2005.

HANSEN, J. M. Oxidative stress as a mechanism of teratogenesis. **Birth Defects Res C Embryo Today**, v. 78, n. 4, p. 293-307, 2006.

HARRIS, M. J.; JURILOFF, D. M. Mouse mutants with neural tube closure defects and their role in understanding human neural tube defects. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v. 79, n. 3, p. 187-210, 2007.

HARTFUSS, E. et al. Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. **Dev Biol**, v. 229, n. 1, p. 15-30, 2001.

HATTORI, T. et al. SOX9 is a major negative regulator of cartilage vascularization, bone marrow formation and endochondral ossification. **Development**, v. 137, n. 6, p. 901-911, 2010.

HAY, E. D. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. **Dev Dyn**, v. 233, n. 3, p. 706-20, 2005.

HEALY, C.; UWANOGHO, D.; SHARPE, P. T. Regulation and role of Sox9 in cartilage formation. **Developmental Dynamics**, v. 215, n. 1, p. 69-78, 1999.

HENDZEL, M. J. et al. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. **Chromosoma**, v. 106, n. 6, p. 348-360, 1997.

HIRSCH, N.; HARRIS, W. A. Xenopus Pax-6 and retinal development. **J Neurobiol**, v. 32, n. 1, p. 45-61, 1997.

HOBBS, C. A. et al. Congenital heart defects and maternal biomarkers of oxidative stress. **Am J Clin Nutr**, v. 82, n. 3, p. 598-604, 2005.

HUNTER-LAVIN, C. et al. Folate supplementation reduces serum hsp70 levels in patients with type 2 diabetes. **Cell Stress Chaperones**, v. 9, n. 4, p. 344-9, 2004.

IKEGAMI, D. et al. Sox9 sustains chondrocyte survival and hypertrophy in part through Pik3ca-Akt pathways. **Development**, v. 138, n. 8, p. 1507-19, 2011.

INAGAKI, T. et al. Neural Tube Defects. In: TUAN, R. e LO, C. (Ed.). **Developmental Biology Protocols: Volume II**: Humana Press, v.136, 2000. cap. 17, p.161-166. (Methods in Molecular Biology).

INMAN, C. F. et al. Validation of computer-assisted, pixel-based analysis of multiple-colour immunofluorescence histology. **Journal of Immunological Methods**, v. 302, n. 1–2, p. 156-167, 2005.

JAKUBOWSKI, H. Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels. **J Biol Chem**, v. 272, n. 3, p. 1935-42, 1997.

_____. Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans. **J Nutr**, v. 130, n. 2S Suppl, p. 377S-381S, 2000.

JAMES, S. J. et al. Elevation in S-adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology. **J Nutr**, v. 132, n. 8 Suppl, p. 2361S-2366S, 2002.

JESSELL, T. M. Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. **Nat Rev Genet**, v. 1, n. 1, p. 20-9, 2000.

KALAM AL AZAD, A. et al. Gradient based spinal cord axogenesis and locomotor connectome of the hatchling *Xenopus tadpole*. **BMC Neuroscience**, v. 12, n. Suppl 1, p. O9, 2011.

KALTER, H. Teratology in the 20th century. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 25, n. 2, p. 131-282, 2003.

KALYANI, A. J. et al. Spinal cord neuronal precursors generate multiple neuronal phenotypes in culture. **J Neurosci**, v. 18, n. 19, p. 7856-68, 1998.

KAUFMANN, J. A.; BICKFORD, P. C.; TAGLIALATELA, G. Oxidative-stress-dependent up-regulation of Bcl-2 expression in the central nervous system of aged Fisher-344 rats. **J Neurochem**, v. 76, n. 4, p. 1099-108, 2001.

KELMAN, Z. PCNA: structure, functions and interactions. **Oncogene**, v. 14, n. 6, p. 629-40, 1997.

KEYNES, R. et al. Segmentation and the development of the vertebrate nervous system. **J Physiol (Paris)**, v. 84, n. 1, p. 27-32, 1990.

KIDD, P. M. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. **Altern Med Rev**, v. 2, n. 3, p. 155-176, 1997.

KIECKER, C.; NIEHRS, C. A morphogen gradient of Wnt/beta-catenin signalling regulates anteroposterior neural patterning in *Xenopus*. **Development**, v. 128, n. 21, p. 4189-201, 2001.

KIRKE, P. N.; MILLS, J. L.; SCOTT, J. M. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural tube defects. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 13, n. 11, p. 994-995, 1997.

KLUCK, R. M. et al. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. **Science**, v. 275, n. 5303, p. 1132-6, 1997.

KNOTT, L. et al. Homocysteine oxidation and apoptosis: a potential cause of cleft palate. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, v. 39, n. 1-2, p. 98-105, 2003.

KOBUS, K. **Ação da Homocisteína e do Ácido Fólico sobre o Padrão Morfológico e Estrutura Organizacional do Telencéfalo e Medula Espinhal de Embriões de *Gallus Domesticus***. 2007. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

KOBUS, K.; NAZARI, E.; MÜLLER, Y. Effects of folic acid and homocysteine on spinal cord morphology of the chicken embryo. **Histochem Cell Biol**, v. 132, n. 5, p. 525-532, 2009.

KOSEKI, H. et al. A role for Pax-1 as a mediator of notochordal signals during the dorsoventral specification of vertebrae. **Development**, v. 119, n. 3, p. 649-60, 1993.

KOTB, M. et al. Consensus nomenclature for the mammalian methionine adenosyltransferase genes and gene products. **Trends Genet**, v. 13, n. 2, p. 51-2, 1997.

KOWALTOWSKI, A. J.; FISKUM, G. Redox mechanisms of cytoprotection by Bcl-2. **Antioxid Redox Signal**, v. 7, n. 3-4, p. 508-14, 2005.

KOZ, S. T. et al. Effects of maternal hyperhomocysteinemia induced by methionine intake on oxidative stress and apoptosis in pup rat brain. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 28, n. 4, p. 325-329, 2010.

KRAUSS, S. et al. Zebrafish pax[zf-a]: a paired box-containing gene expressed in the neural tube. **EMBO J**, v. 10, n. 12, p. 3609-19, 1991.

KRIEGSTEIN, A. R.; GÖTZ, M. Radial glia diversity: a matter of cell fate. **Glia**, v. 43, n. 1, p. 37-43, 2003.

KWOK, C. et al. Mutations in SOX9, the gene responsible for Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal. **Am J Hum Genet**, v. 57, n. 5, p. 1028-36, 1995.

LADHER, R.; SCHOENWOLF, G. Making a Neural Tube: Neural Induction and Neurulation. In: RAO, M. e JACOBSON†, M. (Ed.). **Developmental Neurobiology**: Springer US, 2005. cap. 1, p.1-20.

LATACHA, K. S.; ROSENQUIST, T. H. Homocysteine inhibits extra-embryonic vascular development in the avian embryo. **Dev Dyn**, v. 234, n. 2, p. 323-31, 2005.

LAWSON, A.; ANDERSON, H.; SCHOENWOLF, G. C. Cellular mechanisms of neural fold formation and morphogenesis in the chick embryo. **Anat Rec**, v. 262, n. 2, p. 153-68, 2001.

LE DOUARIN, N. M.; TEILLET, M. A.; CATALA, M. Neurulation in amniote vertebrates: a novel view deduced from the use of quail-chick chimeras. **Int J Dev Biol**, v. 42, n. 7, p. 909-16, 1998.

LECLAIR, E. E.; BONFIGLIO, L.; TUAN, R. S. Expression of the paired-box genes Pax-1 and Pax-9 in limb skeleton development. **Developmental Dynamics**, v. 214, n. 2, p. 101-115, 1999.

LEE, M. K.; REBHUN, L. I.; FRANKFURTER, A. Posttranslational modification of class III beta-tubulin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 18, p. 7195-7199, 1990.

LEE, Y. J. et al. Protective role of Bcl 2 in metabolic oxidative stress-induced cell death. **J Cell Sci**, v. 114, n. 4, p. 677-684, 2001.

LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociência**. São Paulo: Atheneu / Biblioteca Biomédica / FAPERJ, 2002. 698.

LEUNG, V. Y. et al. SOX9 governs differentiation stage-specific gene expression in growth plate chondrocytes via direct concomitant transactivation and repression. **PLoS Genet**, v. 7, n. 11, p. e1002356, 2011.

LEVITT, P.; RAKIC, P. Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. **J Comp Neurol**, v. 193, n. 3, p. 815-40, 1980.

LEWIS, K. E.; EISEN, J. S. From cells to circuits: development of the zebrafish spinal cord. **Progress in Neurobiology**, v. 69, n. 6, p. 419-449, 2003.

LIEM JR, K. F. et al. Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. **Cell**, v. 82, n. 6, p. 969-979, 1995.

LIMA, M. M. D. S. et al. Ácido fólico na prevenção de gravidez acometida por morbidade fetal: aspectos atuais; Folic acid in prevention of pregnancy affected by fetal morbidity: actual aspects. **Femina**, v. 37, n. 10, p. 569-575, 2009.

LIMPACH, A. et al. Homocysteine inhibits retinoic acid synthesis: a mechanism for homocysteine-induced congenital defects. **Exp Cell Res**, v. 260, n. 1, p. 166-74, 2000.

LIU, G.; NELLAIAPPAN, K.; KAGAN, H. M. Irreversible Inhibition of Lysyl Oxidase by Homocysteine Thiolactone and Its Selenium and Oxygen Analogues: IMPLICATIONS FOR HOMOCYSTINURIA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 51, p. 32370-32377, 1997.

LOWERY, L. A.; SIVE, H. Strategies of vertebrate neurulation and a re-evaluation of teleost neural tube formation. **Mech Dev**, v. 121, n. 10, p. 1189-97, 2004.

LUBOS, E.; LOSCALZO, J.; HANDY, D. E. Homocysteine and glutathione peroxidase-1. **Antioxid Redox Signal**, v. 9, n. 11, p. 1923-40, 2007.

LUCOCK, M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. **Mol Genet Metab**, v. 71, n. 1-2, p. 121-38, 2000.

MADEN, M. Retinoids and spinal cord development. **J Neurobiol**, v. 66, n. 7, p. 726-38, 2006.

MAGA, G.; HUBSCHER, U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. **J Cell Sci**, v. 116, n. Pt 15, p. 3051-60, 2003.

MALDONADO, E. et al. Occurrence of Cleft-Palate and Alteration of Tgf- β_3 Expression and the Mechanisms Leading to Palatal Fusion in Mice following Dietary Folic-Acid Deficiency. **Cells Tissues Organs**, v. 194, n. 5, p. 406-420, 2011.

MALINOWSKA, J.; KOŁODZIEJCZYK, J.; OLAS, B. The disturbance of hemostasis induced by hyperhomocysteinemia; the role of antioxidants. **Acta biochimica Polonica**, v. 59, n. 2, p. 185-194, 2012.

MANSOURI, A.; GOUDREAU, G.; GRUSS, P. Pax genes and their role in organogenesis. **Cancer Res**, v. 59, n. 7 Suppl, p. 1707s-1709s; discussion 1709s-1710s, 1999.

MARTIN, I. et al. Oxidative stress in mothers who have conceived fetus with neural tube defects: the role of aminothiols and selenium. **Clin Nutr**, v. 23, n. 4, p. 507-14, 2004.

MATO, J. et al. S-adenosylmethionine synthesis: Molecular mechanisms and clinical implications. **Pharmacol Ther**, v. 73, n. 3, p. 265-280, 1997.

MATTSON, M. P.; SHEA, T. B. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. **Trends in Neurosciences**, v. 26, n. 3, p. 137-146, 2003.

MCDERMOTT, K. W.; BARRY, D. S.; MCMAHON, S. S. Role of radial glia in cytotogenesis, patterning and boundary formation in the developing spinal cord. **Journal of Anatomy**, v. 207, n. 3, p. 241-250, 2005.

MILLER, R. R. J. et al. Homocysteine-induced changes in brain membrane composition correlate with increased brain caspase-3 activities and reduced chick embryo viability. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 136, n. 3, p. 521-532, 2003.

MOLCHADSKY, A. et al. p53 is balancing development, differentiation and de-differentiation to assure cancer prevention. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 9, p. 1501-8, 2010.

MOLLOY, A. M. The role of folic acid in the prevention of neural tube defects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 6-7, p. 241-245, 2005.

MONSORO-BURQ, A. H. Sclerotome development and morphogenesis: when experimental embryology meets genetics. **Int J Dev Biol**, v. 49, n. 2-3, p. 301-8, 2005.

MONSORO-BURQ, A. H.; LE DOUARIN, N. Duality of molecular signaling involved in vertebral chondrogenesis. **Curr Top Dev Biol**, v. 48, p. 43-75, 2000.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**. 8. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 552.

MOURY, J. D.; SCHOENWOLF, G. C. Cooperative model of epithelial shaping and bending during avian neurulation: autonomous movements of the neural plate, autonomous movements of the epidermis, and

interactions in the neural plate/epidermis transition zone. **Dev Dyn**, v. 204, n. 3, p. 323-37, 1995.

MUDD, S. H.; CANTONI, G. L. Activation of methionine for transmethylation. III. The methionine-activating enzyme of Bakers' yeast. **J Biol Chem**, v. 231, n. 1, p. 481-92, 1958.

MUHR, J. et al. Convergent Inductive Signals Specify Midbrain, Hindbrain, and Spinal Cord Identity in Gastrula Stage Chick Embryos. **Neuron**, v. 23, n. 4, p. 689-702, 1999.

MÜLLER, F.; O'RAHILLY, R. The primitive streak, the caudal eminence and related structures in staged human embryos. **Cells Tissues Organs**, v. 177, n. 1, p. 2-20, 2004.

MÜLLER, F.; O'RAHILLY, R. The development of the human brain, the closure of the caudal neuropore, and the beginning of secondary neurulation at stage 12. **Anat Embryol (Berl)**, v. 176, n. 4, p. 413-430, 1987.

MULLER, T. S. et al. Expression of avian Pax1 and Pax9 is intrinsically regulated in the pharyngeal endoderm, but depends on environmental influences in the paraxial mesoderm. **Dev Biol**, v. 178, n. 2, p. 403-17, 1996.

MÜLLER, Y. M. R.; KOBUS, K.; NAZARI, E. M. Folic Acid, Homocysteine and Neural-Tube Defects. In: KLEIN, A. (Ed.). **Neural Tube Defects: Prevalence, Pathogenesis and Prevention**. New York: Nova Publishers, 2013. cap. 4.

NACHMANY, A. et al. Neural tube closure depends on nitric oxide synthase activity. **J Neurochem**, v. 96, n. 1, p. 247-53, 2006.

NEUBÜSER, A.; KOSEKI, H.; BALLING, R. Characterization and developmental expression of Pax9, a paired-box-containing gene related to Pax1. **Dev Biol**, v. 170, n. 2, p. 701-16, 1995.

NG, L. J. et al. SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. **Dev Biol**, v. 183, n. 1, p. 108-21, 1997.

NIEVELSTEIN, R. A. J. et al. Mr of the Caudal Regression Syndrome - Embryologic Implications. **American Journal of Neuroradiology**, v. 15, n. 6, p. 1021-1029, 1994.

NOLL, M. Evolution and role of Pax genes. **Curr Opin Genet Dev**, v. 3, n. 4, p. 595-605, 1993.

O'RAHILLY, R. et al. **Basic Human Anatomy: A Regional Study of Human Structure**. Editora Dartmouth Medical School, 2008. Disponível em: <http://www.dartmouth.edu/~humananatomy/>.

O'RAHILLY, R.; MÜLLER, F. Somites, Spinal Ganglia, and Centra. **Cells Tissues Organs**, v. 173, n. 2, p. 75-92, 2003.

O'RAHILLY, R. R.; MÜLLER, F. **Embriologia e Teratologia Humanas**. 3. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 482.

OOSTERBAAN, A. M.; STEEGERS, E. A.; URSEM, N. T. The effects of homocysteine and folic acid on angiogenesis and VEGF expression during chicken vascular development. **Microvasc Res**, v. 83, n. 2, p. 98-104, 2012.

ORDAHL, C. P.; LE DOUARIN, N. M. Two myogenic lineages within the developing somite. **Development**, v. 114, n. 2, p. 339-53, 1992.

OSORIO, L. et al. Neural crest ontogeny during secondary neurulation: a gene expression pattern study in the chick embryo. **Int J Dev Biol**, v. 53, n. 4, p. 641-8, 2009.

PADMANABHAN, R.; NARUSE, I.; SHIOTA, K. Caudal dysgenesis in staged human embryos: Carnegie stages 16-23. **Am J Med Genet**, v. 87, n. 2, p. 115-27, 1999.

PALMEIRIM, I.; DUBRULLE, J.; HENRIQUE, D.; ISH-HOROWICZ, D.; POURQUIÉ, O. Uncoupling segmentation and somitogenesis in the chick presomitic mesoderm. **Dev Genet**, v. 23, n. 1, p. 77 - 85, 1998.

PANCHISION, D. M.; MCKAY, R. D. G. The control of neural stem cells by morphogenic signals. **Curr Opin Genet Dev**, v. 12, n. 4, p. 478-487, 2002.

PAPPAS, C. T. et al. Anatomical evaluation of the caudal regression syndrome (lumbosacral agenesis) with magnetic resonance imaging. **Neurosurgery**, v. 25, n. 3, p. 462-465, 1989.

PERLA-KAJAN, J.; TWARDOWSKI, T.; JAKUBOWSKI, H. Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. **Amino Acids**, v. 32, n. 4, p. 561-72, 2007.

PETERS, H.; DOLL, U.; NIESSING, J. Differential expression of the chicken Pax-1 and Pax-9 gene: in situ hybridization and immunohistochemical analysis. **Dev Dyn**, v. 203, n. 1, p. 1-16, 1995.

PETERS, H. et al. Pax1 and Pax9 synergistically regulate vertebral column development. **Development**, v. 126, n. 23, p. 5399-408, 1999.

PFEIFER, D. et al. Campomelic dysplasia translocation breakpoints are scattered over 1 Mb proximal to SOX9: evidence for an extended control region. **Am J Hum Genet**, v. 65, n. 1, p. 111-24, 1999.

PITKIN, R. M. Folate and neural tube defects. **Am J Clin Nutr**, v. 85, n. 1, p. 285S-288S, 2007.

PYRGAKI, C. et al. Dynamic imaging of mammalian neural tube closure. **Dev Biol**, v. 344, n. 2, p. 941-947, 2010.

PYTEL, A.; BRUSKA, M.; WOZNIAK, W. Evidence that the caudal portion of the neural tube develops by cavitation of a neural cord in the caudal eminence of human embryos. **Folia Morphol (Warsz)**, v. 66, n. 2, p. 104-8, 2007.

QIN, Q. et al. A novel function for p53: regulation of growth cone motility through interaction with Rho kinase. **J Neurosci**, v. 29, n. 16, p. 5183-92, 2009.

RAKIC, P. Elusive radial glial cells: historical and evolutionary perspective. **Glia**, v. 43, n. 1, p. 19-32, 2003.

RAPOSO, B. et al. High levels of homocysteine inhibit lysyl oxidase (LOX) and downregulate LOX expression in vascular endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 177, n. 1, p. 1-8, 2004.

RAY, J.; GAGE, F. Spinal cord neuroblasts proliferate in response to basic fibroblast growth factor. **The Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 6, p. 3548-3564, 1994.

RICH, J. T. et al. A practical guide to understanding Kaplan-Meier curves. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 143, n. 3, p. 331-6, 2010.

RICHARDS, L. J. et al. Lineage specification of neuronal precursors in the mouse spinal cord. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 22, p. 10079-83, 1995.

RIMPLER, M. M. et al. Protection against hydrogen peroxide cytotoxicity in rat-1 fibroblasts provided by the oncoprotein Bcl-2: maintenance of calcium homeostasis is secondary to the effect of Bcl-2 on cellular glutathione. **Biochem. J.**, v. 340, n. 1, p. 291-297, 1999.

RODRIGO, I. Pax1 and Pax9 activate Bapx1 to induce chondrogenic differentiation in the sclerotome. **Development**, v. 130, n. 3, p. 473-482, 2003.

ROELINK, H. et al. Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. **Cell**, v. 76, n. 4, p. 761-775, 1994.

ROSENQUIST, T. H.; RATASHAK, S. A.; SELHUB, J. Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: Effect of folic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 26, p. 15227-15232, 1996.

ROSENQUIST, T. H.; SCHNEIDER, A. M.; MONAGHAN, D. T. N-methyl-D-aspartate receptor agonists modulate homocysteine-induced developmental abnormalities. **The FASEB Journal**, v. 13, n. 12, p. 1523-1531, 1999.

ROSKAMS, A. J. I.; CAI, X.; RONNETT, G. V. Expression of neuron-specific beta-III tubulin during olfactory neurogenesis in the embryonic and adult rat. **Neuroscience**, v. 83, n. 1, p. 191-200, 1998.

SADLER, T. W. Embryology of neural tube development. **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**, v. 135C, n. 1, p. 2-8, 2005.

_____. **Langman's Medical Embryology**. 11. Rio de Janeiro: Lippincott Williams & Wilkins, 2009. 385.

SAGARA, Y. et al. Cellular Mechanisms of Resistance to Chronic Oxidative Stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, n. 9, p. 1375-1389, 1998.

SAITSU, H. et al. Development of the posterior neural tube in human embryos. **Anat Embryol (Berl)**, v. 209, n. 2, p. 107-17, 2004.

SANTOS, L. M. P.; PEREIRA, M. Z. Efeito da fortificação com ácido fólico na redução dos defeitos do tubo neural. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, p. 17-24, 2007.

SANZO, J.; TUAN, R. High sensitivity analysis of gene expression in single embryonic somites using coupled reverse transcription-polymerase chain reaction. **Molecular Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 7-15, 1998.

SAYED, A.-R. et al. Decline in the prevalence of neural tube defects following folic acid fortification and its cost-benefit in South Africa. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 82, n. 4, p. 211-216, 2008.

SCHOENWOLF, G. C. Histological and ultrastructural observations of tail bud formation in the chick embryo. **Anat Rec**, v. 193, n. 1, p. 131-147, 1979.

SCHOENWOLF, G. C.; DELONGO, J. Ultrastructure of secondary neurulation in the chick embryo. **American Journal of Anatomy**, v. 158, n. 1, p. 43-63, 1980.

SCHOENWOLF, G. C.; SMITH, J. L. Mechanisms of neurulation: traditional viewpoint and recent advances. **Development**, v. 109, n. 2, p. 243-270, 1990.

SCHULZ, J. B. et al. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 16, p. 4904-4911, 2000.

SCOVASSI, A. I.; PROSPERI, E. Analysis of Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Associated With DNA Excision Repair Sites in Mammalian Cells. In: HENDERSON, D. S. (Ed.). **Methods in Molecular Biology: DNA Repair Protocols: Mammalian Systems**. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2006. cap. 31, p.457-475.

SELHUB, J. Homocysteine metabolism. **Annu Rev Nutr**, v. 19, p. 217-46, 1999.

SESHADRI, S. et al. Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Dementia and Alzheimer's Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 7, p. 476-483, 2002.

SHARMA, P. et al. Mining literature for a comprehensive pathway analysis: a case study for retrieval of homocysteine related genes for genetic and epigenetic studies. **Lipids Health Dis**, v. 5, p. 1, 2006.

SIDIA, M. C-J. **Bioestatística: Princípios e Aplicações**. São Paulo: Artmed, 2003. 246.

SILVEIRA P.C.L. et al. Effects of low-power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing. **Lasers Med Sci**, v. 26, p. 125-131, 2011.

SMITH, J. L.; SCHOENWOLF, G. C. Further evidence of extrinsic forces in bending of the neural plate. **J Comp Neurol**, v. 307, n. 2, p. 225-236, 1991.

_____. Neurulation: coming to closure. **Trends in Neurosciences**, v. 20, n. 11, p. 510-517, 1997.

SMITHELLS, R. W.; SHEPPARD, S.; SCHORAH, C. J. Vitamin deficiencies and neural tube defects. **Arch Dis Child**, v. 51, n. 12, p. 944-50, 1976.

SOCK, E. Loss of DNA-dependent dimerization of the transcription factor SOX9 as a cause for campomelic dysplasia. **Hum Mol Genet**, v. 12, n. 12, p. 1439-1447, 2003.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry**. 3. New York: WH Freeman & Co, 1994. 887.

SOLA, S. et al. p53 interaction with JMJD3 results in its nuclear distribution during mouse neural stem cell differentiation. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e18421, 2011.

SOUZA, A. B. C. **Epidemiologia das Malformações Congênitas Maiores em Florianópolis – Santa Catarina, no período de 1999 a 2004**. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

STAFFORD, D. A. et al. Cooperative activity of noggin and gremlin 1 in axial skeleton development. **Development**, v. 138, n. 5, p. 1005-14, 2011.

STAPLETON, P. et al. Chromosomal localization of seven PAX genes and cloning of a novel family member, PAX-9. **Nat Genet**, v. 3, n. 4, p. 292-8, 1993.

STARKEBAUM, G.; HARLAN, J. M. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. **J Clin Invest**, v. 77, n. 4, p. 1370-1376, 1986.

STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. et al. Neural tube defects and elevated homocysteine levels in amniotic fluid. **Am J Obstet Gynecol**, v. 172, n. 5, p. 1436-1441, 1995.

STEWART, Z. A.; PIETENPOL, J. A. p53 Signaling and cell cycle checkpoints. **Chem Res Toxicol**, v. 14, n. 3, p. 243-63, 2001.

STOREY, K. G. et al. Early posterior neural tissue is induced by FGF in the chick embryo. **Development**, v. 125, n. 3, p. 473-484, 1998.

STRÄHLE, U.; BLADER, P. Early neurogenesis in the zebrafish embryo. **The FASEB Journal**, v. 8, n. 10, p. 692-8, 1994.

SUSNOW, N. et al. Bcl-2 family proteins as regulators of oxidative stress. **Semin Cancer Biol**, v. 19, n. 1, p. 42-9, 2009.

SUZUKI, K. Neuropathology of developmental abnormalities. **Brain and Development**, v. 29, n. 3, p. 129-141, 2007.

TANG, X. Q. et al. ACS6, a Hydrogen sulfide-donating derivative of sildenafil, inhibits homocysteine-induced apoptosis by preservation of mitochondrial function. **Med Gas Res**, v. 1, n. 1, p. 20, 2011.

TEDESCHI, A.; DI GIOVANNI, S. The non-apoptotic role of p53 in neuronal biology: enlightening the dark side of the moon. **EMBO Rep**, v. 10, n. 6, p. 576-83, 2009.

TEILLET, M.-A.; LAPOINTE, F.; LE DOUARIN, N. M. The relationships between notochord and floor plate in vertebrate development revisited. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 20, p. 11733-11738, 1998.

TEILLET, M. A.; KALCHEIM, C.; LE DOUARIN, N. M. Formation of the dorsal root ganglia in the avian embryo: segmental origin and migratory behavior of neural crest progenitor cells. **Dev Biol**, v. 120, n. 2, p. 329-47, 1987.

THIERY, J. P. et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 871-90, 2009.

THOMPSON, L. P.; AL-HASAN, Y. Impact of oxidative stress in fetal programming. **J Pregnancy**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

THOTTUNGAL, A. D. et al. Caudal dysgenesis and sirenomelia-single centre experience suggests common pathogenic basis. **Am J Med Genet A**, v. 152A, n. 10, p. 2578-87, 2010.

TIERNEY, B. J. et al. Homocysteine inhibits cardiac neural crest cell formation and morphogenesis in vivo. **Dev Dyn**, v. 229, n. 1, p. 63-73, 2004.

TYAGI, N. et al. Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n. 6, p. H2649-H2656, 2005.

UELAND, P. M. et al. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. **Clin Chem**, v. 39, n. 9, p. 1764-79, 1993.

UFER, C.; WANG, C. C. The Roles of Glutathione Peroxidases during Embryo Development. **Front Mol Neurosci**, v. 4, p. 12, 2011.

ULREY, C. L. et al. The impact of metabolism on DNA methylation. **Hum Mol Genet**, v. 14 Spec No 1, p. R139-47, 2005.

UPCHURCH, G. R. et al. Homocyst(e)ine Decreases Bioavailable Nitric Oxide by a Mechanism Involving Glutathione Peroxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 27, p. 17012-17017, 1997.

VAN AERTS, L. A. G. J. M. Investigation, Using Rat Embryo Culture, of the Role of Methionine Supply in Folic Acid-Mediated Prevention of Neural-Tube Defects. **Toxicology in Vitro**, v. 9, n. 5, p. 677-684, 1995.

VAN AERTS, L. A. G. J. M. et al. Stereospecific in vitro embryotoxicity of l-homocysteine in pre- and post-implantation rodent embryos. **Toxicology in Vitro**, v. 7, n. 6, p. 743-749, 1993.

VAN DER PAL-DE BRUIN, K. M. et al. Periconceptional folic acid use and the prevalence of neural tube defects in The Netherlands. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 108, n. 1, p. 33-39, 2003.

VAN DER PUT, N. M. J. et al. Folate, homocysteine and neural tube defects: An overview. **Experimental Biology and Medicine**, v. 226, n. 4, p. 243-270, 2001.

VAN MIL, N. H.; OOSTERBAAN, A. M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. Teratogenicity and underlying mechanisms of homocysteine in animal models: a review. **Reprod Toxicol**, v. 30, n. 4, p. 520-31, 2010.

VAN STRAATEN, H. W. M. et al. Neurulation in the pig embryo. **Anat Embryol (Berl)**, v. 202, n. 2, p. 75-84, 2000.

VUONG, L.; CONLEY, S. M.; AL-UBAIDI, M. R. Expression and role of p53 in the retina. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 53, n. 3, p. 1362-71, 2012.

WALLIN, J. et al. The role of Pax-1 in axial skeleton development. **Development**, v. 120, n. 5, p. 1109-21, 1994.

WALTHER, C. et al. Pax: a murine multigene family of paired box-containing genes. **Genomics**, v. 11, n. 2, p. 424-34, 1991.

WANG, J. et al. Homocysteine Induces Apoptosis of Rat Hippocampal Neurons by Inhibiting 14-3-3 epsilon Expression and Activating Calcineurin. **PLoS One**, v. 7, n. 11, 2012.

WANG, W. et al. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends Plant Sci**, v. 9, n. 5, p. 244-252, 2004.

WEIBEL, E. R.; KISTLER, G. S.; SCHERLE, W. F. PRACTICAL STEREOLOGICAL METHODS FOR MORPHOMETRIC CYTOLOGY. **The Journal of Cell Biology**, v. 30, n. 1, p. 23-38, 1966.

WEIL, M. et al. Folic acid rescues nitric oxide-induced neural tube closure defects. **Cell Death Differ**, v. 11, n. 3, p. 361-3, 2004.

WHITLEY, D.; GOLDBERG, S. P.; JORDAN, W. D. Heat shock proteins: A review of the molecular chaperones. **Journal of Vascular Surgery**, v. 29, n. 4, p. 748-751, 1999.

WILTING, J.; EICHMANN, A.; CHRIST, B. Expression of the avian VEGF receptor homologues Quek1 and Quek2 in blood-vascular and lymphatic endothelial and non-endothelial cells during quail embryonic development. **Cell Tissue Res**, v. 288, n. 2, p. 207-23, 1997.

WILTING, J. et al. Kinetics and differentiation of somite cells forming the vertebral column: studies on human and chick embryos. **Anat Embryol (Berl)**, v. 190, n. 6, p. 573-81, 1994.

WODARZ, A.; HUTTNER, W. B. Asymmetric cell division during neurogenesis in Drosophila and vertebrates. **Mech Dev**, v. 120, n. 11, p. 1297-1309, 2003.

WOLPERT, L.; TICKLE, C. **Principles of Development**. 4. Oxford: Oxford University Press, 2010. 656.

WONG, C. M. et al. Protein carbonylation as a novel mechanism in redox signaling. **Circ Res**, v. 102, n. 3, p. 310-8, 2008.

YAMADA, T. et al. Control of cell pattern in the neural tube: motor neuron induction by diffusible factors from notochord and floor plate. **Cell**, v. 73, n. 4, p. 673-86, 1993.

YANG, H.-J. et al. Neural differentiation of caudal cell mass (secondary neurulation) in chick embryos: Hamburger and Hamilton Stages 16–45. **Developmental Brain Research**, v. 142, n. 1, p. 31-36, 2003.

ZHANG, H.-Y. et al. Neural tube defects and disturbed maternal folate- and homocysteine-mediated one-carbon metabolism. **Exp Neurol**, v. 212, n. 2, p. 515-521, 2008.

ZHANG, J.; YAN, W.; CHEN, X. p53 is required for nerve growth factor-mediated differentiation of PC12 cells via regulation of TrkA levels. **Cell Death Differ**, v. 13, n. 12, p. 2118-28, 2006.

ZHANG, W. et al. Roles of sequential ubiquitination of PCNA in DNA-damage tolerance. **FEBS Lett**, v. 585, n. 18, p. 2786-2794, 2011.

ZHAO, Q. et al. Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. **Developmental Dynamics**, v. 209, n. 4, p. 377-386, 1997.

ZHAO, W. et al. Neural tube defects and maternal biomarkers of folate, homocysteine, and glutathione metabolism. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v. 76, n. 4, p. 230-6, 2006.

ZHUO, J. M.; WANG, H.; PRATICO, D. Is hyperhomocysteinemia an Alzheimer's disease (AD) risk factor, an AD marker, or neither? **Trends Pharmacol Sci**, v. 32, n. 9, p. 562-71, 2011.

ZIMMERMANN, A. K. et al. Glutathione binding to the Bcl-2 homology-3 domain groove: a molecular basis for Bcl-2 antioxidant function at mitochondria. **J Biol Chem**, v. 282, n. 40, p. 29296-304, 2007.

ANEXOS

Publicações:

KOBUS, K.; NAZARI, E.; MÜLLER, Y. Effects of folic acid and homocysteine on spinal cord morphology of the chicken embryo. **Histochem Cell Biol**, v. 132, n. 5, p. 525-532, 2009.

MÜLLER, Y.M.R.; KOBUS, K.; NAZARI, E.M. Folic Acid, Homocysteine and Neural-Tube Defects. In: KLEIN, A. (Ed.). **Neural Tube Defects: Prevalence, Pathogenesis and Prevention**. New York: Nova Publishers, 2013. Cap. 4, p. 32-45.

KOBUS, K.; AMMAR, D.; NAZARI, E.M.; MÜLLER, Y.M.R. Homocysteine causes disruptions in spinal cord morphology and changes the expression of Pax 1/9 and Sox 9 gene products in the axial mesenchyme. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v. xx, n. x, p. xx-xx, 2013.

Effects of folic acid and homocysteine on spinal cord morphology of the chicken embryo

Karoline Kobus · Evelise Maria Nazari ·
Yara Maria Rauh Müller

Accepted: 28 July 2009 / Published online: 13 August 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract Maternal ingestion of folic acid (FA) reduces neural tube defects, which are associated with high homocysteine levels. Present study evaluated the effects of FA and homocysteine on cell proliferation and cell adhesion, as well as on apoptosis, throughout the development of the spinal cord and mesenchyme of chicken embryos. Normal closure of the neural tube and a regular distribution of the mesenchymal cells were observed in control and FA-treated embryos. All homocysteine-treated embryos and also 6 of 10 embryos treated with FA + homocysteine showed failure of closure of the neural tube. Homocysteine decreased the thickness of the mantle and marginal layers of the spinal cord, and FA did not prevent this effect. FA treatment reversed the decrease of proliferating cells in the spinal cord induced by homocysteine. FA-treated embryos showed the highest numerical density of apoptotic cells. Homocysteine treatment reduced NCAM expression in both spinal cord and mesenchymal tissue, and FA prevents this effect. These results are important because they demonstrate *in situ* that the imbalance between FA and homocysteine levels can lead to disruptions in spinal cord development, changing proliferation, apoptosis, and cell adhesion and consequently changing the arrangement of the spinal cord layers.

Keywords Spinal cord development · Cell proliferation · Apoptosis · Cell adhesion · Folic acid · Homocysteine

Introduction

Neural tube defects (NTD), which comprise disorders of primary neurulation, are among the most distressing congenital anomalies. These anomalies originate from failure of neural tube closure, termed true NTD, or from abnormalities of the paraxial mesoderm development, which cause anomalies in skeletal tissues around the neural tube (O'Rahilly and Muller 1992; Suzuki 2007). NTD have a multifactorial etiology that consists of a combination of genetic predisposition and/or environmental factors (Daly et al. 1997; Deraït et al. 2005).

Maternal ingestion of folic acid (FA) during pre-conception and early gestation prevents the occurrence of NTD in about 50–70% of cases, according to recent epidemiological studies (Persad et al. 2002; Kalter 2003; Pacheco et al. 2006). Dietary FA deficiency as well as nutritional disorders, such as B₆ and B₁₂ vitamin deficiency, results in increased homocysteine (Hcy) plasmatic levels (De la Calle et al. 2003; Brauer and Tierney 2004; Pintó et al. 2005). In this way, Hcy tends to accumulate intracellularly (Limpach et al. 2000) and may be related to decreased DNA methylation, resulting in DNA breakage or triggering of abnormal apoptosis in the nervous system (Mattson and Shea 2003). Studies in birds and rodents have demonstrated a correlation between high Hcy levels and the occurrence of congenital anomalies (De las Casas et al. 2003; Afman et al. 2005; Dunlevy et al. 2006).

In avian embryos, normal levels of Hcy in the serum are similar to those in other vertebrates ($10 \pm 5 \mu\text{mol/l}$) (Rosenquist et al. 1996), and administration of Hcy in different concentrations causes NTD (Limpach et al. 2000; Epeldegui et al. 2002). Developmental studies using chicken embryos were encouraged because the *in ovo* development occurs in the absence of maternal factors;

K. Kobus · E. M. Nazari · Y. M. R. Müller (✉)
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética,
Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa
Catarina, Florianópolis, Santa Catarina 88040-900, Brazil
e-mail: yararm@ccb.ufsc.br

Chapter

FOLIC ACID, HOMOCYSTEINE AND NEURAL-TUBE DEFECTS

Yara Maria Rauh Müller, Karoline
Kobus and Evelise Maria Nazari*

¹Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de
Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em
Biologia Celular e do Desenvolvimento, Campus
Universitário, Florianópolis, SC, Brazil

ABSTRACT

Knowledge of the cellular mechanisms responsible for normal neural-tube formation is essential to comprehending the genesis of neural-tube defects (NTD), as well as their prevention. Neurulation is the early embryonic process in which the neural plate undergoes shaping and folding to form the neural tube, the precursor of the central nervous system (CNS). NTD result from a failure of the rise and fusion of the neural folds, which can affect the brain and/or spinal cord. The mechanism of NTD genesis has not yet been established, but there is consensus in the literature that it involves disruptions in neural and also mesenchymal tissues. These defects have a multifactorial etiology, a combination of genetic predisposition and/or environmental factors. In humans, supplementation with folic acid (FA) during preconception and

* Corresponding author: Yara Maria Rauh Müller.

Homocysteine Causes Disruptions in Spinal Cord Morphology and Changes the Expression of Pax 1/9 and Sox 9 Gene Products in the Axial Mesenchyme

Karoline Kobus,¹ Dib Ammar,¹ Evelise Maria Nazari,^{1,2} and Yara Maria Rauh Müller^{1,2*}

¹Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil

²Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil

Received 5 September 2012; Revised 1 February 2013; Accepted 26 February 2013

A02

BACKGROUND: Neural tube defects (NTD) involve disruptions in the axial mesenchyme, and are related to an imbalance between folic acid (FA) and homocysteine (Hcy). This study evaluated the effects of FA/Hcy imbalance on cell proliferation and expression of the Pax 1/9 and Sox 9 gene products in the axial mesenchyme of chickens. **METHODS:** Embryos were incubated (38°C) and pretreated at 24 h and treated at 46 h of incubation. The experimental groups were: FA—pretreated with saline and treated with 0.5 µg FA/ saline; Hcy—pretreated with 50 µl saline and treated with 20 µmol D,L-Hcy/50 µl saline; FA+Hcy—pretreated with 0.5 µg FA/50 µl saline and treated with 20 µmol D,L-Hcy/50 µl saline; and the control embryos were pretreated and treated with saline. Embryos were analyzed at E4 and E6. Immunohistochemistry was performed to identify proliferating cells and the expression of the gene products of Pax 1/9 and Sox 9. Total RNA of the E4 embryos was extracted and an RT-qPCR assay was performed to quantify Pax 1/9 mRNA expression. **RESULTS:** Hcy treatment caused spinal NTD and abnormalities in axial mesenchyme development, affecting the distribution of sclerotomal cells and chondrification. Hcy also reduced cell proliferation and changed the expression of Pax 1/9 and Sox 9 in the mesenchyme. **CONCLUSIONS:** Our data clarified the relationship between spinal NTD genesis and disruptions of Pax 1/9 and Sox 9 in the axial mesenchyme caused by the FA / Hcy imbalance. *Birth Defects Research (Part A) 00:000-000, 2013.* © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: spinal NTD; homocysteine; folic acid; axial mesenchyme; Pax 1/9; Sox 9; chicken embryos

INTRODUCTION

Neural tube defects (NTD) occur in an estimated 300,000 newborns/year worldwide. Children affected by spinal NTD have multiple disabilities including some degree of lower limb paralysis, bowel and bladder incontinence, and sometimes other conditions including hydrocephalus and intellectual and learning disabilities (Christianson et al., 2006). NTD are complex congenital anomalies of the central nervous system, which are classified into three categories: (1) "true" NTD, which result from failure of neural-tube closure, exposing nerve tissues to the environment, as in anencephaly and myelomeningocele (open spina bifida); (2) abnormal development of the axial mesenchyme causes bone defects and herniated neural and/or meningeal tissues, forming a cystic bulge that is covered by skin, as in encephalocele and myelomeningocele/meningocele (spina bifida cystic); (3) a bone defect is present, particularly missing vertebral arches, and the defect is covered by skin, but may not have involvement

of the neural tissue, as in spina bifida occulta and caudal regression (Alles and Sulik, 1993; Suzuki, 2007; Copp and Greene, 2012).

Human NTD occurrence is related to high homocysteine (Hcy) plasma levels, due to maternal FA deficiency (Kirke et al., 1997; Brauer and Tierney, 2004; Zhang et al., 2008). Since 1976, periconceptual use of FA has been associated with a reduction in the risk of women having NTD-affected pregnancies (Smithells et al., 1976).

Evelise Maria Nazari and Yara Maria Rauh Müller contributed equally to this work.

Supported by a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*Correspondence to: Yara Maria Rauh Müller, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil. E-mail: yaramm@ccb.ufsc.br

Published online 00 Month 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI 10.1002/bdra.23131

Birth Defects Research (Part A): Clinical and Molecular Teratology 00:00-00 (2013)

ID: nagarajulum Time: 15:29 I Path: N:/3b2/BDRA/ol00000/130024/APPFfile/JW-BDRA130024

NOTE TO AUTHORS: This will be your only chance to review this proof. Once an article appears online, even as an EarlyView article, no additional corrections will be made.