

GILIAN FERNANDO BOURCKHARDT

**TOXICIDADE CELULAR DA HOMOCISTEÍNA SOBRE O
PROCESSO DE OSSIFICAÇÃO ENDOCONDAL NO
DESENVOLVIMENTO DE MEMBROS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento – PGBCD, do Centro de Ciências Biológicas – CCB, da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e do Desenvolvimento. Orientadora: Prof^a. Dra. Evelise Maria Nazari.

**FLORIANÓPOLIS
2017**

Bourckhardt, Gilian Fernando

Toxicidade celular da homocisteína sobre o processo de ossificação endocondral no desenvolvimento de membros/Gilian Fernando Bourckhardt; orientadora Prof^a. Dra. Evelise Maria Nazari - Florianópolis, SC, 2017.

96 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. Hiperhomocisteinemia. 3. VEGF/VCAM-1/NOS3. 4. Osteocalcina. 5. Mitofagia. 6. Estresse do RER. I. Nazari, Evelise Maria. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. I. Título.

**"Toxicidade celular da homocisteína sobre o processo de ossificação endocondral
no desenvolvimento de membros"**

Por

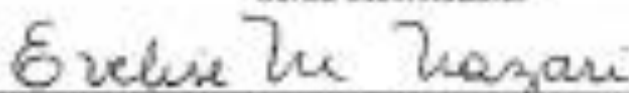
Gilvan Fernando Bourckhardt

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca
Examinadora (12/PPGCCD/2017) do Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e do Desenvolvimento - UFSC.



Prof.(a) Dr.(a) Geison de Souza Izidio
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento

Banca examinadora:



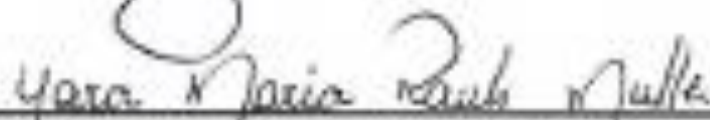
Dra. Evêlise Maria Nazari (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientadora



Dra. Silvano Allodi (Universidade Federal do Rio de Janeiro)



Dr. Geison de Souza Izidio (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dra. Yara Maria Raub Müller (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 09 de agosto de 2017.

Dedico à pessoa mais importante da minha vida,
minha mãe Márcia!

AGRADECIMENTOS

É tão bom sonhar. Há 4 anos atrás sonhei e agora tudo torna-se realidade. Mas este desejo não é só meu, é de muitas pessoas, as quais quero agradecer.

Primeiramente gostaria de agradecer ao apoio financeiro da Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC), a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do desenvolvimento por viabilizar a execução desta pesquisa.

Esta pesquisa só foi possível porque foi brilhantemente orientada pela professora Dra. Evelise Maria Nazari, a quem devo gratidão por apostar em mim quando ninguém mais apostaria. Sou grato pela oportunidade concedida e por permitir o meu crescimento profissional. Sem dúvidas, nossas “timinas translocadas” nos renderam bons momentos de discussão e de construção de conhecimentos. Obrigado por tudo!

Agradeço à professora Dra. Yara Maria Rauh Müller por me ensinar que ciência se faz com persistência. Nunca desistir. Vamos pra frente!

Ao professor Dr. Fabiano Dahlke (CCA/UFSC) e a empresa Tyson do Brasil por disponibilizar os ovos fertilizados de galinha doméstica fundamentais para realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (LRDA), pelos momentos de colaboração, de choros e de risos. Muito obrigado.

Um agradecimento especial para minha pequena/grande menina (IC) Maria Luísa, pelo comprometimento e responsabilidade na execução das tarefas, e principalmente pelas trocas de conhecimento. É sempre muito bom ensinar para quem quer e tem vontade de aprender.

A minha “irmã-gêmea” Eliane, muito obrigado por trilhar comigo esse caminho. Por compartilhar e contribuir para realização desse sonho. Se eu estivesse sozinho, sem dúvida não seria a mesma coisa.

As equipes do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) e do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) obrigado pelos auxílios técnicos na condução dos experimentos.

Agradeço à minha família de SC (mãe, tia e vó) e à minha família de SP (mãe e irmã), pelo amor, compreensão e apoio incondicional. Amo vocês!

Ao meu amigo Maicon Willian pelos conselhos, pelos momentos de descontração, pelos momentos de convivência e principalmente por aturar meu estado de espírito todas as manhãs ao acordar (sei que não sou fácil nas primeiras horas do dia!), obrigado por existir em minha vida, meu amigo.

A minha amiga Débora (Bee), pelas conversas produtivas e não produtivas, pelos momentos em que me ouviu e ouve, pelas horas de diversão e risos soltos e principalmente por me acompanhar desde sempre. Quero você sempre comigo, muito obrigado.

Ao meu amigo Danilo (Bibi), por compartilhar momentos de muita diversão que aliviaram as preocupações diárias e tornaram a caminhada mais leve, obrigado.

As minhas amigas Luciane e Thaline pelos sábios conselhos, pelas chamadas de atenção, pelos passeios ao shopping e por me ouvir muitas vezes, obrigado.

Ao meu amigo Renan, pelos momentos de disciplina nos treinos e pelos momentos divertidos ao seu lado, muito obrigado.

Aos amigos Débora, Djúlia e Pedro Henrique, vocês apareceram ao acaso em minha, mas dela não mais sairão. Obrigado por tornar esse período mais feliz e obrigado por estar sempre ao meu lado.

Ao grupo seleta de divas “Só as princesas”, pelas companhias nas aulas de ginástica, pelos momentos de conversas engraçadas, por me compreender e por me dar ânimo para seguir em frente, obrigado.

Aos meus amigos Carlos Augusto, Madson, Manuela e Thiciane, pelos momentos que me proporcionam diariamente, muito obrigado. A ciência nos aproximou, mas as ideias em comum, o carinho e a compreensão nos unirão pra sempre. Vocês são especiais!

Enfim, a todos que de uma forma ou de outra me deram força e que contribuíram para realização deste sonho, muito obrigado!

*"Fé eterna na ciência."
Oswaldo Cruz*

RESUMO

A ossificação endocondral durante o desenvolvimento requer constante aporte sanguíneo, o qual é mantido pela rede vascular embrionária. Níveis elevados de homocisteína (Hcy) têm propriedades vasculotóxicas, porém ainda não está claro como a Hcy interfere na formação de vasos sanguíneos na ossificação. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito de níveis elevados de Hcy na ossificação endocondral durante o desenvolvimento dos membros de embriões de *Gallus domesticus*, sobretudo na formação de vasos sanguíneos, e o seu impacto na mineralização óssea e nas células mesenquimais em torno do molde cartilaginoso/ósseo. Para tal, embriões de *G. domesticus* foram tratados em E2 com 20 μmol D-L Hcy/50 μL solução salina e analisados em E6 e E10. Embriões do grupo controle foram tratados somente com 50 μL de solução salina. Inicialmente, não foram observadas diferenças nas células em proliferação e em apoptose entre embriões tratados com Hcy e embriões-controle, em E6 e E10. Não foram identificadas diferenças na área dos moldes cartilaginoso/ósseo entre os membros de embriões tratados com Hcy e embriões-controle. Em E6 e E10, houve uma redução significativa nos conteúdos de VEGF, VCAM-1 e NOS3 e osteocalcina em embriões tratados com Hcy. Nas análises ultraestruturais das células mesenquimais dos embriões em E6 tratados com Hcy foram observadas dilatações nas cristas mitocondriais e no lúmen do RER. Além disso, em embriões tratados com Hcy foi observado um aumento de 19,0% no número de perfis mitocondriais e uma redução no número de cisternas do RER. Nos embriões em E10 foram observadas apenas dilatações no lúmen do RER. No entanto, em E6 e E10 foi observado um aumento na área das cisternas do RER nos embriões tratados com Hcy. Nas células mesenquimais em E6, foi observado um aumento no conteúdo da proteína DRP1 (marcadora de fissão mitocondrial) e uma redução no conteúdo das proteínas MFN1 e MFN2 (marcadoras de fusão mitocondrial) após o tratamento com Hcy. No entanto, em embriões E10 não foram encontradas diferenças no conteúdo de DRP1 e MFN1, enquanto que foi observado um aumento no conteúdo de MFN2. Nos embriões em E6 tratados com Hcy, foi observada uma diminuição no conteúdo das proteínas Bak e Bcl2 nas células mesenquimais. Em E10, o tratamento com Hcy não alterou os conteúdos das proteínas Bak e Bcl2. Adicionalmente, o tratamento com Hcy induziu mitofagia nas células mesenquimais em embriões E6, reconhecida pelo aumento no conteúdo das proteínas PRK8, LC3II e p62 (marcadoras de mitofagia). Por outro lado, em E10, o tratamento com Hcy induziu apenas redução no conteúdo de PRK8. Por último, em E6 e E10, o tratamento com Hcy induziu estresse no RER, identificado pelo aumento no conteúdo da proteína GRP78. Nossos resultados mostram que elevados níveis de Hcy interferiram na ossificação endocondral, promovendo a diminuição na formação de vasos sanguíneos no molde cartilaginoso e na matriz óssea. Além disso, o tratamento com Hcy desencadeou outros mecanismos de respostas celulares relacionados à sobrevivência, como a mitofagia e o estresse no RER no mesênquima durante o desenvolvimento de membros.

Palavras-chave: hiperhomocisteinemia; proteínas VEGF/VCAM-1/NOS3; osteocalcina; mitofagia; estresse do RER.

ABSTRACT

Developmental endochondral ossification requires constant blood supply, which is provided by the embryonic vascular network. High levels of homocysteine (Hcy) has vasculotoxic properties, but it remains unclear how Hcy disrupts blood vessel formation in ossification. The aim of this study was to investigate the effect of high levels of Hcy on endochondral ossification during limb development of *Gallus domesticus* embryos, especially in the blood vessels formation, and its impact on bone mineralization and in mesenchymal cells around the cartilage/bone molds. For this, *G. domesticus* embryos were treated at E2 with 20 μmol D-L Hcy/50 μL saline and analyzed at E6 and E10. Control embryos received exclusively 50 μL saline solution. First, no differences were observed in proliferating and apoptotic cells between Hcy-treated embryos and control embryos at E6 and E10. No differences were identified in the area of limb ossification in Hcy-treated and untreated embryos. At E6 and E10, there was a significant decrease in the contents of VEGF, VCAM-1, NOS3 and osteocalcin in Hcy-treated embryos. Ultrastructural analysis of mesenchymal cells of Hcy-treated embryos at E6, showed mitochondrial crest and RER lumen dilatations. Moreover, in Hcy-treated embryos, an increase of 19.0% on the number of mitochondrial profiles and a decrease on the number of RER cisterns were found. In embryos at E10, only dilatation of RER lumen was observed. However, at E6 and E10 an increase of the area of RER cisterns was observed in Hcy-treated embryos. In mesenchymal cells at E6, an increase in the content of DRP1 protein (mitochondrial fission marker) and a decrease in the contents of MFN1 and MFN2 proteins (mitochondrial fusion markers) were observed after treatment with Hcy. However, in embryos at E10 no differences were found in the contents of DRP1 and MFN1, while it was observed an increase in the content of MFN2. In Hcy-treated embryos at E6, a decrease in the content of Bak and Bcl2 proteins was observed in mesenchymal cells. At E10, Hcy treatment did not change the contents of Bak and Bcl2 proteins. Additionally, Hcy-treatment induced mitophagy in mesenchymal cells of embryos at E6, recognized by the increase on the contents of PRK8, LC3II e p62 proteins (mitophagy markers). On the other hand, at E10, Hcy-treatment induced only a decrease in PRK8 content. Finally, at E6 and E10, Hcy-treatment induced RER stress, identified by the increase of the content of GRP78 protein. Our results showed that high levels of Hcy interfered on the endochondral ossification, promoting a decrease of formation of blood vessels cartilage molds and bone matrix. In addition, Hcy-treatment triggered other mechanisms of cellular responses, related with as cell survival, such as mitophagy and RER stress on mesenchyme during limb development.

Keywords: hyperhomocysteinemia; VEGF/VCAM-1/NOS3 proteins; osteocalcin; mitophagy; RER stress.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 23 |
| 1.1 HOMOCISTEÍNA E AS RESPOSTAS CELULARES | 23 |
| 1.2 FORMAÇÃO DE CARTILAGENS E OSSOS NOS MEMBROS | 27 |
| 1.3 FATORES VASCULOGÊNICOS E ANGIOGÊNICOS NO AMBIENTE DE OSSIFICAÇÃO | 30 |
| 1.4 HIPERHOMOCISTEINEMIA E O PROCESSO DE OSSIFICAÇÃO ENDOCONDAL DOS MEMBROS EM TETRÁPODES | 33 |
| 2 OBJETIVOS | 35 |
| 2.1 GERAL | 35 |
| 2.2 ESPECÍFICOS | 35 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 36 |
| 3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO | 36 |
| 3.2 DELINEAMENTO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS | 36 |
| 3.3 PREPARO DOS EMBRIÕES PARA ANÁLISES MICROSCÓPICAS | 37 |
| 3.4 ANÁLISES MORFOLÓGICAS DOS MOLDES CARTILAGINOSOS E DA MATRIZ ÓSSEA | 37 |
| 3.5 MARCAÇÕES CELULARES POR IMUNO-HISTOQUÍMICA | 38 |
| 3.6 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO | 39 |
| 3.7 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS POR CITOMETRIA DE FLUXO | 40 |
| 3.8 DETECÇÃO DAS PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING | 40 |
| 3.9 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE ATOFAGIA PELA HCY | 41 |
| 3.10 IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS EM APOPTOSE PELO MÉTODO DE TUNEL | 41 |
| 3.11 ANÁLISES ESTATÍSTICA | 42 |
| 4 RESULTADOS | 43 |
| 4.1 EFEITO DA HCY NA PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE | 43 |
| 4.2 IMPACTO DA HOMOCISTEÍNA NA OSSIFICAÇÃO ENDOCONDAL | 45 |
| 4.2.1 Análises Morfométricas da Área de Ossificação | 45 |
| 4.2.2 Efeito da Hcy na Formação de Vasos Sanguíneos | 48 |
| 4.2.3 Efeito da Hcy no Conteúdo de OC | 52 |
| 4.3 TOXICIDADE CELULAR DA HCY SOBRE AS CÉLULAS MESENQUIMAIS | 54 |
| 4.3.1 Efeito da Hcy nas Estruturas Subcelulares | 54 |
| 4.3.2 Efeito da Hcy nas Mitocôndrias | 64 |
| 4.3.3 Efeito da Hcy no Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) | 68 |
| 5 DISCUSSÃO | 72 |
| 6 CONCLUSÕES | 81 |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 82 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Metabolismo da homocisteína (Hcy). | 24 |
| Figura 2: Representação esquemática do processo de ossificação endocondral. | 28 |
| Figura 3: Representação do delineamento experimental | 37 |
| Figura 4: Células em proliferação nos membros de embriões em E6 marcadas com anticorpo anti-fosfohistona H3..... | 44 |
| Figura 5: Células em proliferação nos membros de embriões em E10 marcadas com anticorpo anti-fosfohistona H3..... | 44 |
| Figura 6: Células apoptóticas em membros de embriões em E6 e E10. | 45 |
| Figura 7: Efeito da Hcy sobre morfometria dos moldes de cartilagem de membros em embriões em E6 | 46 |
| Figura 8: Efeito da Hcy sobre a área de ossificação em membros de embriões em E10 | 47 |
| Figura 9: Imunolocalização e quantificação das células VEGF/VCAM-1/NOS3-positivas em E6 | 50 |
| Figura 10: Imunolocalização e quantificação das células VEGF/VCAM-1/NOS3-positivas em E10 | 52 |
| Figura 11: Efeito da Hcy no conteúdo de osteocalcina (OC) em embriões E10..... | 53 |
| Figura 12: Micrografias de condrócitos e células mesenquimais analisados em membros de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E6 e E10 | 55 |
| Figura 13: Micrografias dos núcleos celulares em membros de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E6 e E10 | 56 |
| Figura 14: Micrografias do Aparelho de Golgi em membros de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E6 e E10 | 58 |
| Figura 15: Efeito da Hcy sobre a ultraestrutura da mitocôndria em células do mesênquima condensado dos membros em desenvolvimento em E6 e E10..... | 60 |
| Figura 16: Efeito da Hcy sobre o retículo endoplasmático rugoso (RER) em células do mesênquima condensado dos membros em desenvolvimento em E6 e E10..... | 63 |
| Figura 17: Imunolocalização e quantificação de DRP1, MFN1 e MFN2 em embriões E6 e E10 . | 65 |
| Figura 18: Quantificação das proteínas Bak e Bcl2 em membros de embriões em E6 e E10 | 66 |
| Figura 19: Indução de mitofagia por Hcy em embriões E6 e E10. | 67 |
| Figura 20: Imunolocalização e quantificação da proteína GRP78 | 69 |
| Figura 21: Efeito da Hcy nas proteínas envolvidas na formação de vasos sanguíneos e na mineralização da matriz durante a ossificação | 70 |
| Figura 22: Efeito da Hcy nas proteínas envolvidas na mitofagia e no estresse do RER | 71 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1: Anticorpos primários utilizados nas análises por imuno-histoquímica e citometria de fluxo. | 39 |
| Quadro 2: Anticorpos secundários utilizados nas análises por imuno-histoquímica e citometria de fluxo. | 39 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------|---|
| AF | Ácido Fólico |
| ATP | Adenosina trifosfato, do inglês, <i>adenosine triphosphate</i> |
| Bak | Proteína killer-antagonista homóloga a Bcl2, do inglês <i>Bcl2-antagonist killer</i> |
| Bax | Proteína X associada ao Bcl2, do inglês <i>Bcl-2-associated X protein</i> |
| Bcl2 | Proteína da célula-B de linfoma 2, do inglês <i>B-cell lymphoma 2</i> |
| BMP | Proteína morfogenética óssea, do inglês <i>bone morphogenetic protein</i> |
| DAB | Diaminobenzidina, do inglês <i>3,3'-Diaminobenzidine</i> |
| DAPI | do inglês <i>4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride</i> |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i> |
| DRP1 | Proteína relacionada com dinamina 1, do inglês <i>dynamamin-related protein 1</i> |
| DTN | Defeitos do tubo neural |
| E | Dia embrionário |
| EPM | Erro padrão da média |
| EROS | Espécies reativas de oxigênio (do inglês <i>reactive oxygen species</i>) |
| FADD | Proteína de Domínio de Morte Associada a Faz, do inglês <i>Fas-associated protein with death domain</i> |
| Fas-L | Ligante Fas, do inglês <i>fas ligand</i> |
| FBS | Soro fetal bovino, do inglês <i>fetal bovine serum</i> |
| FGF | Fator de crescimento fibroblástico, do inglês <i>fibroblast growth factor</i> |
| FSC-A | Do inglês <i>forward scatter</i> |
| GLA | Ácido Y-carboxiglutâmico |
| GRP78 | Proteína-78 regulada pela glicose, do inglês <i>glucose-regulated protein</i> |
| Hcy | Homocisteína, do inglês <i>homocysteine</i> |
| HE | Hematoxilina e Eosina |
| HH | Hamburger e Hamilton |
| HSPG | Proteoglicano de heparan sulfato, do inglês <i>heparan sulfate proteoglycans</i> |
| Hsp90 | Proteína de choque térmico 90, do inglês <i>heat shock protein 90</i> |
| HUVEC | Células endoteliais de veia umbilical humana, do inglês <i>human umbilical vein endothelial cells</i> |
| ICAM-1 | Molécula de adesão intercelular 1, do inglês <i>intercellular cell adhesion molecule-1</i> |
| IgG | Imunoglobulina G |
| Kb | Quilobyte |
| kDa | Quilodalton |
| LA | Laranja de acridina |
| LC3II | Do inglês <i>LC3-phosphatidylethanolamine conjugate</i> |

| | |
|--------|--|
| MEC | Matriz Extracelular |
| MET | Microscopia eletrônica de transmissão |
| MFN1/2 | Mitofusinas 1 e 2 |
| mRNA | Ácido Ribonucleico Mensageiro, do inglês <i>messenger ribonucleic acid</i> |
| NA | Densidade numérica de células por área |
| NOS3 | Óxido nítrico sintase (do inglês <i>nitric oxid synthase</i>) |
| OC | Osteocalcina |
| ON | Óxido nítrico |
| PBS | Tampão fosfato salino (do inglês <i>phosphate buffered saline</i>) |
| PRK8 | Parquina |
| PH3 | Fosfohistona H3, do inglês <i>phospho histone H3</i> |
| RER | Retículo endoplasmático rugoso |
| RNA | Ácido Ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic acid</i> |
| SSC-A | Do inglês <i>side scatter</i> |
| TBS | Tampão tris-glicina |
| TNF | Fator de necrose tumoral, do inglês <i>tumoral necrosis factor</i> |
| TRK | Tirosina quinase |
| TUNEL | Do inglês <i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i> |
| VCAM-1 | Molécula de adesão celular vascular 1, do inglês <i>vascular cell adhesion molecule-1</i> |
| VEGF | Fator de crescimento endotelial vascular, do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i> |
| VEGFR | Receptor do fator de crescimento endotelial vascular, do inglês <i>receptor for vascular endothelial growth factor</i> |

1 INTRODUÇÃO

O aumento dos níveis plasmáticos do aminoácido homocisteína (Hcy), causado por alterações metabólicas, constitui uma condição conhecida como hiperhomocisteinemia (HHcy). Estudos epidemiológicos investigando a relação de HHcy com o aparecimento de anomalias congênitas e condições patológicas vem sendo desenvolvidos desde a década de 1960. Em 1962 foram identificados, em pacientes com níveis elevados de Hcy na urina, comprometimentos no sistema nervoso (Carson e Neill, 1962). E em 1969 foi reconhecida, pela primeira vez, a relação entre HHcy e as patologias relacionadas ao sistema cardiovascular, sobretudo aos danos arteriais relacionados à aterosclerose (McCully, 1969).

Somente na década de 1990, os estudos confirmaram a hipótese da HHcy como um fator de risco para doenças cardiovasculares (Clarke et al., 1991; Fenech et al., 1998; Refsum et al., 1998). Hoje, além de doenças cardiovasculares, é amplamente aceito que níveis elevados de Hcy (mais de 15 μM) são considerados um fator de risco para o desenvolvimento de distúrbios neurológicos, doença renais, osteoporose, distúrbios gastrointestinais e principalmente, desenvolvimento de anomalias congênitas (Givvimani et al., 2012; Iacobazzi et al., 2014; Lehotsky et al., 2015; Perna e Ingrosso, 2016; Schalinske e Smazal, 2012).

As anomalias congênitas relacionadas à condição de HHcy incluem os defeitos do tubo neural (DTN), anomalias cardiovasculares, fendas orofaciais, anomalias do sistema urinário e anomalias em membros (Ganguly e Alam, 2015; 2006; Ma et al., 2017; Shaw et al., 1995; van Mil et al., 2010).

Atualmente, mesmo conhecendo a relação entre desequilíbrios no metabolismo de Hcy e o aparecimento de anomalias congênitas, a etiologia destas anomalias, a influência morfogenética e a forma como os micronutrientes estão envolvidos nestes processos são em grande parte desconhecidos. Portanto, torna-se necessário realizar estudos que visem compreender os mecanismos celulares e moleculares que podem ser comprometidos frente à condição de HHcy, no sentido de esclarecer a toxicidade da Hcy durante o desenvolvimento embrionário.

Especificamente, nesta tese foi investigado o efeito de elevados níveis de Hcy em diferentes etapas do processo de ossificação endocondral no desenvolvimento de membros de embriões, utilizando como organismo modelo, embriões de *Gallus domesticus*.

1.1 HOMOCISTEÍNA E AS RESPOSTAS CELULARES

Hcy é um aminoácido sulfurado, não essencial, derivado da via biossintética do aminoácido essencial metionina, que é metabolizado a partir de duas vias distintas: por remetilação à metionina ou por transulfuração à cisteína (Selhub, 1999; Škovierová et al., 2016). Especificamente no processo de remetilação, a Hcy adquire grupamentos metil a partir da conversão de 5-metiltetrahidrofolato a tetrahidrofolato pela ação da enzima metionina sintetase,

cuja atividade é dependente de ácido fólico (AF). Assim, nesta via metabólica, o AF atua como um fator importante no mecanismo de controle das concentrações intracelulares de Hcy (Fig. 1) (Hague, 2003; Mattson et al., 2002).

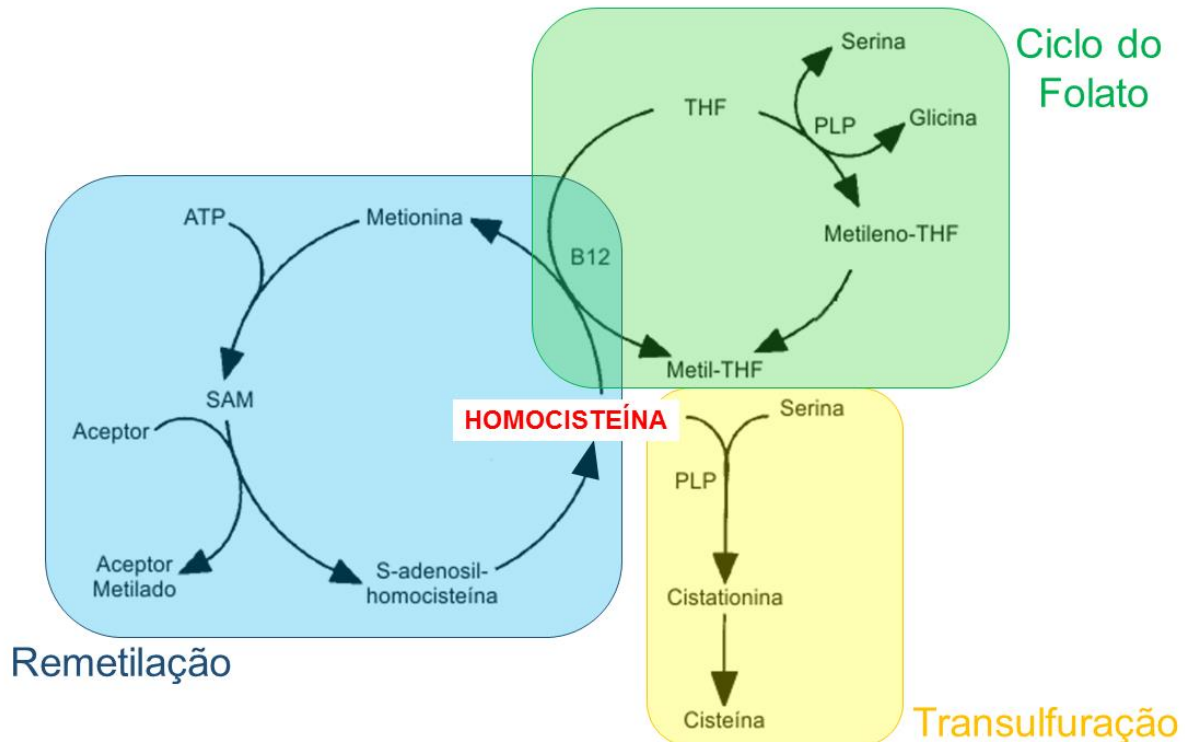


Figura 1: Metabolismo da homocisteína (Hcy). As setas indicam reações enzimáticas. A Hcy é metabolizada a partir de duas vias distintas: por remetilação à metionina (quadrado azul) ou por transulfuração à cisteína (quadrado amarelo). Ciclo do folato (quadrado verde) (Adaptado de Selhub, 1999).

De um modo geral, os organismos animais não são capazes de sintetizar o AF, por isso a principal fonte de incorporação desta vitamina é através da alimentação. Uma dieta rica em AF é principalmente composta por vegetais folhosos verdes, leguminosas, frutas cítricas e carnes vermelhas (Eskes, 1997).

Nas condições de acúmulo intracelular de Hcy, como na HHcy, são frequentes situações de estresse oxidativo e alterações no processo de síntese de proteínas e lipídeos, bem como de danos ao DNA induzidos pela não-remetilação de Hcy à metionina. Essas situações afetam diretamente os mecanismos de proliferação, diferenciação e apoptose (Ivanov et al., 2007; Oikawa et al., 2003). Nos processos de proliferação e diferenciação celular, ocorrem ciclos contínuos de replicação do DNA, por isso uma falha ou mudança no processo de metilação, pode ser mantida nas gerações celulares (Waterland, 2006).

De um modo geral, a Hcy é capaz de gerar condições celulares adversas que podem interferir em mecanismos celulares básicos, como a proliferação por exemplo, porém ainda pouco se conhece sobre a toxicidade celular da Hcy e como essas condições podem interferir na formação de estruturas embrionárias, como os membros (Škovierová et al., 2016).

Quando as células são submetidas a condições de estresse, podem desencadear mecanismos que vão desde a ativação de vias que promovem a sobrevivência até a ativação de vias relacionadas à morte celular programada. As células desencadeiam as respostas de proteção dependendo da duração e da natureza da condição de estresse e também do tipo celular envolvido (Fulda et al., 2010).

Os insultos celulares podem ser gerados a partir da exposição a agentes teratogênicos, tais como condições metabólicas maternas, medicamentos, radiações ou ainda por substâncias químicas. Nesses casos, o dano ao DNA é um evento inicial comum (Christmann et al., 2003; Roos e Kaina, 2006).

Primeiramente, a resposta celular a um insulto é desencadeada de modo a garantir a sobrevivência celular. Entretanto, se houver falha nessa primeira resposta e a condição nociva não for solucionada, as células ativam vias de sinalização de morte celular, como por exemplo, as vias que desencadeiam apoptose. Neste sentido, a capacidade de desencadear uma resposta adequada é o que determina o seu destino (Fulda et al., 2010).

Rupturas nos filamentos e quebras das fitas de DNA são consideradas lesões-chave na ativação de respostas aos danos ao DNA. Geralmente, em condições de HHcy, os danos ao DNA são induzidos pela não-remetilação e/ou hipometilação de Hcy para metionina. Nestas condições, os grupamentos metil necessários para as reações de metilação para o DNA não são gerados (Dean et al., 2005; Moritz et al., 2005; Muriel e Castro, 1998; Reik et al., 2001; Waterland, 2006).

Dados da literatura apontam para a capacidade da Hcy em gerar danos ao DNA – reconhecidos pela proteína γ -H2A.X – que resultaram em alterações nas proteínas envolvidas no ciclo celular e na diferenciação de condrócitos durante o desenvolvimento de membros (Bourckhardt et al., 2015). Além disso, os danos ao DNA gerados por elevados níveis plasmáticos de Hcy, alteram a metilação do DNA, interferindo no desenvolvimento do sistema nervoso (Kruman et al., 2000).

Uma vez gerado o dano, a indução da proteína p53 pode acionar diferentes programas celulares, como por exemplo as proteínas reguladoras do ciclo celular, e ainda fatores pró-apoptóticos (Vousden e Lane, 2007). Quando os danos ao DNA são gerados, os processos de reparo são necessários para garantir a sobrevivência celular. Alternativamente, se o dano é muito extenso, são ativados sistemas efetores para mediar a morte celular (Hoeijmakers, 2001; Roos e Kaina, 2006).

Existem vários mecanismos de morte celular, que é determinada de acordo a capacidade da célula em lidar com o insulto. O mecanismo classicamente estudado é a apoptose que pode ser desencadeada por diferentes vias (Fulda et al., 2010). Em condições de HHcy já foram observadas diferentes respostas. Células da crista neural em embriões de galinha tratadas com Hcy (30 μ mol/L) apresentaram redução em 60% nas taxas de apoptose (Boot et al., 2004). Por outro lado, em células mesenquimais da medula óssea o tratamento com Hcy resultou num aumento de morte celular por apoptose (Levasseur, 2009).

A apoptose é um mecanismo no qual há o envolvimento de diferentes proteínas, como por exemplo as proteínas da família Bcl2, dos receptores de morte e a liberação do citocromo c. Além disso, a apoptose envolve um conjunto de alterações morfológicas e bioquímicas explicadas pela ativação de caspases, desse modo, torna-se um evento caspase-dependente (Samali et al., 1999; Vaux et al., 1988; Yang et al., 1997).

As caspases são uma família de proteases que agem como efetoras de apoptose. São sintetizadas como pró-enzimas inativas, que depois de clivadas tornam-se ativas. Essa ativação pode ocorrer por diferentes mecanismos, como por exemplo a estimulação do receptor Fas-L da família TNF (do inglês *Tumor Necrosis Fator*), que recruta a molécula adaptadora do domínio de morte associado a Fas (FADD do inglês *Fas-associated death domain*) e a procaspase-8 para induzir a apoptose (Ashkenazi, 2008).

Além disso a apoptose também pode ser desencadeada pelo desequilíbrio de proteínas antiapoptóticas x pró-apoptóticas. Neste sentido, a proteína Bcl2 é considerada um regulador-chave da apoptose (Adams e Cory, 2007). Atua desempenhando papel antiapoptótico promovendo a sobrevivência celular através de interações proteína-proteína com membros da família Bcl-2, tais como os supressores de morte Bcl-XL ou com os agonistas de morte Bak e Bad. A função antiapoptótica de Bcl2 também pode ser regulada através de processamento proteolítico e fosforilação. Bcl2 pode promover a sobrevivência celular, interferindo na ativação de citocromo c/Apaf-1 por meio da estabilização da permeabilidade da membrana mitocondrial (Letai et al., 2002; Zhang et al., 2013).

Alterações nas proteínas pró e antiapoptóticas foram observadas quando expostas a elevados níveis de Hcy (400 $\mu\text{mol/L}$). Neste caso, a apoptose foi caracterizada pelo aumento do conteúdo de p53 e da proteína pró-apoptótica Bak (Darendelioglu et al., 2016; Kamudhamas et al., 2004). Além disso, a Hcy é capaz de induzir a apoptose em neurônios do hipocampo de ratos mediada por Bad (Wang et al., 2012).

Nessas vias de ativação de apoptose tem-se a permeabilização da membrana mitocondrial como um passo importante na regulação da apoptose. Sendo assim, as mitocôndrias podem ser consideradas organelas com funções variadas, entre elas, controlar a morte celular, bem como vários aspectos da sobrevivência celular (Galluzzi et al., 2012).

O envolvimento das mitocôndrias nos processos fisiológicos é vital para o desenvolvimento embrionário e pós-natal, assim como para a manutenção da homeostase do tecido adulto. Ciclos contínuos de fissão e fusão que estão envolvidos na dinâmica mitocondrial são essenciais para o funcionamento da célula. As moléculas de MFN1 e MFN2 promovem a fusão, e a molécula de DRP1 promove a fissão das mitocôndrias. Os mecanismos de fusão e fissão mitocondrial permitem uma cooperação intermitocondrial, permitindo a troca entre a membrana e o conteúdo da matriz e, por conseguinte, podem ajudar na manutenção da função mitocondrial (Chen et al., 2003; Famil'tseva et al., 2014). Além disso, a molécula de MFN2 pode estar associado à quebra de DNA mitocondrial. Alterações na expressão do gene *MFN2* pode induzir danos na cadeia respiratória,

fragmentação da rede mitocondrial e redução no conteúdo da proteína MFN2 (Rouzier et al., 2012).

As mitocôndrias realizam constantemente fusão e fissão em resposta a estímulos fisiológicos ou estresse. Além disso, fissão mitocondrial excessiva e diminuição da fusão mitocondrial levam à fragmentação mitocondrial e ao acúmulo de danos mitocondriais que podem desencadear a apoptose ou mitofagia (Dranka et al., 2010; Makino et al., 2010; Pangare e Makino, 2012; Shenouda et al., 2011).

Nas células ganglionares da retina de camundongos, em condições de elevados níveis de Hcy, ocorre intensa fissão e diminuição de fusão mitocondrial. A superexpressão de *DRP-1* leva à perda de potencial de membrana mitocondrial, à liberação de citocromo c e à consequente ativação de caspase-3 que causa a apoptose. Dessa forma, sugere-se o aumento da fissão mitocondrial como um mecanismo de toxicidade da Hcy (Ganapathy et al., 2011).

Uma das respostas às alterações na dinâmica mitocondrial pode ser a mitofagia, sendo este um processo fisiológico autofágico das mitocôndrias danificadas e não funcionais, importante na manutenção da qualidade destas organelas. De um modo geral, no mecanismo de mitofagia as mitocôndrias despolarizadas têm a proteína parkina (PRK8) translocada para a membrana externa, sendo que posteriormente ocorre ubiquitinação mitocondrial e recrutamento da proteína p62 que recruta autofagossomos LC3II-positivos (Ni et al., 2015).

Leveduras em condição de HHcy podem desenvolver uma disfunção mitocondrial, desencadeando o processo de mitofagia. Porém, são necessários mais estudos para comprovar se a mitofagia seria um dos mecanismos de toxicidade induzidos pela Hcy (Kumar et al., 2011).

1.2 FORMAÇÃO DE CARTILAGENS E OSSOS NOS MEMBROS

O processo de desenvolvimento dos membros em tetrápodes tem início com a proliferação e migração das células mesenquimais, a partir do mesoderma lateral e do miótomo em direção aos brotos dos membros. Nos brotos, as células mesenquimais proliferam intensamente permitindo o crescimento a partir de três eixos principais, o eixo proximal-distal (P/D), o eixo ântero-posterior (A/P) e o eixo dorsoventral (D/V) (Gilbert, 2010).

A configuração dos membros anteriores e posteriores basicamente compreende três regiões que vão desde a parede lateral do corpo até a porção distal. Durante a formação, as células mesenquimais passam pelo processo de diferenciação para originar músculos e ossos, que constituirão três segmentos no sentido próximo-distal, chamados de estilópode, zeugópode e autópole (Christ e Brand-Saberi, 2002).

A região do estilópode é constituída por um único elemento esquelético, o úmero (membro anterior) e fêmur (membro posterior); enquanto que a região do zeugópode é constituída por um ou mais elementos esqueléticos, o rádio e a ulna (membro anterior) e a tíbia e fíbula (membro posterior), que são altamente conservadas entre as espécies. Entretanto, a região do autópole

contém elementos esqueléticos formadores dos dígitos, os quais podem variar em número nas diferentes espécies animais (Hinchliffe, 2002).

A formação das estruturas ósseas nos membros de tetrápodes ocorre por ossificação endocondral. Esse processo envolve a formação de um molde cartilaginoso, que subsequentemente será mineralizado à matriz óssea (Fig. 2) (Mackie et al., 2008; Salazar et al., 2016).

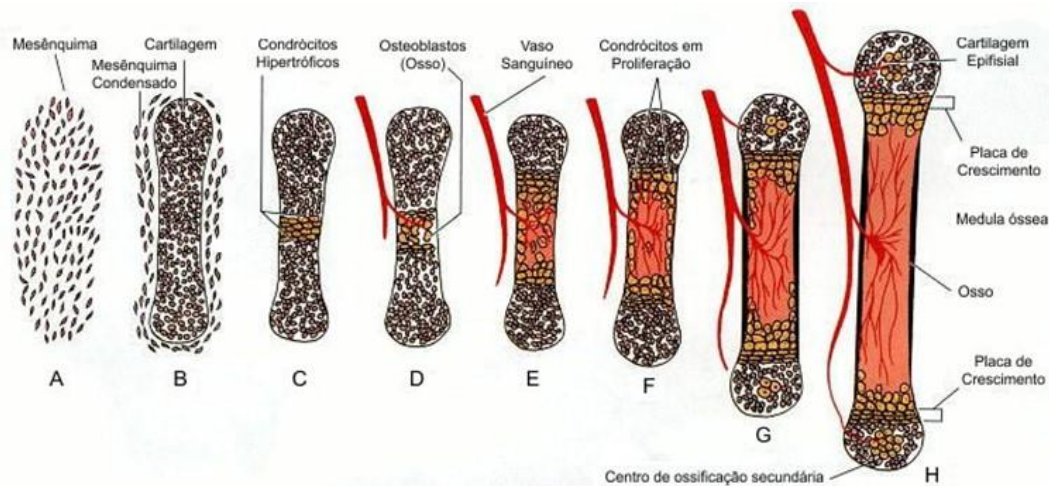


Figura 2: Representação esquemática do processo de ossificação endocondral. Seções longitudinais descrevem etapas-chave da formação óssea endocondral em membros. A) Células mesenquimais que migram em direção ao broto do membro em desenvolvimento. B) Mesênquima adjacente ao molde de cartilagem. C) Hipertrofia dos condrocitos. D-E) Invasão da vascularização ao molde de cartilagem. Vasos sanguíneos permitem um influxo de osteoprogenitores: osteoclastos que, por reabsorção óssea, formam o compartimento medular ósseo, e osteoblastos, que permitem que o osso cresça em largura. F-H) Crescimento dos ossos a partir de matrizes ordenadas de condrocitos em proliferação, hipertroficando e mineralização da matriz óssea. Formação dos centros de ossificação secundária a partir da invasão dos vasos sanguíneos nas extremidades do osso (Adaptado de Gilbert, 2010).

Na ossificação endocondral, inicialmente as células mesenquimais agregam-se e formam condensações de alta densidade celular que posteriormente se diferenciarão em condrocitos, formando moldes de cartilagem (Messier e Leblond, 1960).

As células mesenquimais, passam a expressar os fatores de transcrição Pax1 e Pax9, que controlam a proliferação, condensação e diferenciação dessas células mesenquimais em condrocitos. A partir disso, as células mesenquimais mais condensadas passam a se diferenciar em condrocitos, expressando moléculas de adesão celular e o fator de transcrição Sox9 que tem papel importante na ativação de genes característicos do tecido cartilaginoso, que codificam o colágeno do tipo II (LeClair, 1999).

Posteriormente, os condrocitos passam por intensa atividade de proliferação para formação do molde cartilaginoso e, à medida que se dividem, passam a secretar uma matriz cartilaginosa específica de colágeno do tipo X. Seguindo a proliferação, as células aumentam seu volume, tornando-se condrocitos hipertroficados (Greenspan e Blackwood, 1966). Os condrocitos hipertroficados produzem moléculas de colágeno e fibronectina para permitir a mineralização por

fosfato de cálcio, ao mesmo tempo em que Fgf-18 induz a expressão de VEGF (do inglês, *vascular endothelial growth factor*) para formação de vasos sanguíneos (Hojo et al., 2010).

À medida que as células da região hipertrófica morrem por apoptose, as células que circundam a cartilagem diferenciam-se em osteoblastos que secretam osteocalcina (OC), que durante a ossificação, assume um papel duplo: atuando como um regulador da mineralização óssea; e regulando a remodelação óssea modulando atividade osteoclástica (Neve et al., 2013). O material ósseo é acrescentado periféricamente no perióstio que é constituído por uma bainha fibrosa que cobre o osso em desenvolvimento. Concomitantemente, há um esvaziamento da região interna do osso, pelos osteoclastos, formando a cavidade da medula óssea (Bonucci, 1971).

1.2.1 O Papel da Osteocalcina na Ossificação Endocondral

A osteocalcina (OC) é uma proteína expressa pelos osteoblastos. Sua molécula contém três resíduos de ácido γ -carboxiglutâmico, porém, existem outras isoformas que podem conter um ou dois resíduos de ácido γ -carboxiglutâmico (Ferron et al., 2008; Ferron et al., 2010; Fulzele et al., 2010; Kumar e Vella, 2011; Lee et al., 2007).

A molécula de OC é sintetizada a partir de uma pré-molécula composta de 98 aminoácidos e um peso molecular de 11 kDa. Após várias modificações pós-traducionais, a forma ativa de OC é composta por 49 aminoácidos e um peso molecular de 5,5 kDa (Booth et al., 2013).

Um peptídeo de 23 sinais é clivado e uma carboxila é adicionada no resíduo de glutamato na presença de vitamina K, que atua como cofator da enzima carboxilase. A vitamina K tem como função transformar os resíduos de ácido glutâmico em ácido γ -carboxiglutâmico, através de um processo de carboxilação (Booth et al., 2013; Plaza e Lamson, 2005; Shearer et al., 2012).

O processo de γ -carboxilação de OC é necessária por induzir mudanças na conformação da molécula que permite maior afinidade ao cálcio. Qualquer alteração na carboxilação resulta no acúmulo de OC não-carboxilada, com menor afinidade aos íons de cálcio e por consequência uma redução na qualidade óssea (Hauschka et al., 1989).

No final das modificações pós-traducionais, OC é liberada na matriz óssea, onde os íons de cálcio estão ligados aos resíduos de ácido γ -carboxiglutâmico em cada molécula de OC. O cálcio confere estabilidade à molécula de OC e permite a ligação de OC ao conteúdo mineral do osso (Hoang et al., 2003).

Existe uma fração de OC que não se liga ao osso. Essa fração é liberada para corrente sanguínea, onde representa um substrato para enzimas proteolíticas, que clivam a molécula de OC em fragmentos de tamanhos menores que desempenham funções extra-esqueléticas, como por exemplo, na regulação do metabolismo da glicose (Booth et al., 2013). Além dessa forma circulante de OC, estudos *in vitro* demonstraram que fragmentos de OC também podem ser liberados e participar da reabsorção óssea (Ivaska et al., 2004; Salo et al., 1997).

As respostas de OC frente a toxicidade da Hcy não são muito claras. Há poucos estudos que relacionam a condição de HHcy como um fator de risco para a atividade dos osteoblastos, em função da diminuição no conteúdo da proteína OC, resultando na inibição da formação óssea (Sakamoto et al., 2005).

1.3 FATORES VASCULOGÊNICOS E ANGIOGÊNICOS NO AMBIENTE DE OSSIFICAÇÃO

Na formação dos membros, a angiogênese é iniciada com a ramificação da aorta dorsal, invadindo o broto de membro e formando um plexo vascular, que é incorporado no mesênquima condensado. Ao mesmo tempo, por vasculogênese células derivadas do somito (dermomiótomo) migram e integram-se ao membro formando outros centros de vascularização (Ambler et al., 2001).

Quando a esqueletogênese é iniciada, o plexo vascular passa por um rearranjo espacial, resultando em uma rede vascular altamente ramificada e padronizada para formação dos elementos esqueléticos. Essas áreas vascularizadas emergem a partir da regressão da cartilagem para dar espaço à matriz óssea (Feinberg et al., 1986; Hall e Miyake, 2000).

Durante o processo de ossificação endocondral, o sistema vascular regula o desenvolvimento ósseo e alterações nos vasos sanguíneos podem ser refletidas na esqueletogênese (Caplan, 1985; Fraser e Travill, 1978; Hootnick et al., 1980; Jargiello e Caplan, 1983).

A formação de vasos sanguíneos é fundamental para assegurar as trocas gasosas e o fornecimento de nutrientes para as células requeridos durante o processo de desenvolvimento (Cleaver e Melton, 2003; Coultas et al., 2005; Hogan et al., 2004). Os vasos sanguíneos podem formar-se por dois mecanismos distintos: vasculogênese ou angiogênese. Basicamente, por vasculogênese, forma-se o plexo vascular primitivo e por angiogênese ocorre uma expansão da rede vascular a partir do crescimento dos vasos já existentes (Eshkar-Oren et al., 2009).

A vascularização é necessária para a homeostase dos moldes cartilagosos, assim como na remodelação óssea durante a ossificação endocondral. Fatores vasculogênicos e angiogênicos, tais como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*), a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1, do inglês *vascular cell adhesion molecule 1*) e a óxido nítrico sintase 3 (NOS3, do inglês *nitric oxide synthase 3*) são produzidos por células mesenquimais regulando a atividade das células endoteliais para organização e formação de vasos sanguíneos (Chim et al., 2013).

Nos processos de formação de vasos sanguíneos, o VEGF atua como molécula-chave, regulando a diferenciação de células mesenquimais e a proliferação e migração de células endoteliais (Brown et al., 1997; Ferrara e Henzel, 1989; Leung et al., 1989). A molécula de VEGF liga-se aos receptores do tipo tirosina cinase VEGFR1 (Flt1) e VEGFR2 (Flk1) específicos para células endoteliais. Além desses receptores, as células endoteliais ainda podem expressar os co-

receptores neuropilinas 1 e 2 que podem potencializar a atividade de Flk1 (Neufeld et al., 1999; Soker et al., 1998).

O VEGF no mesênquima condensado, desempenha papel fundamental na regulação do modelamento vascular no processo de ossificação durante o desenvolvimento de membros. Experimentos de perda e ganho de função de *VEGF* com embriões de galinha, têm demonstrado respectivamente redução e aumento na vascularização (Drake et al., 2000).

Uma vez formada a rede de vasos sanguíneos, as células mesenquimais diferenciam-se em condrócitos e a expressão de *VEGF* é aumentada para assegurar a invasão dos vasos sanguíneos à matriz cartilaginosa durante o processo de ossificação endocondral (Zelzer et al., 2004; Zelzer et al., 2002).

VCAM-1 é expressa no endotélio vascular numa variedade de condições inflamatórias e medeia o recrutamento de leucócitos do sangue para os tecidos (Gurtner et al., 1995).

Em células endoteliais de tecidos saudáveis, a molécula de VCAM-1 é expressa em baixos níveis (Schlesinger e Bendas, 2015). Essa molécula apresenta alta afinidade com a integrina $\alpha 4$, por meio da qual, permite as interações célula a célula (Hynes, 2011). Quando do processo inflamatório, uma variedade de leucócitos migra para o local da inflamação, e por meio da adesão via VCAM-1 e migração através da parede endotelial, constitui conjunto importante para angiogênese. Além disso, a molécula de VCAM-1 tem sua atividade estimulada pelo VEGF (Schlesinger e Bendas, 2015).

VCAM-1 é membro da superfamília de proteínas imunoglobulinas (Ig), composta por sete domínios extracelulares do tipo Ig mantidos por ligações de dissulfeto, um domínio transmembranar do tipo I e um domínio citoplasmático composto por 19 aminoácidos e uma porção terminal de carboxila (Kumar et al., 1994; Osborn et al., 1989) (Fig. 6). Curiosamente, a sequência de aminoácidos deste domínio citoplasmático apresenta 100% de similaridade entre espécies, como o camundongo, rato, coelho e humano (Hession et al., 1992; Osborn et al., 1989; Pepinsky et al., 1992; Polte et al., 1990; Polte et al., 1991).

Em células endoteliais, a molécula de VCAM-1 pode estar relacionada com doenças inflamatórias. VCAM-1 funciona como um suporte para a migração de leucócitos, pela sinalização endotelial através de NADPH-Oxidase gerada por EROs (Espécies Reativas de Oxigênio). Estes EROs induzem sinais para a abertura de passagens intercelulares, pelas quais os leucócitos migram. Por isso, em várias doenças inflamatórias são bloqueadas pela inibição da ligação de leucócitos a VCAM-1, ou por inibição da transdução de sinal de VCAM-1 (Cook-Mills et al., 2011).

Além da interação com leucócitos, VCAM-1 desempenha papel importante em doenças cardiovasculares e na embriogênese. Em camundongos, VCAM-1 participa da formação do cordão umbilical, placenta e sistema cardiovascular. Estudos com camundongos knockout demonstraram que a ausência de expressão de *VCAM-1* gerou malformações no coração (Gurtner et al., 1995).

Na aterosclerose, VCAM-1 é a primeira molécula de adesão expressa antes do desenvolvimento da placa aterosclerótica e, em estágios mais avançados, pode ser expressa por

células musculares lisas. VCAM-1 também pode ser associada à estenose aórtica em pacientes com doença arterial coronariana (Braun et al., 1999; Hastings et al., 2009; Iiyama et al., 1999; Linhartova et al., 2009).

O óxido nítrico (ON) é uma molécula que tem numerosos alvos moleculares. ON pode controlar diversas funções celulares, tais como neurotransmissão (O'Dell et al., 1991; Schuman e Madison, 1991), tônus vascular (Forstermann et al., 1986; Rapoport et al., 1983), transcrição de genes (Gudi et al., 1999; Khan et al., 1996; Liu et al., 2002; Pantopoulos e Hentze, 1995) e ainda pode produzir modificações pós-traducionais (Brune et al., 1994; Pozdnyakov et al., 1993).

Um modo importante de inativação de ON é sua reação com ânion superóxido (O_2^-) para formar o potente peroxinitrito oxidante (ONOO⁻). Este composto é capaz de gerar danos às biomoléculas, incluindo proteínas, lipídios e DNA (Lee et al., 2003; Mikkelsen e Wardman, 2003).

Nas células, o ON pode ser gerado por três isoformas enzimáticas diferentes de ON sintase: A isoenzima dos neurônios NOS1 (ou nNOS), a induzível NOS2 (ou iNOS), a NOS3 das células endoteliais (ou eNOS) (Forstermann e Sessa, 2012).

A NOS3 é uma molécula expressa principalmente em células endoteliais e sua atividade enzimática é regulada por cálcio calmodulina quinase. A NOS3 sintetiza o ON de forma pulsátil, de modo que a sua atividade aumenta à medida que os níveis intracelulares de Ca^{2+} aumentam. Ca^{2+} induz a ligação de calmodulina à enzima (Forstermann, 2000; Forstermann et al., 1994; Hemmens e Mayer, 1998).

A isoenzima NOS3 parece ser um regulador homeostático de funções cardiovasculares essenciais. A supressão do gene *NOS3*, por exemplo, pode levar à elevação da pressão arterial (Huang et al., 1995; Shesely et al., 1996). Além disso, o ON liberado para o lúmen vascular é um potente inibidor de fatores de crescimento derivados de plaquetas, impedindo a obstrução de vasos sanguíneos pela agregação e adesão plaquetária à parede vascular. Essa produção de ON também é fundamental para induzir a vasodilatação, que mantém o fluxo sanguíneo (Alheid et al., 1987; Busse et al., 1987; Radomski et al., 1987; Rudic et al., 1998).

O NO produzido por NOS3 desempenha um papel crítico na angiogênese, principalmente pela inibição da apoptose de células endoteliais, através do aumento do conteúdo da proteína anti-apoptótica Bcl2. Esse aumento impede a liberação de citocromo c mitocondrial e por consequência a ativação de cascata proteolítica de caspases (Melikian et al., 2009; Schwarz et al., 1999).

Os progenitores endoteliais também podem ser ativados pelo ON sintetizado por NOS3. Em um modelo de isquemia em membros de camundongos com supressão para o gene *NOS3*, houve alterações na neovascularização, relacionadas com a dificuldade na mobilização de células progenitoras, pela redução do conteúdo de VEGF em células endoteliais (Aicher et al., 2003).

1.4 HIPERHOMOCISTEINEMIA E O PROCESSO DE OSSIFICAÇÃO ENDOCONDAL DOS MEMBROS EM TETRÁPODES

A HHcy, tem sido identificada como uma condição vasculotóxica, principalmente por reduzir a área de vascularização extraembrionária (Latacha e Rosenquist, 2005; Oosterbaan et al., 2012). Além disso, Hcy é capaz de interferir no conteúdo de OC, tal alteração representa um fator de risco para a função de osteoblastos (Herrmann et al., 2008; Sakamoto et al., 2005).

Os efeitos da Hcy na formação dos vasos sanguíneos e no conteúdo de OC, podem interferir diretamente na cascata de acontecimentos consecutivos da ossificação. Existem evidências da interferência de Hcy durante os processos de ossificação (Levasseur, 2009; Sakamoto et al., 2005) e de formação de vasos sanguíneos (Baggott e Tamura, 2015; Latacha e Rosenquist, 2005; Oosterbaan et al., 2012), porém os estudos têm como foco a formação óssea pós-natal em mamíferos adultos, principalmente humanos, e seu delineamento experimental se baseia apenas na exposição *in vitro*.

Há poucos estudos *in vivo* centrados na toxicidade celular da Hcy no desenvolvimento de estruturas embrionárias, principalmente relacionando a tríade Hcy x vascularização x ossificação. Os dados tornam-se ainda mais raros quando se fala em desenvolvimento de membros, mesmo que sejam estruturas que constituem um modelo para estudo de tecidos e que já se tenha demonstrado, por meio de estudos epidemiológicos, a associação entre a HHcy e malformações em membros (Cohn et al., 1995; Czeizel, 2009, 2011; Johnson e Tabin, 1997; Li et al., 2009; Shaw et al., 1995; van Mil et al., 2010).

Estudos anteriores realizados no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (LRDA/UFSC) demonstraram mudanças na dinâmica de células mesenquimais e alterações no conteúdo dos produtos gênicos de Pax9 e Sox9, e alterações em proteínas envolvidas no ciclo celular durante a diferenciação condrogênica no desenvolvimento dos membros em embriões tratados com 20 μmol D,L-Hcy (Bourckhardt et al., 2015).

A partir dos resultados obtidos pelo grupo de pesquisa do LRDA, e considerando (i) a toxicidade da Hcy para o desenvolvimento embrionário; (ii) a dinâmica das células mesenquimais na ossificação endocondral durante o desenvolvimento de membros; (iii) a lacuna científica relacionando a interferência da Hcy nas moléculas-chave nos processos de formação de vasos sanguíneos, a presente tese tem como foco investigar como elevados níveis de Hcy podem interferir no conteúdo dos fatores angiogênicos/vasculogênicos (VEGF, VCAM-1 e NOS3) e de OC, proteína fundamental na mineralização da matriz óssea. Além disso, essa tese visa analisar respostas das células mesenquimais frente à condição de HHcy no processo de ossificação endocondral durante o desenvolvimento de membros.

Diante desse contexto, a seguinte hipótese foi estabelecida: A HHcy interfere diretamente na ossificação, promovendo a diminuição nos conteúdos de VEGF, VCAM-1 e NOS3 durante a formação de vasos sanguíneos e ainda promove diminuição do conteúdo de OC, resultando na

diminuição da mineralização da matriz óssea. Do mesmo modo, nas células mesenquimais, a HHcy pode desencadear outros mecanismos de respostas para garantir a sobrevivência celular.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Investigar o efeito de elevados níveis de Hcy na formação de vasos sanguíneos no processo de ossificação endocondral durante o desenvolvimento dos membros de embriões de *G. domesticus*.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito diferencial da Hcy nos mecanismos de proliferação celular e apoptose considerando a informação posicional dos membros anteriores/posteriores e nos membros dos lados direito/esquerdo;
- Observar o efeito da Hcy sobre a morfometria dos moldes cartilagosos e nos ossos em desenvolvimento;
- Avaliar os conteúdos dos fatores vasculogênicos/angiogênicos VEGF, VCAM-1 e NOS3 após o tratamento com Hcy;
- Analisar o efeito da Hcy no conteúdo da proteína OC fundamental para mineralização da matriz óssea;
- Verificar a integridade dos componentes subcelulares, reconhecendo quais os alvos da Hcy;
- Investigar a capacidade da Hcy em induzir estresse nas organelas e as respostas celulares frente a essa condição.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Neste trabalho foram utilizados embriões de *G. domesticus* como modelo de estudo para a investigação dos efeitos da Hcy sobre o desenvolvimento de membros. Para tal, ovos fertilizados foram doados pela empresa Tyson do Brasil Alimentos Ltda - São José/SC. No LRDA, os ovos foram higienizados com água destilada, e posteriormente incubados (incubadora Golden, capacidade para 70 ovos) em condições controladas de temperatura (37,5°C) e umidade (65%). Os procedimentos adotados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais nº 175/CEUA/PROPESQ/2014.

3.2 DELINEAMENTO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Este estudo foi constituído por dois grupos controle que receberam 50 µL salina a 0,9% e dois grupos tratados com 20 µmol D,L-Hcy diluído em 50 µL salina a 0,9% (400 µM), sendo utilizadas a concentração adotada por Kobus et al. (2013), a qual induz toxicidade nas células embrionárias e não inviabiliza o desenvolvimento dos embriões.

A idade dos embriões foi determinada em dias embrionários, onde a cada 24 h de desenvolvimento corresponde a um dia embrionário (E). Os embriões foram observados em estereomicroscópio para verificar o estágio de desenvolvimento e a presença de alterações na morfologia externa com base nas descrições dos membros, apresentadas por Hamburger e Hamilton (1951).

Após 48 horas de incubação (E2 – 12HH) os tratamentos foram realizados pela abertura de um orifício (1 cm de diâmetro) na câmara de ar, possibilitando a administração das substâncias e o acompanhamento do desenvolvimento do embrião. As substâncias foram administradas sobre a membrana interna da casca com auxílio de micropipeta. Concluída a manipulação, a abertura na casca foi selada com fita transparente não tóxica e o ovo recolocado na estufa. Após, os ovos permaneceram na estufa até E6 (29HH) e E10 (36HH), quando os embriões foram crioadestesiados a 4°C, removidos dos ovos e lavados em solução salina a 0,9%. As idades E6 e E10 foram escolhidas para esta tese porque encontram-se em estágios diferentes do processo de ossificação: quando são reconhecidos os moldes cartilagosos nas três regiões do membro (E6) e quando se inicia a mineralização da matriz cartilaginosa (E10) (Fig. 3).

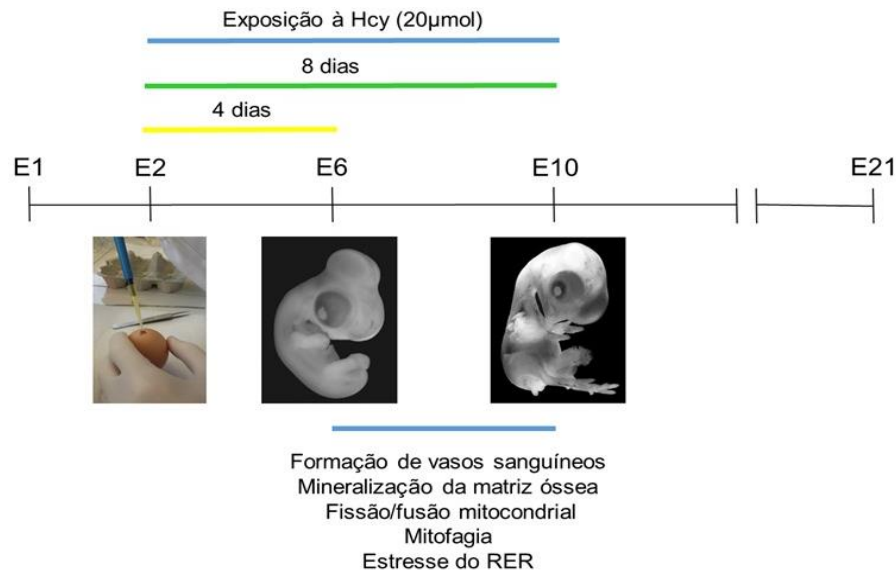


Figura 3: Representação do delineamento experimental. O tratamento foi realizado após as primeiras 48 horas (E2 – 12HH) de incubação. Foram adotados dois períodos de exposição, de 4 dias (entre E2 e E6) e de 8 dias (entre E2 e E10). Os membros anteriores e posteriores dos embriões foram dissecados e submetidos à análise de marcadores específicos para formação de vasos sanguíneos, mineralização da matriz óssea, fissão/fusão mitocondrial, mitofagia e estresse do RER.

3.3 PREPARO DOS EMBRIÕES PARA ANÁLISES MICROSCÓPICAS

Os embriões removidos dos ovos foram fixados em formaldeído a 4% por 24 horas e, então conservados em etanol a 70% à temperatura ambiente. Para realização das análises microscópicas, os membros foram dissecados, desidratados em série etanólica crescente 70% - 100%, incluídos em parafina e seccionados a 6 µm de espessura em micrótomo rotativo (CUT 4055, Olympus), sendo as secções montadas seriadamente em lâminas histológicas. Os conjuntos de lâminas foram destinados às técnicas de coloração, histoquímica, imuno-histoquímica e TUNEL (do inglês *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*).

3.4 ANÁLISES MORFOLÓGICAS DOS MOLDES CARTILAGINOSOS E DA MATRIZ ÓSSEA

Para a observação das características morfológicas moldes cartilagosos e da matriz óssea, as secções foram desparafinizados em xilol e hidratados em série etanólica decrescente 100% - 70% para posterior realização da coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) (1); e das histoquímicas com Azul de Alcian (2) e Safranina T (3):

1) Coloração com HE: utilizada para controle histológico. Decorridas as etapas de desparafinização e hidratação, as secções foram lavadas em água corrente e coradas com Hematoxilina por 10 segundos. Após, as secções foram lavadas em água corrente e coradas com Eosina a 1% por 20 segundos, seguido de lavagem em água destilada, desidratação em série etanólica crescente 70% - 100% e diafanização em xilol. As lâminas foram montadas com Entellan®;

2) Reação histoquímica com Azul de Alcian: específica para glicosaminoglicanos, portanto adequado para cartilagens e utilizada para verificar a condrogênese em embriões E6. Após desparafinização e hidratação, as secções foram lavadas em água corrente e imersas com Azul de Alcian por 30 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as secções foram lavadas em água destilada seguido da desidratação em série etanólica crescente 70% - 100% e diafanização em xilol. As lâminas foram montadas com Entellan®;

3) Reação histoquímica com Safranina T: utilizada para reconhecer os centros de ossificação em embriões E10. Depois de desparafinizar e hidratar, as secções foram lavadas em água corrente e imersas com Safranina T por 3 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as secções foram lavadas em água destilada, seguida da desidratação em série etanólica crescente 70% - 100% e diafanização em xilol. As lâminas foram montadas com Entellan®.

Para as análises morfométricas foram considerados os membros anteriores (lados direito e esquerdo) e posteriores (lados direito e esquerdo) de embriões em E6 e em E10. A área de ossificação foi medida utilizando o software Image J (NIH Image) e a espessura da região média dos moldes de cartilagem e da matriz óssea dos dígitos, rádio e ulna (membros anteriores), bem como dos dígitos, tíbia e fíbula (membros posteriores) foram obtidos usando ocular micrométrica (40 x; Olympus) (n = 30 embriões por grupo experimental).

3.5 MARCAÇÕES CELULARES POR IMUNO-HISTOQUÍMICA

As marcações celulares por reações imuno-histoquímicas foram utilizadas para localização celular das proteínas (n = 5 embriões por grupo experimental). Para isso, as secções foram inicialmente desparafinizadas em xilol e reidratadas em série etanólica decrescente 100% - 70%. A inativação das peroxidases endógenas foi realizada com solução de peróxido de hidrogênio: metanol (1:2) por 10 minutos, seguida de banho em tampão fosfato salino PBS (do inglês *phosphate-buffered saline*) a 1M por 5 minutos. A permeabilização das membranas celulares foi realizada por dois banhos em PBS + Triton X-100 a 0,3% por 10 minutos cada banho. Posteriormente, os sítios inespecíficos foram inativados com solução de PBS + soro bovino fetal (SBF) a 5% por 30 minutos. A incubação com anticorpo primário para as proteínas de interesse (Quadro 1) foi realizada durante 12 horas a 4°C e, posteriormente, foram realizados três banhos com PBS + Triton X-100 a 0,1% por 10 minutos cada. Em seguida, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário (Quadro 2) por 3 horas a temperatura ambiente.

Para microscopia de fluorescência, as lâminas foram montadas com Gelmount® acrescido do marcador nuclear fluorescente DAPI (4'-6-Diamidino-2-fenilindol) e para microscopia de luz, as lâminas foram montadas com Entellan®.

Quadro 1: Anticorpos primários utilizados nas análises por imuno-histoquímica e citometria de fluxo.

| ANTICORPO | ESPÉCIES | | ISOTIPO | DILUIÇÃO | | |
|----------------------|--------------|--------|---------|----------|--------|-------|
| | DESENVOLVIDA | ORIGEM | | IF | CF | WB |
| Anti-Fosfohistona H3 | Coelho | Humana | IgG | 1:300 | - | - |
| Anti-VCAM-1 | Camundongo | Humana | IgG1 | 1:100 | 1:1000 | 1:500 |
| Anti-VEGF | Camundongo | Humana | IgG | 1:100 | 1:1000 | 1:500 |
| Anti-NOS3 | Camundongo | Humana | IgG | 1:100 | 1:1000 | 1:500 |
| Anti-Osteocalcina | Camundongo | Humana | IgG | 1:100 | 1:1000 | 1:500 |
| Anti-DRP-1 | Coelho | Humana | IgG | - | 1:1000 | - |
| Anti-MFN-1 | Coelho | Humana | IgG | - | 1:1000 | - |
| Anti-MFN-2 | Coelho | Humana | IgG | - | 1:1000 | - |
| Anti-Bcl2 | Camundongo | Humana | IgG1 | - | 1:1000 | - |
| Anti-Bak | Coelho | Humana | IgG | - | 1:1000 | - |
| Anti-PRK8 | Camundongo | Humana | IgG2b | - | 1:1000 | - |
| Anti-p62 | Camundongo | Humana | IgG1 | - | 1:1000 | - |
| Anti-LC3II | Coelho | Humana | IgG | - | 1:1000 | - |
| Anti-GRP78 | Coelho | Humana | IgG | 1:100 | 1:1000 | - |

| | | | | | |
|----------------------|---------------------------|-------------------------------|----------------------------|-----------|-----------------|
| Proliferação celular | Angiogênese Vasculogênese | Mineralização da matriz óssea | Fissão/Fusão Mitochondrial | Mitofagia | Estresse no RER |
|----------------------|---------------------------|-------------------------------|----------------------------|-----------|-----------------|

IF-Imunofluorescência, CF-Citometria de Fluxo, WB-Western Blotting

Quadro 2: Anticorpos secundários utilizados nas análises por imuno-histoquímica e citometria de fluxo.

| ANTICORPO | ISOTIPO | ESPÉCIE DE ORIGEM |
|------------------------------------|---------|-------------------|
| Anti-coelho conjugado a peroxidase | IgG | Cabra |
| Anti-camundongo Alexa-fluor 488 | IgG | |
| Anti-camundongo Alexa-fluor 488 | IgG1 | |
| Anti-camundongo Alexa-fluor 488 | IgG2b | |
| Anti-camundongo Alexa-fluor 633 | IgG | |
| Anti-coelho Alexa-fluor 488 | IgG | |
| Anti-coelho Alexa-fluor 568 | IgG | |

3.6 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

As estruturas subcelulares foram observadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para isso, os membros (n = 3 embriões por grupo experimental) foram fixados em solução de glutaraldeído a 2,5% + paraformaldeído a 4% durante 48 horas a 4°C. Posteriormente, foram lavados por 3 vezes de 10 minutos cada em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M (pH 7,2). Os membros foram pós-fixados em tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1% por 1 hora a temperatura ambiente e posteriormente foram realizadas 3 lavagens de 10 minutos cada com tampão cacodilato de sódio a 0,1 M (pH 7,2). Em seguida, as amostras foram desidratadas em série acetônica crescente

(30% - 100%) por 30 minutos cada. As amostras foram infiltradas com resina Spurr, em 3 séries graduais de acetona:resina (2:1; 1:1 e 1:2) por 24 horas cada, seguida de duas infiltrações em resina pura por 12 e 4 horas à temperatura ambiente. A polimerização da resina foi realizada em estufa à 70°C por 24 horas.

As secções semifinas (700 nm) foram obtidas com navalha de vidro em ultramicrotomo (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica/UFSC, LCME), as quais foram coradas com solução de azul de toluidina a 1% e observadas ao microscópio de luz para controle da orientação e qualidade do tecido. As secções ultrafinas (60 - 70 nm) foram realizadas com navalha de diamante em ultramicrotomo, coletadas em grades 300 *mesh*, contrastadas com acetato de uranila a 5% por 20 minutos e citrato de chumbo a 1% por 5 minutos. As secções ultrafinas foram analisadas e fotografadas no microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM 1011 (LCME).

Para as análises foram utilizadas micrografias, sendo as alterações nas estruturas subcelulares quantificadas a partir de um conjunto de 25 micrografias por embrião. A área das organelas foi medida através do software Image J (NIH Image).

3.7 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Com objetivo de quantificar as células reativas para as proteínas de interesse (Quadro 1), foram realizadas análises por citometria de fluxo. Para esta técnica, os membros foram dissecados (n = 18 embriões por grupo experimental), homogeneizados com pistilo em tubo Eppendorf e submetidos a 7 lavagens sucessivas com PBS a 0,1 M. As células foram dissociadas com tripsina a 0,25% durante 30 minutos e em seguida, adicionou-se 100 µL de SBF, sob agitação durante 45 minutos. Subsequentemente, as amostras foram centrifugadas a 640 x *g* durante 5 minutos, o sobrenadante foi coletado e incubado com anticorpo primário (Quadro 1) durante 1 hora e, em seguida, incubadas durante 45 minutos com o anticorpo secundário (Quadro 2).

Os procedimentos foram realizados separadamente para cada anticorpo em cada tratamento. Para determinar as regiões das células de interesse, foram realizadas leituras com células não marcadas. A partir disso, foram obtidos gráficos de dispersão de pontos com 20.000 células, considerando parâmetros de dispersão lateral (SSC-A, do inglês *side scatter*) e dispersão frontal (FSC-A, do inglês *forward scatter*). Para as quantificações foi utilizado o Citômetro de Fluxo FACSCanto II (BD Biosciences) (Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia/UFSC, LAMEB). Os dados foram apresentados em valores absolutos em percentuais de células positivas em relação ao número total de células analisadas (20.000 células).

3.8 DETECÇÃO DAS PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING

Para demonstrar a especificidade dos anticorpos utilizados em imuno-histoquímica e citometria de fluxo, foi realizada a técnica de Western Blotting. Os membros foram dissecados (n

= 15 embriões por grupo experimental), homogeneizados a 4°C em tampão de fluoreto de sódio a 1 mM. Os homogenatos foram centrifugados durante 10 minutos a 12.000 x *g* a 4°C. O sobrenadante foi separado e as proteínas totais para cada amostra foram estimadas pelo método de Lowry *et al.* (1951).

As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (gel de entrada de a 4% e de separação a 12%) aplicando uma tensão de 100 V durante 1,5 horas em tampão Tris-glicina (TBS), utilizando padrões de peso molecular de 245-11 kDa. As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e bloqueadas com leite desnatado a 5% em TBS + Tween 20 a 0,05% (TBS-T) durante 1 hora. As membranas foram então, incubadas com o anticorpo primário (Quadro 1) à 4°C durante a noite, em agitação. As membranas imunocomplexadas foram lavadas em TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário (Quadro 2) à temperatura ambiente durante 1 hora em agitação. As bandas foram reveladas no Fotodocumentador Chemidoc MP (Bio-Rad) (LAMEB).

3.9 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE AUTOFAGIA PELA HCY

Para identificação de vacúolos autofágicos, foi utilizada a reação histoquímica com Laranja de Acridina (LA) em secções histológicas e em citometria de fluxo. Para histoquímica (n = 5 embriões por grupo experimental), as secções foram desparafinizadas em xilol e reidratadas em série etanólica decrescente 100% - 70%. Em seguida, lavadas em PBS a 1 M por 5 minutos e imersas com LA (1:1000). Posteriormente, para retirar o excesso de LA, as secções foram submetidas a dois banhos com PBS a 1 M por 5 minutos cada, sendo as lâminas montadas com Gelmount® acrescido do marcador nuclear fluorescente DAPI.

Para as quantificações do número de células marcadas, as amostras foram processadas seguindo os mesmos procedimentos descritos no item 3.7 (n = 18 embriões por grupo experimental) e imersas com LA por 15 minutos (1:10.000).

O LA marca o citoplasma e o núcleo com fluorescência verde (488 nm). Quando em um ambiente ácido, LA passa a emitir fluorescência vermelha (633 nm). Logo, células que emitem fluorescência vermelha elevada foram caracterizadas como células em processo de autofagia.

3.10 IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS EM APOPTOSE PELO MÉTODO DE TUNEL

Para identificação de células em apoptose nas secções histológicas (n = 15 embriões por grupo experimental), foi utilizada a técnica de TUNEL (do inglês *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) que se baseia na identificação da fragmentação do DNA durante o processo de apoptose. O protocolo seguiu as especificações do kit de detecção (Calbiochem, EUA), com uma adaptação para a diluição da proteinase K (1:600). As células TUNEL-positivas exibiram precipitados marrom-escuro em seus núcleos. A densidade numérica de células por área (NA) das

células TUNEL-positivas foi determinada pelo método estereológico utilizando gráticula de Weibel, cuja área de amostragem foi de 36,36mm² (Mandarim-de-Lacerda, 2003). A razão entre proliferação celular e apoptose foi determinada entre o NA de células FH3-positivas e o NA de células TUNEL-positivas.

3.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados quantitativos foram analisados no programa de estatística Statistica® versão 10.0 para Windows. Após a realização do teste de normalidade Shapiro-Wilk, as amostras com distribuição normal foram avaliadas, dentro das respectivas idades deste estudo, pelo teste t de Student para amostras independentes e os dados expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM). As amostras que não apresentarem distribuição normal foram avaliadas pelo teste U de Mann-Whitney e os dados expressos como a mediana \pm intervalo interquartil (IIQ). $P < 0,05$ foi considerado significativo.

4 RESULTADOS

Os resultados foram relacionados ao efeito da Hcy sobre: (i) a razão proliferação celular/apoptose considerando a informação posicional dos membros anteriores/posteriores e nos membros dos lados direito/esquerdo; (ii) a morfometria do molde cartilaginoso/ósseo em desenvolvimento; (iii) no conteúdo dos fatores vasculogênicos/angiogênicos VEGF, VCAM-1 e NOS3; (iv) no conteúdo da proteína OC envolvida na mineralização da matriz óssea; e (v) a integridade dos componentes subcelulares.

A dose de Hcy empregada nesse estudo não comprometeu o ritmo de desenvolvimento dos membros de embriões em E6 e E10, além disso, os embriões apresentavam morfologia externa compatível para as idades analisadas.

4.1 EFEITO DA HCY NA PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE

Inicialmente os mecanismos de proliferação celular e apoptose foram avaliados. Foi investigado se o tratamento com Hcy afetou diferencialmente o desenvolvimento de membros, ou seja, se o efeito variou de acordo com a informação posicional (membros anteriores e posteriores e/ou membros do lado direito e esquerdo).

Foi observada a presença de células em proliferação em toda extensão do membro em desenvolvimento. Primeiramente, foi comparada a proliferação celular nos membros anteriores e posteriores de embriões em E6. Foi observado que o NA de células FH3-imunorreativas em membros anteriores de embriões tratados com Hcy foi de 110,0 células/mm² (\pm 9,0) e em embriões-controle foi de 126,5 células/mm² (\pm 11,8). O NA nos membros posteriores de embriões tratados com Hcy foi de 104,5 células/mm² (\pm 9,0) e em embriões-controle foi de 100,3 células/mm² (\pm 7,9) (Fig. 4A).

Nas comparações do NA de células FH3-imunorreativas entre os membros do lado direito e esquerdo de embriões em E6, nos membros do lado direito, o NA de células em proliferação em embriões tratados com Hcy foi de 123,7 células/mm² (\pm 9,8) e em embriões-controle foi de 133,3 células/mm² (\pm 11,0). Em membros do lado esquerdo, o NA em embriões tratados com Hcy foi de 90,7 células/mm² (\pm 7,4) e em embriões-controle foi de 92,1 células/mm² (\pm 8,4) (Fig. 4B).

Nas análises morfométricas não foram encontradas diferenças entre embriões-controle e embriões tratados com Hcy em E6. Não havendo diferenças, os dados foram comparados na sua totalidade. Quando analisados em conjunto, o NA de células em proliferação em membros em desenvolvimento foi de 107,2 células/mm² \pm 6,3 em embriões tratados com Hcy, o que não diferiu do NA em embriões-controle (113,4 células/mm² \pm 7,2) quando analisados em conjunto (Fig. 4C).

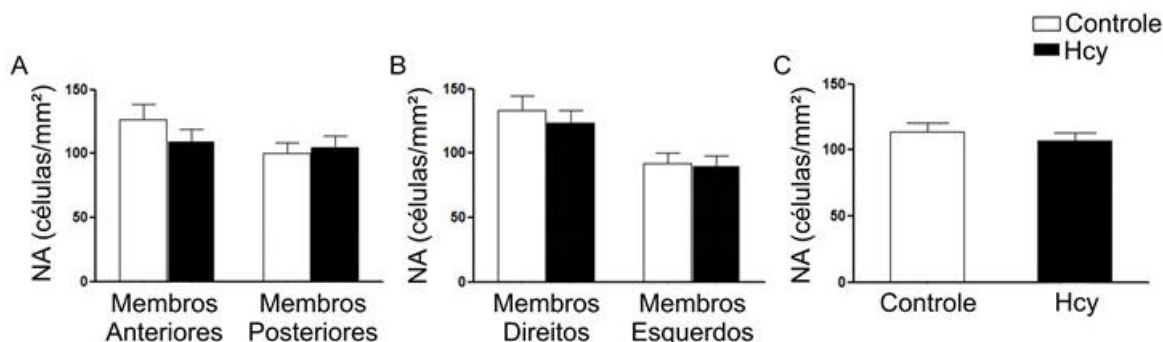


Figura 4: Células em proliferação nos membros de embriões em E6 marcadas com anticorpo anti-fosfohistona H3. NA (densidade numérica de células por área) nos membros anteriores e posteriores (A), membros do lado direito e do lado esquerdo (B), e membros em sua totalidade agrupados pelos tratamentos (C). Os dados são apresentados como média \pm EPM, sendo utilizado o teste estatístico t Student para a comparação entre as médias ($n = 15$ embriões por grupo experimental).

Do mesmo modo, as análises comparativas foram realizadas em E10. Foi observada a presença de células em proliferação em toda extensão do membro em desenvolvimento. Nas comparações entre membros anteriores e posteriores de embriões em E10, foi observado que o NA de células p $H3$ -imunorreativas em membros anteriores de embriões tratados com Hcy foi de 96,2 células/mm² ($\pm 4,9$) e em embriões-controle foi de 107,7 células/mm² ($\pm 5,7$). O NA nos membros posteriores de embriões tratados com Hcy foi de 104,2 células/mm² ($\pm 5,8$) e em embriões-controle foi de 100,8 células/mm² ($\pm 5,7$) (Fig. 5A).

Em membros do lado direito, o NA de células em proliferação em embriões tratados com Hcy foi de 98,5 células/mm² ($\pm 5,2$) e em embriões-controle foi de 103,1 células/mm² ($\pm 5,7$). Em membros do lado esquerdo, o NA em embriões tratados com Hcy foi de 101,9 células/mm² ($\pm 5,5$) e em embriões-controle foi de 105,4 células/mm² ($\pm 5,7$) (Fig. 5B).

Nas análises morfométricas não foram encontradas diferenças entre embriões-controle e embriões tratados com Hcy em E10. Não havendo diferenças, os dados foram comparados na sua totalidade. Quando analisados em conjunto, o NA de células em proliferação em membros em desenvolvimento foi de 100,2 células/mm² $\pm 0,3$ em embriões tratados com Hcy, o que não diferiu do NA em embriões-controle (104,2 células/mm² $\pm 0,3$) (Fig. 5C).

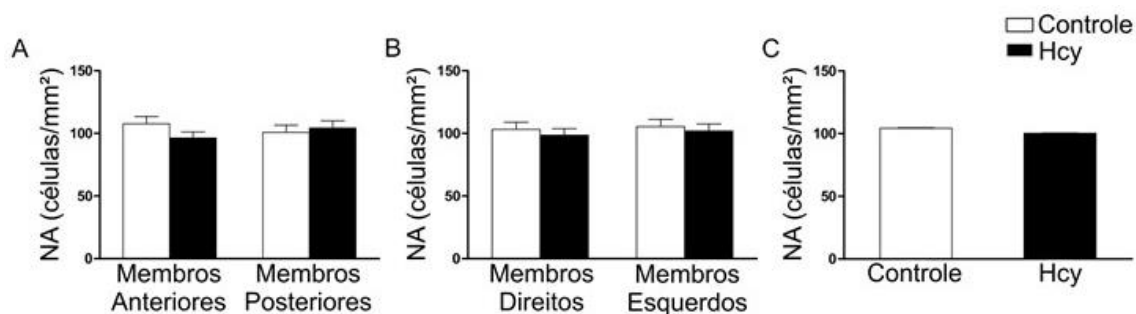


Figura 5: Células em proliferação nos membros de embriões em E10 marcadas com anticorpo anti-fosfohistona H3. NA (densidade numérica de células por área) de células em proliferação nos membros anteriores e posteriores (A), membros do lado direito e do lado esquerdo (B), e membros em sua totalidade agrupados pelos tratamentos (C). Os dados são apresentados como média \pm EPM, sendo utilizado o teste estatístico t Student para a comparação entre as médias ($n = 15$ embriões por grupo experimental).

Uma vez que não foi identificado o efeito da Hcy nas células em proliferação, foi investigado também o potencial da Hcy em induzir a apoptose. Para isso foi utilizada a técnica de TUNEL. Porém as análises para apoptose foram realizadas na sua totalidade, sem considerar informação posicional. Em embriões em E6, não foram observadas diferenças nas células em apoptose entre embriões tratados com Hcy ($1.086,0 \text{ células/mm}^2 \pm 80,2$) e embriões-controle ($1.104,7 \text{ células/mm}^2 \pm 96,6$) (Fig. 6A). Do mesmo modo em embriões em E10, não foram observadas diferenças nas células em apoptose entre embriões tratados com Hcy ($900,7 \text{ células/mm}^2 \pm 93,3$) e embriões do grupo controle ($809,0 \text{ células/mm}^2 \pm 63,8$) (Fig. 6B).

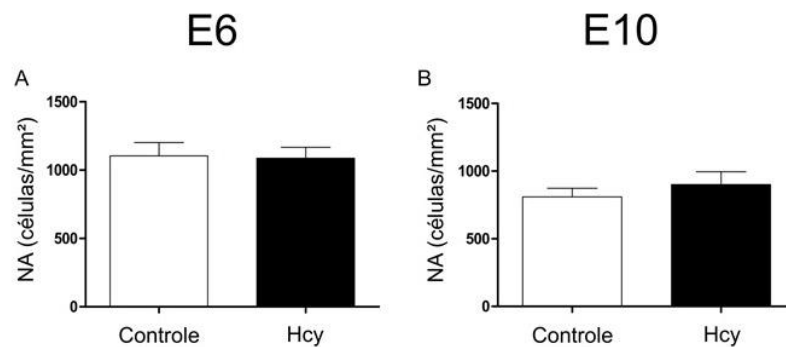


Figura 6: Células apoptóticas em membros de embriões em E6 e E10. Não foram reconhecidas diferenças significativas no número de células TUNEL-positivas em embriões tratados com Hcy quando comparados com embriões-controle, em E6 (A) e em E10 (B). Gráficos de barras mostrando os dados de NA representados como média \pm EPM, sendo utilizado o teste estatístico t Student para a comparação entre as médias ($n = 15$ embriões por grupo experimental).

Com relação a razão proliferação/apoptose, em embriões em E6, não foram observadas diferenças na razão do NA de células FH3-positivas / NA de células TUNEL-positivas entre embriões tratados com Hcy ($r = 0,17$) e embriões-controle ($r = 0,19$). Igualmente, em embriões em E10, não foram observadas diferenças na razão do NA de células FH3-positivas / NA de células TUNEL-positivas entre embriões tratados com Hcy ($r = 0,19$) e embriões do grupo controle ($r = 0,17$).

Considerando não haver diferenças entre células em proliferação e apoptose, durante o desenvolvimento de membros de embriões tratados com Hcy e embriões-controle, para os próximos resultados apresentados, as análises não discriminaram a informação posicional dos membros. Portanto, o termo "membros" refere-se de forma conjunta aos membros anteriores/posteriores e membros do lado direito/esquerdo.

4.2 IMPACTO DA HOMOCISTEÍNA NA OSSIFICAÇÃO ENDOCONDRA

4.2.1 Análises Morfométricas da Área de Ossificação

Na região dos moldes cartilagosos em embriões E6, por meio da coloração com HE foram identificadas a zona proliferativa, constituída por condrócitos pré-hipertróficos (cph)

organizados em fileiras. Circundando os moldes cartilagosos, foi reconhecida a região de mesênquima condensado (mc). Esta organização de tecido foi identificada tanto em embriões-controle como em embriões tratados com Hcy em E6. Assim como também, por meio da histoquímica de Azul de Alcian, não foram observadas diferenças nas espessuras dos moldes cartilagosos nos embriões-controle e nos embriões tratados com Hcy em E6 (Fig. 7A-C).

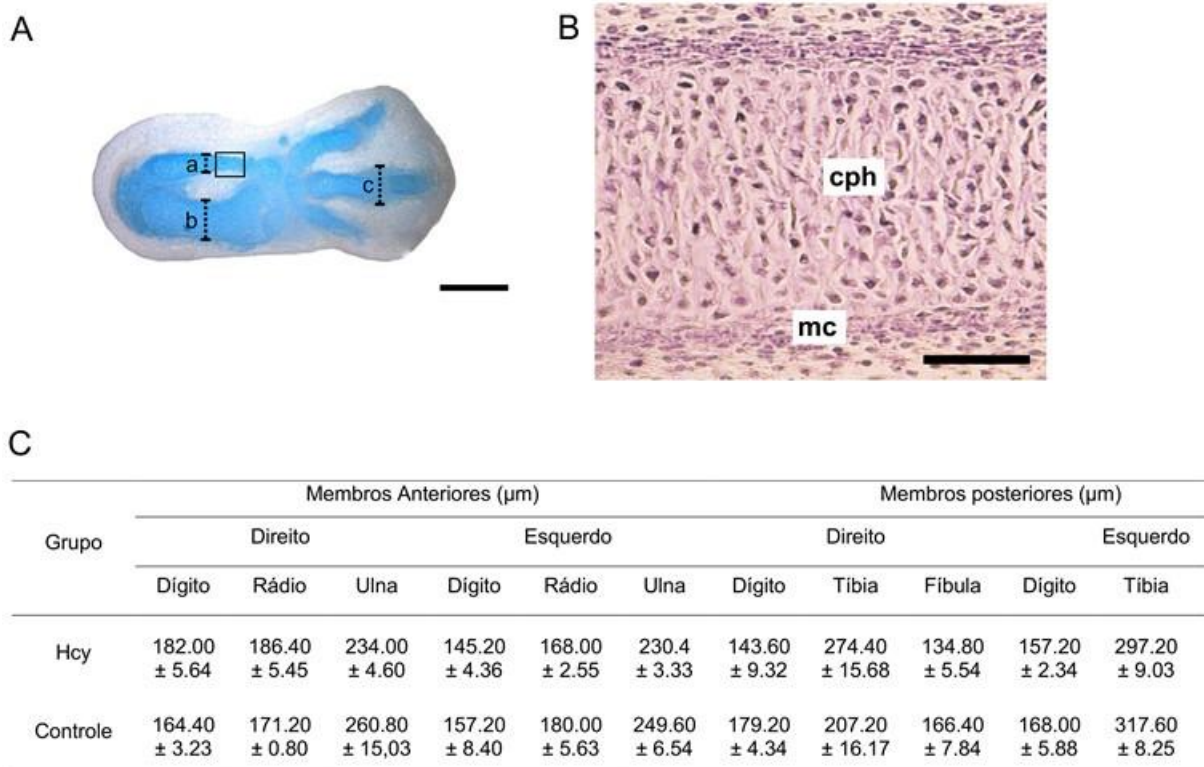


Figura 7: Efeito da Hcy sobre morfometria dos moldes de cartilagem de membros em embriões em E6. Secção longitudinal de uma amostra de membro anterior mostrando os centros de condriificação usando a reação histoquímica com Azul de Alcian (A). O quadrado corresponde à área analisada mostrada na secção sagital corada com HE; mc - mesênquima condensado e cph - condrócitos pré-hipertróficos (B). As linhas tracejadas representam as posições médias dos moldes de cartilagem onde foram realizadas as medidas. Letras a, b e c representam, respectivamente, rádio, úmero e dígitos em membros anteriores e fíbula, tíbia e dígitos em membros posteriores (C). Barra de escala em A = 500 µm e em B = 50 µm. O teste estatístico t Student foi empregado para a comparação entre as médias (n = 30 embriões por grupo experimental).

Na região de desenvolvimento ósseo em embriões E10, por meio da coloração com HE foram identificadas a zona proliferativa, constituída por condrócitos pré-hipertróficos (cph) organizados em fileiras; e a zona hipertrófica constituída por condrócitos hipertróficos (ch), células volumosas as quais darão espaço para posterior mineralização da matriz óssea. Circundando os ossos, foi reconhecida a região de mesênquima condensado (mc). Esta organização de tecido foi identificada tanto em embriões-controle como em embriões tratados com Hcy em E10 (Fig. 8A-C).

Por meio dos parâmetros morfométricos não foram observadas diferenças na área de ossificação de membros de embriões-controle e embriões tratados com Hcy (Fig. 8D). Além disso, não foram encontradas diferenças significativas na espessura do rádio, ulna e dígitos de membros

anteriores e, tibia, fíbula e dígitos de membros posteriores de embriões-controle e embriões tratados com Hcy (Fig. 8E).

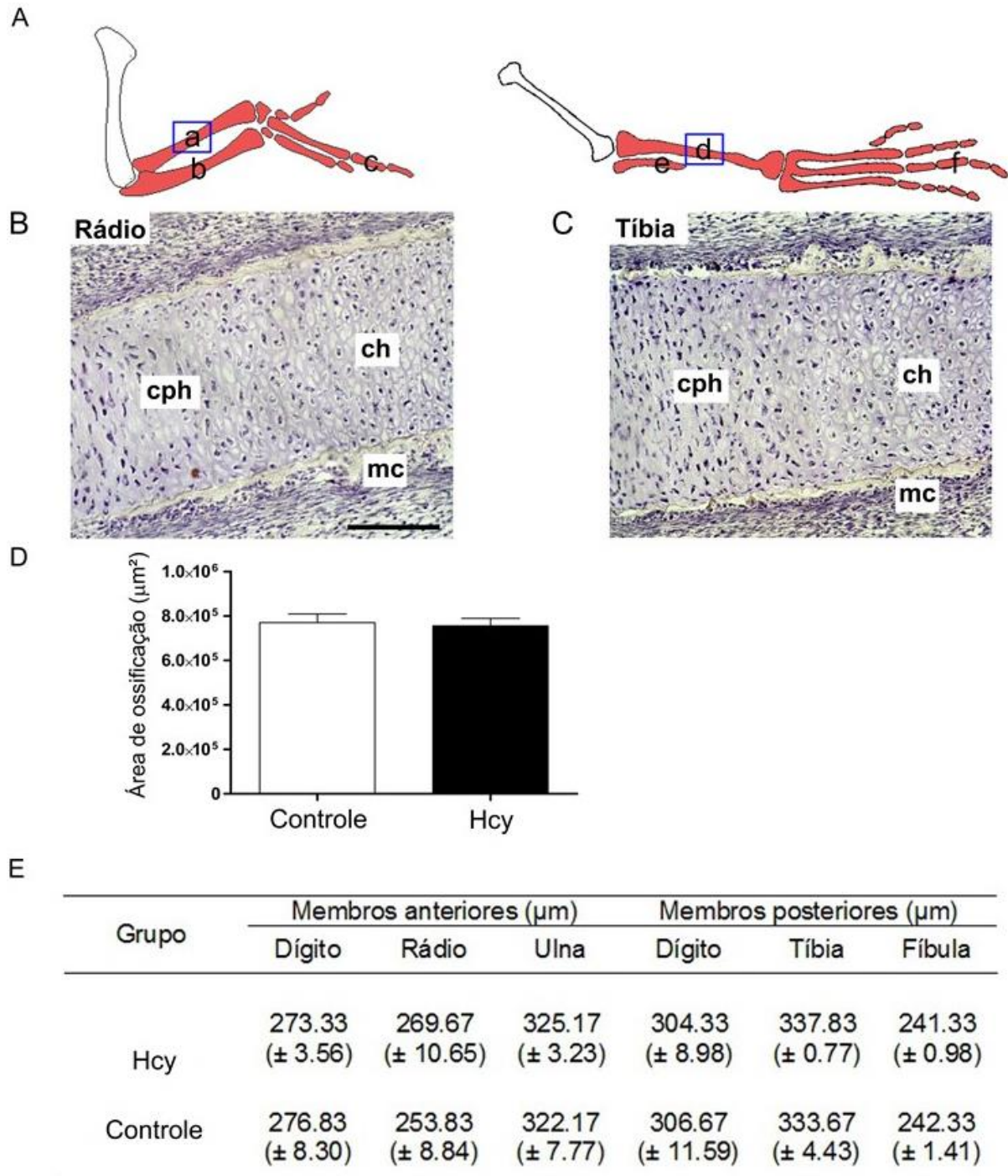


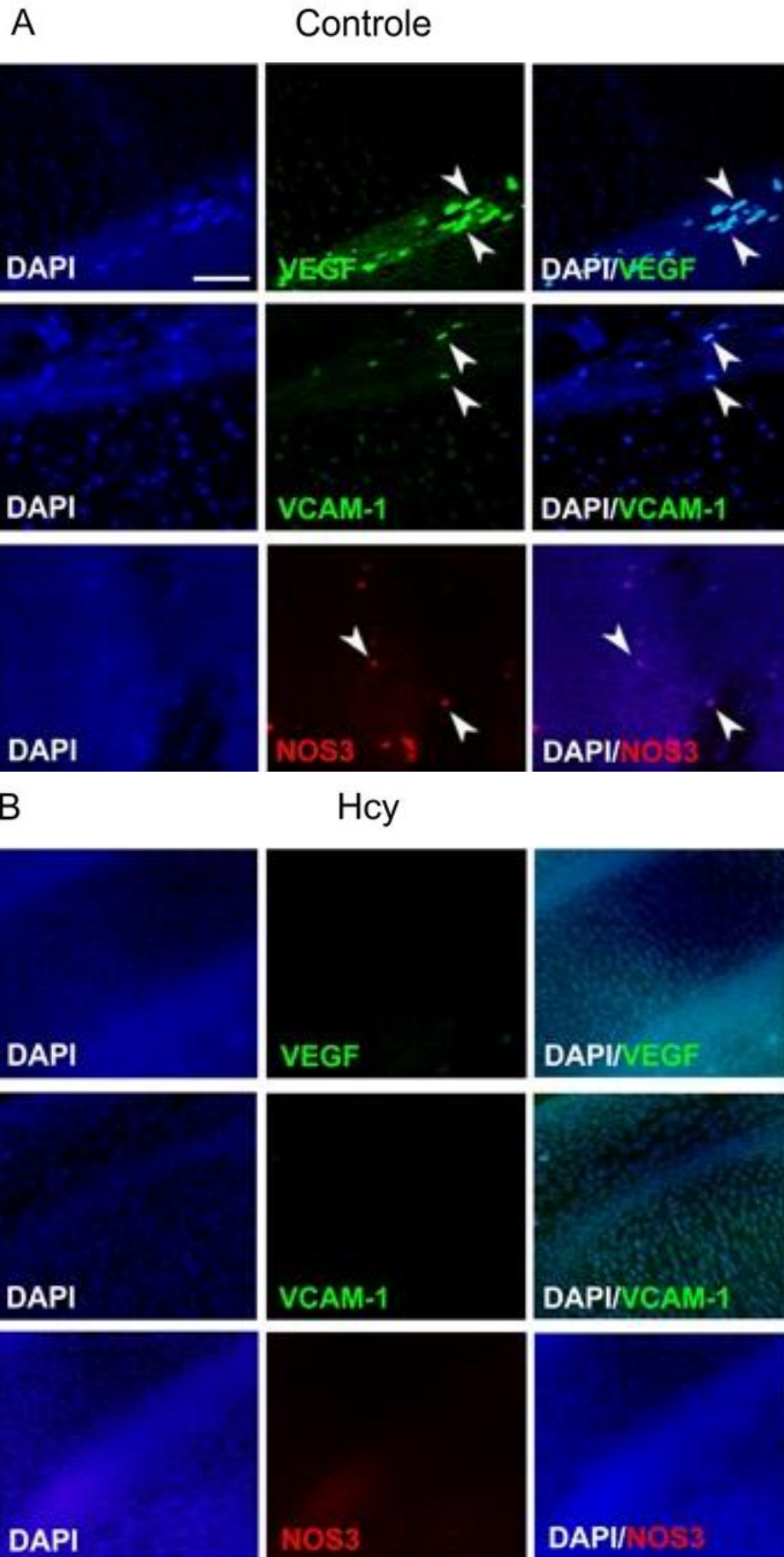
Figura 8: Efeito da Hcy sobre a área de ossificação em membros de embriões em E10. Representação esquemática da área analisada (vermelho), com, rádio (a), úmero (b) e dígitos (c) em membros anteriores e tibia (d), fíbula (e) e dígitos (f) em membros posteriores (A). Os quadrados correspondem à área analisada mostrada nas secções sagitais coradas com HE; mc - mesênquima condensado, cph - condrócitos pré-hipertroficados e ch - condrócitos hipertroficados (B,C). Não foram observadas diferenças na área de ossificação nos membros anteriores e nos membros posteriores entre embriões-controle e embriões tratados com Hcy (D, E). Os dados no gráfico (D) são representados como a média ± EPM. Barra de escala = 100 μm. O teste estatístico t Student foi empregado para a comparação entre as médias (n = 30 embriões por grupo experimental).

4.2.2 Efeito da Hcy na Formação de Vasos Sanguíneos

Para investigar os efeitos da Hcy durante a formação de vasos sanguíneos, verificamos os conteúdos de três proteínas que desempenham um papel importante nesse processo: VEGF, VCAM-1 e NOS3. Por imunofluorescência, as células VEGF, VCAM-1 e NOS3-imunorreativas foram observadas principalmente no mesênquima condensado de embriões E6 e E10 do grupo controle, porém, no mesênquima condensado de embriões E6 e E10 do grupo tratado com Hcy houve uma redução nas células VEGF, VCAM-1 e NOS3-imunorreativas (Figs. 9A-B e 10A-B).

As quantificações do número de células VEGF-, VCAM-1- e NOS3-positivas foram realizadas pela técnica de citometria de fluxo. Em E6, foi observado uma redução de 46,8% no número de células VEGF-positivas em embriões tratados com Hcy (1.247,4 células \pm 233,2) em relação aos embriões-controle (2.346,2 células \pm 349,0; $P = 0,03$; $t = 2,62$). Para a molécula de adesão VCAM-1, nos embriões tratados com Hcy foi identificado uma redução de 98,7% nas células VCAM-1-positivas (38,2 células \pm 13,8), em comparação aos embriões-controle (2.944,2 células \pm 266,5; $P = 0,000004$; $t = 10,91$). Além disso, foi reconhecida uma redução de 54,0% no número de células NOS3-positivas em membros de embriões tratados com Hcy (68,0 células \pm 13,1) quando comparado ao número de células em membros de embriões não tratados (149,4 células \pm 13,1; $P = 0,001$; $t = 4,90$) (Fig. 9C-D).

Efeitos similares da Hcy foram reconhecidos em embriões em E10. Foi verificada uma redução de 26,0% no número de células VEGF-positivas em embriões tratados com Hcy (3.811,0 células \pm 292,1) quando comparado ao número de células em membros de embriões-controle (5.151,8 células \pm 304,1; $P = 0,01$; $t = 3,18$). Para a molécula de adesão VCAM-1, foi observado uma redução de 34,6% no número de células VCAM-1-positivas em embriões tratados com Hcy (3.368,8 células \pm 470,7) em comparação com embriões-controle (5.182,0 células \pm 260,8; $P = 0,01$; $t = 3,34$). Além disso, o número de células NOS3-positivas foi reduzido em cerca de 91,5% nos embriões tratados com Hcy (247,0 \pm 11,3) em relação aos embriões-controle (2.919,8 células \pm 647,5; $P = 0,003$; $t = 4,13$) (Fig. 10C-D).



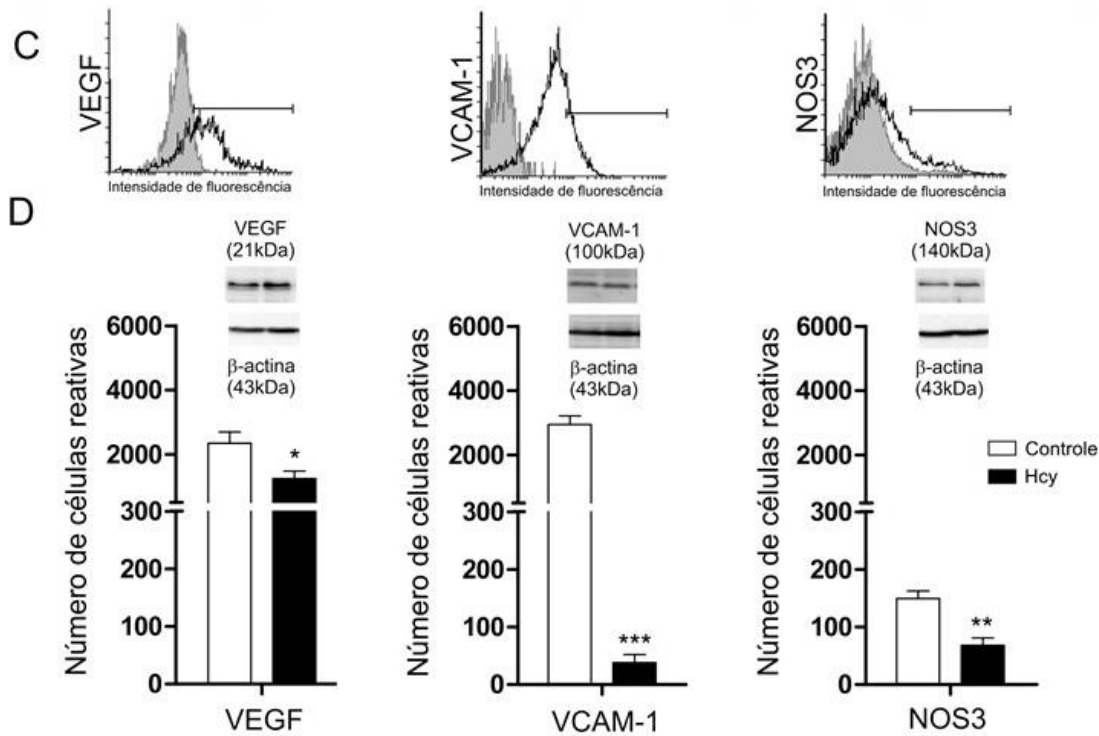
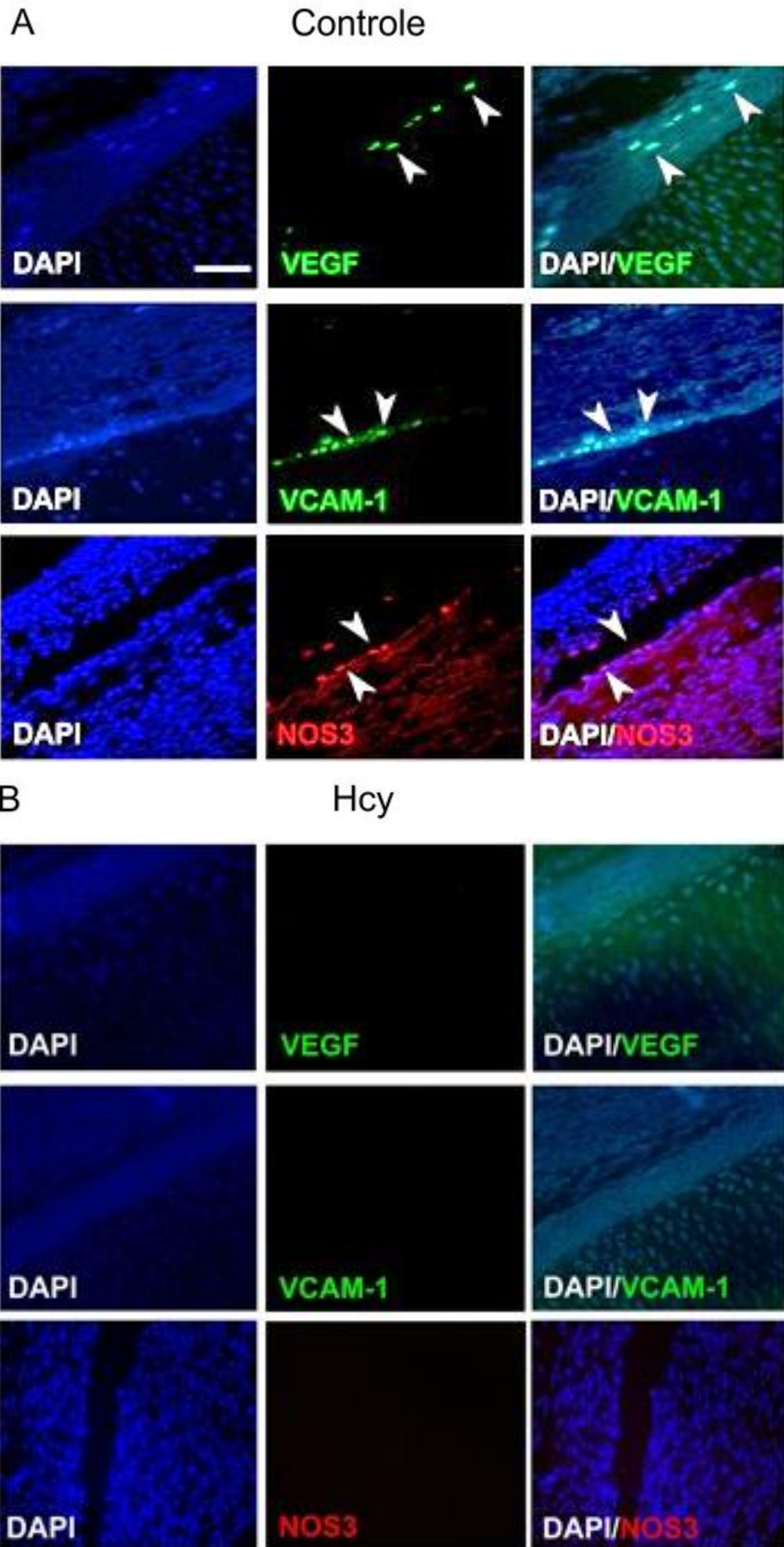


Figura 9: Imunolocalização e quantificação das células VEGF/VCAM-1/NOS3-positivas em E6. Células imunorreativas (setas) foram reconhecidas no mesênquima condensado de embriões-controle (A), mas não foram reconhecidas em embriões tratados com Hcy (B). Gráficos (C) exibem a frequência relativa e o gráfico (D) exibe a contagem absoluta de células VCAM-1/VEGF/NOS3-positivas obtida por citometria de fluxo (n = 18 embriões por grupo experimental). Barra de escala = 50 μ m. Os dados no gráfico (D) são representados como a média \pm EPM, tendo sido utilizado o teste estatístico t Student para a comparação entre as médias. * $P = 0,03$, ** $P = 0,001$ e *** $P = 0,000004$. Western blotting demonstrando a especificidade dos anticorpos anti-VEGF, anti-VCAM-1 e anti-NOS3.



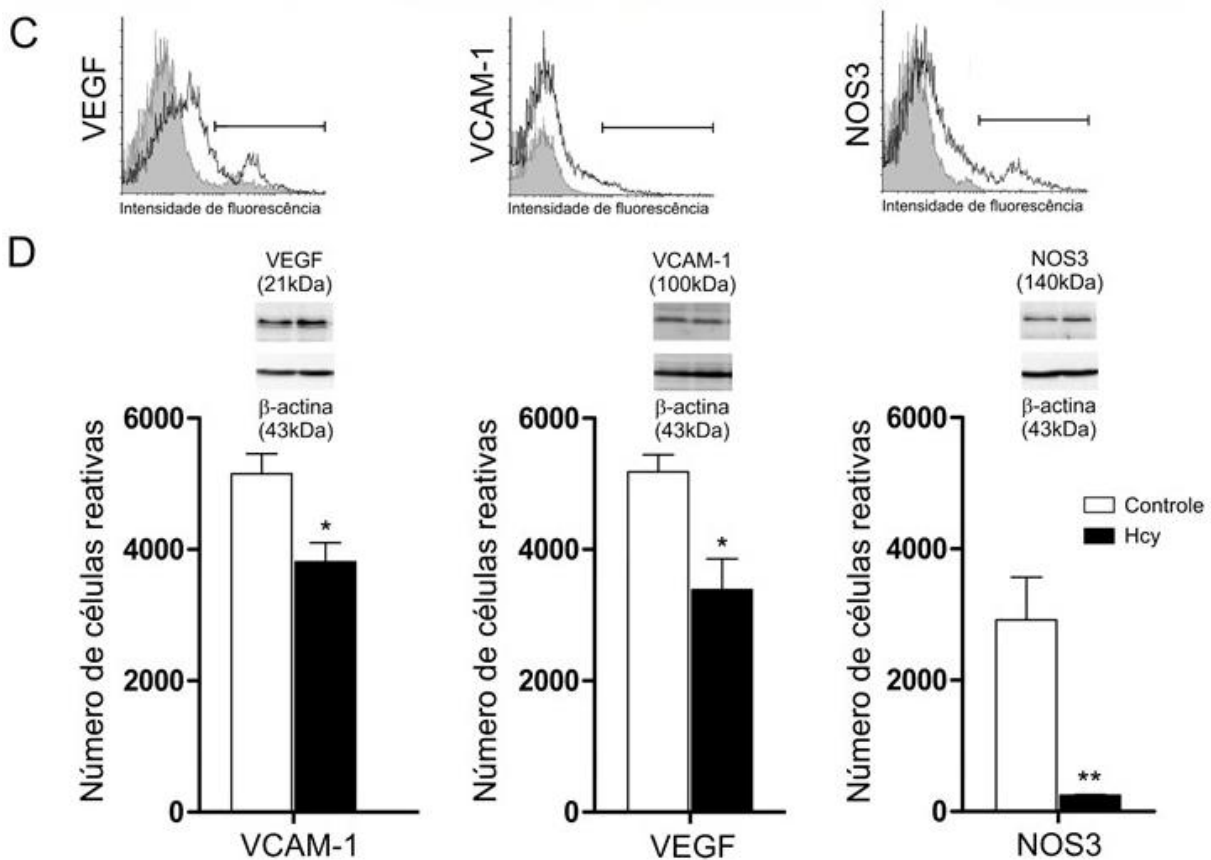


Figura 10: Imunolocalização e quantificação das células VEGF/VCAM-1/NOS3-positivas em E10. Células imunorreativas (setas) foram reconhecidas no mesênquima condensado de embriões-controle (A), mas não foram reconhecidas em embriões tratados com Hcy (B). Gráficos (C) exibem a frequência relativa e o gráfico (D) exibe a contagem absoluta de células VCAM-1/VEGF/NOS3-positivas obtida por citometria de fluxo ($n = 18$ embriões por grupo experimental). Barra de escala = 50 μ m. Os dados no gráfico (D) são representados como a média \pm EPM, tendo sido utilizado o teste estatístico t Student para a comparação entre as médias. * $P = 0,01$ e ** $P = 0,003$. Western blotting demonstrando a especificidade dos anticorpos anti-VEGF, anti-VCAM-1 e anti-NOS3.

4.2.3 Efeito da Hcy no Conteúdo de OC

Para determinar se o tratamento com Hcy interferiu no desenvolvimento ósseo, foi analisado o conteúdo de OC, uma proteína secretada por osteoblastos, importante na incorporação de cálcio para a matriz óssea de embriões em E10, quando se inicia a mineralização da matriz cartilaginosa. Por imunofluorescência, foram observadas células reativas à OC na área de crescimento periosteal em E10 (Fig. 11A-F). Nos membros dos embriões tratados com Hcy, foi detectada uma redução de 58,8% ($17,2 \pm 2,4$) no número de células OC-positivas em relação aos embriões-controle ($41,8 \pm 2,6$; $P = 0,0001$; $t = 6,85$) (Fig. 11G-H).

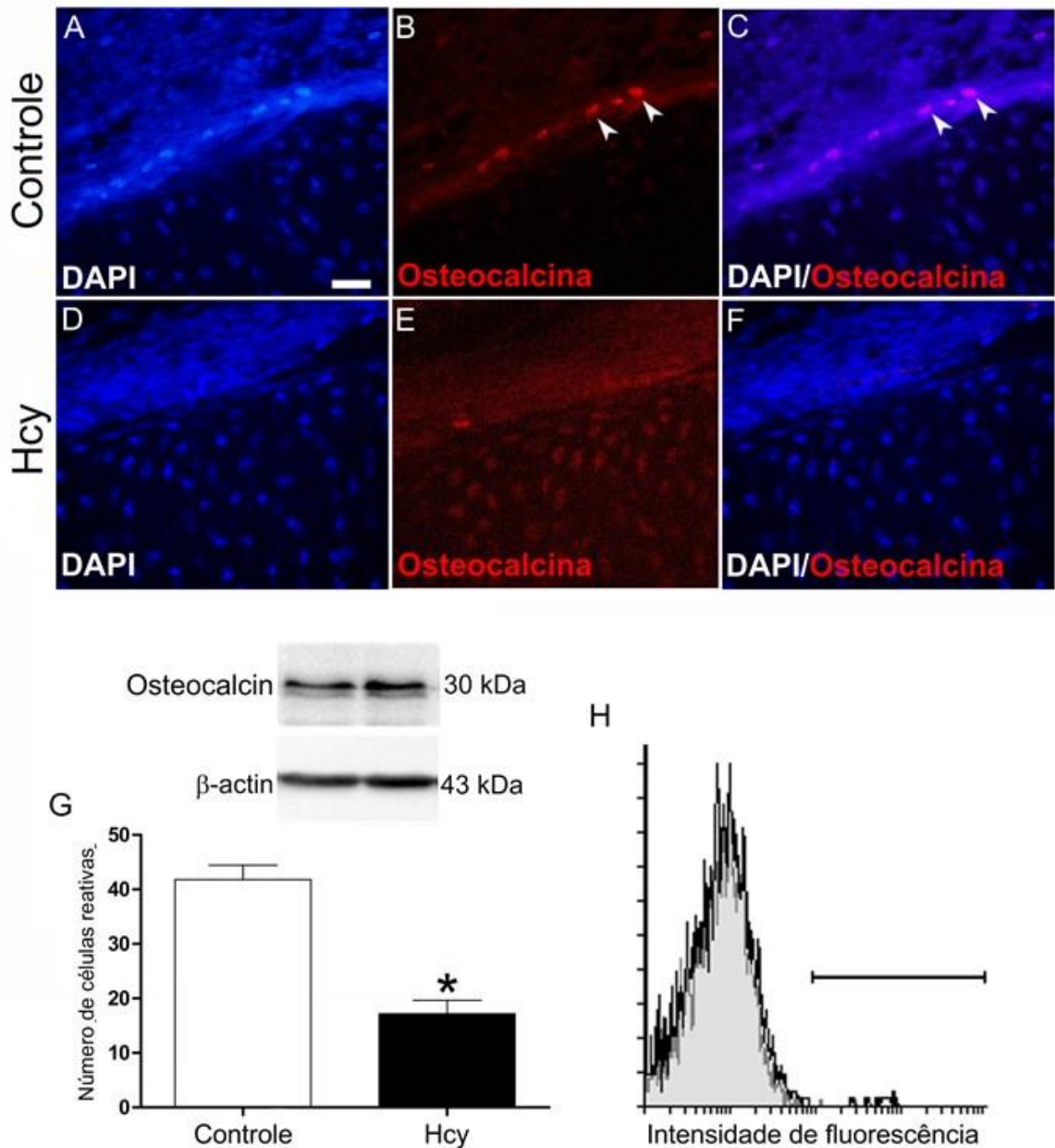


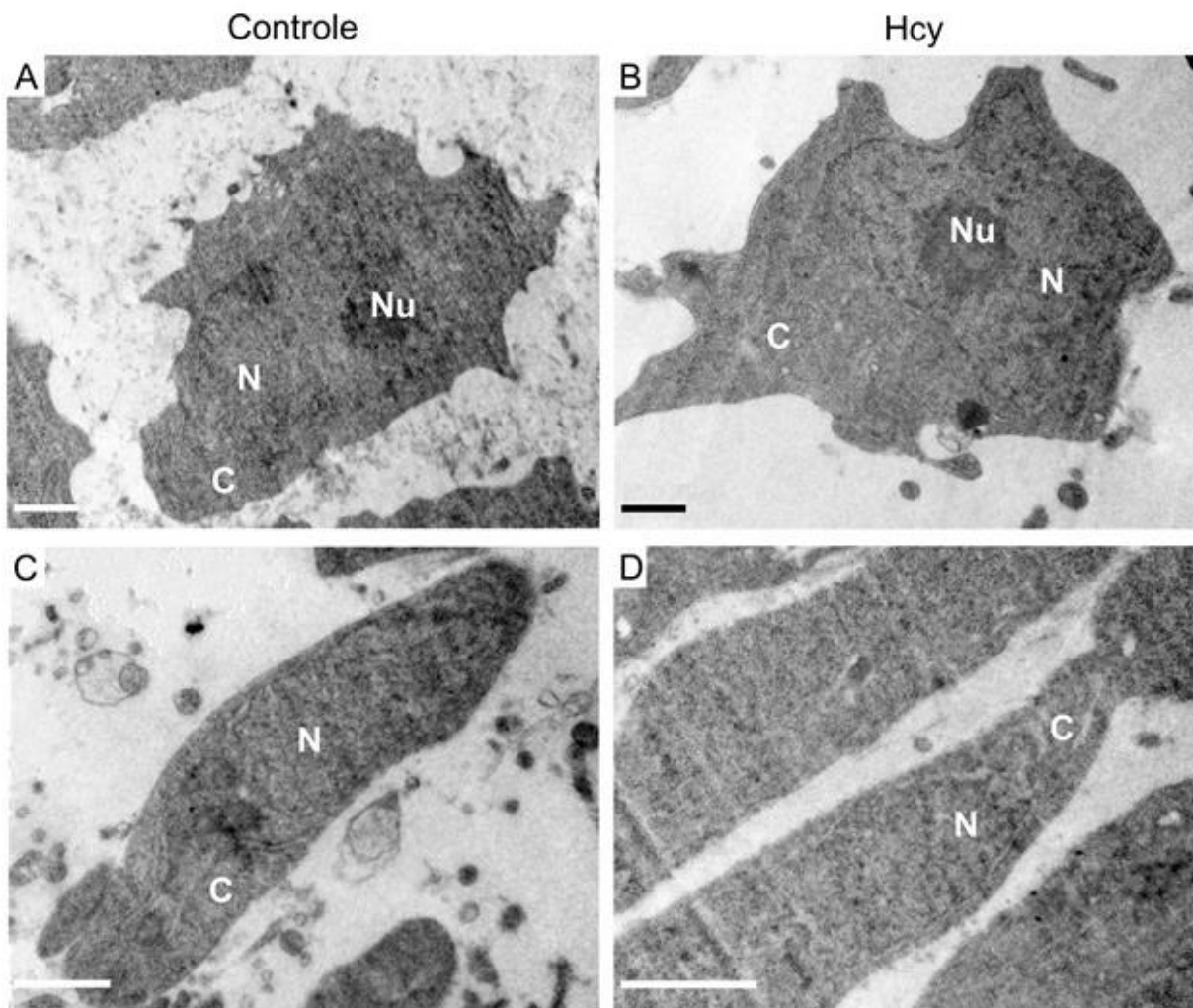
Figura 11: Efeito da Hcy no conteúdo de osteocalcina (OC) em embriões E10. A imunofluorescência mostrou uma diminuição no número de células imunorreativas (setas) para OC em embriões tratados com Hcy (A-F). O gráfico (G) exibe a contagem absoluta de células OC-positivas e o gráfico (H), o perfil do conteúdo das células OC-positivas obtidas por citometria de fluxo (n = 18 embriões por grupo experimental). Barra de escala = 50 μ m. Os dados no gráfico (G) são representados como a média \pm EPM, tendo sido utilizado o teste estatístico t Student para a comparação entre as médias. * $P = 0,0001$. Western blotting demonstrando a especificidades do anticorpo anti-OC.

4.3 TOXICIDADE CELULAR DA HCY SOBRE AS CÉLULAS MESENQUIMAIS

4.3.1 Efeito da Hcy nas Estruturas Subcelulares

Para avaliar o efeito da Hcy nas estruturas subcelulares, foram avaliados os condrócitos, as células do mesênquima condensado e a matriz extracelular, em embriões do grupo controle e do grupo tratado com Hcy em E6 e E10.

Nas duas idades (E6 e E10), tanto em embriões-controle quanto em embriões tratados com Hcy, os condrócitos apresentaram morfologia normal, com uma forma ovoide e globosa, e as células do mesênquima condensado apresentaram formato alongado organizando-se em grupos de células próximas umas das outras (Fig. 12A-D). Além disso, nos embriões em E6 e E10, dos grupos controle e tratado com Hcy, foi observada uma matriz extracelular rica em proteoglicanos e em fibras de colágeno (Fig. 12E-H).



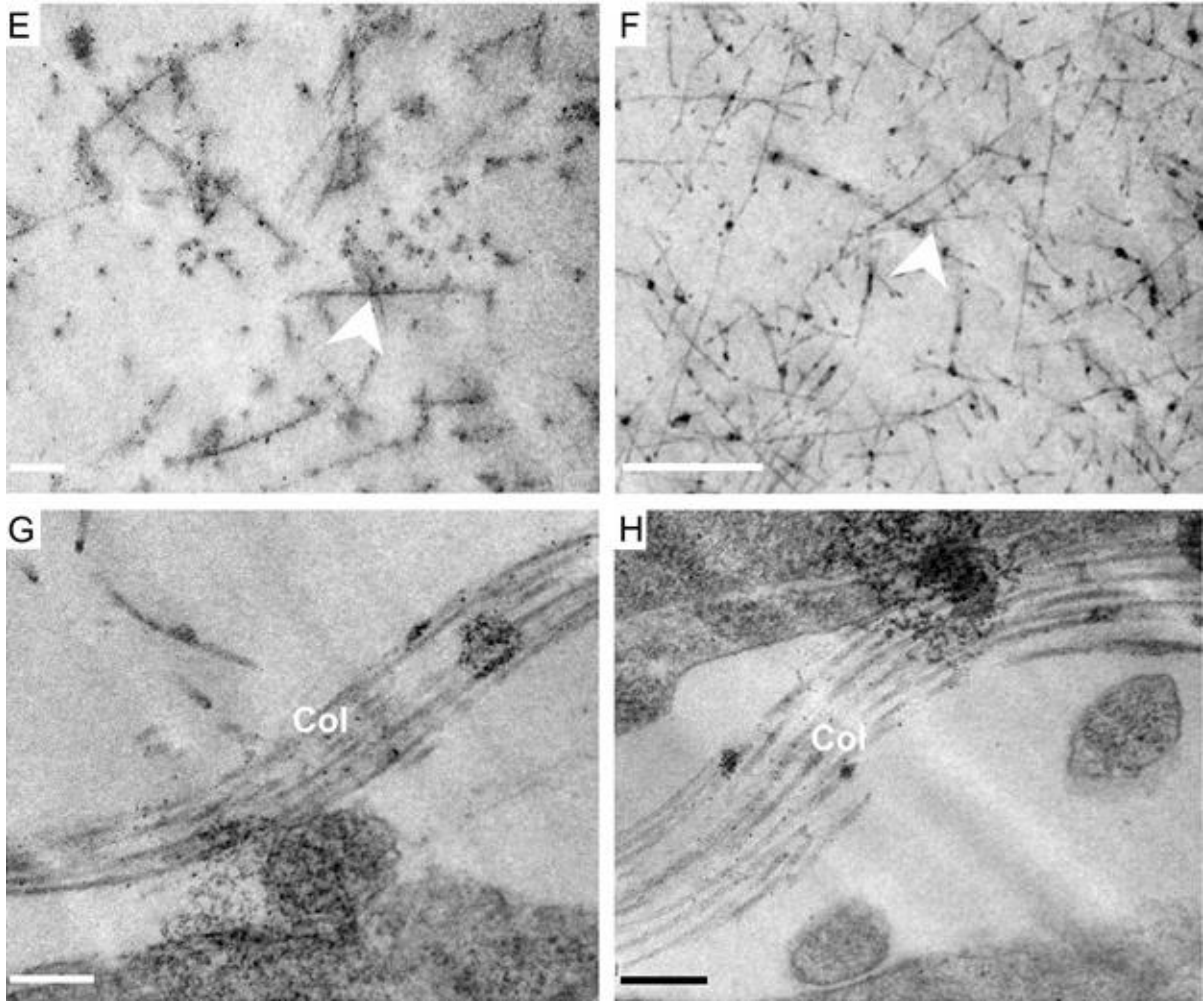


Figura 12: Micrografias de condrócitos e células mesenquimais analisados em membros de embriões de *Gallus domesticus* em E6 e E10. Condrócitos em embriões do grupo controle (A) e em embriões tratados com Hcy (B). Células do mesênquima condensado em embriões do grupo controle (C) e em embriões tratados com Hcy (D). Proteoglicanos (setas) da matriz extracelular (MEC) em embriões do grupo controle (E) e em embriões tratados com Hcy (F). Fibras de colágeno (Col) da MEC em embriões do grupo controle (G) e em embriões tratados com Hcy (H). Barras de escala em A-D = 1 μ m, em E, G e H = 200 nm e em F = 500 nm. C = citoplasma; N = Núcleo e Nu = Nucléolo. (n = 3 embriões por grupo experimental).

Os núcleos celulares nos embriões em E6 e E10, dos grupos controle e tratado com Hcy, apresentaram a cromatina condensada, organizada em eucromatina e heterocromatina. A eucromatina corresponde às regiões mais dispersas de cromossomos, menos elétron-densas e a heterocromatina apresentou aspecto mais elétron-denso. O envoltório nuclear apresentou-se íntegro, com membranas, espaço perinuclear e poros nucleares (Fig. 13A-H).

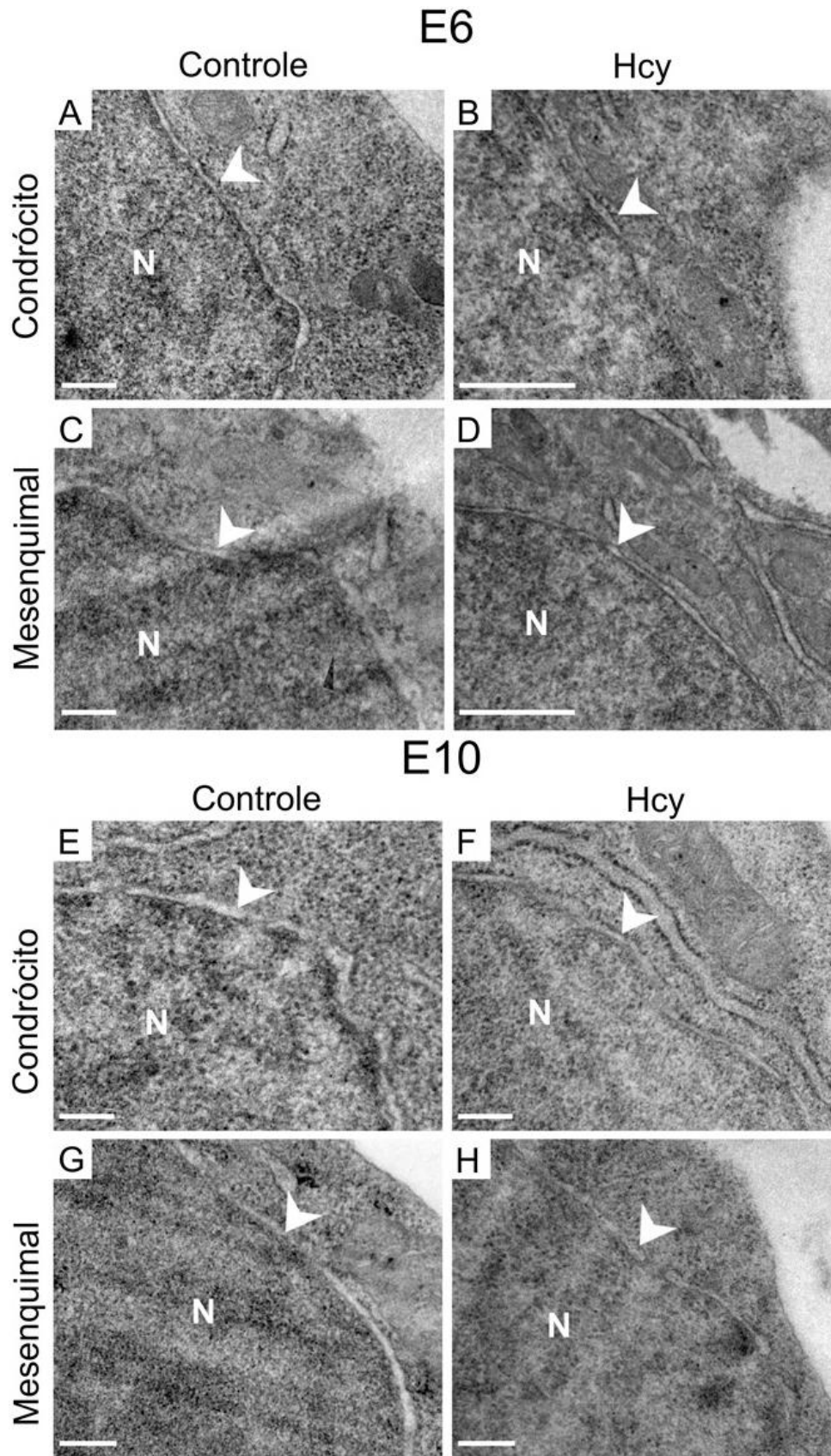
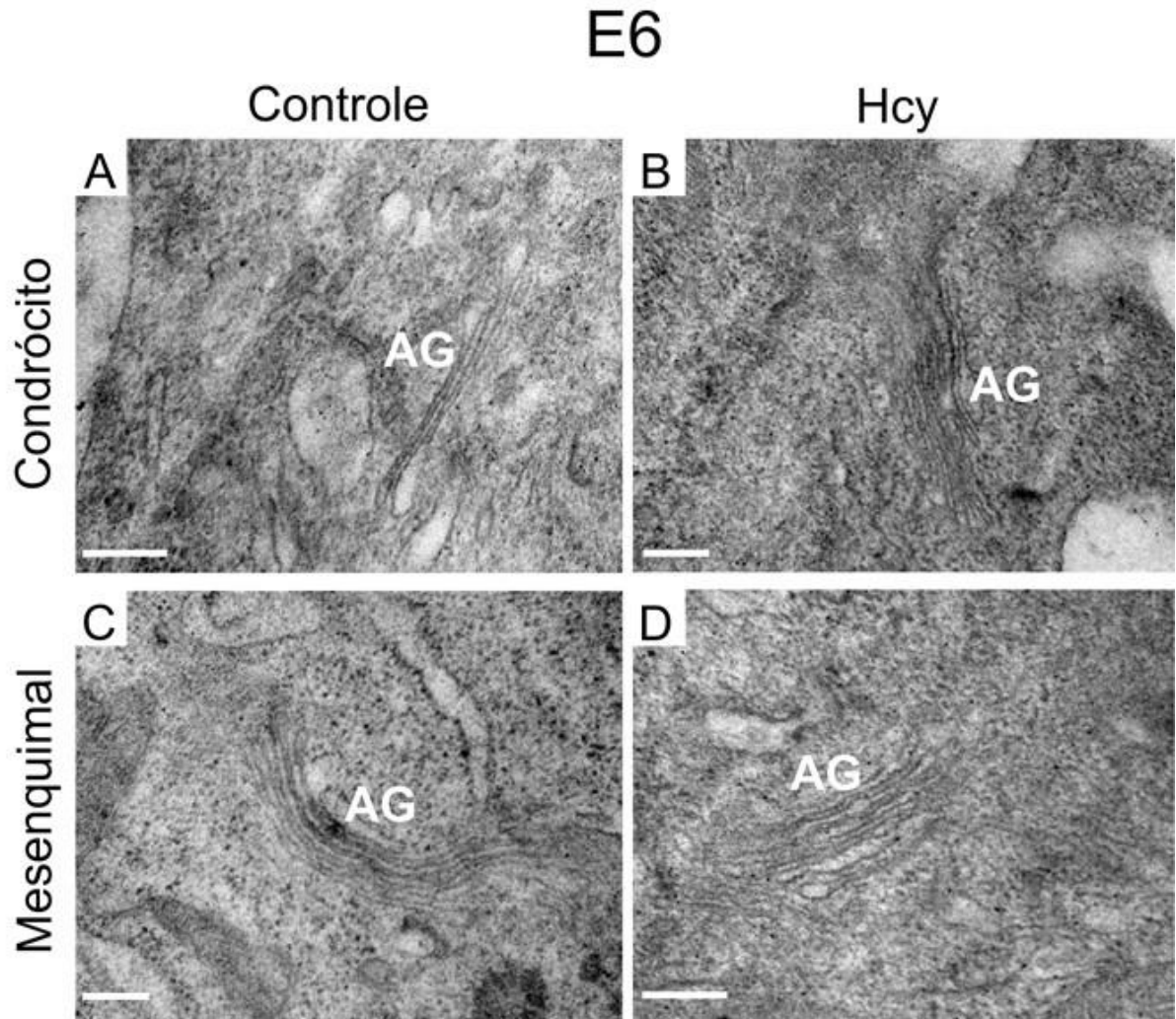


Figura 13: Micrografias dos núcleos celulares em membros de embriões de *Gallus domesticus* em E6 e E10. Núcleos de condrocitos (A-B, E-F) e das células do mesênquima condensado (C-D, G-H) em embriões do grupo controle e tratados com Hcy em E6 e E10. Barras de escala em A, C, E, F, G e H = 200 nm e em B e D = 500 nm. N = núcleo. (n = 3 embriões por grupo experimental).

Foi observado o Aparelho de Golgi com morfologia normal em formato lamelar, no citoplasma dos condrócitos e das células do mesênquima condensado, em embriões-controle e embriões tratados com Hcy, em E6 e E10 (Fig. 14A-H).



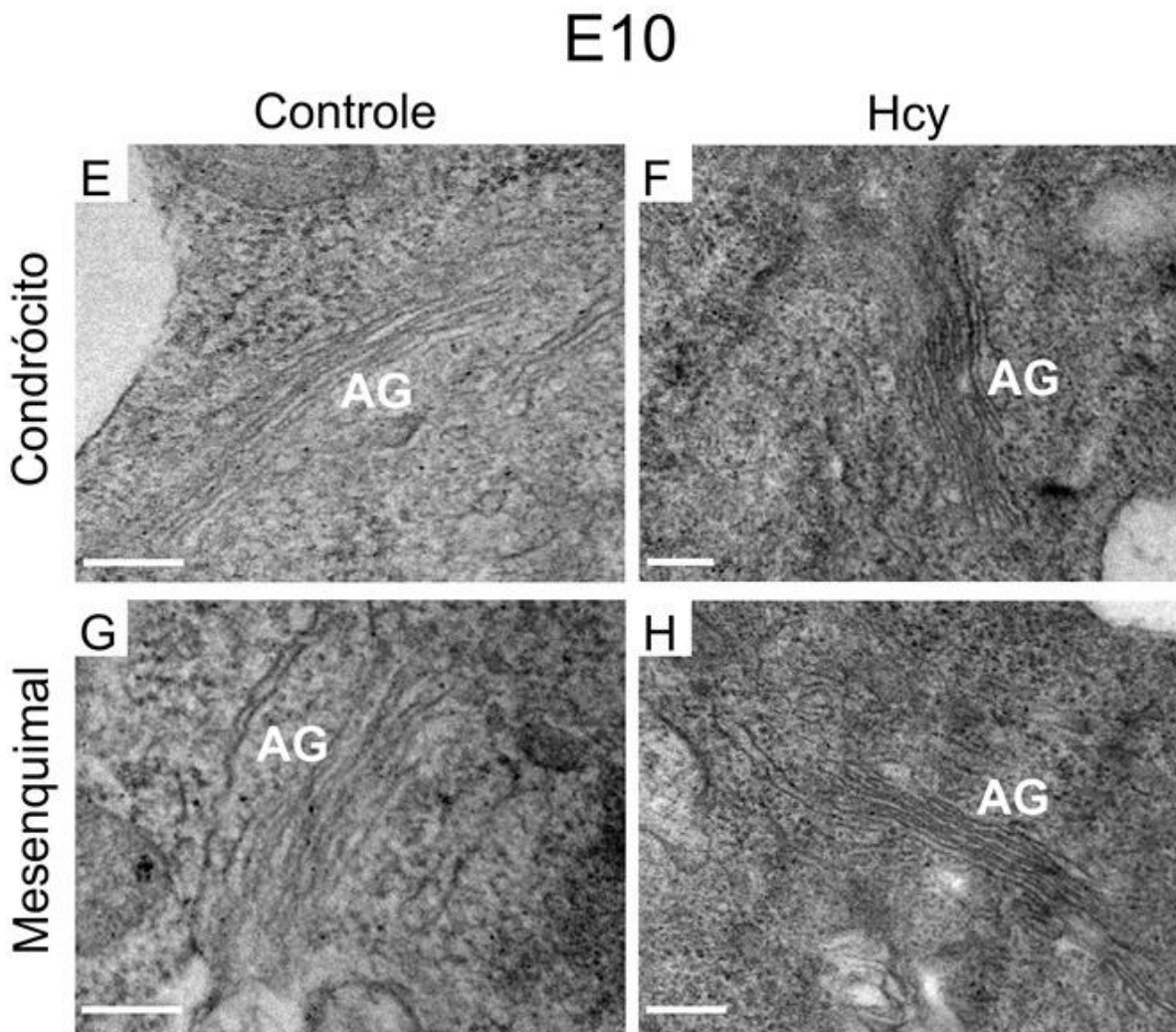
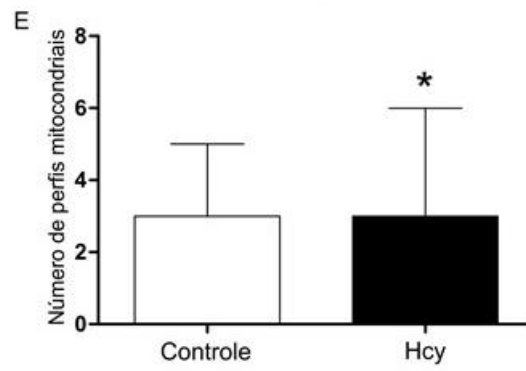
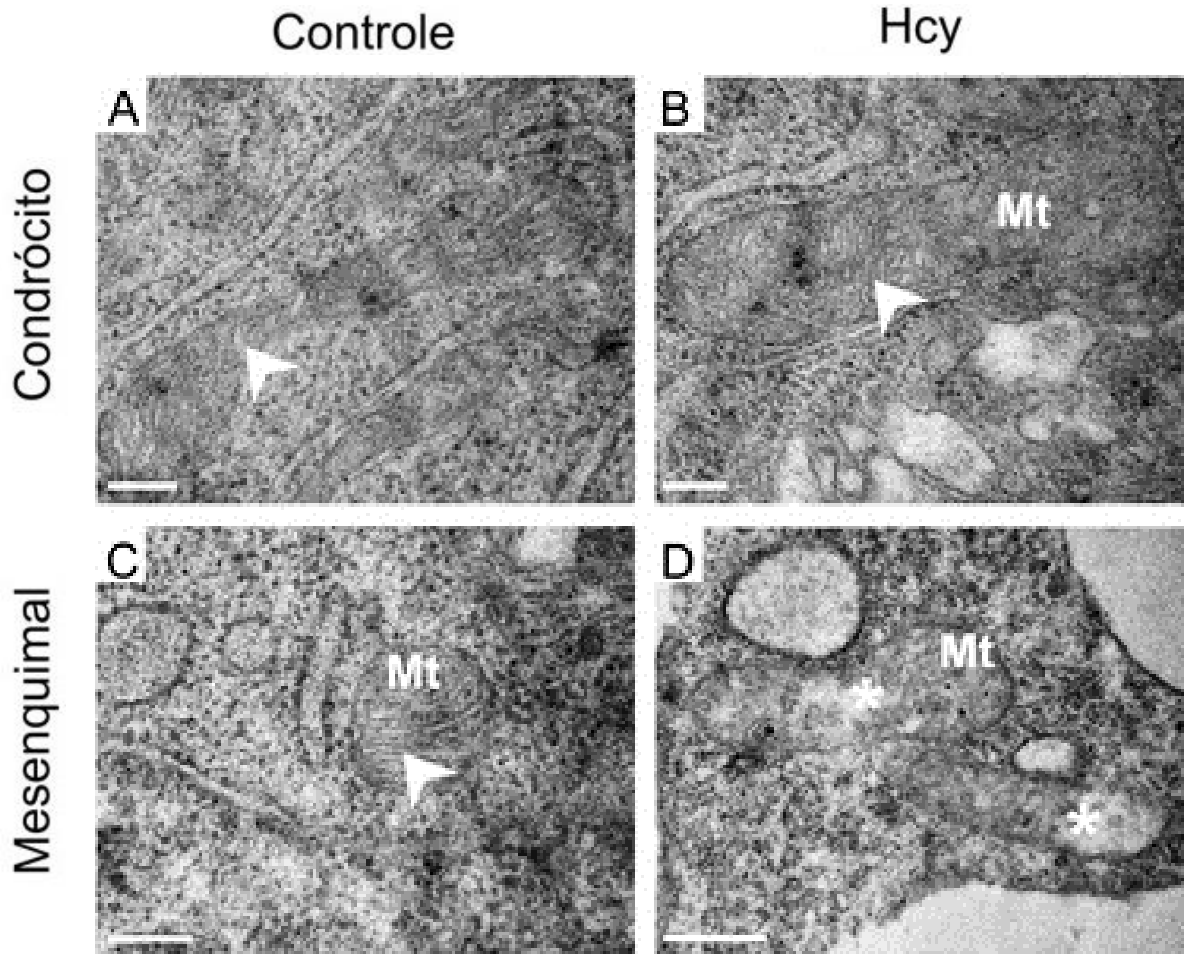


Figura 14: Micrografias do Aparelho de Golgi em membros de embriões de *Gallus domesticus* em E6 e E10. Corpos de Golgi de condrocitos (A-B, E-F) e das células do mesênquima condensado (C-D, G-H) em embriões do grupo controle e tratados com Hcy em E6 e E10. Barras de escala = 200 nm. (n = 3 embriões por grupo experimental).

Nos embriões em E6 e E10, dos grupos controle e tratado com Hcy, foram observadas mitocôndrias distribuídas por todo citoplasma dos condrocitos e das células do mesênquima condensado. Além disso, nos condrocitos, as membranas mitocondriais interna e externa encontraram-se preservadas (Fig. 15A-B, F-G).

Nas células do mesênquima condensado, dos embriões em E6 tratados com Hcy foram observadas dilatações nas cristas mitocondriais em 54,8% das mitocôndrias (Fig. 15C-D). Em E10, tanto em embriões-controle quanto em embriões tratados com Hcy não foram observadas alterações ultraestruturais nas cristas mitocondriais (Fig. 14H-I). Além disso, em membros de embriões E6 tratados com Hcy foi identificado um aumento de 19,0% no número de perfis mitocondriais, em comparação aos embriões-controle ($P = 0,01$; $U = 2182,00$) (Fig. 15E). Porém em E10, não foram observadas diferenças significativas no número de perfis mitocondriais em membros de embriões tratados com Hcy e de embriões-controle (Fig. 14J).

E6



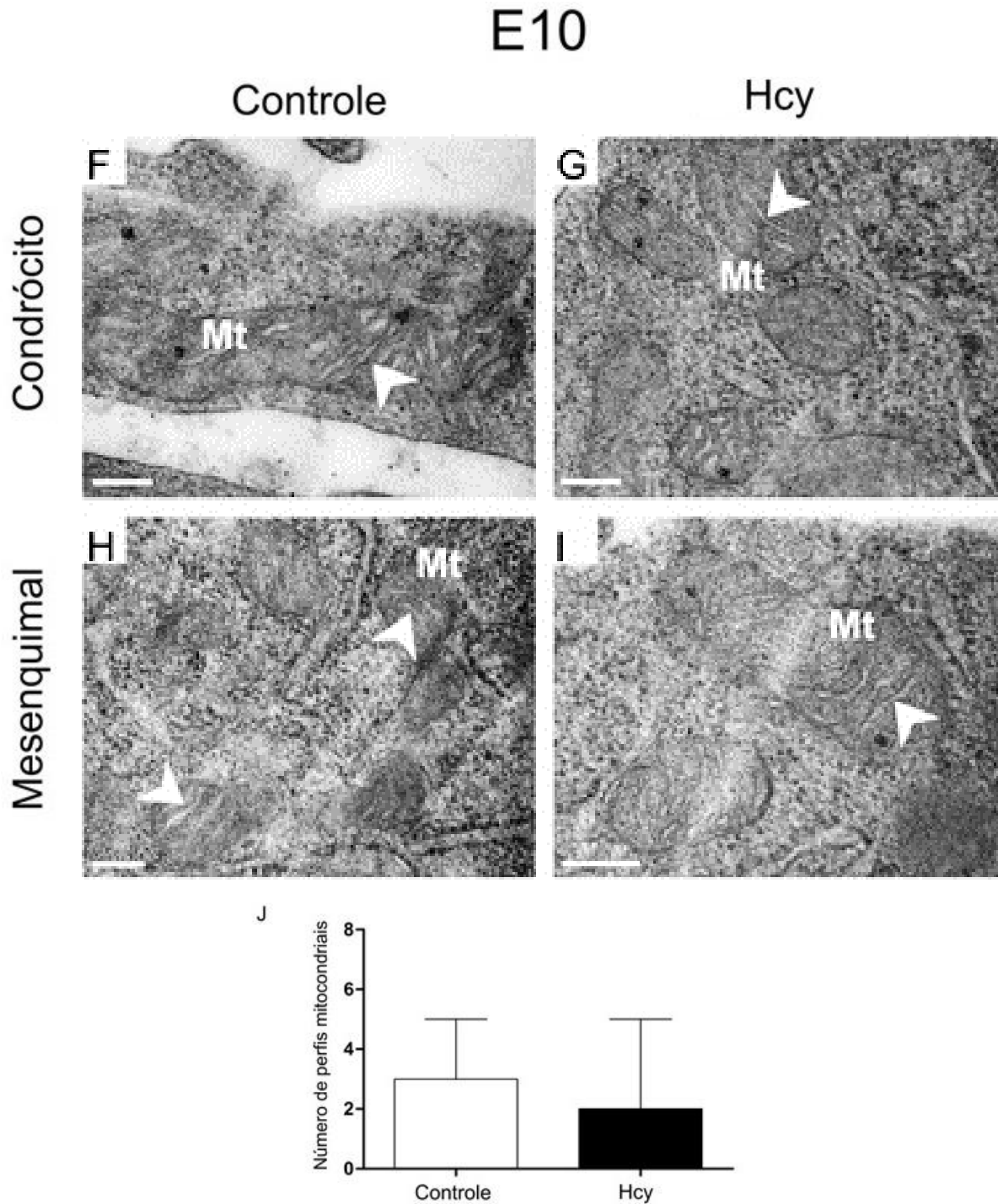


Figura 15: Efeito da Hcy sobre a ultraestrutura da mitocôndria em células do mesênquima condensado dos membros em desenvolvimento em E6 e E10. Micrografias de condrocitos de embriões em E6 e em E10 demonstrando a organização normal das mitocôndrias em embriões- controle e em embriões tratados com Hcy (A-B, F-G). Micrografias de células do mesênquima condensado em E6 e E10 demonstrando a organização normal das mitocôndrias em embriões-controle (C, H-I); e dilatações na membrana mitocondrial interna (asteriscos) em embriões tratados com Hcy (D) ($n = 3$ embriões por tratamento). Gráficos (E e J) exibem o número de perfis mitocondriais em células do mesênquima condensado em membros de embriões tratados com Hcy e embriões-controle em E6 e E10. Os dados são representados como mediana \pm IIQ, sendo utilizado o teste estatístico U de Mann-Whitney para a comparação entre as médias. $*P = 0,01$. Barras de escala = 200 nm.

Nos condrócitos de embriões em E6 e E10, dos grupos controle e tratado com Hcy, foi observado um citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso (RER), composto por cisternas achatadas com muitos ribossomos associados à superfície (Fig. 16A-B, F-G).

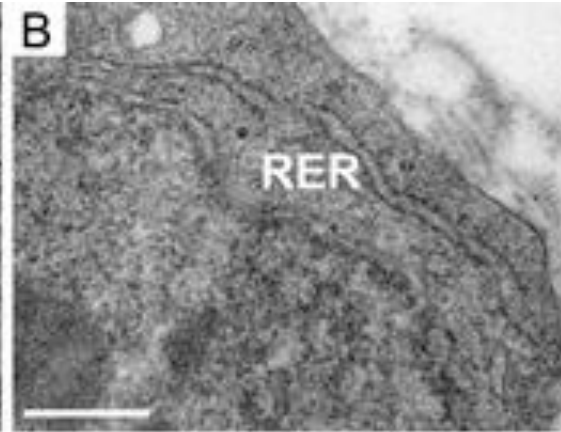
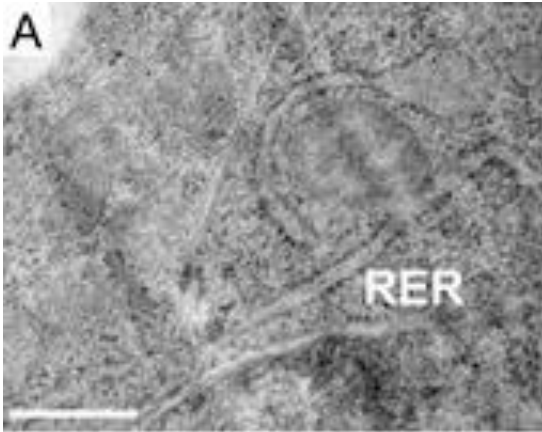
Também foi identificado nos embriões tratados com Hcy em E6, que 57,6% das células mesenquimais apresentaram dilatação no lúmen do RER (Fig. 16C-D) e em E10, 45,2% das células mesenquimais apresentaram dilatação no lúmen do RER (Fig. 16H-I). Além disso, nos membros de embriões em E6 foi identificada uma redução de 30,4% no número de cisternas do RER após o tratamento com Hcy, quando comparada ao grupo controle ($P = 0,000001$; $U = 1506,50$). Em E10, não foram encontradas diferenças no número de cisternas do RER em membros de embriões tratados com Hcy e embriões-controle (Fig. 16E). Com relação à área das cisternas do RER, foi observado um aumento na área nos embriões tratados com Hcy em E6 ($189,8 \text{ nm}^2 \pm 9,5$) e em E10 ($252,2 \text{ nm}^2 \pm 17,9$) em comparação aos embriões-controle em E6 ($113,9 \pm 8,9 \text{ nm}^2$; $P = 0,00000007$; $t = 5,80$) e E10 ($75,8 \pm 5,5 \text{ nm}^2$; $P = 0,00000007$; $t = 9,40$) (Fig. 16J).

E6

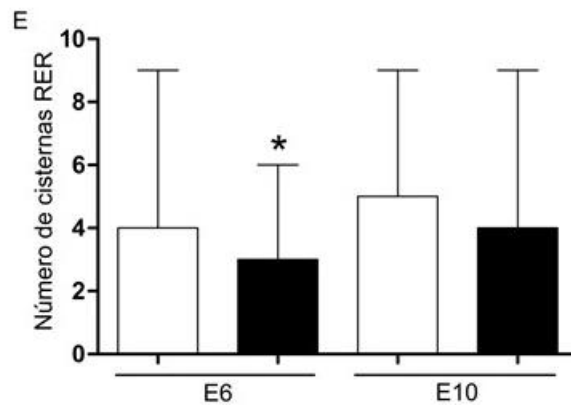
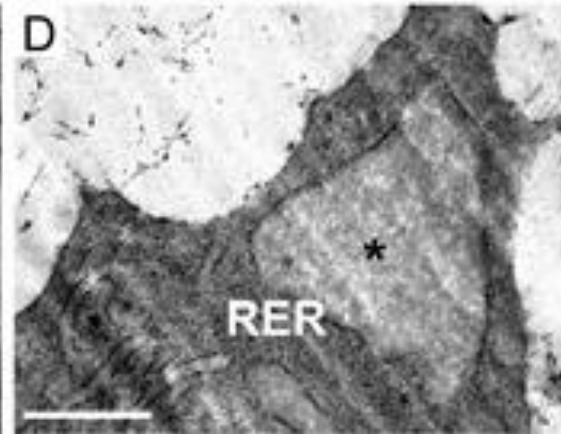
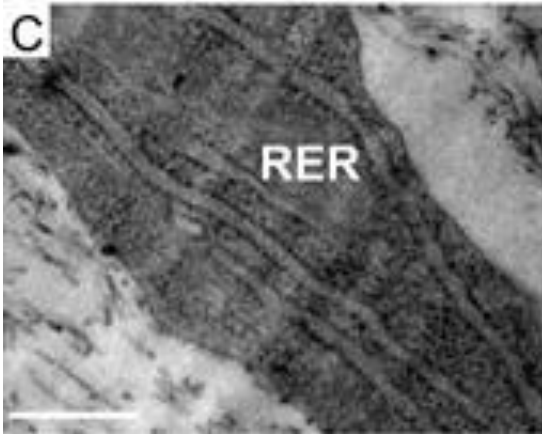
Controle

Hcy

Condrócito



Mesenquimal



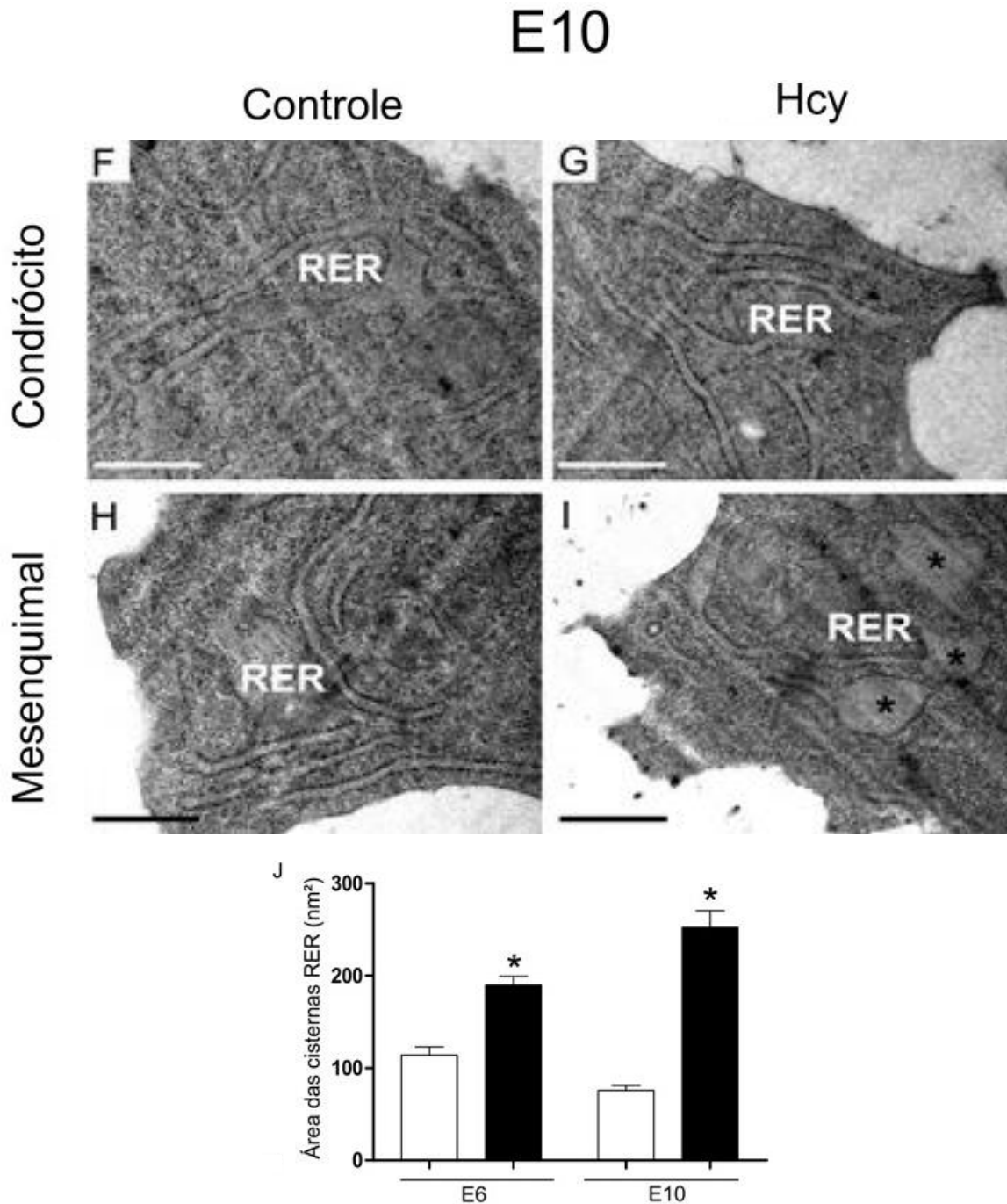


Figura 16: Efeito da Hcy sobre o retículo endoplasmático rugoso (RER) em células do mesênquima condensado dos membros em desenvolvimento em E6 e E10. Micrografias de condrocitos de embriões em E6 e em E10 demonstrando a organização normal das cisternas do RER em embriões-controle e em embriões tratados com Hcy (A-B, F-G). Micrografias de células do mesênquima condensado em E6 e E10 demonstrando a organização normal das cisternas do RER em embriões-controle (C,G); e dilatações no lúmen do RER (asteriscos) em embriões tratados com Hcy (D,I) (n = 3 embriões por tratamento). Gráfico (E) exibe o número de cisternas do RER em membros de embriões tratados com Hcy e embriões-controle em E6 e E10. Os dados são representados como mediana \pm IIQ. Gráfico (J) mostra a área de cisternas do RER (nm²) em membros de embriões Hcy-tratados e embriões-controle em E6 e E10. Testes estatísticos empregados: U de Mann-Whitney (I) (* $P = 0,000001$), e teste t de Student (J) (* $P = 0,00000007$) para a comparação entre as médias. Barras de escala = 0,5 μ m.

4.3.2 Efeito da Hcy nas Mitocôndrias

Baseado nas observações ultraestruturais nas mitocôndrias nos embriões tratados com Hcy, foi analisado o efeito da Hcy nos mecanismos de fissão/fusão mitocondrial, na alteração da permeabilidade das membranas mitocondriais e na indução à mitofagia.

As mitocôndrias são organelas dinâmicas que continuamente passam pelos ciclos de fissão e fusão. Assim, foi avaliado o conteúdo da proteína de DRP1, (fissão mitocondrial), e das proteínas MFN1 e MFN2 (fusão mitocondrial), para verificar o efeito da Hcy nos mecanismos mitocondriais de fissão/fusão.

Em E6, foi observado um aumento no número de células DRP1-positivas nos embriões tratados com Hcy (551,0 células \pm 50,4) em comparação aos embriões-controle (340,6 células \pm 27,7; $P = 0,004$; $t = 3,65$) (Fig. 17A). No entanto, em E10 não foram encontradas diferenças no número de células DRP1-positivas nos membros de embriões tratados com Hcy (2.709,0 células \pm 232,3) e nos membros de embriões-controle (2.318,0 células \pm 205,8) (Fig. 17B). Nos embriões E6 tratados com Hcy foi identificada uma redução no número de células MFN1-positivas (121,6 \pm 2,7), quando comparados aos embriões-controle (276,0 células \pm 24,4; $P = 0,00009$; $t = 6,26$) (Fig. 17C). Em E10 não foram observadas diferenças no número de células MFN1-positivas entre os embriões tratados com Hcy (3.138,6 células \pm 130,5) e embriões-controle (2.658,3 células \pm 488,4) (Fig. 17D). Além disso, em E6 foi observado uma redução no número de células MFN2-positivas em membros de embriões tratados com Hcy (241,6 células \pm 8,1), quando comparados aos membros de embriões-controle (299,3 células \pm 23,0; $P = 0,03$; $t = 2,37$) (Fig. 17E). Em E10, foi reconhecido um aumento no número de células MFN2-positivas em embriões tratados com Hcy (3.983,6 células \pm 131,7) em comparação aos embriões-controle (1.588,4 células \pm 108,1; $P = 0,000001$; $t = 14,09$) (Fig. 17F).

Com relação às proteínas Bak e Bcl2, responsáveis por manter a estabilidade da membrana mitocondrial externa, observamos que em embriões em E6 tratados com Hcy, houve uma diminuição no número de células reativas para proteína Bak (90,3 células \pm 11,7) quando comparados aos embriões-controle (144,0 células \pm 18,0; $P = 0,02$; $t = 3,65$). Do mesmo modo, após o tratamento com Hcy, houve uma diminuição no número de células reativas para a proteína Bcl2 (42,0 células \pm 12,5) nos membros dos embriões tratados com Hcy, quando comparados aos embriões-controle (94,6 células \pm 8,8; $P = 0,000004$; $t = 5,45$) (Fig. 18A). Nos embriões em E10, o tratamento com Hcy não induziu alterações no número de células reativas para as proteínas Bak e Bcl2 nos membros de embriões tratados, quando comparados aos embriões do grupo controle (Fig. 18B).

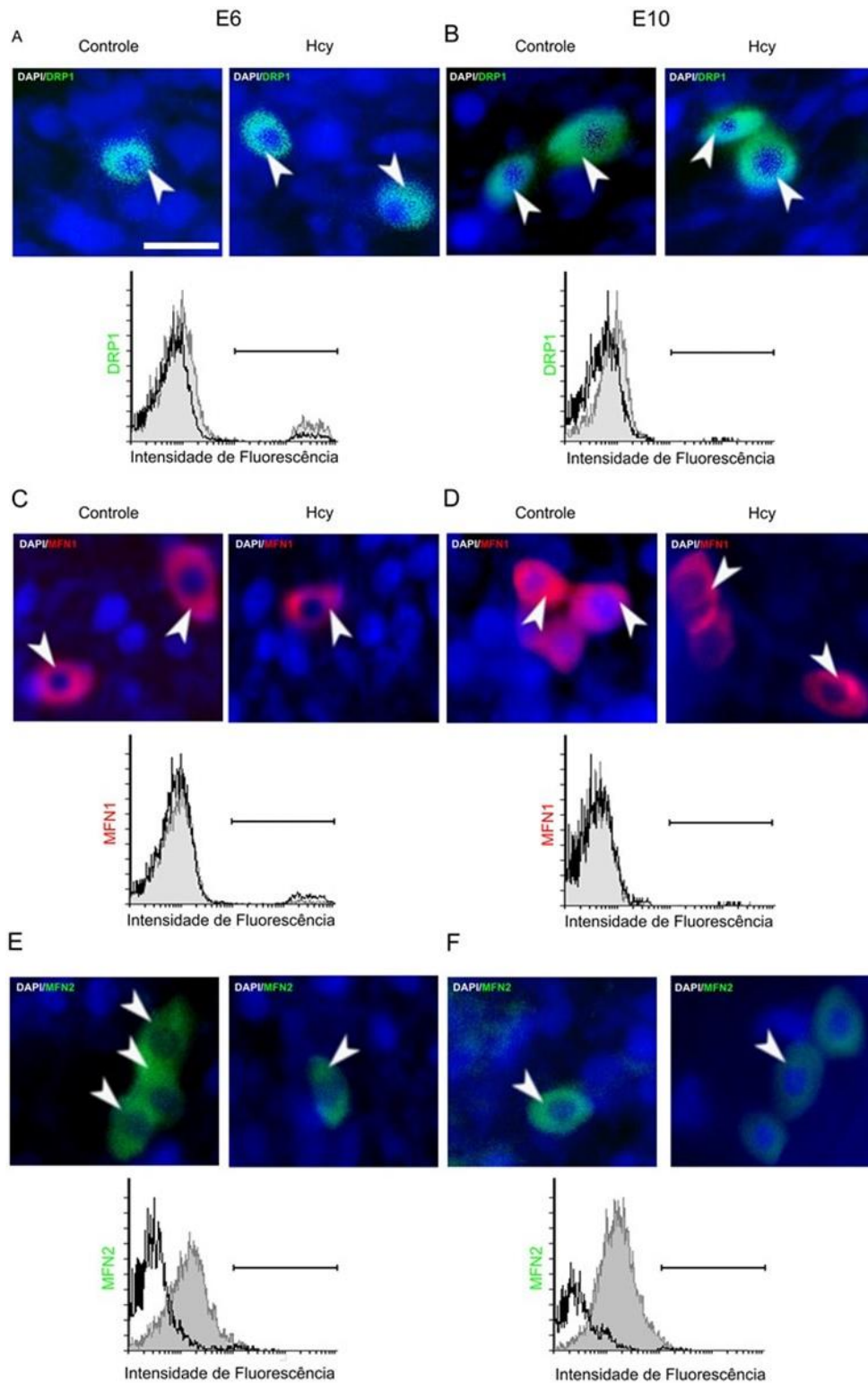


Figura 17: Imunolocalização e quantificação de DRP1, MFN1 e MFN2 em embriões E6 e E10. As células imunorreativas (setas) foram reconhecidas em embriões tratados com Hcy e em embriões-controle em E6 e E10. Gráficos (A-F) o perfil dos conteúdos das células DRP1/MFN1/MFN2-positivas, obtidas por citometria de fluxo (n = 18 embriões por tratamento). Barra de escala = 5 μm.

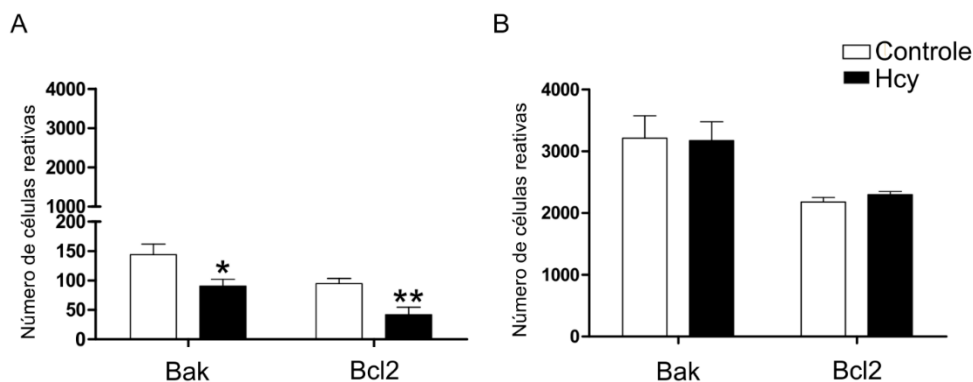


Figura 18: Quantificação das proteínas Bak e Bcl2 em membros de embriões em E6 e E10. Os gráficos (A e B) apresentam os dados das quantificações do número de células reativas para as proteínas Bak e Bcl2 em embriões E6 e E10 respectivamente. Os dados foram apresentados como média \pm EPM, sendo utilizado o teste estatístico t Student para a comparação entre as médias. * $P = 0,02$ e ** $P = 0,000004$.

Uma vez identificados danos mitocondriais, nos mecanismos de fissão/fusão e na permeabilidade da membrana mitocondrial, foi investigada a indução de mitofagia. Neste caso, a mitofagia como mecanismo de remoção de mitocôndrias danificadas.

Para determinar a capacidade da Hcy induzir mitofagia, foram analisados os compartimentos celulares ácidos por LA, seguido pelo conteúdo das proteínas envolvidas na mitofagia: PRK8, que é expressa em casos de danos mitocondriais; LC3II, marcador de autofagossomos; e p62, que controle o fluxo autofágico.

Em E6, foi possível observar nas células mesenquimais de embriões E6 tratados com Hcy, a presença de danos subcelulares, como a presença de lisossomos e vacúolos autofágicos (Fig. 19A-C). Além disso, nos embriões tratados com Hcy, foi reconhecido um aumento ($6.419,6$ células $\pm 1.164,5$) no número de compartimentos celulares ácidos quando comparados aos embriões-controle ($2.112,0$ células $\pm 576,2$; $P = 0,0003$; $t = 5,24$) (Fig. 19D). Em E10, não foram observadas diferenças no número de compartimentos celulares ácidos nos embriões tratados com Hcy ($2.560,6$ células $\pm 95,3$) e nos embriões-controle ($2.877,3$ células $\pm 82,8$) (Fig. 19E).

Para as proteínas PRK8, LC3II e p62, em E6, foi constatado um aumento significativo no número de células PRK8-positivas em embriões tratados com Hcy ($2.582,0$ células $\pm 146,7$) em comparação com embriões-controle ($1.419,0$ células $\pm 152,5$; $P = 0,0002$; $t = 5,51$). Nos embriões em E6 tratados com Hcy foi observado um aumento nas células LC3II-positivas ($2.787,3$ células $\pm 62,3$), quando comparados aos embriões-controle ($1.286,3$ células $\pm 75,1$; $P = 0,0006$; $t = 9,75$). Quanto ao número de células p62-positivas, foi detectado um aumento no número de células em membros de embriões tratados com Hcy ($1.533,3$ células $\pm 95,4$) em comparação a membros de embriões-controle ($367,0$ células $\pm 100,0$; $P = 0,000006$; $t = 8,61$) (Fig. 19F). Nos embriões E10 tratados com Hcy, foi observado um aumento no número de células PRK8-positivas ($3.511,2$ células $\pm 111,5$) em relação aos embriões-controle ($4.420,0$ células $\pm 114,6$, $P = 0,0002$; $t = 5,70$). No entanto, em E10 não foram encontradas diferenças no número de células LC3II-positivas em membros de embriões tratados com Hcy ($2.644,6 \pm 149,9$) e embriões-controle ($2.584,0$ células $\pm 125,8$). Também não foram observadas diferenças no número de células p62-positivas entre os

embriões em E10 tratados com Hcy (3.627,6 células \pm 109,5) e embriões E10 controle (3.459,0 células \pm 141,5) (Fig. 19G).

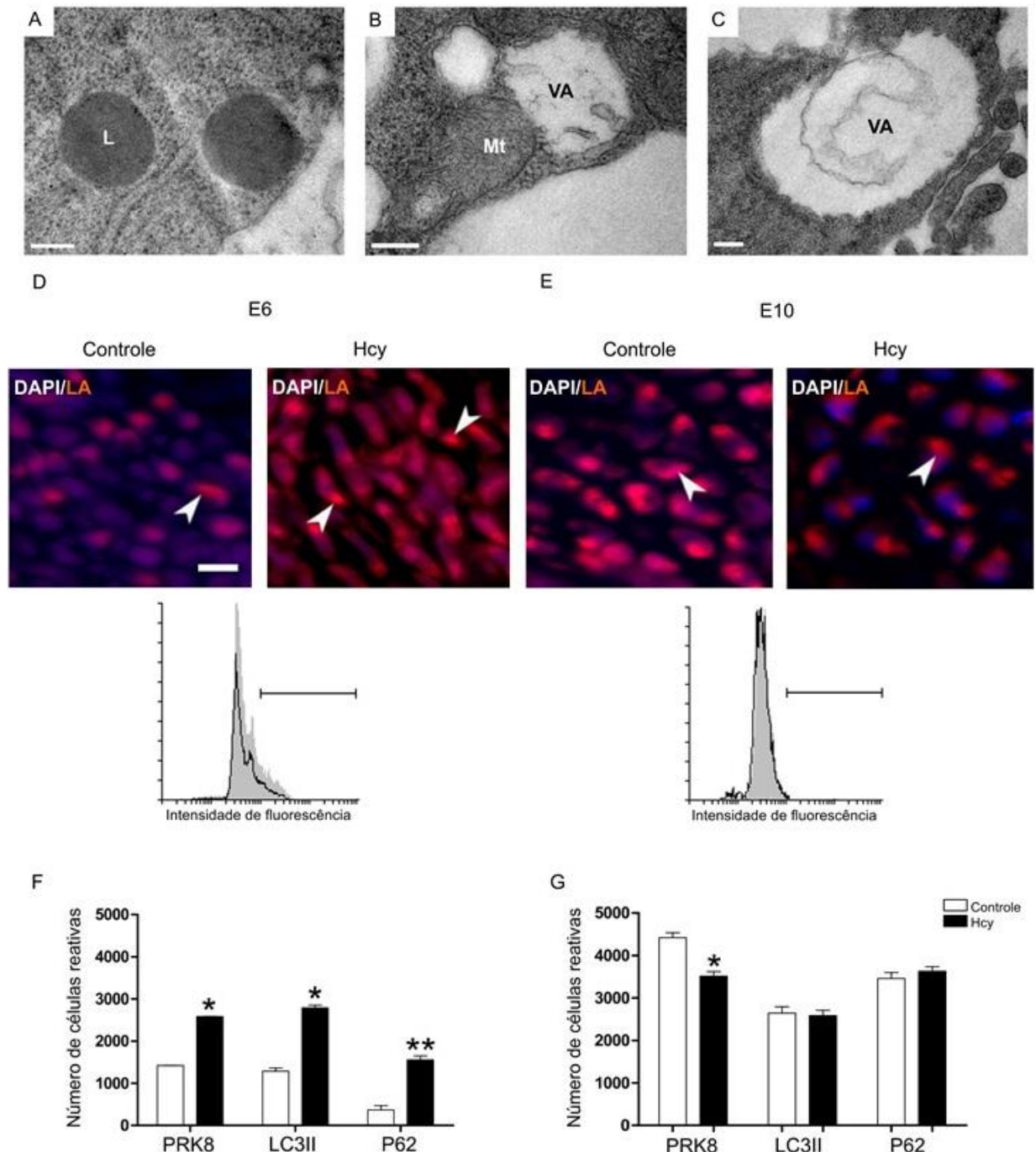
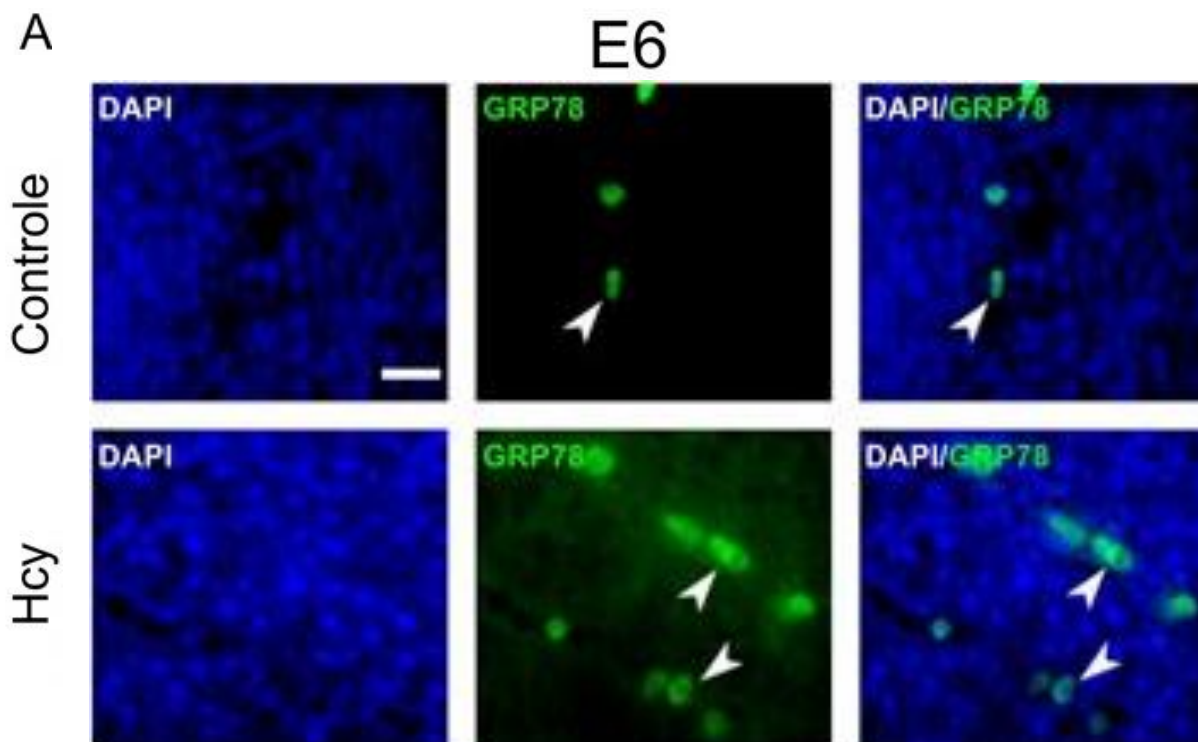


Figura 19: Indução de mitofagia por Hcy em embriões E6 e E10. Micrografias (E-G) demonstrando respectivamente lisossomos, vacúolo autofágico englobando uma mitocôndria e vacúolo autofágico com conteúdo sendo degradado em células mesenquimais embriões tratados com Hcy. Gráficos (D,E) de citometria de fluxo demonstram o número de compartimentos celulares ácidos (setas) em embriões tratados com Hcy e embriões-controle, em E6 e E10 submetidos a reação com Laranja de Acridina (LA). Gráficos (F, G) exibem a contagem absoluta de células PRK8/LC3II/p62-positivas, obtidas por citometria de fluxo (n = 18 embriões por tratamento). Os dados nos gráficos são representados como a média \pm EPM, tendo sido utilizado o teste estatístico t Student para a comparação entre as médias. * $P = 0,0002$ e ** $P = 0,000006$. Barras de escala em A-C = 200 nm em D e E = 10 μ m.

4.3.3 Efeito da Hcy no Retículo Endoplasmático Rugoso (RER)

Considerando as alterações ultraestruturais nas cisternas do RER geradas pela Hcy, foi analisado, pelo conteúdo de GRP78, a capacidade da Hcy de induzir estresse no RER. Por imunofluorescência, as células GRP78-imunorreativas foram observadas principalmente nas células do mesênquima condensado de membros dos embriões E6 e E10 (Fig. 20A-B) Em E6, foi identificado um aumento no número de células GRP78-positivas em embriões tratados com Hcy (1.905,0 células \pm 115,4) quando comparados aos embriões-controle (229,8 células \pm 22,6; $P = 0,000001$; $t = 10,67$) (Fig. 20C). Em E10, também foi identificado um aumento no número de células GRP78-positivas em embriões tratados com Hcy (6.414,0 células \pm 121,0) em comparação aos embriões-controle (3.636,0 células \pm 246,9; $P = 0,000001$; $t = 10,05$) (Fig. 20D).



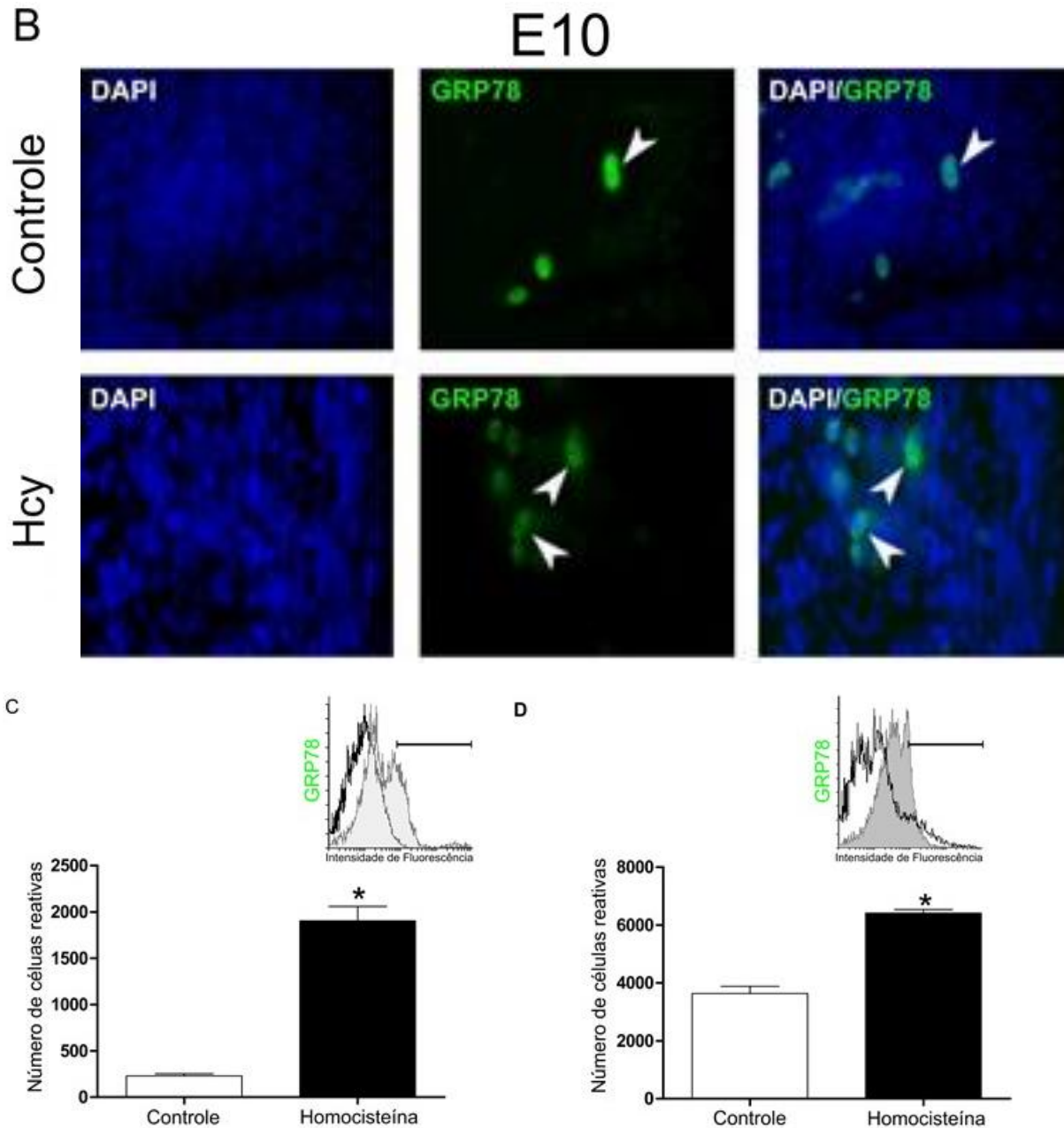


Figura 20: Imunolocalização e quantificação da proteína GRP78. As células imunorreativas (setas) foram reconhecidas em embriões tratados com Hcy e embriões-controle, em E6 (A) e E10 (B). Os gráficos (C, D) exibem a frequência relativa e a contagem absoluta de células GRP78-positivas, obtidas por citometria de fluxo ($n = 18$ embriões por tratamento). Barras de escala = 10 μm . Os dados são representados como a média \pm EPM, tendo sido utilizado o teste estatístico t Student para a comparação entre as médias. $*P = 0,000001$.

Em síntese, os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que elevados níveis de Hcy interferiram no processo de ossificação endocondral diminuindo os conteúdos das proteínas VEGF, VCAM-1, NOS3 envolvidas na formação de vasos sanguíneos, e no conteúdo da proteína OC responsável pela mineralização da matriz óssea (Fig. 20).

Nas células do mesênquima condensado, a Hcy teve como alvos as mitocôndrias e o RER. Nas mitocôndrias, Hcy promoveu danos ultraestruturais, alterando os mecanismos de fissão/fusão mitocondrial, bem como a permeabilidade das membranas mitocondriais pela diminuição dos conteúdos das proteínas Bak e Bcl2. Uma vez danificadas, as mitocôndrias foram eliminadas pelo

mecanismo de mitofagia, identificado pelo aumento de compartimentos acídicos e, principalmente pelo aumento dos conteúdos das proteínas PRK8, LC3II e p62. Além disso, elevados níveis de Hcy geraram estresse no RER, alterando a ultraestrutura e aumentando o conteúdo da proteína GRP78 (Fig. 21).

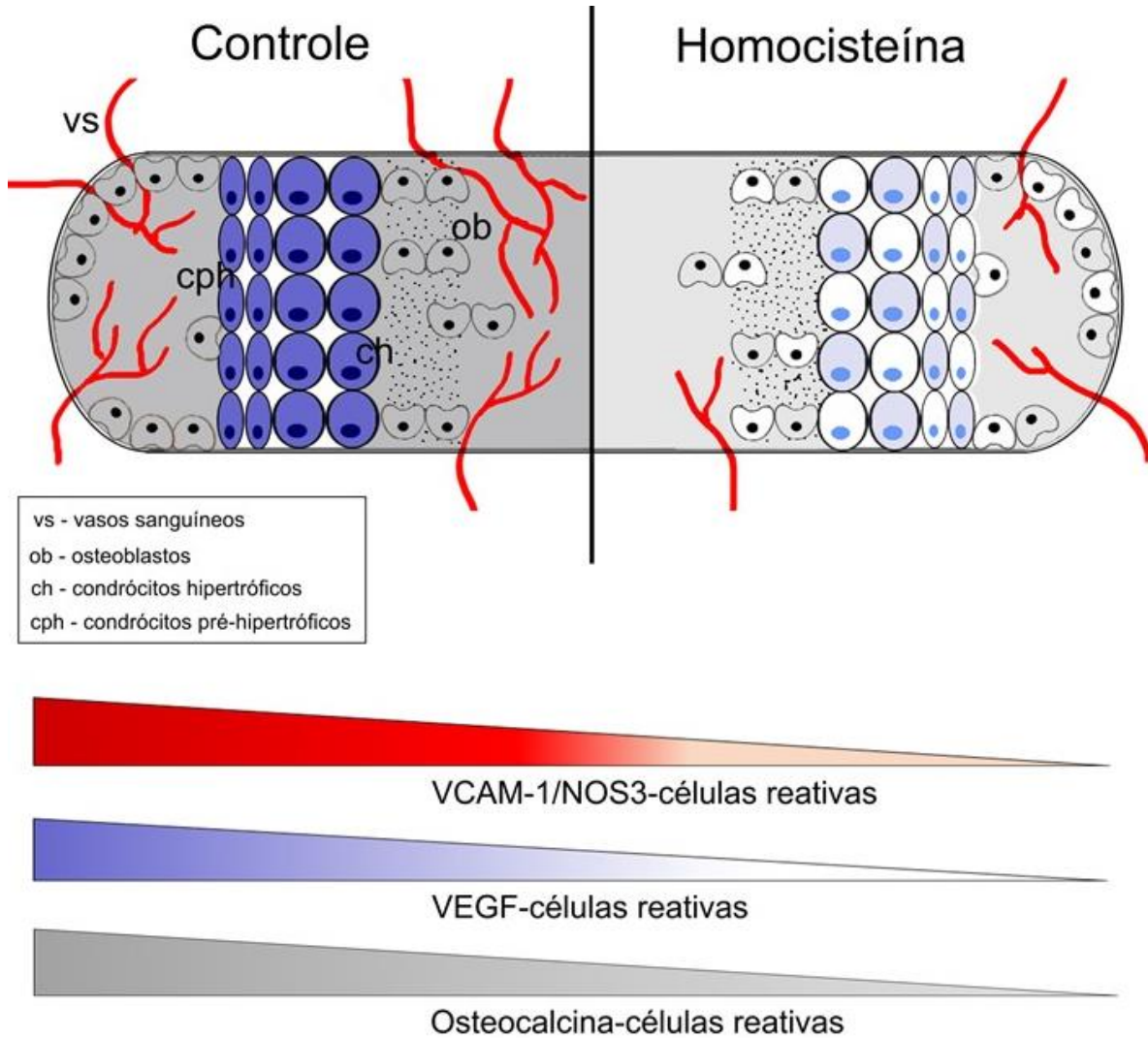


Figura 21: Efeito da Hcy nas proteínas envolvidas na formação de vasos sanguíneos e na mineralização da matriz durante a ossificação. Foi observada uma diminuição no conteúdo das proteínas VEGF, VCAM-1, NOS3 e osteocalcina (OC) na formação óssea durante o desenvolvimento dos membros. No entanto, não foram identificadas diferenças na área de ossificação dos membros dos embriões tratados com Hcy e dos embriões do grupo controle.

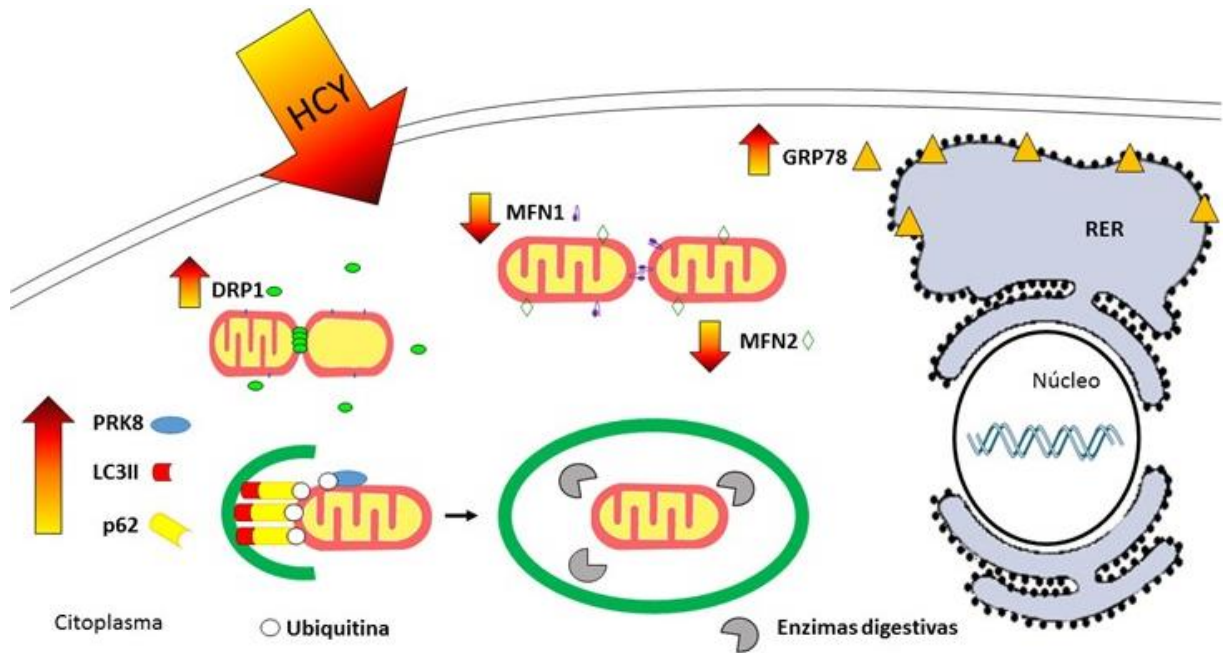


Figura 22: Efeito da Hcy nas proteínas envolvidas na mitofagia e no estresse do RER. Nos embriões tratados com Hcy, foi observada uma diminuição no conteúdo das proteínas MFN1/2 e um aumento na proteína DRP1, relacionadas com os mecanismos fusão e fissão mitocondrial, respectivamente. As proteínas PRK8, LC3II e p62 tiveram um aumento nos conteúdos após o tratamento com Hcy, indicando mitofagia. No RER, foi observado um aumento no conteúdo de GRP78, indicando estresse reticular gerado pela exposição a Hcy.

5 DISCUSSÃO

Durante o desenvolvimento de membros, desde a aquisição da informação posicional até a padronização nos três eixos (proximal-distal, ântero-posterior e dorsoventral), são requeridos conjuntos de sinalizações coordenadas entre células mesenquimais e células ectodérmicas (Gilbert, 2010; Hinchliffe, 2002; Tickle, 2004). Por isso, essas estruturas apresentam uma complexidade estrutural, onde as células do mesoderma formam arranjos espaciais ordenados de tecidos diferenciados. Além disso, em tetrápodes, os membros apresentam um padrão comum, em que a região do estilópode é constituída por um único elemento esquelético, o úmero (membro anterior) e fêmur (membro posterior); enquanto que a região do zeugópode é constituída por um ou mais elementos esqueléticos, o rádio e a ulna (membro anterior) e a tíbia e fíbula (membro posterior), que são altamente conservadas entre as espécies. Entretanto, a região do autópode contém elementos esqueléticos formadores dos dígitos, os quais podem variar em número nas diferentes espécies animais. Por todas essas características, os membros são considerados estruturas-modelo para estudos de embriotoxicidade e toxicidade celular (Hinchliffe, 2002).

Nosso estudo utilizou membros de embriões *G. domesticus* como modelo para investigar a toxicidade da Hcy na dinâmica molecular e celular da ossificação endocondral. *G. domesticus* foi empregado como modelo biológico principalmente pela facilidade de manipulação e por permitir o acompanhamento dos eventos do desenvolvimento. Além disso, os princípios que fundamentam o desenvolvimento dos membros em embriões de galinha podem ser aplicáveis a outros tetrápodes, inclusive humanos. Outro fator preponderante é que as sequências gênicas de *G. domesticus* são todas conhecidas, o que gera novas oportunidades de observação e manipulação dos membros nestes embriões (Tickle, 2004). As alterações na organização morfológica são facilmente reproduzíveis em embriões de galinha, porque os genes envolvidos na padronização dos membros são altamente conservados nos grupos animais (Hinchliffe, 2002).

Durante o desenvolvimento embrionário, a proliferação celular e a morte celular por apoptose são processos básicos que precisam ser controlados. O desenvolvimento de membros ilustra particularmente bem como a morfogênese depende do equilíbrio espacial e temporal entre os processos, como a apoptose e a proliferação celular (Fernandez-Teran et al., 2006). Tomando como base a importância da proliferação celular e da apoptose, nesta tese foi observado que o tratamento com Hcy não foi capaz de alterar os mecanismos de proliferação celular e apoptose, bem como a razão proliferação celular/apoptose, durante desenvolvimento de membros, em embriões de galinha em E6 e E10.

O padrão de proliferação celular é órgão-específico e dinâmico (Tickle, 2003). Durante o desenvolvimento dos membros, as sinalizações entre a zona de progressão, composta por células mesenquimais, e a crista ectodérmica apical mantém uma alta taxa de proliferação (Tickle e Munsterberg, 2001). Em embriões de galinha, a proliferação celular nos membros anteriores e posteriores se inicia em E4 ocorrendo uniformemente em toda a extensão do broto de membro

(Summerbell e Wolpert, 1972). Posteriormente, em E5, há um número grande de células em proliferação, para assegurar e promover o crescimento dos membros anteriores e posteriores. Essas células seguem em proliferação até E6 quando a proliferação celular progressivamente diminui proximamente, as células mesenquimais passam a se diferenciar e formar os moldes cartilagosos. A partir daí, após o crescimento e diferenciação das estruturas dos dígitos, o mecanismo de apoptose torna-se essencial para remoção do tecido interdigital (Fernandez-Teran et al., 2006; Hamburger e Hamilton, 1951).

Nesse estudo, a exposição a Hcy não alterou a proliferação celular durante o desenvolvimento de membros, em embriões de galinha em E6 e E10, mesmo que, em estudo anterior, durante o desenvolvimento de membros, já se tenha observado que a Hcy tem efeito sobre proteínas relacionadas ao ciclo celular, diminuindo o conteúdo do antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA) e das proteínas p21, ambas envolvidas na fase G1 da progressão do ciclo celular. Além disso, a Hcy aumenta o conteúdo da proteína p53, ativada por danos ao DNA. Deste modo, a Hcy altera a dinâmica das células mesenquimais porém, não altera as taxas de proliferação celular (Bourckhardt et al., 2015). Entretanto, quando se observou as células neurais, a Hcy interferiu na proliferação celular, e que esse efeito foi idade-dependente ao longo do desenvolvimento do sistema nervoso, sendo relacionado com a diminuição da diferenciação neuronal e o aparecimento de defeitos do tubo neural (DTN) (Kobus-Bianchini et al., 2017). Parece existir uma resposta diferencial da proliferação celular frente à exposição a Hcy. Padrões diferenciados dos conteúdos destas proteínas podem variar nas células mesenquimais, enquanto que as células que diferenciam para formação da coluna vertebral têm origem nos somitos, as que originam os elementos esqueléticos em membros têm origem do mesoderma lateral (LeClair, 1999).

Em conjunto com a proliferação celular, a apoptose também é um fator crucial responsável por determinar o tamanho e a forma dos membros. Geralmente, as áreas em que ocorre a apoptose, são importantes na determinação do número de dígitos. Eis o grande paradigma do desenvolvimento de membros, a separação dos dígitos, onde em diferentes espécies, diferentes padrões de apoptose podem ser relacionados com a variação no número de dígitos (Hinchliffe, 2002). Os dígitos diferenciam-se a partir do mesênquima onde as condensações pré-condrogênicas surgem como primeiro sinal de espessamento dos raios digitais separados pelo tecido interdigital, composto por células mesenquimais. Nos grupos animais em que há a individualização dos dígitos, esta ocorre progressivamente pela remoção do tecido interdigital por apoptose (Saunders et al., 1962; Hinchliffe, 1982).

Em embriões de galinha, a apoptose desempenha um papel importante para morfogênese de membros, principalmente na constituição dos dígitos nos membros anteriores e posteriores. A apoptose durante o desenvolvimento de membros tem início em E6-E7, nos espaços interdigitais separando os dígitos que compõem a asa e a pata. Posteriormente, em E7-E7,5, a apoptose atinge seu ápice, e os dígitos prosseguem o desenvolvimento (Fernandez-Teran et al., 2006).

Nesse estudo, a exposição a Hcy não alterou a apoptose durante desenvolvimento de membros, em embriões de galinha em E6 e E10, não comprometendo o equilíbrio entre proliferação/apoptose. Esse comportamento celular de equilíbrio também foi observado em células do músculo liso por Buemi et al (2001), que mesmo com a exposição a Hcy em concentrações de 10, 15, e 20 μM , foi mantido o equilíbrio proliferação/apoptose. Porém, foi observada redução nas taxas de apoptose nas células da crista neural em embriões de galinha (9-10HH) em que o tratamento com Hcy (30 $\mu\text{mol/L}$) diminuiu em 60% as taxas de apoptose (Boot et al., 2004).

O equilíbrio entre a proliferação celular e a apoptose durante o desenvolvimento normal de membros é essencial. Nesta tese, foi observado equilíbrio na razão proliferação/apoptose em embriões em E6 e E10. Deste modo, observou-se que a Hcy não interferiu no processo desenvolvimento normal dos membros anteriores e posteriores e dos lados esquerdo e direito.

Uma vez que não foram observadas alterações no equilíbrio proliferação/apoptose, neste estudo demonstrou-se que a Hcy está associada a uma redução no conteúdo das proteínas envolvidas na formação de vasos sanguíneos e na mineralização óssea. As alterações o conteúdo protéica não foram acompanhadas por alterações na área de ossificação, ou alterações na espessura dos moldes cartilagosos em embriões E6 e em elementos ósseos em embriões E10.

Evidenciamos que a Hcy promoveu uma redução no conteúdo das proteínas VEGF, VCAM-1 e NOS3, necessárias para a formação e manutenção da integridade dos vasos sanguíneos em embriões E6 e E10. Essa redução no conteúdo desses fatores vasculogênicos parece não se modificar ao longo do tempo de desenvolvimento, uma vez que esses efeitos foram observados em estágios mais iniciais, quando os moldes cartilagosos estão se formando (E6), e em estágios mais tardios onde a mineralização da matriz óssea está ocorrendo (E10). Esse efeito temporal de redução no conteúdo das moléculas de VEGF, VCAM-1 e NOS3 promovido pela Hcy, pode ter consequências no desenvolvimento ósseo, uma vez que os vasos sanguíneos desempenham papel regulador do crescimento, diferenciação, modelagem, homeostase e morfogênese do tecido ósseo em desenvolvimento (Cleaver e Dor, 2012; Lazarus et al., 2011).

De um modo geral, existe uma correlação entre formação de vasos sanguíneos e a ossificação durante o desenvolvimento, e mudanças nos padrões vasculares podem resultar em alterações na morfogênese óssea (Zelzer et al., 2002). A ingressão dos vasos sanguíneos nos moldes cartilagosos é essencial para o direcionamento da deposição mineral durante o desenvolvimento ósseo. Esse fato ocorre porque associados aos vasos sanguíneos encontram-se osteoblastos e fibras de colágeno tipo I, e à medida que os vasos ingressam nos moldes cartilagosos, os osteoblastos passam a secretar fatores que permitem a mineralização (Ben Shoham et al., 2016; Ramasamy et al., 2014).

A redução no conteúdo de VEGF está associada a uma redução na rede de vasos sanguíneos, promovendo atraso da invasão capilar nos moldes de cartilagem, comprometendo os primeiros passos da ossificação endocondral (Maes, 2013). Em contrapartida, a superexpressão dessa molécula resulta em aumento da massa óssea (Maes et al., 2010). Essa invasão dos vasos

sanguíneos aos moldes cartilagosos, está associada à expressão de *VEGF* em condrócitos e a ligação com os receptores (VEGFR) nas células endoteliais do pericôndrio. Neste caso, a expressão de *VEGF* é essencial para a diferenciação e funcionalidade de condrócitos hipertróficos, osteoblastos, células endoteliais e osteoclastos (Zelzer et al., 2001).

O padrão de resposta da expressão de *VEGF* a Hcy pode variar de acordo com o tipo de tecido. Em células HUVEC (do inglês *Human umbilical vein endothelial cells*) e em vasos subintestinais de embriões de peixe-zebra, a Hcy diminuiu o número de células, a viabilidade celular, e induziu uma parada do ciclo celular em G1/S, resultando na diminuição de vasos sanguíneos. Essas alterações ocorreram devido à redução nos níveis de mRNA de *VEGF*, *VEGFR-1*, *VEGFR-2*, e à redução dos níveis proteicos de VEGF, ERK1/2 e Akt (Xu et al., 2017; Xu, 2016; Zhang et al., 2012).

Estudos com embriões de galinha demonstraram que a Hcy reduz significativamente a vascularização extra-embriônica, principalmente por reduzir a expressão de mRNA de *VEGF* (Latacha e Rosenquist, 2005; Oosterbaan et al., 2012). No entanto, o efeito da Hcy sobre a vascularização intra-embriônica é pouco explorado, e não há estudos que abordem os efeitos da toxicidade da Hcy sobre os vasos sanguíneos necessários para a ossificação endocondral dos membros. Nossos resultados demonstram que Hcy compromete o produto gênico de VEGF, reduzindo o recrutamento das células endoteliais para o ambiente de ossificação, observado pela redução da proteína NOS3, utilizada neste estudo como um marcador endotelial.

A NOS3 é uma molécula expressa principalmente em células endoteliais e sua atividade enzimática é regulada por Cálcio calmodulina quinase. A NOS3 sintetiza o ON de forma pulsátil, de modo que a sua atividade aumenta à medida que os níveis intracelulares de Ca^{2+} aumentam (Förstermann, 2000; Förstermann et al., 1994; Hemmens e Mayer, 1998).

ON pode modular concentrações plasmáticas de Hcy, atuando diretamente no metabolismo de Hcy. ON pode atuar na via de remetilização, e inibir a atividade enzimática da enzima metionina sintetase (Danishpajoo et al., 2001; Xu, 2016). Alternativamente, o ON pode modular indiretamente as concentrações de Hcy via metabolismo do folato, inibindo a síntese de ferritina, uma proteína que promove a oxidação e clivagem irreversível do folato (Juckett et al., 1996; Suh et al., 2000).

Determinantes genéticos de HHcy podem incluir polimorfismos funcionais em vários níveis metabólicos de folato/Hcy. Em humanos, o polimorfismo NOS3 G894T está associado com concentrações plasmáticas elevadas de Hcy e com baixas concentrações de folato (Brown et al., 2003; Guidi et al., 2005; Matsha et al., 2016; Shaw et al., 2005).

Em nosso estudo, a Hcy promoveu uma redução no conteúdo de NOS3. Assim, parece que existe uma relação de controle nos níveis de Hcy e NOS3 mútua, onde, algumas vezes o produto da atividade enzimática de NOS3 interfere no metabolismo da Hcy, e em outras vezes a Hcy interfere no conteúdo de NOS3. Porém, são necessárias mais pesquisas para entender esses

mecanismos, uma vez que neste estudo, NOS3 foi utilizada como marcador endotelial por ser uma molécula característica de células endoteliais.

Nesta tese, a proteína VCAM-1 foi utilizada para avaliar a integridade dos vasos sanguíneos no processo de ossificação durante o desenvolvimento dos membros. Poucos estudos, com enfoques diversificados, têm relatado os efeitos de Hcy sobre moléculas de adesão celular na formação de vasos sanguíneos. Em monócitos de camundongos, após o tratamento com Hcy a 20 μ M, foi observado um aumento no conteúdo da molécula de VCAM-1 (Hohsfield e Humpel, 2010). Do contrário, em microglia de ratos expostos a Hcy a 100 μ M, foi observada uma redução no conteúdo de VCAM-1 (Lin et al., 2007). Em nosso estudo, quando expostos a Hcy a 400 μ M, a molécula de VCAM-1 dos embriões de galinha teve seu conteúdo reduzido temporalmente, tanto em E6 quanto em E10. Portanto, parece que as respostas celulares após o tratamento com Hcy dessa molécula de adesão são variáveis, apresentando um padrão dose-dependente inverso.

Essa variedade de respostas de VCAM-1 pode estar relacionada às diferentes funções desempenhadas nos organismos, como por exemplo, a relação de VCAM-1 em resposta aos processos inflamatórios. No caso dos camundongos, o aumento no conteúdo de VCAM-1 pode ser decorrente do potencial da Hcy em desencadear a resposta inflamatória nesta espécie (Hohsfield e Humpel, 2010; Ley et al., 2007; Li et al., 2015; Tian et al., 2016). Esse aumento do conteúdo de VCAM-1 em respostas inflamatórias nos condrócitos, desencadeadas por elevados níveis de Hcy, pode implicar em alterações na ossificação, onde a mineralização da matriz óssea foi prejudicada em decorrência da desorganização da matriz de colágeno (Grogan et al., 2009; Khan et al., 2001). Entretanto, nossos dados sugerem que o comportamento de VCAM-1, observado durante o desenvolvimento ósseo em embriões de galinha frente ao tratamento com Hcy, parece não ser uma resposta relacionada aos processos inflamatórios, uma vez que essa molécula tem seu conteúdo reduzido.

Níveis elevados de Hcy podem induzir alterações na formação de vasos sanguíneos e, conseqüentemente, interferir com os passos subsequentes da ossificação endocondral. Durante a condrogênese, nos estágios iniciais a Hcy é capaz de induzir respostas diferenciais nos fatores de transcrição envolvidos na diferenciação celular. No desenvolvimento de membros, Hcy induziu um aumento principalmente das proteínas Pax9 e Sox9, envolvidas na diferenciação das células mesenquimais a condrócitos (Bourckhardt et al., 2015). Além disso, após exposição a elevados níveis de Hcy (20 μ mol), que se compara a concentração usada nesta tese, em células do mesênquima axial de embriões da galinha, durante o desenvolvimento das vértebras, Hcy induziu uma redução da expressão de Pax1, Pax9 e Sox9 (Kobus et al., 2013).

A ingressão dos vasos sanguíneos nos moldes cartilagosos é essencial para o direcionamento da deposição mineral, realizada pelos osteoblastos aderidos à superfície dos vasos, durante o desenvolvimento ósseo (Ben Shoham et al., 2016). A mineralização é realizada pela OC que aparece transientemente no osso em formação no momento da deposição mineral,

quando a molécula liga-se à hidroxiapatita na matriz óssea de maneira cálcio-dependente (Karaöz et al., 2011). Foi observada uma redução no conteúdo de OC após exposição a Hcy em linhagens celulares MC3T3 obtidas de camundongos recém-nascidos (Sakamoto et al., 2005). No entanto, após exposição à Hcy, em osteoblastos obtidos de cultura celular de osso trabecular humano, a proteína OC não foi alterada (Herrmann et al., 2008). Nesse sentido, o efeito da Hcy pode ser considerado idade-dependente, sendo os embriões mais suscetíveis ao tratamento Hcy, do que o tecido ósseo adulto. Nosso estudo demonstrou que o tratamento com Hcy promoveu uma redução no conteúdo de OC, confirmando o fato dos embriões serem mais suscetíveis, porém ainda assim, não houve comprometimentos para o processo de ossificação durante o desenvolvimento de membros em embriões de galinha.

Durante a ossificação endocondral, os efeitos da Hcy não são restritos à formação de vasos sanguíneos e à mineralização da matriz óssea. A Hcy também pode interferir nas células do mesênquima condensado. Neste estudo, também demonstramos o potencial citotóxico de Hcy em células mesenquimais durante o processo de ossificação em membros de embriões de galinha em E6 e E10. Onde, a Hcy afeta dois alvos potenciais: as mitocôndrias e o RER.

Em homeostase, ciclos contínuos de fissão e fusão mitocondrial ocorrem nas células. A proteína DRP1 está envolvida na fissão mitocondrial, enquanto MFN1/2 e Opa1 controlam a fusão mitocondrial. Esses mecanismos são essenciais para reparar danos mitocondriais em condições de estresse celular e para manter a população mitocondrial funcionalmente homogênea (Chen et al., 2003). Em nosso estudo, o efeito do tempo foi crucial para que esses mecanismos ocorressem e reestabelecessem a integridade mitocondrial. Os danos às mitocôndrias em embriões E6 tratados com Hcy, foram suficientes para aumentar o conteúdo da proteína DRP1 envolvida no processo de fissão, e diminuir os conteúdos das proteínas MFN1/2 envolvidas no processo de fusão mitocondrial. Já em E10, por se tratar de um estágio posterior, os conteúdos das proteínas DRP1 e MFN1 não foi alterada, e em conjunto com aumento do conteúdo de MFN2, podemos sugerir que os mecanismos de fissão/fusão mitocondrial foram essenciais na remoção de danos mitocondriais ao longo do processo de ossificação.

A Hcy é conhecida por causar disfunções mitocondriais que podem levar às respostas celulares como a apoptose. Essas condições estão relacionadas à patogênese de muitas doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson (Barbosa et al., 2015; Cho et al., 2010; Clement et al., 2009; Mammucari e Rizzuto, 2010; Tu et al., 2010; Turgut et al., 2010; Zhuo e Pratico, 2010). Entretanto, o efeito da Hcy nas mitocôndrias no processo de ossificação endocondral durante o desenvolvimento embrionário, tem sido pouco estudado. Nesta tese, nossos resultados demonstram que Hcy induziu um aumento no conteúdo da proteína DRP-1 e uma diminuição no conteúdo das proteínas MFN1/2, associado as mudanças ultraestruturais nas mitocôndrias dos embriões tratados com Hcy.

O desequilíbrio fissão/fusão mitocondrial constitui um mecanismo de citotoxicidade de Hcy. Em tecidos adultos, níveis elevados de Hcy (50 μ M) induziram perda de células ganglionares da

retina em camundongos, principalmente por causar aumento dos conteúdos de Opa1 e Fis1, proteínas igualmente envolvidas nos processos de fusão e fissão mitocondrial. Além disso, em células endoteliais, Hcy foi capaz de aumentar a fissão mitocondrial, levando ao desequilíbrio na relação MFN-2/DRP-1, promovendo alterações nas células endoteliais e na deposição de colágeno na artéria mesentérica (Familtseva et al., 2014; Ganapathy et al., 2011).

MFN-2 pode ser relacionado com a manutenção do DNA mitocondrial, bem como com a cadeia respiratória. A redução do conteúdo de MFN-2 pode gerar fragmentação da estrutura mitocondrial dificultando o reparo aos danos no DNA mitocondrial (Rouzier et al., 2012). A alteração dos conteúdos das proteínas de fusão/fissão mitocondrial, juntamente com alterações no potencial de membrana, danos ao DNA e a fragmentação da estrutura mitocondrial indicam que a condição de HHcy tem um impacto importante nas funções mitocondriais (Kumar et al., 2011).

Os processos de fissão e fusão mitocondrial podem ser alterados quando expostos a agentes teratogênicos ou em estados patológicos (Detmer e Chan, 2007; Suen et al., 2008; Szabadkai et al., 2006). Quando em condições de danos mitocondriais, a fissão mitocondrial é importante para a remodelação da matriz mitocondrial e segregação de porções mitocondriais alteradas, posteriormente degradadas por mitofagia, um mecanismo intrínseco de sequestro seletivo e fragmentação de mitocôndrias danificadas (Givvimani et al., 2014).

Nosso estudo demonstrou que a Hcy, em embriões em E6, foi capaz de induzir a mitofagia, reconhecida pelo aumento dos conteúdos das proteínas PRK8, LC3II e p62. Essa indução não foi reconhecida no estágio mais tardio da ossificação, nos embriões em E10. Isso pode sugerir que uma vez que a Hcy induz danos mitocondriais, esses são reparados via mitofagia, e as células recuperadas seguem em frente no processo de ossificação endocondral. No entanto, existem poucos estudos que nos fornecem evidências para elucidar os mecanismos de respostas mitocondriais específicas para a condição de HHcy.

Sugerimos que o mecanismo de mitofagia desencadeado pela exposição a Hcy seja mediado por PRK8. PRK8 é uma ubiquitina-ligase normalmente dispersa no citosol, que se transloca para mitocôndria despolarizada e inicia a sua degradação por mitofagia (Narendra et al., 2008; Yin e Ding, 2013; Youle e Narendra, 2011). Em células β -pancreáticas de camundongos, o conteúdo de PRK8 foi aumentada em condições mitocondriais com consumo reduzido de oxigênio e baixas concentrações de ATP (Geisler et al., 2014). Uma vez que PRK8 é recrutada para mitocôndria alterada, ocorre a ubiquitinação que permite a ligação com a proteína adaptadora de autofagia seletiva p62, que tem como função permitir a ligação com a proteína LC3II da membrana do autofagossomo (Ding et al., 2010; Geisler et al., 2010; Huang et al., 2011; Manley et al., 2013).

Há poucas evidências sobre o mecanismo de mitofagia desencadeado pela exposição a Hcy. Já foi observado em cardiomiócitos de camundongos neonatais que a Hcy aumenta o estresse nitrosativo mitocondrial, gerando um estímulo à mitofagia, aumentando a incidência de

cardiomiopatias e insuficiência cardíaca (Tyagi et al., 2010; Vacek et al., 2012). Em células endoteliais do cérebro de camundongos, a exposição à Hcy (100 μ M) gerou uma disfunção endotelial pela produção de espécies reativas de oxigênio, comprometendo a função mitocondrial, levando a uma resposta por mitofagia (Kamat et al., 2015). Além disso, em ratos, a administração de Hcy aumentou a mitofagia em neurônios, o que contribui para a morte celular após isquemia cerebral. Nesse caso, a mitofagia mediada por danos oxidativos foi um mecanismo molecular subjacente à toxicidade das células neuronais em condições de níveis elevados de Hcy (Zhao et al., 2016). Embora esses estudos descrevam o potencial da Hcy em induzir mitofagia, os modelos biológicos em questão tratam-se de mamíferos. Além disso, o mecanismo pelo qual a mitofagia ocorreu não foi claramente descrito. Nesta tese, utilizando embriões de galinha como modelo biológico, o mecanismo de mitofagia foi analisado em resposta à citotoxicidade da Hcy durante o processo de ossificação pela primeira vez.

Outro alvo potencial para o efeito da Hcy é o RER. Em embriões em E6, a Hcy promoveu a diminuição no número de cisternas do RER. Além disso, Hcy induziu estresse no RER, reconhecido pelo aumento do conteúdo da proteína GRP78 e pelo aumento na área das cisternas causada por dilatações no lúmen do RER dos embriões em E6 e E10, provavelmente associado ao acúmulo de proteínas mal dobradas. Nesses casos durante o desenvolvimento quando o estresse ao RER não é resolvido, pode haver degradação das cisternas, assim a célula responde de modo a manter o conteúdo da proteína GRP78 até que o RER seja reparado e as proteínas voltem a ser sintetizadas (Veeranki e Tyagi, 2013). Parece que durante o processo de ossificação, durante o espaço de tempo analisado, as células mesenquimais dos embriões E6 e E10 responderam mantendo o conteúdo de GRP78 aumentado, de modo a reparar os danos causados pela Hcy às cisternas do RER.

O RER desempenha um papel fundamental no dobramento adequado das proteínas. Qualquer processo que interfira com a função do RER resulta em alterações no dobramento das proteínas e, por consequência gera estresse ao RER. Nesses casos, o aumento no conteúdo da chaperona GRP78, é induzida para restaurar a função do RER. Quando a condição de estresse não é resolvida, a degradação associada ao RER é ativada (Feng et al., 2016). Em hepatócitos, a condição de HHcy promoveu um aumento no conteúdo de GRP78, demonstrando assim um papel direto da ativação do estresse de RER pela Hcy. Diretamente, isto desregula a síntese de colesterol/triglicerídeos, além de levar à parada do ciclo celular, ou apoptose. No entanto, o mecanismo preciso de ativação dessas respostas celulares não é totalmente compreendido (Werstuck et al., 2001; Yu et al., 2013).

Nos casos de degradação das cisternas do RER em que não há o reparo, pode haver um acúmulo de proteínas mal dobradas, o que as tornam citotóxicas, comprometendo a função celular. Sendo assim, o estresse ao RER é importante na manutenção da integridade fisiológica das células (Deldicque et al., 2012; Rayavarapu et al., 2012).

As respostas geradas pelo estresse no RER variam de acordo com o tipo e a origem celular, exibindo uma ampla gama de sensibilidade a Hcy (Outinen et al., 1999; Zhang et al., 2001; Zou e Banerjee, 2005). Hcy pode causar estresse no RER interrompendo a formação de ligações dissulfeto e ativando a resposta de proteína desdobrada. Em cultura celular, quando as HUVECs são expostas a níveis elevados de Hcy, há um aumento dos conteúdos de proteínas de resposta ao estresse do RER, entre elas a proteína GRP78 (Kokame et al., 1996). De um modo geral, a Hcy pode gerar estresse no RER por homocisteinilação, ou seja, pela modificação da estrutura da proteína, no caso do RER a GRP78 (Glushchenko e Jacobsen, 2007). Nesta tese, sugere-se que Hcy induziu o estresse pela homocisteinilação de GRP78, uma vez que seu conteúdo encontrou-se aumentado em embriões em E6 e em E10.

A relação entre a exposição de Hcy e os mecanismos de resposta celular durante o desenvolvimento do membro permanece pouco esclarecida. Nesse estudo, demonstramos que Hcy promoveu um desequilíbrio nos conteúdos de proteínas necessárias para mecanismos mitocondriais de fissão e fusão, bem como manutenção e controle de qualidade de mitocôndrias via mitofagia. Além disso, Hcy ainda teve como alvo de toxicidade o RER, onde foi capaz de gerar estresse, reconhecido pelo aumento do conteúdo da proteína GRP78.

De acordo com Škovierová et al. (2016), a toxicidade celular da Hcy pode ser induzida por três diferentes formas: (i) por indução de estresse oxidativo; (ii) por excitotoxicidade, isto é, a Hcy como uma neurotoxina; e (iii) por homocisteinilação, isto é, por modificações na estrutura, e por consequência no conteúdo das proteínas. Neste estudo, demonstramos que durante o processo de ossificação endocondral em membros de embriões de galinha em E6 e E10, a homocisteinilação parece ser o modo pelo qual a Hcy induziu a toxicidade. As alterações no conteúdo das proteínas ora relacionavam-se às células em processo de diferenciação para formação do molde cartilaginoso, e ora relacionavam-se às células do mesênquima condensado em torno do molde cartilaginoso e do osso em formação. O efeito do tempo do desenvolvimento foi determinante nas respostas celulares em condição de HHcy. Nas etapas iniciais do processo de ossificação endocondral, a Hcy interferiu na formação de vasos sanguíneos no molde cartilaginoso e na matriz óssea. Esse efeito inicial, comprometeu a mineralização da matriz óssea em etapa posterior do processo de ossificação. Do mesmo modo, nas células mesenquimais, ao longo do desenvolvimento a Hcy desencadeou outros mecanismos de respostas envolvidos na sobrevivência celular, como a mitofagia e o estresse no RER.

6 CONCLUSÕES

Os dados obtidos nesta tese permitem concluir que a exposição à Hcy (20 μmol) induziram alterações na formação de vasos sanguíneos. Esses efeitos comprometeram a cascata sucessiva de eventos da ossificação endocondral, sobretudo na mineralização da matriz óssea.

Além disso, em condições de HHcy houve alterações nas células mesenquimais, sendo os principais alvos as mitocôndrias e o RER. Nas mitocôndrias, a Hcy gerou danos às cristas mitocondriais, concomitante ao aumento no conteúdo de proteínas DRP1, PRK8, LC3II e p62 envolvidas nos mecanismos de fissão mitocondrial e mitofagia. No RER, a Hcy induziu estresse pelo aumento no conteúdo de GRP78.

Embora a Hcy tenha causado alterações celulares, essas mudanças não foram acompanhadas por alterações morfológicas externas no osso em desenvolvimento. Estes resultados fornecem novos conhecimentos para melhor compreender as bases celulares da toxicidade de Hcy.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams JM, Cory S (2007) The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26:1324-1337
- Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM, Dimmeler S (2003) Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nature medicine* 9:1370-1376
- Alheid U, Frolich JC, Forstermann U (1987) Endothelium-derived relaxing factor from cultured human endothelial cells inhibits aggregation of human platelets. *Thrombosis research* 47:561-571
- Ambler CA, Nowicki JL, Burke AC, Bautch VL (2001) Assembly of trunk and limb blood vessels involves extensive migration and vasculogenesis of somite-derived angioblasts. *Developmental biology* 234:352-364
- Ashkenazi A (2008) Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine & growth factor reviews* 19:325-331
- Baggott JE, Tamura T (2015) Homocysteine, iron and cardiovascular disease: a hypothesis. *Nutrients* 7:1108-1118
- Barbosa DJ, Capela JP, Feio-Azevedo R, Teixeira-Gomes A, Bastos MdL, Carvalho F (2015) Mitochondria: key players in the neurotoxic effects of amphetamines. *Archives of toxicology* 89:1695-1725
- Ben Shoham A, Rot C, Stern T, Krief S, Akiva A, Dadosh T, Sabany H, Lu Y, Kadler KE, Zelzer E (2016) Deposition of collagen type I onto skeletal endothelium reveals a new role for blood vessels in regulating bone morphology. *143:3933-3943*
- Bonucci E (1971) The locus of initial calcification in cartilage and bone. *Clinical orthopaedics and related research* 78:108-139
- Boot MJ, Steegers-Theunissen RP, Poelmann RE, van Iperen L, Gittenberger-de Groot AC (2004) Homocysteine induces endothelial cell detachment and vessel wall thickening during chick embryonic development. *Circulation research* 94:542-549
- Booth SL, Centi A, Smith SR, Gundberg C (2013) The role of osteocalcin in human glucose metabolism: marker or mediator? *Nature reviews Endocrinology* 9:43-55
- Bourckhardt GF, Cecchini MS, Ammar D, Kobus-Bianchini K, Muller YM, Nazari EM (2015) Effects of homocysteine on mesenchymal cell proliferation and differentiation during chondrogenesis on limb development. *Journal of applied toxicology : JAT* 35:1390-1397
- Braun M, Pietsch P, Schror K, Baumann G, Felix SB (1999) Cellular adhesion molecules on vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular research* 41:395-401
- Brown KS, Kluijtmans LA, Young IS, Woodside J, Yarnell JW, McMaster D, Murray L, Evans AE, Boreham CA, McNulty H, Strain JJ, Mitchell LE, Whitehead AS (2003) Genetic evidence that nitric oxide modulates homocysteine: the NOS3 894TT genotype is a risk factor for hyperhomocystenemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23:1014-1020
- Brown LF, Detmar M, Claffey K, Nagy JA, Feng D, Dvorak AM, Dvorak HF (1997) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *Exs* 79:233-269

- Brune B, Dimmeler S, Molina y Vedia L, Lapetina EG (1994) Nitric oxide: a signal for ADP-ribosylation of proteins. *Life sciences* 54:61-70
- Buemi M, Marino D, Di Pasquale G, Floccari F, Ruello A, Aloisi C, Corica F, Senatore M, Romeo A, Frisina N (2001) Effects of homocysteine on proliferation, necrosis, and apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture and influence of folic acid. *Thrombosis research* 104:207-213
- Busse R, Luckhoff A, Bassenge E (1987) Endothelium-derived relaxant factor inhibits platelet activation. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 336:566-571
- Caplan AI (1985) The vasculature and limb development. *Cell differentiation* 16:1-11
- Carson NAJ, Neill DW (1962) Metabolic Abnormalities Detected in a Survey of Mentally Backward Individuals in Northern Ireland. *Archives of disease in childhood* 37:505-513
- Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC (2003) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *The Journal of cell biology* 160:189-200
- Chim SM, Tickner J, Chow ST, Kuek V, Guo B, Zhang G, Rosen V, Erber W, Xu J (2013) Angiogenic factors in bone local environment. *Cytokine & growth factor reviews* 24:297-310
- Cho DH, Nakamura T, Lipton SA (2010) Mitochondrial dynamics in cell death and neurodegeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67:3435-3447
- Christ B, Brand-Saberi B (2002) Limb muscle development. *The International journal of developmental biology* 46:905-914
- Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B (2003) Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 193:3-34
- Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, Graham I (1991) Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *The New England journal of medicine* 324:1149-1155
- Cleaver O, Dor Y (2012) Vascular instruction of pancreas development. *Development* 139:2833-2843
- Cleaver O, Melton DA (2003) Endothelial signaling during development. *Nature medicine* 9:661-668
- Clement CI, Goldberg I, Healey PR, Graham SL (2009) Plasma homocysteine, MTHFR gene mutation, and open-angle glaucoma. *Journal of Glaucoma* 18:73-78
- Cohn MJ, Izpisua-Belmonte JC, Abud H, Heath JK, Tickle C (1995) Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos. *Cell* 80:739-746
- Cook-Mills JM, Marchese ME, Abdala-Valencia H (2011) Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxidants & redox signaling* 15:1607-1638
- Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J (2005) Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature* 438:937-945
- Czeizel AE (2009) Periconceptional folic acid and multivitamin supplementation for the prevention of neural tube defects and other congenital abnormalities. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 85:260-268

- Czeizel AE (2011) Periconceptional folic acid-containing multivitamin supplementation for the prevention of neural tube defects and cardiovascular malformations. *Annals of nutrition & metabolism* 59:38-40
- Danishpajooch IO, Gudi T, Chen Y, Kharitonov VG, Sharma VS, Boss GR (2001) Nitric oxide inhibits methionine synthase activity in vivo and disrupts carbon flow through the folate pathway. *The Journal of biological chemistry* 276:27296-27303
- Darendelioglu E, Aykutoglu G, Tartik M, Baydas G (2016) Turkish propolis protects human endothelial cells in vitro from homocysteine-induced apoptosis. *Acta histochemica*
- Dean W, Lucifero D, Santos F (2005) DNA methylation in mammalian development and disease. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 75:98-111
- Deldicque L, Hespel P, Francaux M (2012) Endoplasmic reticulum stress in skeletal muscle: origin and metabolic consequences. *Exercise and sport sciences reviews* 40:43-49
- Detmer SA, Chan DC (2007) Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nature reviews Molecular cell biology* 8:870-879
- Ding WX, Ni HM, Li M, Liao Y, Chen X, Stolz DB, Dorn GW, 2nd, Yin XM (2010) Nix is critical to two distinct phases of mitophagy, reactive oxygen species-mediated autophagy induction and Parkin-ubiquitin-p62-mediated mitochondrial priming. *The Journal of biological chemistry* 285:27879-27890
- Drake CJ, LaRue A, Ferrara N, Little CD (2000) VEGF Regulates Cell Behavior during Vasculogenesis. *Developmental biology* 224:178-188
- Dranka BP, Hill BG, Darley-Usmar VM (2010) Mitochondrial reserve capacity in endothelial cells: The impact of nitric oxide and reactive oxygen species. *Free radical biology & medicine* 48:905-914
- Eshkar-Oren I, Viukov SV, Salameh S, Krief S, Oh CD, Akiyama H, Gerber HP, Ferrara N, Zelzer E (2009) The forming limb skeleton serves as a signaling center for limb vasculature patterning via regulation of Vegf. *Development (Cambridge, England)* 136:1263-1272
- Eskes TK (1997) Folates and the fetus. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology* 71:105-111
- Familtseva A, Kalani A, Chaturvedi P, Tyagi N, Metreveli N, Tyagi SC (2014) Mitochondrial mitophagy in mesenteric artery remodeling in hyperhomocysteinemia. *Physiological reports* 2:e00283
- Familtseva A, Kalani A, Chaturvedi P, Tyagi N, Metreveli N, Tyagi SC (2014) Mitochondrial mitophagy in mesenteric artery remodeling in hyperhomocysteinemia. *Physiological Reports* 2
- Feinberg RN, Latker CH, Beebe DC (1986) Localized vascular regression during limb morphogenesis in the chicken embryo. I. Spatial and temporal changes in the vascular pattern. *The Anatomical record* 214:405-409
- Fenech M, Aitken C, Rinaldi J (1998) Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage in young Australian adults. *Carcinogenesis* 19:1163-1171
- Feng J, Lü S, Ding Y, Zheng M, Wang X (2016) Homocysteine activates T cells by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria coupling and increasing mitochondrial respiration. *Protein & Cell* 7:391-402

- Fernandez-Teran MA, Hinchliffe JR, Ros MA (2006) Birth and death of cells in limb development: a mapping study. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 235:2521-2537
- Ferrara N, Henzel WJ (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 161:851-858
- Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P (2008) Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:5266-5270
- Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Del Fattore A, DePinho RA, Teti A, Ducy P, Karsenty G (2010) Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell* 142:296-308
- Förstermann U (2000) Regulation of Nitric Oxide Synthase Expression and Activity. In: Mayer B (ed) Nitric Oxide. *Springer Berlin Heidelberg*, Berlin, Heidelberg, pp 71-91
- Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H (1994) Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23:1121-1131
- Forstermann U, Mulsch A, Bohme E, Busse R (1986) Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. *Circulation research* 58:531-538
- Forstermann U, Sessa WC (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal* 33:829-837, 837a-837d
- Fraser BA, Travill AA (1978) The relation of aberrant vasculogenesis to skeletal malformation in the hamster fetus. *Anatomy and Embryology* 154:111-120
- Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A (2010) Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int J Cell Biol* 2010:214074
- Fulzele K, Riddle RC, DiGirolamo DJ, Cao X, Wan C, Chen D, Faugere MC, Aja S, Hussain MA, Bruning JC, Clemens TL (2010) Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. *Cell* 142:309-319
- Galluzzi L, Kepp O, Trojel-Hansen C, Kroemer G (2012) Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circulation research* 111:1198-1207
- Ganapathy PS, Perry RL, Tawfik A, Smith RM, Perry E, Roon P, Bozard BR, Ha Y, Smith SB (2011) Homocysteine-Mediated Modulation of Mitochondrial Dynamics in Retinal Ganglion Cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 52:5551-5558
- Ganguly P, Alam SF (2015) Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutrition Journal* 14:1-10
- Geisler S, Holmstrom KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ, Springer W (2010) PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nature cell biology* 12:119-131
- Geisler S, Vollmer S, Golombek S, Kahle PJ (2014) The ubiquitin-conjugating enzymes UBE2N, UBE2L3 and UBE2D2/3 are essential for Parkin-dependent mitophagy. *Journal of cell science* 127:3280-3293

- Gilbert SF (2010) *Developmental biology*. Sinauer Associates, Sunderland
- Givvimani S, Munjal C, Narayanan N, Aqil F, Tyagi G, Metreveli N, Tyagi SC (2012) Hyperhomocysteinemia decreases intestinal motility leading to constipation. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 303:G281-290
- Givvimani S, Pushpakumar S, Veeranki S, Tyagi SC (2014) Dysregulation of Mfn2 and Drp-1 proteins in heart failure. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 92:583-591
- Glushchenko AV, Jacobsen DW (2007) Molecular targeting of proteins by L-homocysteine: mechanistic implications for vascular disease. *Antioxidants & redox signaling* 9:1883-1898
- Goh YI, Bollano E, Einarson TR, Koren G (2006) Prenatal multivitamin supplementation and rates of congenital anomalies: a meta-analysis. *Journal of Obstetrics and Gynaecology* 28:680-689
- Greenspan JS, Blackwood HJJ (1966) Histochemical Studies of Chondrocyte Function in the Cartilage of the Mandibular Condyle of the Rat. In: Fleisch H, Blackwood HJJ, Owen M (eds) *Calcified Tissues 1965: Proceedings of the Third European Symposium on Calcified Tissues held at Davos (Switzerland), April 11th–16th, 1965*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 40-45
- Grogan SP, Miyaki S, Asahara H, D'Lima DD, Lotz MK (2009) Mesenchymal progenitor cell markers in human articular cartilage: normal distribution and changes in osteoarthritis. *Arthritis research & therapy* 11:R85
- Gudi T, Hong GK, Vaandrager AB, Lohmann SM, Pilz RB (1999) Nitric oxide and cGMP regulate gene expression in neuronal and glial cells by activating type II cGMP-dependent protein kinase. *The FASEB Journal* 13:2143-2152
- Guidi I, Galimberti D, Venturelli E, Lovati C, Del Bo R, Fenoglio C, Gatti A, Dominici R, Galbiati S, Virgilio R, Pomati S, Comi GP, Mariani C, Forloni G, Bresolin N, Scarpini E (2005) Influence of the Glu298Asp polymorphism of NOS3 on age at onset and homocysteine levels in AD patients. *Neurobiology of aging* 26:789-794
- Gurtner GC, Davis V, Li H, McCoy MJ, Sharpe A, Cybulsky MI (1995) Targeted disruption of the murine VCAM1 gene: essential role of VCAM-1 in chorioallantoic fusion and placentation. *Genes & Development* 9:1-14
- Gurtner GC, Davis V, Li H, McCoy MJ, Sharpe A, Cybulsky MI (1995) Targeted disruption of the murine VCAM1 gene: essential role of VCAM-1 in chorioallantoic fusion and placentation. *Genes Dev* 9:1-14
- Hague WM (2003) Homocysteine and pregnancy. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 17:459-469
- Hall BK, Miyake T (2000) All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 22:138-147
- Hamburger V, Hamilton HL (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental Dynamics* 195:231-272
- Hastings NE, Feaver RE, Lee MY, Wamhoff BR, Blackman BR (2009) Human IL-8 regulates smooth muscle cell VCAM-1 expression in response to endothelial cells exposed to atheroprone flow. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29:725-731
- Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM (1989) Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiological reviews* 69:990-1047

- Hemmens B, Mayer B (1998) Enzymology of Nitric Oxide Synthases. In: Titheradge MA (ed) Nitric Oxide Protocols. *Humana Press*, Totowa, NJ, pp 1-32
- Herrmann M, Umanskaya N, Wildemann B, Colaianni G, Widmann T, Zallone A, Herrmann W (2008) Stimulation of osteoblast activity by homocysteine. *Journal of cellular and molecular medicine* 12:1205-1210
- Herrmann M, Umanskaya N, Wildemann B, Colaianni G, Widmann T, Zallone A, Herrmann W (2008) Stimulation of osteoblast activity by homocysteine. *Journal of cellular and molecular medicine* 12:1205-1210
- Hession C, Moy P, Tizard R, Chisholm P, Williams C, Wysk M, Burkly L, Miyake K, Kincade P, Lobb R (1992) Cloning of murine and rat vascular cell adhesion molecule-1. *Biochemical and biophysical research communications* 183:163-169
- Hinchliffe JR (2002) Developmental basis of limb evolution. *The International journal of developmental biology* 46:835-845
- Hoang QQ, Sicheri F, Howard AJ, Yang DS (2003) Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure. *Nature* 425:977-980
- Hoijmakers JHJ (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411:366-374
- Hogan KA, Ambler CA, Chapman DL, Bautch VL (2004) The neural tube patterns vessels developmentally using the VEGF signaling pathway. *Development (Cambridge, England)* 131:1503-1513
- Hohsfield LA, Humpel C (2010) Homocysteine enhances transmigration of rat monocytes through a brain capillary endothelial cell monolayer via ICAM-1. *Current neurovascular research* 7:192-200
- Hojo H, Ohba S, Yano F, Chung UI (2010) Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by hypertrophic chondrocytes in endochondral bone development. *Journal of bone and mineral metabolism* 28:489-502
- Hootnick DR, Levinsohn EM, Randall PA, Packard DS, Jr. (1980) Vascular dysgenesis associated with skeletal dysplasia of the lower limb. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 62:1123-1129
- Huang C, Andres AM, Ratliff EP, Hernandez G, Lee P, Gottlieb RA (2011) Preconditioning Involves Selective Mitophagy Mediated by Parkin and p62/SQSTM1. *PloS one* 6:e20975
- Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC (1995) Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377:239-242
- Hynes RO (2011) Metastatic cells will take any help they can get. *Cancer cell* 20:689-690
- Iacobazzi V, Infantino V, Castegna A, Andria G (2014) Hyperhomocysteinemia: related genetic diseases and congenital defects, abnormal DNA methylation and newborn screening issues. *Molecular genetics and metabolism* 113:27-33
- Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, Li H, DiChiara M, Medoff BD, Cybulsky MI (1999) Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circulation research* 85:199-207

- Ivanov GS, Ivanova T, Kurash J, Ivanov A, Chuikov S, Gizatullin F, Herrera-Medina EM, Rauscher F, Reinberg D, Barlev NA (2007) Methylation-acetylation interplay activates p53 in response to DNA damage. *Molecular and cellular biology* 27:6756-6769
- Ivaska KK, Hentunen TA, Vaaraniemi J, Ylipahkala H, Pettersson K, Vaananen HK (2004) Release of intact and fragmented osteocalcin molecules from bone matrix during bone resorption in vitro. *The Journal of biological chemistry* 279:18361-18369
- Jargiello DM, Caplan AI (1983) The establishment of vascular-derived microenvironments in the developing chick wing. *Developmental biology* 97:364-374
- Johnson RL, Tabin CJ (1997) Molecular models for vertebrate limb development. *Cell* 90:979-990
- Juckett MB, Weber M, Balla J, Jacob HS, Vercellotti GM (1996) Nitric oxide donors modulate ferritin and protect endothelium from oxidative injury. *Free Radical Biology and Medicine* 20:63-73
- Kamat PK, Kalani A, Tyagi SC, Tyagi N (2015) Hydrogen Sulfide Epigenetically Attenuates Homocysteine-Induced Mitochondrial Toxicity Mediated Through NMDA Receptor in Mouse Brain Endothelial (bEnd3) Cells. *Journal of cellular physiology* 230:378-394
- Kamudhamas A, Pang L, Smith SD, Sadovsky Y, Nelson DM (2004) Homocysteine thiolactone induces apoptosis in cultured human trophoblasts: a mechanism for homocysteine-mediated placental dysfunction? *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 191:563-571
- Karaöz E, Okçu A, Gacar G, Sağlam Ö, Yürüker S, Kenar H (2011) A comprehensive characterization study of human bone marrow mscs with an emphasis on molecular and ultrastructural properties. *Journal of cellular physiology* 226:1367-1382
- Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM (1996) Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:9114-9119
- Khan M, Yamauchi M, Srisawasdi S, Stiner D, Doty S, Paschalis EP, Boskey AL (2001) Homocysteine decreases chondrocyte-mediated matrix mineralization in differentiating chick limb-bud mesenchymal cell micro-mass cultures. *Bone* 28:387-398
- Kobus-Bianchini K, Bourckhardt GF, Ammar D, Nazari EM, Muller YMR (2017) Homocysteine-induced changes in cell proliferation and differentiation in the chick embryo spinal cord: implications for mechanisms of neural tube defects (NTD). *Reprod Toxicol* 69:167-173
- Kobus K, Ammar D, Nazari EM, Rauh Muller YM (2013) 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 Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 97:386-397
- Kokame K, Kato H, Miyata T (1996) Homocysteine-respondent genes in vascular endothelial cells identified by differential display analysis. GRP78/BiP and novel genes. *The Journal of biological chemistry* 271:29659-29665
- Kruman, II, Culmsee C, Chan SL, Kruman Y, Guo Z, Penix L, Mattson MP (2000) Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *Journal of Neuroscience* 20:6920-6926
- Kumar A, John L, Maity S, Manchanda M, Sharma A, Saini N, Chakraborty K, Sengupta S (2011) Converging evidence of mitochondrial dysfunction in a yeast model of homocysteine metabolism imbalance. *The Journal of biological chemistry* 286:21779-21795

- Kumar AG, Dai XY, Kozak CA, Mims MP, Gotto AM, Ballantyne CM (1994) Murine VCAM-1. Molecular cloning, mapping, and analysis of a truncated form. *J Immunol* 153:4088-4098
- Kumar R, Vella A (2011) Carbohydrate Metabolism and the Skeleton: Picking a Bone with the β -Cell. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 96:1269-1271
- Latacha KS, Rosenquist TH (2005) Homocysteine inhibits extra-embryonic vascular development in the avian embryo. *Developmental Dynamics* 234:323-331
- Lazarus A, Del-Moral PM, Ilovich O, Mishani E, Warburton D, Keshet E (2011) A perfusion-independent role of blood vessels in determining branching stereotypy of lung airways. *Development* 138:2359-2368
- LeClair EE (1999) Expression of the paired-box genes Pax-1 and Pax-9 in limb skeleton development. *Developmental Dynamics* 214:101-115
- Lee JH, Yang ES, Park JW (2003) Inactivation of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase by peroxynitrite. Implications for cytotoxicity and alcohol-induced liver injury. *The Journal of biological chemistry* 278:51360-51371
- Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G (2007) Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130:456-469
- Lehotsky J, Petras M, Kovalska M, Tothova B, Drgova A, Kaplan P (2015) Mechanisms involved in the ischemic tolerance in brain: effect of the homocysteine. *Cellular and molecular neurobiology* 35:7-15
- Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ (2002) Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer cell* 2:183-192
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science (New York, NY)* 246:1306-1309
- Levasseur R (2009) Bone tissue and hyperhomocysteinemia. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme* 76:234-240
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology* 7:678-689
- Li F, Watkins D, Rosenblatt DS (2009) Molecular Genetics and Metabolism. *Molecular genetics and metabolism* 98:166-172
- Li J-J, Li Q, Du H-P, Wang Y-L, You S-J, Wang F, Xu X-S, Cheng J, Cao Y-J, Liu C-F, Hu L-F (2015) Homocysteine Triggers Inflammatory Responses in Macrophages through Inhibiting CSE-H2S Signaling via DNA Hypermethylation of CSE Promoter. *International journal of molecular sciences* 16:12560
- Lin PY, Yang TH, Lin HG, Hu ML (2007) Synergistic effects of S-adenosylhomocysteine and homocysteine on DNA damage in a murine microglial cell line. *Clinica Chimica Acta* 379:139-144
- Linhartova K, Sterbakova G, Racek J, Cerbak R, Porazikova K, Rokyta R (2009) Linking soluble vascular adhesion molecule-1 level to calcific aortic stenosis in patients with coronary artery disease. *Experimental & Clinical Cardiology* 14:e80-83

- Liu XB, Hill P, Haile DJ (2002) Role of the ferroportin iron-responsive element in iron and nitric oxide dependent gene regulation. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 29:315-326
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193:265-275
- Ma Y, Peng D, Liu C, Huang C, Luo J (2017) Serum high concentrations of homocysteine and low levels of folic acid and vitamin B(12) are significantly correlated with the categories of coronary artery diseases. *BMC Cardiovascular Disorders* 17
- Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M (2008) Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40:46-62
- Maes C (2013) Role and regulation of vascularization processes in endochondral bones. *Calcified tissue international* 92:307-323
- Maes C, Goossens S, Bartunkova S, Drogat B, Coenegrachts L, Stockmans I, Moermans K, Nyabi O, Haigh K, Naessens M, Haenebalcke L, Tuckermann JP, Tjwa M, Carmeliet P, Mandic V, David JP, Behrens A, Nagy A, Carmeliet G, Haigh JJ (2010) Increased skeletal VEGF enhances beta-catenin activity and results in excessively ossified bones. *The EMBO journal* 29:424-441
- Makino A, Scott BT, Dillmann WH (2010) Mitochondrial fragmentation and superoxide anion production in coronary endothelial cells from a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia* 53:1783-1794
- Mammucari C, Rizzuto R (2010) Signaling pathways in mitochondrial dysfunction and aging. *Mechanisms of ageing and development* 131:536-543
- Mandarim-de-Lacerda CA (2003) Stereological tools in biomedical research. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 75:469-486
- Manley S, Williams JA, Ding WX (2013) Role of p62/SQSTM1 in liver physiology and pathogenesis. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)* 238:525-538
- Matsha TE, Pheiffer C, Mutize T, Erasmus RT, Kengne AP (2016) Glucose Tolerance, MTHFR C677T and NOS3 G894T Polymorphisms, and Global DNA Methylation in Mixed Ancestry African Individuals. *Journal of Diabetes Research* 2016:8
- Mattson MP, Kruman, II, Duan W (2002) Folic acid and homocysteine in age-related disease. *Ageing research reviews* 1:95-111
- McCully KS (1969) Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *The American journal of pathology* 56:111-128
- Melikian N, Seddon MD, Casadei B, Chowienczyk PJ, Shah AM (2009) Neuronal nitric oxide synthase and human vascular regulation. *Trends in cardiovascular medicine* 19:256-262
- Messier B, Leblond CP (1960) Cell proliferation and migration as revealed by radioautography after injection of thymidine-H3 into male rats and mice. *American Journal of Anatomy* 106:247-285
- Mikkelsen RB, Wardman P (2003) Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* 22:5734-5754
- Moritz KM, Boon WM, Wintour EM (2005) Glucocorticoid programming of adult disease. *Cell and tissue research* 322:81-88

- Muriel P, Castro V (1998) Effects of S-Adenosyl- L -methionine and interferon- α 2b on liver damage induced by bile duct ligation in rats. *Journal of Applied Toxicology* 18:143-147
- Narendra D, Tanaka A, Suen D-F, Youle RJ (2008) Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of cell biology* 183:795-803
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB Journal* 13:9-22
- Neve A, Corrado A, Cantatore FP (2013) Osteocalcin: skeletal and extra-skeletal effects. *Journal of cellular physiology* 228:1149-1153
- Ni H-M, Williams JA, Ding W-X (2015) Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox Biology* 4:6-13
- O'Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER, Arancio O (1991) Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences* 88:11285-11289
- Oikawa S, Murakami K, Kawanishi S (2003) Oxidative damage to cellular and isolated DNA by homocysteine: implications for carcinogenesis. *Oncogene* 22:3530-3538
- Oosterbaan AM, Steegers EA, Ursem NT (2012) The effects of homocysteine and folic acid on angiogenesis and VEGF expression during chicken vascular development. *Microvascular research* 83:98-104
- Osborn L, Hession C, Tizard R, Vassallo C, Luhowskyj S, Chi-Rosso G, Lobb R (1989) Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 59:1203-1211
- Outinen PA, Sood SK, Pfeifer SI, Pamidi S, Podor TJ, Li J, Weitz JI, Austin RC (1999) Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood* 94:959-967
- Pangare M, Makino A (2012) Mitochondrial function in vascular endothelial cell in diabetes. *Journal of smooth muscle research = Nihon Heikatsukin Gakkai kikanishi* 48:1-26
- Pantopoulos K, Hentze MW (1995) Nitric oxide signaling to iron-regulatory protein: direct control of ferritin mRNA translation and transferrin receptor mRNA stability in transfected fibroblasts. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:1267-1271
- Pepinsky B, Hession C, Chen LL, Moy P, Burkly L, Jakubowski A, Chow EP, Benjamin C, Chi-Rosso G, Luhowskyj S, et al. (1992) Structure/function studies on vascular cell adhesion molecule-1. *The Journal of biological chemistry* 267:17820-17826
- Perna AF, Ingrosso D (2016) Atherosclerosis determinants in renal disease: how much is homocysteine involved? *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 31:860-863
- Plaza SM, Lamson DW (2005) Vitamin K2 in bone metabolism and osteoporosis. *Alternative Medicine Review* 10:24-35
- Polte T, Newman W, Gopal TV (1990) Full length vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). *Nucleic acids research* 18:5901
- Polte T, Newman W, Raghunathan G, Gopal TV (1991) Structural and functional studies of full-length vascular cell adhesion molecule-1: internal duplication and homology to several adhesion proteins. *DNA Cell Biology* 10:349-357

- Pozdnyakov N, Lloyd A, Reddy VN, Sitaramayya A (1993) Nitric oxide-regulated endogenous ADP-ribosylation of rod outer segment proteins. *Biochemical and biophysical research communications* 192:610-615
- Radomski MW, Palmer RM, Moncada S (1987) The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *British journal of pharmacology* 92:639-646
- Ramasamy SK, Kusumbe AP, Wang L, Adams RH (2014) Endothelial Notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone. *Nature* 507:376-380
- Rapoport RM, Draznin MB, Murad F (1983) Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* 306:174-176
- Rayavarapu S, Coley W, Nagaraju K (2012) Endoplasmic reticulum stress in skeletal muscle homeostasis and disease. *Current rheumatology reports* 14:238-243
- Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE (1998) Homocysteine and cardiovascular disease. *Annual review of medicine* 49:31-62
- Reik W, Dean W, Walter J (2001) Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293:1089-1093
- Roos WP, Kaina B (2006) DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in molecular medicine* 12:440-450
- Rouzier C, Bannwarth S, Chausseot A, Chevrollier A, Verschueren A, Bonello-Palot N, Fragaki K, Cano A, Pouget J, Pellissier JF, Procaccio V, Chabrol B, Paquis-Flucklinger V (2012) The MFN2 gene is responsible for mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotype. *Brain : a journal of neurology* 135:23-34
- Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC (1998) Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *The Journal of clinical investigation* 101:731-736
- Sakamoto W, Isomura H, Fujie K, Deyama Y, Kato A, Nishihira J, Izumi H (2005) Homocysteine attenuates the expression of osteocalcin but enhances osteopontin in MC3T3-E1 preosteoblastic cells. *Biochim Biophys Acta* 1740:12-16
- Sakamoto W, Isomura H, Fujie K, Deyama Y, Kato A, Nishihira J, Izumi H (2005) Homocysteine attenuates the expression of osteocalcin but enhances osteopontin in MC3T3-E1 preosteoblastic cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1740:12-16
- Salazar VS, Gamer LW, Rosen V (2016) BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nature reviews Endocrinology* 12:203-221
- Salo J, Lehenkari P, Mulari M, Metsikko K, Vaananen HK (1997) Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis. *Science* 276:270-273
- Samali A, Zhivotovsky B, Jones D, Nagata S, Orrenius S (1999) Apoptosis: cell death defined by caspase activation. *Cell death and differentiation* 6:495-496
- Schalinske KL, Smazal AL (2012) Homocysteine imbalance: a pathological metabolic marker. *Advances in Nutrition* 3:755-762

- Schlesinger M, Bendas G (2015) Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)--an increasing insight into its role in tumorigenicity and metastasis. *International journal of cancer Journal international du cancer* 136:2504-2514
- Schuman EM, Madison DV (1991) A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science* 254:1503-1506
- Schwarz PM, Kleinert H, Forstermann U (1999) Potential functional significance of brain-type and muscle-type nitric oxide synthase I expressed in adventitia and media of rat aorta. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19:2584-2590
- Selhub J (1999) Homocysteine metabolism. *Annual review of nutrition* 19:217-246
- Shaw GM, Iovannisci DM, Yang W, Finnell RH, Carmichael SL, Cheng S, Lammer EJ (2005) Endothelial nitric oxide synthase (NOS3) genetic variants, maternal smoking, vitamin use, and risk of human orofacial clefts. *American journal of epidemiology* 162:1207-1214
- Shaw GM, O'Malley CD, Wasserman CR, Tolarova MM, Lammer EJ (1995) Maternal periconceptional use of multivitamins and reduced risk for conotruncal heart defects and limb deficiencies among offspring. *American Journal of Medical Genetics A* 59:536-545
- Shearer MJ, Fu X, Booth SL (2012) Vitamin K Nutrition, Metabolism, and Requirements: Current Concepts and Future Research. *Advances in Nutrition: An International Review Journal* 3:182-195
- Shenouda SM, Widlansky ME, Chen K, Xu G, Holbrook M, Tabit CE, Hamburg NM, Frame AA, Caiano TL, Kluge MA, Duess MA, Levit A, Kim B, Hartman ML, Joseph L, Shirihai OS, Vita JA (2011) Altered mitochondrial dynamics contributes to endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circulation* 124:444-453
- Shesely EG, Maeda N, Kim H-S, Desai KM, Krege JH, Laubach VE, Sherman PA, Sessa WC, Smithies O (1996) Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:13176-13181
- Škovierová H, Vidomanová E, Mahmood S, Sopková J, Drgová A, Červeňová T, Halašová E, Lehotský J (2016) The Molecular and Cellular Effect of Homocysteine Metabolism Imbalance on Human Health. *International journal of molecular sciences* 17
- Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M (1998) Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92:735-745
- Suen DF, Norris KL, Youle RJ (2008) Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev* 22:1577-1590
- Suh JR, Oppenheim EW, Girgis S, Stover PJ (2000) Purification and properties of a folate-catabolizing enzyme. *The Journal of biological chemistry* 275:35646-35655
- Summerbell D, Wolpert L (1972) Cell density and cell division in the early morphogenesis of the chick wing. *Nature: New biology* 239:24-26
- Szabadkai G, Simoni AM, Bianchi K, De Stefani D, Leo S, Wieckowski MR, Rizzuto R (2006) Mitochondrial dynamics and Ca²⁺ signaling. *Biochimica et biophysica acta* 1763:442-449
- Tian X, Zhao L, Song X, Yan Y, Liu N, Li T, Yan B, Liu B (2016) HSP27 Inhibits Homocysteine-Induced Endothelial Apoptosis by Modulation of ROS Production and Mitochondrial Caspase-Dependent Apoptotic Pathway. *BioMed Research International* 2016

- Tickle C (2003) Patterning systems--from one end of the limb to the other. *Developmental cell* 4:449-458
- Tickle C (2004) The contribution of chicken embryology to the understanding of vertebrate limb development. *Mechanisms of development* 121:1019-1029
- Tickle C, Munsterberg A (2001) Vertebrate limb development--the early stages in chick and mouse. *Current opinion in genetics & development* 11:476-481
- Tu MC, Huang CW, Chen NC, Chang WN, Lui CC, Chen CF, Chen C, Wang YL, Lin YT, Chang CC (2010) Hyperhomocysteinemia in Alzheimer dementia patients and cognitive decline after 6 months follow-up period. *Acta neurologica Taiwanica* 19:168-177
- Turgut B, Kaya M, Arslan S, Demir T, Guler M, Kaya MK (2010) Levels of circulating homocysteine, vitamin B6, vitamin B12, and folate in different types of open-angle glaucoma. *Clinical interventions in aging* 5:133-139
- Tyagi N, Vacek JC, Givvimani S, Sen U, Tyagi SC (2010) Cardiac specific deletion of N-methyl-d-aspartate receptor 1 ameliorates mtMMP-9 mediated autophagy/mitophagy in hyperhomocysteinemia. *Journal of Receptors and Signal Transduction* 30:78-87
- Vacek TP, Vacek JC, Tyagi SC (2012) Mitochondrial mitophagic mechanisms of myocardial matrix metabolism and remodelling. *Archives of physiology and biochemistry* 118:31-42
- van Mil NH, Oosterbaan AM, Steegers-Theunissen RP (2010) Teratogenicity and underlying mechanisms of homocysteine in animal models: a review. *Reproductive Toxicology* 30:520-531
- Vaux DL, Cory S, Adams JM (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335:440-442
- Veeranki S, Tyagi SC (2013) Defective Homocysteine Metabolism: Potential Implications for Skeletal Muscle Malfunction. *International journal of molecular sciences* 14:15074-15091
- Vousden KH, Lane DP (2007) p53 in health and disease. *Nature reviews Molecular cell biology* 8:275-283
- Wang J, Bai X, Chen Y, Zhao Y, Liu X (2012) Homocysteine Induces Apoptosis of Rat Hippocampal Neurons by Inhibiting 14-3-3 σ Expression and Activating Calcineurin. *PloS one* 7:e48247
- Waterland RA (2006) Assessing the effects of high methionine intake on DNA methylation. *Journal of Nutrition* 136:1706S-1710S
- Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK, Shi YY, Zhou J, Maeda N, Krisans SK, Malinow MR, Austin RC (2001) Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *The Journal of clinical investigation* 107:1263-1273
- Xu S, Zhao Y, Jin C, Yu L, Ding F, Fu G, Zhu J (2017) PKC/NADPH oxidase are involved in the protective effect of pioglitazone in high homocysteine-induced paracrine dysfunction in endothelial progenitor cells. *American Journal of Translational Research* 9:1037-1048
- Xu X (2016) Placental NRP1 and VEGF expression in pre-eclamptic women and in a homocysteine-treated mouse model of pre-eclampsia.
- Yang Y, Drossopoulou G, Chuang PT, Duprez D, Marti E, Bumcrot D, Vargesson N, Clarke J, Niswander L, McMahon A, Tickle C (1997) Relationship between dose, distance and time in Sonic Hedgehog-mediated regulation of anteroposterior polarity in the chick limb. *Development* 124:4393-4404

- Yin X-M, Ding W-X (2013) The reciprocal roles of PARK2 and mitofusins in mitophagy and mitochondrial spheroid formation. *Autophagy* 9:1687-1692
- Youle RJ, Narendra DP (2011) Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12:9-14
- Yu X, Lv J, Zhu Y, Duan L, Ma L (2013) Homocysteine inhibits hepatocyte proliferation via endoplasmic reticulum stress. *PLoS biology* 8:e54265
- Zelzer E, Glotzer DJ, Hartmann C, Thomas D, Fukai N, Soker S, Olsen BR (2001) Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2. *Mechanisms of development* 106:97-106
- Zelzer E, Mamluk R, Ferrara N, Johnson RS, Schipani E, Olsen BR (2004) VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Development (Cambridge, England)* 131:2161-2171
- Zelzer E, McLean W, Ng YS, Fukai N, Reginato AM, Lovejoy S, D'Amore PA, Olsen BR (2002) Skeletal defects in VEGF(120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development* 129:1893-1904
- Zhang C, Cai Y, Adachi MT, Oshiro S, Aso T, Kaufman RJ, Kitajima S (2001) Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells through activation of the unfolded protein response. *The Journal of biological chemistry* 276:35867-35874
- Zhang H, Cai C, Wu Y, Shao D, Ye B, Zhang Y, Liu J, Wang J, Jia X (2013) Mitochondrial and endoplasmic reticulum pathways involved in microcystin-LR-induced apoptosis of the testes of male frog (*Rana nigromaculata*) in vivo. *Journal of hazardous materials* 252-253:382-389
- Zhang Q, Li Q, Chen Y, Huang X, Yang IH, Cao L, Wu WK, Tan HM (2012) Homocysteine-impaired angiogenesis is associated with VEGF/VEGFR inhibition. *Frontiers in bioscience (Elite edition)* 4:2525-2535
- Zhao Y, Huang G, Chen S, Gou Y, Dong Z, Zhang X (2016) Homocysteine Aggravates Cortical Neural Cell Injury through Neuronal Autophagy Overactivation following Rat Cerebral Ischemia-Reperfusion. *International journal of molecular sciences* 17
- Zhuo JM, Pratico D (2010) Normalization of hyperhomocysteinemia improves cognitive deficits and ameliorates brain amyloidosis of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *The FASEB Journal* 24:3895-3902
- Zou CG, Banerjee R (2005) Homocysteine and redox signaling. *Antioxidants & redox signaling* 7:547-559