



**Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Neurociências**

**EFEITO DA HOMOCISTEÍNA E ÁCIDO FÓLICO NA MORFOGÊNESE
DA CRISTA NEURAL, IN VITRO.**

Fernanda Rosene Melo

Florianópolis
2010

FERNANDA ROSENE MELO

**EFEITO DA HOMOCISTEÍNA E ÁCIDO FÓLICO NA MORFOGÊNESE
DA CRISTA NEURAL, IN VITRO.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: PROF.DRA. ANDRÉA GONÇALVES TRENTIN

Florianópolis
2010

**EFEITO DA HOMOCISTEÍNA E ÁCIDO FÓLICO NA MORFOGÊNESE
DA CRISTA NEURAL, IN VITRO.**

FERNANDA ROSENE MELO

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS

na área de Neurobiologia Celular e Molecular aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Orientadora

Profa. Dra. Andréa Gonçalves Trentin

Coordenador do Curso

Profa. Dra. Carla Inês Tasca

Banca Examinadora

Profa. Dra. Andréa Gonçalves Trentin (Presidente)
Dept. Biologia Celular, Embriologia e Genética (CCB, UFSC)

Profa. Dra. Yara Maria Rauh Muller (Membro)
Dept. Biologia Celular, Embriologia e Genética (CCB, UFSC)

Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal (Membro)
Dept. Bioquímica (CCB, UFSC)

Profa. Dra. Margherita A. A. Maria Barracco (Suplente)
Dept. Biologia Celular, Embriologia e Genética (CCB, UFSC)

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação representa a concretização de um esforço, contando com a cooperação efetiva de profissionais, amigos e familiares, aos quais sou imensamente grata e reconhecida.

À minha orientadora, Dra. Andréa Gonçalves Trentin, a quem devoto minha sincera admiração, pela dedicação e pelo exemplo de profissional.

Ao Professor Dr. Márcio, que me acolheu em seu laboratório, juntamente com a professora Andréa.

Ao Bruno, pela paciência e amizade, a quem devo grande parte dos meus ensinamentos no laboratório.

Às pessoas queridas e amigos do laboratório, pelo auxílio nos experimentos, pelas palavras de estímulo, pelas idéias compartilhadas e pela descontração: Maria Cecília, Mari, Denise, Rossana, Talita, Meline, Gabriela, Cláudia, Ricardinho, Raul, Suelen, Bianca, Bruna, Zucco, Bianka, Beatriz, Sarah, Aloísio, Ricardo, Ricardo New, Diego, Ana, Silvia, Sabrina, Viviane, Ezequiel e Giordano. Vocês me trouxeram ensinamentos valiosos.

À Rossana, pela ajuda solícita e paciente na editoração do trabalho.

Aos meus pais Samuel e Fátima, pela dedicação de toda uma vida, pelo apoio e carinho em todos os momentos, por me fazerem acreditar em mim mesma, e principalmente pelo exemplo de trabalho e respeito.

Ao meu irmão Eduardo, pela amizade e companheirismo.

À toda minha família, que é um exemplo de união e cumplicidade, pelo incentivo, sempre. E aos meus primos que são exemplos de amizade.

A uma pessoa muito especial, que a vida nos levou tão inesperadamente, minha avó Cacilda, que sempre me incentivou a seguir em busca dos meus sonhos.

Ao Jairo pela sua constante dedicação, incentivo e paciência... muita paciência.

À Ana Paula e Maren pela amizade incondicional, que embora distantes, sempre me trazem conforto.

Aos amigos que encontrei ao longo da graduação e do mestrado, em especial à Paula, Mirian, Fernanda, Ângela e Diane, que compartilharam conversas, encontros e conquistas.

Aos professores da pós-graduação, que contribuíram para o meu crescimento acadêmico.

Gostaria de agradecer a CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

À Deus, pelo dom da vida, e por ter concedido luz e força para percorrer esse caminho.

E a todos que não foram aqui mencionados, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus agradecimentos sinceros.

"O estudo, a busca da verdade e da beleza são domínios em que nos é consentido sermos crianças por toda a vida."

Albert Einstein

RESUMO

A crista neural (CN) constitui uma população celular pluripotente derivada das pregas neurais da placa neural que surge nos estágios iniciais da embriogênese, durante o processo de neurulação. A CN origina todo o sistema nervoso periférico, pigmentação do corpo além dos ossos e cartilagens crânio-faciais. A deficiência de ácido fólico (AF) promove um aumento nos níveis de homocisteína (HC) e tem sido associada a diversas anomalias congênitas, principalmente a defeitos no fechamento do tubo neural e neurocristopatias. No entanto, os mecanismos celulares desse processo não estão esclarecidos e se são causados pela deficiência de folato ou pelo aumento dos níveis de HC. Desse modo, esse trabalho tem por objetivo investigar o efeito da HC e AF em diversos aspectos da morfogênese da CN, como a migração, proliferação, morte e diferenciação celular. Culturas primárias de células da crista neural (CN) da região cefálica (mesencefálo) foram realizadas a partir de explantes das pregas neurais de embriões murinos de 8,5 dias de gestação. Os explantes foram cultivados sobre substrato de fibronectina (FN) (20µg/mL) em meio de cultura contendo homocisteína (HC) (0, 75, 150 ou 300 uM) e/ou ácido fólico (AF) (45 e 90uM). Após 48 horas, os explantes foram removidos e as células da CN que migraram para a placa de cultivo a partir do tubo neural foram tripisinizadas, replaqueadas e mantidas em cultura por mais 10 dias nas mesmas condições de tratamento. Os fenótipos celulares foram identificados por imunofluorescência utilizando anticorpos para proteínas marcadoras específicas de células gliais (proteína ácida fibrilar glial-GFAP), neurônios (β -Tubulina III), células de músculo liso (alfa-actina de músculo liso- α SMA) e células da crista neural indiferenciada (nestina e p75). Foram analisados ainda, a área de migração das células da CN, a proliferação celular por incorporação de BrdU e a proporção de núcleos apoptóticos. Nossos resultados demonstram que a HC reduz a diferenciação da CN para o fenótipo de músculo liso de maneira dose-dependente, e aumenta a proporção de células indiferenciadas, não alterando a proporção de células gliais e neurônios. A adição de AF previne esse efeito da HC. A proporção de núcleos apoptóticos manteve-se baixa em todas as condições analisadas, sugerindo que os efeitos observados não se devem a uma morte celular acentuada. Por outro lado, observamos um progressivo aumento na migração e proliferação celular das células da CN após tratamento com concentrações crescentes de HC, efeito este prevenido pela adição de AF. Os resultados sugerem que a HC influencia os processos de diferenciação, migração e proliferação das células da CN podendo assim estar relacionada com o surgimento de anomalias congênitas e que o AF previne esses efeitos.

Palavras-chave: Crista neural. Homocisteína. Ácido fólico. Neurocristopatias.

ABSTRACT

The neural crest (NC) is a transient structure of the vertebrate embryo formed by the lateral borders of the neural primordium during neurulation. The NC originates most of neurons and glial cells of the peripheral nervous system, pigment cell of body and bones and cartilage of the head. Folic acid (FA) deficiencies lead to an increase in the level of homocysteine (HC) and have been associated with many adverse congenital abnormalities, particularly neural tube closure defects and neurocristopathies. However, it is not clear, whether these defects are due to a FA deficiency or to the increased levels of (HC) levels neither the involvement of the NC cells. Thus, the objective of this study was to investigate the effect of HC and AF in various aspects of morphogenesis the CN, such as migration, proliferation, death and cell differentiation. Primary cell cultures were performed by mechanical dissection of neural tubes of 8.5 days post coitum mouse embryos at the level of mesencephalon. Explants were applied on plastic dishes coated with fibronectin (FN) (20 μ g/mL), being removed 48 hours later. The remaining migrated cells (NC cells) were then trypsinized, reapplied on the same culture condition and cultured for additional 10 days. Cells were cultured in the complex media containing HC (0, 75, 150 or 300 μ M) and/or FA (45 or 90 μ M). The medium was changed every 3 days. The cell phenotypes were identified by immunofluorescence using the lineage-specific markers to glial cells (*GFAP*), neurons (*β -III-Tubulin*), smooth muscle cells (*α SMA*), and indifferntiated neural crest cells (nestin and p75). It was also analyzed the NC cell migration area, the cell proliferation (by BrdU incorporation) and the proportion of apoptotic nuclei. We could observe that HC reduces in a dose-dependent manner the differentiation of NC to smooth muscle cells, and increases the proportion of undifferentiated cells, an effect that is prevented by AF. The proportion of apoptotic nuclei was insignificant in all tested condition, suggesting that massive cell death is not responsible to the observed effects. In addition, we verified that HC progressively increased the migration and proliferation of NC cells, effects prevented by FA. These results suggest an effect of the HC in the differentiation, migration and proliferation processes of the CN cells that may be involved in congenital anomalies, and that FA prevent this effects.

Key-words: Neural Crest. Homocysteine. Folic Acid. Neurocristopathies.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-MeTHF	5-metiltetrahidrofolato
AF	Ácido Fólico
α -MEM	Meio Mínimo Essencial Modificado Alfa
ANOVA	Análise de Variância
BrdU	5-bromo-2'-deoxiuridina
CN	Crista Neural
DAPI	4'-6-diamino-2-fenilindol
DTN	Defeito no Tubo Neural
ET3	Endotelina 3
EGF	Fator de Crescimento de Epiderme
EDTA	Ácido etilanediamino tetra-acético
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto
FGF2	Fator de Crescimento de Fibroblasto 2
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
GFAP	Proteína Fibrilar Ácida Glial
HC	Homocisteína
Ig	Imunoglobulina
NMDA	N-metil-D-aspartato
PBS	Tampão Fosfato Salina
Shh	Sonic Hedgehog
SMA	Actina de Músculo Liso
T3	3-3'-5 triiodo-L-thionina
THF	tetrahidrofolato
TN	Tubo Neural
TxRd	Vermelho do Texas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formação do tubo neural..	11
Figura 2. Derivados da crista neural.	12
Figura 3. Metabolismo do Folato e Homocisteína..	16
Figura 4. Procedimento cirúrgico para a remoção do embrião de camundongo e do tubo neural.	21
Figura 5. Esquema representativo da metodologia utilizada.	22
Figura 6. Migração das células da CN.....	26
Figura 7. Fotografia representativa da proliferação celular.....	27
Figura 8. Fotografia representativa da morte celular.	28
Figura 9. Fotografias representativas dos fenótipos celulares da CN aos 12 dias de cultura secundária..	29
Figura 10. Análise quantitativa do efeito da HC e AF na expressão de células de músculo liso.	30
Figura 11. Análise quantitativa do efeito da HC e AF na expressão de neurônios..	31
Figura 12. Análise quantitativa do efeito da HC e AF na expressão de células gliais.	32
Figura 13. Fotografia representativa de células indiferenciadas da CN positivas para nestina.	33
Figura 14. Fotografia representativa de células indiferenciadas da CN positivas para p75....	34
Figura 15. Modelo de linhagens celulares na CN.....	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 A CRISTA NEURAL	11
1.2 DEFEITOS DO TUBO NEURAL E CRISTA NEURAL	13
1.3 ÁCIDO FÓLICO E HOMOCISTEÍNA	14
2 OBJETIVOS	19
2.1. OBJETIVO GERAL	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 ANIMAIS	20
3.2 CULTURAS DE CÉLULAS DA CRISTA NEURAL CEFÁLICA DE CAMUNDONGO	20
3.3 ANÁLISE DA MIGRAÇÃO CELULAR.....	22
3.4 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR	22
3.5 IMUNOFLOURESCÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA	23
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
4 RESULTADOS	25
4.1 EFEITO DA HC E AF NA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CNC	25
4.2 EFEITO DA HC E AF NA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DA CN	26
4.3 EFEITO DO AF E DA HC NA MORTE CELULAR DAS CÉLULAS DA CN.....	28
4.4. EFEITO DA HC E AF NA EXPRESSÃO FENOTÍPICA DAS CÉLULAS DA CN.....	28
4.4.1 Músculo liso.....	29
4.4.2 Neurônios.....	30
4.4.3 Células gliais.....	31
4.4.4 Células da CN indiferenciadas	32
4.4.4.1 Células Nestina +.....	32
4.4.4.2 Células p75+	33
5 DISCUSSÃO	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 A CRISTA NEURAL

A crista neural (CN) é uma estrutura exclusiva de embriões de vertebrados, formada pelas bordas laterais do primórdio neural durante a neurulação. Durante este processo, o tubo neural se dobra em forma de “V” e as pregas neurais se fundem originando o tubo neural que irá se desenvolver no sistema nervoso central. No momento da especificação da CN, estas células desfazem seus contatos célula-célula mediados por caderinas, perdendo seu arranjo epitelial e adquirindo propriedades migratórias (Figura 1) (LE DOUARIN, 1999).

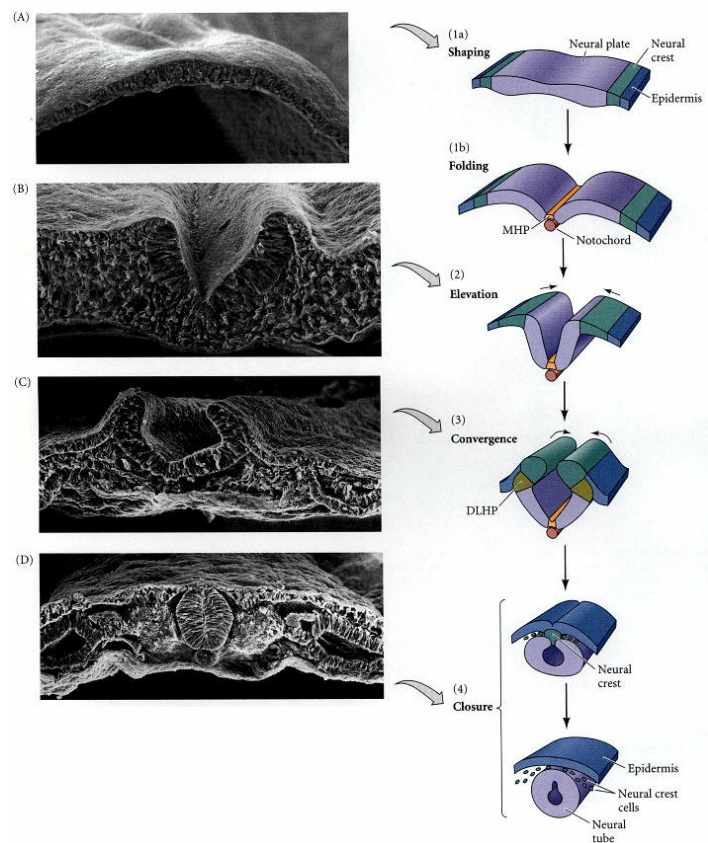


Figura 1. Formação do tubo neural. (A,1) As células da placa neural podem ser distinguidas como células alongadas na região dorsal da ectoderme. (B,2; C,3) A dobra neural eleva-se como epiderme presuntiva e continua a se mover em direção do dorso medial. (D4) As dobras neurais entram em contato uma com a outra, e as células da crista neural são especificadas nesta região. As células da crista neural então se dispersam e o tubo neural separa-se da epiderme.

Fonte: Adaptado de Gilbert (2000).

As células da CN migram por todo o embrião até os locais de destino final, dando

origem a uma variedade de fenótipos celulares diferenciados. As rotas migratórias variam quanto a sua posição de origem ao longo do eixo rostrocaudal embrionário formando subdivisões: cranial, vagal, truncal e sacral. Na região truncal, as células da CN se diferenciam em células do sistema nervoso periférico, como neurônios e células gliais, incluindo células de Schwann, gânglios sensoriais e simpáticos, além de células da medula adrenal e melanócitos. A CN truncal segue dois caminhos migratórios distintos, o ventral, em direção a metade rostral de cada esclerótomo, por onde passam precursores sensoriais e simpato-adrenais, e a rota migratória dorsolateral, localizada abaixo da ectoderme, aonde células pigmentares se deslocam 24 horas depois (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999).

Na região cefálica a CN é composta por uma população de células com capacidade migratória provenientes das vesículas encefálicas. Além de ajudar na formação do sistema nervoso periférico e entérico, as células da CN cefálica formam melanócitos (exceto as células pigmentares da retina), meninges cerebrais, e vários tipos celulares mesenquimais (a chamada mesectoderme), abrangendo a maioria da derme, tecido conjuntivo, cartilagens, adipócitos e ossos do crânio e da face, incluindo odontoblastos, ossos do ouvido médio e mandíbula, e até mesmo células de músculo liso, associados com os vasos derivados dos arcos aórticos que irrigam a face e o encéfalo, e ao septo que separa a aorta da artéria pulmonar (Figura 2) (Ver revisão: LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999; DUPIN; CALLONI; LE DOUARIN, 2010).

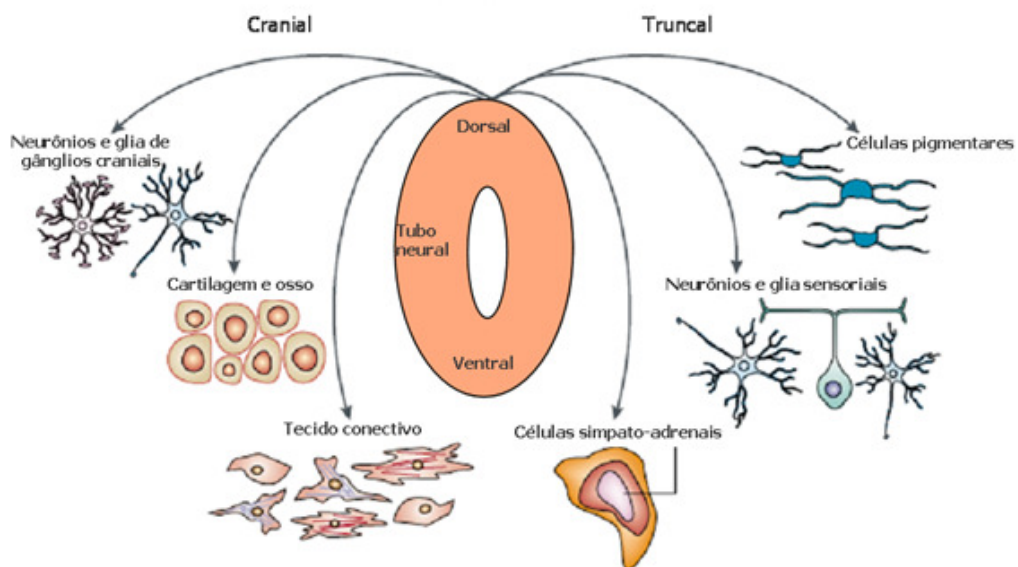


Figura 2. Derivados da crista neural. As células da CN migram em direção ao corpo do embrião e diferenciam em muitos tipos celulares distintos. Apesar das células da CN serem pluripotentes, diferenças existem entre as células que são originadas de diferentes níveis antero-posteriores: células da CN truncal formam melanócitos e vários tipos de neurônios e células da glia, enquanto que células da CN cranial (região embrionária da cabeça) também têm o potencial de formar derivados mesenquimais, como osso, cartilagem e tecido conjuntivo.

Fonte: Adaptado de Knecht e Bronner-Fraser (2002).

No início da migração a CN é composta por uma população heterogênea de células dotadas de diferentes potenciais de proliferação e diferenciação (LE DOUARIN; DUPIN, 2003). Sendo assim, elas podem ser multipotentes, bipotentes ou onipotentes, e tornam-se progressivamente comprometidas, o que as identifica como células-tronco progenitoras (CRANE; TRAINOR, 2006). Essas células recebem fatores que direcionam sua diferenciação e seu destino (CHOUDHARY *et al.*, 2006). O grupo de Calloni e colaboradores (2009) recentemente identificou um progenitor pluripotente comum de condrócitos, osteócitos, neurônios, células gliais, melanócitos e miofibroblastos que está presente no início da migração da CN cefálica. Estudos recentes têm demonstrado que progenitores multipotentes da CN persistem em tecidos adultos em roedores e humanos, esses resultados reforçam um modelo de célula-tronco para a geração e manutenção de linhagens derivadas da CN durante a embriogênese e na homeostase do tecido adulto (CALLONI; LE DOUARIN; DUPIN, 2009; DUPIN; CALLONI; LE DOUARIN, 2010).

1.2 DEFEITOS DO TUBO NEURAL E CRISTA NEURAL

A formação do tubo neural é um processo complexo controlado por genes e modulado por fatores ambientais envolvendo interações gene-gene, gene-ambiente e gene-nutriente (PADMANABHAN, 2006). O fechamento do tubo neural ocorre entre a terceira e a quarta semana após a concepção em humanos, sendo condicionada pela interação entre as condições genéticas do embrião e fatores ambientais (DE LA CALLE *et al.*, 2003).

A alteração em qualquer etapa do processo de neurulação, desde a indução neural primária até o fechamento do tubo neural, pode resultar em defeitos no tubo neural (DTN) (BJORKLUND; GORDON, 2006). Os DTN correspondem a um grupo de anomalias congênitas complexas e heterogêneas do sistema nervoso (PADMANABHAN, 2006) levando a mortalidade infantil ou grave incapacidade em grande parte dos casos (ESKES, 1998). Espinha bífida, encefalocele e anencefalia são relatadas como falhas no fechamento do tubo neural e são as mais freqüentes más-formações congênitas severas, com sua prevalência variando de acordo com a área geográfica, grupo étnico e nível socioeconômico (DE LA CALLE *et al.*, 2003). Em humanos, os DTN que mais têm ocorrência são anencefalia e espinha bífida. A anencefalia é invariavelmente fatal e proveniente de defeitos no fechamento do neuróporo rostral, sendo caracterizada pela ausência total ou parcial da abóbada craniana e

dos hemisférios cerebrais (DETRAIT *et al.*, 2005). Quando os DTN afetam a medula espinhal e os tecidos sobrejacentes: meninges, arcos vertebrais, músculos e tecido epitelial, são denominados de espinha bífida (MOORE; PERSAUD, 2004), envolvendo a protrusão de tecido neural através de uma abertura nos arcos vertebrais, podendo ocorrer em qualquer local ao longo da medula espinhal, o que pode provocar a paralisia das pernas, anestesia da pele e distúrbios urológicos (FINNELL *et al.*, 1998). Um tipo raro de DTN ocorre quando o defeito espinhal é coberto por pele, conhecido como espinha bífida oculta, onde há uma alteração óssea tipicamente benigna em uma ou mais vértebras, mas que não envolvem os nervos da medula espinhal (BOTTO *et al.*, 1999).

A neurulação é um processo complexo que envolve várias etapas temporais precisas de regulação da expressão gênica. Alguns estudos sugerem o envolvimento de diferentes vias moleculares na patogênese das DTN, que vão desde a desregulação do metabolismo da homocisteína (HC) e do ácido fólico (AF), proliferação de células defeituosas ou morte celular, ruptura do citoesqueleto, defeitos na capacidade migratória e síntese de pirimidinas (CORCORAN, 1998; FLEMING; COPP, 1998; HARRIS; JURILOFF, 1999; HERRERA; SAMPER; BLASCO, 1999). Níveis elevados de HC no sangue materno estão associados com aumento no risco de defeitos do tubo neural, defeitos no septo ventricular, defeitos no trato urinário, restrição do crescimento fetal e preeclampsia durante a gravidez (STEEGERS-THEUNISSEN *et al.*, 1994; CZEIZEL, 1996; LEEDA *et al.*, 1998).

O termo neurocristopatias refere-se a defeitos congênitos e condições patológicas associadas a defeitos na morfogênese das células da CN (BRAUER; TIERNEY, 2004). Elevadas concentrações de HC aumentam o risco de neurocristopatias (HEIDENREICH; REEDY; BRAUER, 2008), estando associadas a riscos de defeitos congênitos ligados à dismorfogênese das células da CN, incluindo defeitos craniofaciais e defeitos cardíacos cronotrunciais (BOTTO *et al.*, 1996; WONG *et al.*, 1999). Anomalias craniofaciais constituem pelo menos um terço de todas as anomalias congênitas e são consequência de defeitos na formação da crista neural (DIXON *et al.*, 2006).

1.3 ÁCIDO FÓLICO E HOMOCISTEÍNA

Fatores de nutrição materna parecem contribuir substancialmente para as complexas etiologias de DTNs e neurocristopatias. A suplementação com AF durante a gestação está

associada com a redução do risco dessas patologias (BLOM *et al.*, 2006), prevenindo de 50 a 75% dos casos de defeitos do tubo neural (DTN) (JURILOFF; HARRIS, 2000). Entretanto os mecanismos do efeito benéfico do AF ainda não estão completamente esclarecidos. Observações bioquímicas, genéticas e epidemiológicas têm levado ao desenvolvimento da hipótese que o AF previne defeitos do tubo neural por estimular reações de metilação celular (BLOM *et al.*, 2006). O estado nutricional dos pais pode afetar a qualidade dos gametas e a capacidade de fertilização. Há algumas evidências que sugerem que polimorfismos nas enzimas que metabolizam o folato podem estar associados com o aumento da possibilidade de não-disjunções meióticas. Outra evidência de que os riscos de DTNs sejam atenuados pela suplementação com AF é que respostas imunológicas podem ter influências no transporte de folato e que podem afetar o desenvolvimento embrionário (BLOM *et al.*, 2006). O estudo de Rothenberg e colaboradores (2004) demonstraram que anticorpos maternos se ligam à receptores de folato e bloqueiam a sua captação pelas células epiteliais da placenta, podendo causar DTNs, o que explicaria o efeito benéfico da suplementação de AF no período de gestação (BLOM *et al.*, 2006). O ácido fólico pode ter ainda uma função antioxidante, protegendo componentes celulares como membranas e DNA de danos causados por radicais livres (JOSHI *et al.*, 2001).

O folato é uma vitamina do complexo B solúvel em água que está presente em vegetais de folhas verdes, aspargos, brócolis, couve de Bruxelas, frutas cítricas, leguminosas, cereais secos, grãos integrais, levedura, feijão e fígado (KIM, 2007). O AF é a forma sintética do folato, mais estável e utilizada para uso em suplementos e alimentos fortificados (BLOM *et al.*, 2006), sendo convertida prontamente em derivados metabolicamente ativos requeridos para a síntese e funcionamento do DNA, proteínas e lipídeos (BJORKLUND; GORDON, 2006). Para que o AF seja envolvido no metabolismo do folato, ele precisa primeiramente ser convertido na forma natural bioativa tetrahydrofolato (THF), que ocorre juntamente com duas reações de redução catalisada pela dihydrofolato redutase. A adição de uma unidade de carbono e a sua subsequente redução passam a produzir 5-metiltetrahydrofolato (5-MeTHF) monoglutamato, a forma mais comum de folato na circulação. Do sangue, carreadores específicos ou receptores transportam 5-MeTHF para dentro das células (BJORKLUND; GORDON, 2006). No meio intracelular, a função do folato pode ser tanto como doador ou como aceptor de unidades de carbono em uma série de ciclos metabólicos interconectados que envolvem biossíntese de timidilato e purinas (adenosina e guanina), síntese da metionina através de HC, interconversão de serina e glicina, e metabolismo de histidina, que serão utilizados na síntese de DNA. No ciclo da metilação, o grupo metil do 5-MeTHF é transferido

para a HC, via vitamina B₁₂, para produzir metionina (Figura 3) (BLOM *et al.*, 2006).

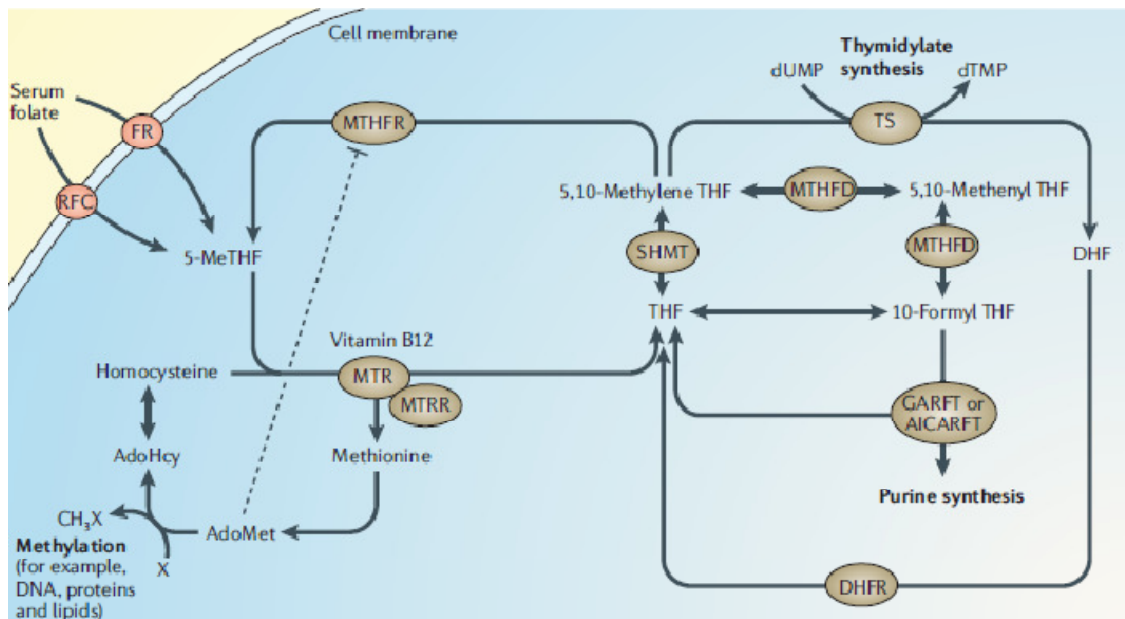


Figura 3. Metabolismo do Folato e Homocisteína. Na circulação sanguínea, o folato é normalmente presente na forma 5-metiltetrahydrofolato (5-MeTHF), o qual entra nas células via receptores e carreadores específicos. Na célula, o folato doa uma unidade de carbono para várias reações de metilação e síntese de purinas e timidina. Alternativamente, o folato pode também receber uma unidade de carbono de vários aminoácidos, incluindo a serina. A enzima Metileno-tetrahydrofolato redutase (MTHFR) compete com a timidilato sintase (TS) e metileno-tetrahydrofolato desidrogenase (MTHFD) por uma unidade de carbono da (5-MeTHF). A atividade da MTHFR é regulada pela S-adenosilmetionina (AdoMet), que inibe a atividade da enzima. A vitamina B₁₂ é um cofator da metionina sintase (MTR), envolvida na transferência do grupo metil do (5-MeTHF) para a homocisteína. AdoHcy, S-adenosilhomocisteína; AICARFT, aminoimidazolecarboxamido ribonucleotídeo transformilase; DHF, dihydrofolato; DHFR, DHF redutase; dTMP, deoxitimidina monofosfato; dUMP, deoxiuridina monofosfato; FR, receptor de fosfato; GARFT, glicinamida ribonucleotídeo transformilase; MTRR, MTR redutase; RFC, carreador de folato reduzido; SHMT, serina hidroximetiltransferase; THF, tetrahydrofolato. Fonte: Blom *et al.* (2006).

A deficiência de folato tem como consequência direta o aumento de níveis plasmáticos de HC (DE LA CALLE *et al.*, 2003). Assim, as concentrações de HC são inversamente proporcionais à concentração de derivados de folato (BJORKLUND; GORDON, 2006). O nível normal de HC no plasma de adultos humanos é de 5-15uM. Quando níveis de HC aumentam para 15-50uM a condição é geralmente referida como hiperhomocisteinemia. Situações em que os níveis plasmáticos de HC estão acima de 50uM, são usualmente referidas como hiperhomocisteinúria ou homocisteinúria (UELAND *et al.*, 1993). A HC é um aminoácido não-essencial contendo enxofre, o seu nível plasmático é regulado por vários fatores, incluindo deficiências nutricionais em vitaminas que atuam como co-fatores e co-substratos do metabolismo de HC/AF (vitaminas B₁₂ e B₆), ou defeitos genéticos nas enzimas responsáveis por esse metabolismo (SELHUB *et al.*, 1999). O ciclo da HC ocorre em todas as células com exceção dos eritrócitos, garantindo a adequada metilação

de numerosos componentes. Isto inclui a metilação de DNA (regula a expressão de genes), proteínas (importante na modificação pós-traducional), e lipídeos (importante na sua síntese, por exemplo, fosfatidilcolina). A metilação é também um importante passo no metabolismo de neurotransmissores e detoxificação de xenobióticos. Por essa razão, o metabolismo do AF é essencial para o funcionamento celular, especialmente durante períodos de rápido crescimento (BLOM *et al.*, 2006).

Várias desordens nutricionais levam a uma desregulação dos níveis de HC, incluindo deficiências de vitamina B₁₂, vitamina B₆ e de folato, já que essas substâncias são requeridas como cofatores por enzimas no ciclo da HC. Quando há uma deficiência nutricional do AF, os níveis do doador metil 5'- MTHF são insuficientes para prover uma unidade de carbono necessária para metilar a HC e originar metionina (BRAUER; ROSENQUIST, 2002), ocasionando aumento dos níveis plasmáticos (DE LA CALLE *et al.*, 2003), e acúmulo intracelular de HC (LIMPACH *et al.*, 2000), o que pode induzir a quebra do DNA, estresse oxidativo e apoptose no sistema nervoso (MATTSON; SHERMAN, 2003). Elevados níveis de HC em embriões e fetos podem ser explicados pela deficiência em transportadores de folato da mãe para o feto, ou mesmo defeitos do próprio metabolismo do folato que pode ser revertido pela suplementação do AF materno (BRAUER; ROSENQUIST, 2002).

Durante o desenvolvimento embrionário, a geração de novas células é um processo constante, sendo assim, embriões são sensíveis a níveis reduzidos de folato. O ectoderma neural e o neuroepitélio são os mais sensíveis de todos os tecidos embrionários, uma vez que placa neural expressa altos níveis de RNA mensageiro para receptores de folato, quando comparados a outros tecidos embrionários, como o do coração (ROSENQUIST; FINNELL, 2001). A hiperhomocisteinemia tem um impacto significativo sobre uma variedade de funções celulares que são importantes no início do desenvolvimento, incluindo mitose, apoptose, diferenciação, migração e proliferação (LATACHA; ROSENQUIST, 2005). Estudos indicam que altos níveis de HC podem alterar o comportamento migratório da CN *in vivo* e *in vitro*, aumentando a dispersão da área de superfície durante a migração em substrato de fibronectina (BRAUER; ROSENQUIST, 2002; TIERNEY *et al.*, 2004), e ainda, aumentar a taxa de adesão celular à laminina e à fibronectina em células de melanoma (que são embriologicamente derivadas da CN) (BRANDA; TRACY, 1990). Esses estudos sugerem uma possível consequência do elevado nível de HC nas células da CN através do distúrbio da aderência normal à matriz extracelular (HEIDENREICH; REEDY; BRAUER, 2008). Epeldegui e colegas (2002) demonstraram que elevados níveis de HC nos estágios iniciais da neurulação *in vivo*, resultam em numerosos DTNs de maneira dose-dependente.

Apesar da forte associação entre neurocristopatias e elevados níveis de HC, pouco se sabe a respeito dos efeitos da alta concentração de HC e deficiência de folato nos processos morfogênicos da CN (BRAUER; TIERNEY, 2004). Acredita-se que a HC possa alterar os padrões de migração, proliferação e diferenciação das células da CN, promovendo, conseqüentemente, o aparecimento dessas patologias, apesar dos estudos nesse sentido serem bastante escassos.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de homocisteína (HC) e ácido fólico (AF), na morfogênese das células da CN da região cefálica de embriões murinos, em cultura de células.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar os efeitos de HC e AF na migração das células da CN, avaliando o halo de migração a partir do tubo neural;
- b) Investigar os efeitos de HC e AF na proliferação e morte das células da CN, através da incorporação de BrdU e análise de núcleos picnóticos, respectivamente;
- c) Avaliar os efeitos de e HC e AF na diferenciação celular da CN avaliando a presença de marcadores de CN indiferenciada e de marcadores dos fenótipos neuronal, glial e de músculo liso, através da técnica de imunofluorescência.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados embriões de camundongos de 8,5 dias de gestação da linhagem C57BL/6. Os genitores foram obtidos de criação própria do biotério setorial do Laboratório, no Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, da Universidade Federal de Santa Catarina, sido mantidos em ambiente climatizado de 23-26° C, com ciclo de claro/escuro de 12 horas, e alimentados com água e ração *ad libitum*.

A utilização destes animais estava de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de ética no Uso de Animais (CEUA)/UFSC, em 03 de junho de 2005, sob o protocolo de pesquisa/ensino número 087/CEUA/PRPe/2007.

3.2 CULTURAS DE CÉLULAS DA CRISTA NEURAL CEFÁLICA DE CAMUNDONGO

As culturas primárias de CN cefálica de camundongos foram preparadas utilizando o método descrito por Ito e colaboradores (1995) e aperfeiçoado em nosso laboratório (COSTA-SILVA *et al.*, 2009). Os embriões foram removidos do útero com a utilização de pinças metálicas sob observação em microscópio estereoscópico (Olympus), sendo as pregas neurais posteriormente dissecadas com o auxílio de agulhas entomológicas de tungstênio (Figura 4).

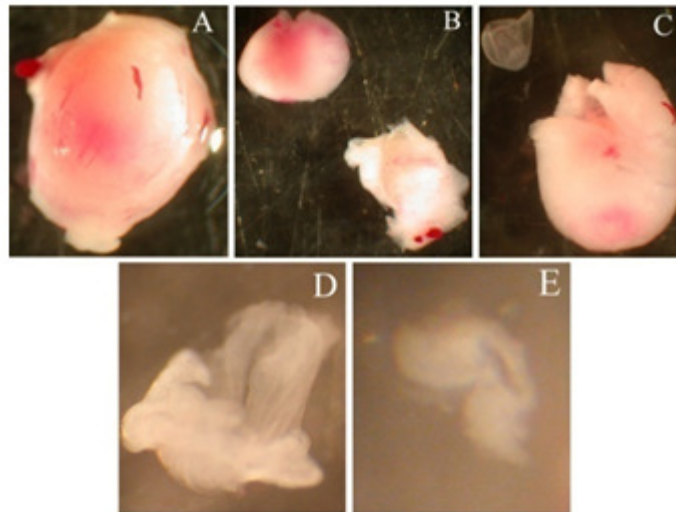


Figura 4. Procedimento cirúrgico para a remoção do embrião de camundongo de 8,5 dias e do tubo neural. (A) Útero (B) Membranas extraembrionárias e útero. (C) Âmnion com embrião e membranas extraembrionárias. (D) Embrião. (E) Porção da região cefálica. (Aumento:6x)

As pregas neurais foram colocadas sobre placas de cultura de 35 milímetros de diâmetro (Corning, NY, USA) previamente revestidas com 20 μ g/mL de fibronectina (FN) de plasma humano dissolvida em água e incubada à temperatura ambiente por um período de 45 minutos, de acordo com especificações do fabricante (Gibco BRL). As culturas foram crescidas em meio de cultura α -modified minimum essential (α -MEM; Gibco-BRL), contendo 10% de soro fetal bovino (Cultlab), 2% de extrato de embrião de galinha, hidrocortisona (0,1 μ g/mL), transferrina (10 μ g/mL), insulina (1ng/mL), 3-3'-5 triiodotironina (T_3) (0,4ng/mL), glucagom (0,01ng/mL), fator de crescimento epidermal (EGF) (0,1ng/mL), fator de crescimento de fibroblasto tipo 2 (FGF-2) (0,2ng/mL), penicilina (200 U/mL), estreptomicina (10 μ g/mL), HC nas concentrações de 0, 75, 150, e 300 uM, e/ou AF nas concentrações 45 e 90uM, e AF na concentração 90uM (todos fornecidos pela Sigma). A cultura foi mantida a 37°C em atmosfera com 5% CO₂ e 95% de umidade (Figura 5).

Para a realização das culturas secundárias, os explantes das pregas neurais foram removidos após 48 horas, e as células remanescentes, que correspondem às células migratórias da CN foram descoladas da placa de cultura com solução de tripsina-EDTA (Sigma) (Figura 5). Em seguida, as células foram centrifugadas durante 5 minutos a 200Xg, ressuspensas em meio de cultura e plaqueadas sobre FN (20 μ g/mL), mantendo-se as mesmas condições das culturas primárias por um período de 12 dias, com trocas de meio a cada 3 dias. As culturas foram então fixadas com paraformaldeído a 4% e submetidas à análise de imunofluorescência para a identificação dos fenótipos presentes, de acordo com o apresentado a seguir.

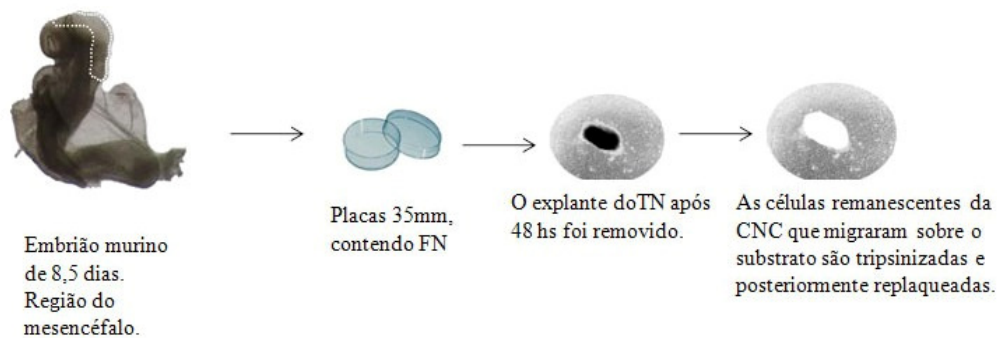


Figura 5. Esquema representativo da metodologia utilizada. A figura ilustra as principais etapas cumpridas para a realização das culturas primárias e secundárias da CN cefálica. FN, fibronectina; TN, tubo neural; CNC, crista neural cefálica.

3.3 ANÁLISE DA MIGRAÇÃO CELULAR

A morfologia e a medida do halo de migração das células da CN foram analisadas após 48 horas de cultura primária como descrito previamente por Costa-Silva e colaboradores (2009). A medida da área de migração das células da CN foi obtida pelo valor total da migração (halo de migração) descontado do valor da área do explante. Os valores foram obtidos pelo uso do *software* Universal Desktop Ruler (AVPSoft, Berlin, Germany) (COSTA-SILVA *et al.*, 2009).

3.4 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR

A proliferação celular foi avaliada no dia 6 de cultura por ensaio de incorporação de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU). As culturas de CN foram incubadas por 2 horas com BrdU (1:100, Invitrogen). As células foram lavadas com água destilada e então incubadas em ácido clorídrico 2N por 20 minutos a 37° C. As culturas foram novamente lavadas com PBS e submetidas à análise imunocitoquímica como descrito no item abaixo. Foram analisados 20 diferentes campos de cada condição experimental, em três experimentos independentes. O número total de células foi obtido por contagem direta dos núcleos corados com 1µg/ml DAPI (Sigma). A proliferação celular foi expressa como proporção de células BrdU positivas em

relação às células totais (COSTA-SILVA *et al.*, 2009).

A morte celular foi avaliada após o décimo segundo dia de cultura, através da análise de núcleos picnóticos com coloração por DAPI. O processo de picnose que ocorre no núcleo de células apoptóticas é caracterizado pela retração, condensação e fragmentação da cromatina, o que torna possível a identificação dessas células através do microscópio de epifluorescência. Foram analisados 20 diferentes campos de cada condição experimental, em três experimentos independentes. A morte celular foi expressa como proporção de núcleos apoptóticos em relação aos núcleos totais (COSTA-SILVA *et al.*, 2009).

3.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA

Para a análise da proliferação celular e expressão dos fenótipos de neurônios, célula gliais, músculo liso e células da CN foi utilizado o método de imunocitoquímica para fluorescência. As culturas foram fixadas após seis ou doze dias com paraformaldeído a 4% durante 20 minutos e, a seguir lavadas com solução de salina tamponada de fosfato (PBS) (pH 7,6). Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 10% de soro fetal bovino em PBS durante 1 hora. As células foram então lavadas com PBS e incubadas, por 1 hora a 37° C, com os anticorpos primários e secundários descritos no Quadro 1. Quando utilizado anticorpo secundário ligado a biotina, foram realizadas incubações posteriores com streptavidina (1:150), e tiramida (1:200) para amplificação da fluorescência com o kit de amplificação Tiramida (Tyramide Signal Amplification – TSA™ Fluorescein System, Perkin – Elmer) segundo orientações do fabricante. Posteriormente, as células foram novamente lavadas com PBS e então incubadas com DAPI para marcação nuclear. As placas foram montadas com glicerina tamponada (pH 9,0), observadas e fotografadas em microscópio epifluorescente (Olympus IX71) e fotografadas em câmara (Olympus DP71).

Foram analisados 20 diferentes campos de cada condição experimental, em sete experimentos independentes. O número total de células foi obtido por contagem direta dos núcleos das células marcadas. As proporções da expressão dos marcadores específicos para cada fenótipo foram analisadas pela porcentagem de células marcadas em relação às células totais, nas diferentes condições de culturas analisadas.

Quadro 1. Marcadores utilizados nas reações de imunocitoquímica.

<i>Fenótipo</i>	<i>Marcadores</i>	
	<i>Anticorpos primários</i>	<i>Anticorpos secundários</i>
Célula glial	Coelho contra proteína fibrilar ácida glial – GFAP (1:250 Dako)	Cabra contra IgG de coelho conjugado à fluoresceína Isotiocianato (FITC 1:80 – Sigma)
Músculo liso	Camundongo contra actina de músculo liso – SMA (1:300 Sigma)	Coelho contra IgG2a de camundongo ligado à fluoresceína Vermelho do Texas (TXRD 1:75 - Sountern Biotechnology)
Neurônio	Camundongo contra tubulina tipo β -III (1:2000 Promega)	Coelho contra IgG1 de camundongo ligado à fluoresceína Vermelho do Texas (TXRD 1:100 - Sountern Biotechnology)
Célula da crista neural	Coelho contra nestina (1:250 Abcam)	Cabra contra IgG de coelho ligado à fluoresceína AlexaFluor® 488 (1:250 – Invitrogen)
Célula da crista neural	Coelho contra p75 (1:150 Chemicon)	Cabra contra IgG de coelho ligado à fluoresceína AlexaFluor® 488 (1:250 – Invitrogen)
Proliferação celular	Camundongo contra BrdU (1:500 Calbiochem)	Cabra contra IgG de camundongo conjugado à biotina (1:50 - Perking Elmer)

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significância das diferenças entre as médias dos grupos experimentais foi avaliada por ANOVA de uma ou duas vias seguido de teste de Bonferroni. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$ em todos os casos. Todas as análises estatísticas foram realizadas através de software estatístico GraphPad Prism 4[®] (COSTA-SILVA *et al.*, 2009).

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DA HC E AF NA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CNC

Analisamos inicialmente o possível efeito da HC e do AF na migração das células da CN a partir do explante das pregas neurais. Verificamos que os tratamentos com essas substâncias isoladamente ou em conjunto (HC, HC/AF ou AF) não alteram significativamente a morfologia das células da CN que se mantêm fusiformes (Figura 6A e B). Observamos pequeno aumento, porém não significativo estatisticamente, da área de migração celular após 48 horas de cultura primária após os tratamentos com 75 e 150uM de HC. Por outro lado, um aumento significativo na área de migração celular, em relação ao controle, foi observado com o tratamento com 300uM de HC. Os resultados mostram ainda, que a adição de 45uM de AF previne parcialmente o efeito de estímulo à migração celular da HC a 300 uM, que se mantém ainda significativamente elevado em relação ao controle. No entanto, a adição de AF na concentração de 90 uM bloqueia totalmente o efeito de HC a 300 uM, que permanece aos níveis do controle. É importante ressaltar que o tratamento com 90uM de AF na ausência de HC não altera a migração celular da CN em relação ao controle.

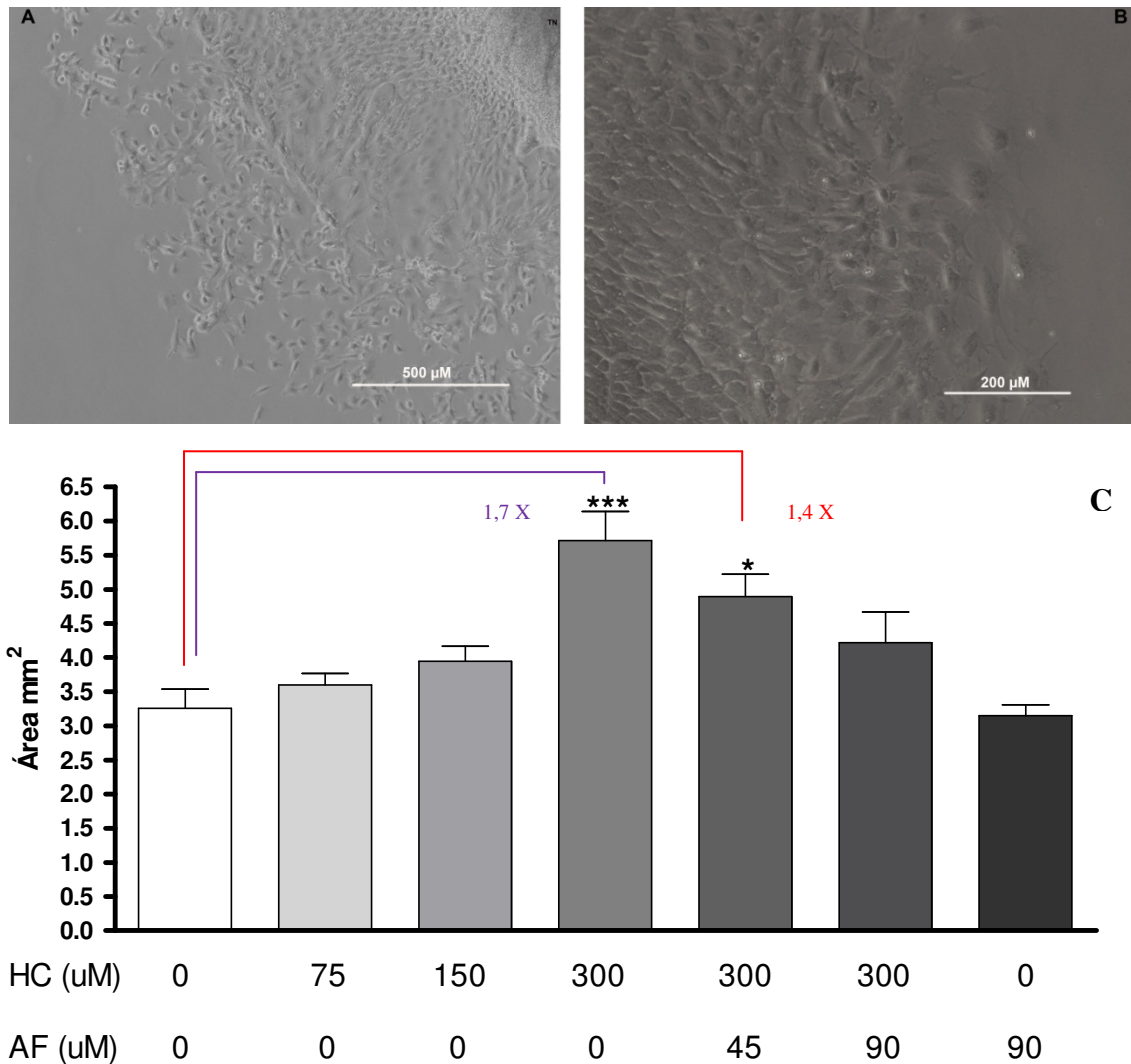


Figura 6. A e B- Migração das células da CN. Fotografias representativas de microscopia de contraste de fase de culturas primárias de células da CN após 48 horas. Aumento de 100x(A) e 200x (B). **C- Medida da área do halo de migração das células da CN.** Realizado após 48 horas de cultura primária na presença de HC, AF ou HC e AF. A área do halo de migração foi medida em mm² descontando-se a área do explante como descrito em Materiais e Métodos. Os valores expressam a média de 6 explantes \pm erro padrão em 3 experimentos. * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001 vs. controle (HC a 0uM e AF a 0uM) por ANOVA de uma via seguido de teste de Bonferroni.

4.2 EFEITO DA HC E AF NA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DA CN

A seguir analisamos por incorporação com BrdU um possível efeito de HC e AF na proliferação das células da CN em nossas condições de cultura. O BrdU é um análogo da timidina que é incorporado pelas células em divisão celular.(Figura 7A). A Figura 7B representa a proporção de células em proliferação no sexto dia de cultura secundária (células

BrdU positivas). Os resultados revelaram um aumento significativo na proliferação celular após os tratamentos com 150 e 300 μM de HC em relação ao controle. O efeito proliferativo da HC a 300 μM foi prevenido pela adição de AF nas concentrações de 45 e 90 μM . É importante salientar que AF na concentração de 90 μM não apresentou alteração na proliferação celular em relação ao controle.

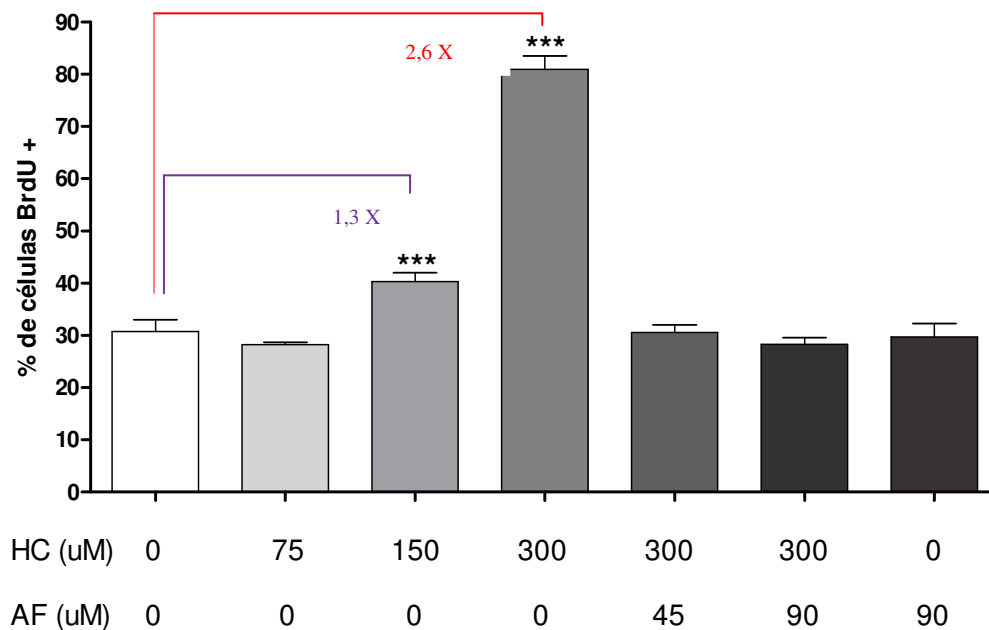
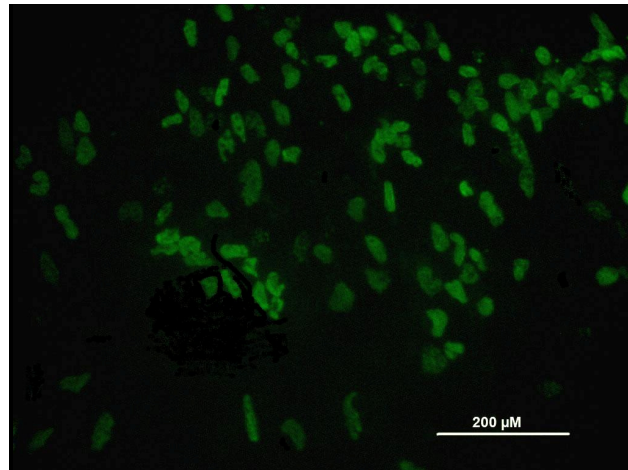


Figura 7. A- Fotografia representativa da proliferação celular. Células marcadas com BrdU. Aumento de 200x. **B- Efeito da HC na proliferação celular da CN.** A proliferação celular foi avaliada por incorporação de BrdU conforme descrito em materiais e métodos no dia 6 de cultura secundária. Os núcleos totais foram corados com DAPI. Os resultados são expressos como proporção de células BrdU positivas em relação às células totais. Os valores representam as médias \pm erro padrão de 3 experimentos. *** $P < 0,001$ vs. controle (HC a 0 μM e AF a 0 μM) por ANOVA de uma via seguido de teste de Bonferroni.

4.3 EFEITO DO AF E DA HC NA MORTE CELULAR DAS CÉLULAS DA CN

A seguir, investigamos se os tratamentos poderiam estar causando morte celular em massa nas culturas da CN, avaliando a proporção dos núcleos picnóticos (Figura 8 e Tabela 2). A Tabela 2 representa a proporção de núcleos apoptóticos após doze dias de cultura secundária nas várias condições de cultivo. Nossos resultados revelaram proporções entre 1,45% e 1,82% de núcleos picnóticos sem diferenças estatísticas entre as condições utilizadas.

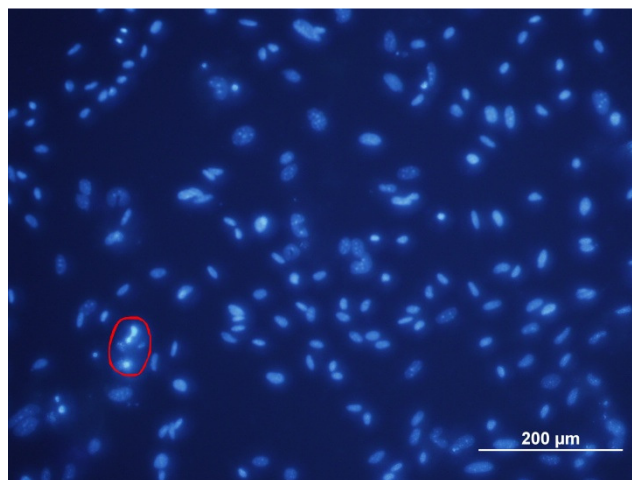


Figura 8. Fotografia representativa da morte celular. Núcleos picnóticos. Marcação dos núcleos feita por DAPI. Aumento de 200X.

Tabela 1. Efeito da HC e AF na morte das células da CN

Condições	Experimentos (% de núcleos picnóticos)								Média (%)	DP
Controle	2,58	1,66	1,89	1,03	1,96	1,33	1,08	1,6471	0,5113	
HC 75	1,32	1,67	1,78	1,62	1,84	1,09	1,54	1,5514	0,2452	
HC 150	2,54	1,49	1,48	1,31	1,97	2,08	1,87	1,8200	0,3956	
HC 300	1,32	1,95	1,24	2,14	1,69	1,23	1,99	1,6514	0,3587	
HC 300 + AF 45	1,69	1,07	1,61	1,25	1,43	1,89	1,21	1,4500	0,2723	
HC 300 + AF 90	1,43	1,77	1,54	1,71	1,34	1,04	1,89	1,5314	0,2688	
AF 90	1,5	2,14	1,89	1,57	-	-	-	1,7750	0,2570	

**Análise dos núcleos picnóticos, identificados por coloração com DAPI. Os valores representam as médias das proporções \pm desvio padrão de 7 ou 4 experimentos independentes.

4.4. EFEITO DA HC E AF NA EXPRESSÃO FENOTÍPICA DAS CÉLULAS DA CN

Para verificar se a HC e o AF influenciam a diferenciação das células da CN,

analisamos a expressão dos marcadores celulares de alguns derivados dessa estrutura por imunofluorescência no dia 12 de cultura secundária: α SMA (células de músculo liso), β -tubulina III (neurônios) e GFAP (células gliais) (Figura 9).

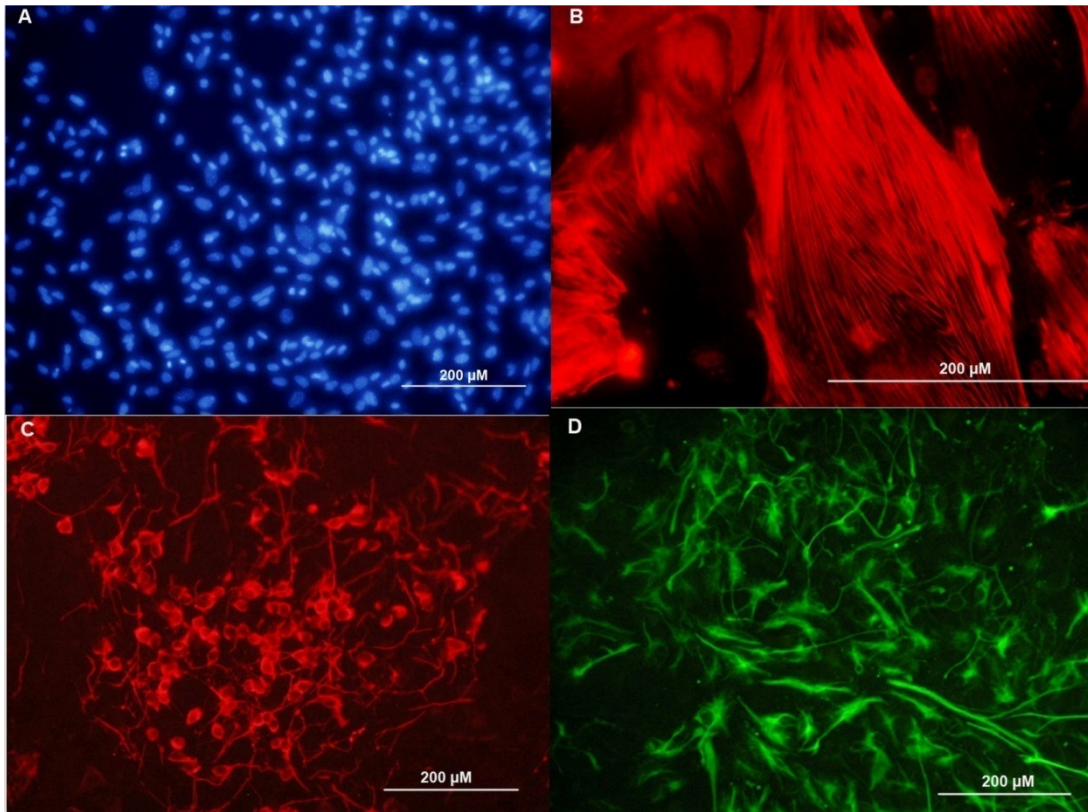


Figura 9. Fotografias representativas dos fenótipos celulares da CN aos 12 dias de cultura secundária. (A) Marcação dos núcleos por coloração com DAPI. Imunofluorescência indireta utilizando anticorpos (B) anti- α SMA (células de músculo liso), (C) anti- β -tubulina III (neurônios) e (D) anti-GFAP (células gliais). Aumento: 200x (A, C e D) e 400x (B).

4.4.1 Músculo liso

Após a realização das análises quantitativas, verificamos diferenças significativas nas proporções dos fenótipos celulares em algumas condições experimentais analisadas.

O fenótipo de músculo liso foi o mais freqüente nas culturas, com cerca de 15% das células sendo positivas para α SMA. O Tratamento com HC reduziu significativamente a proporção desse tipo celular em cerca de 2 vezes nas concentrações de 75 e 150uM, porém o efeito máximo foi observado na concentração de 300uM de HC reduzindo em 5 vezes a proporção desse fenótipo em relação ao controle. A adição de AF a partir da concentração de

45uM preveniu esse efeito da HC (Figura 10).

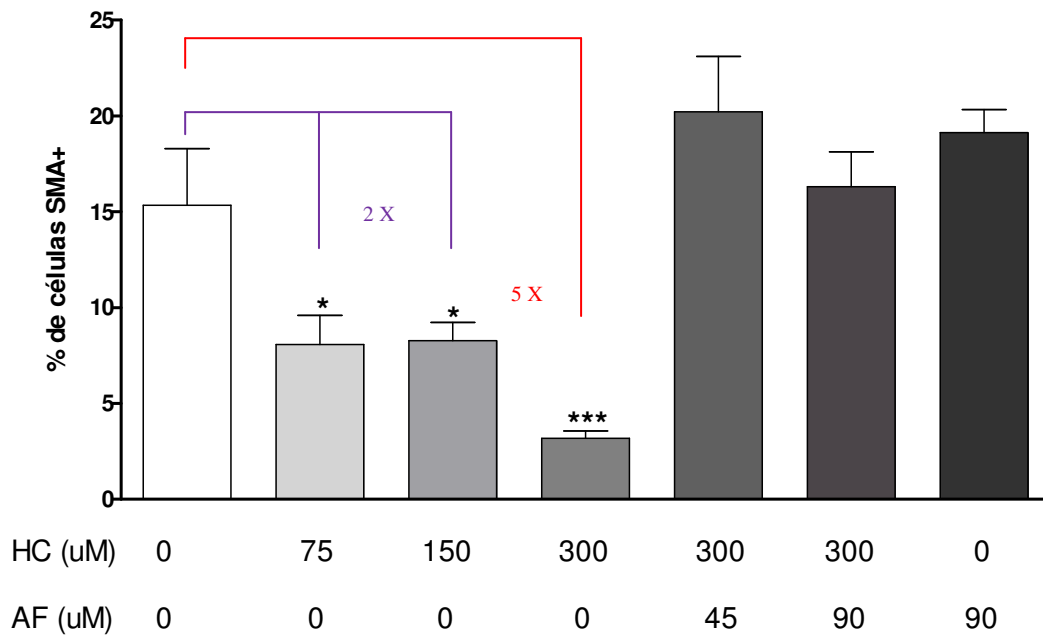


Figura 10. Análise quantitativa do efeito da HC e AF na expressão de células de músculo liso . Culturas secundárias da CN de 12 dias foram analisadas por imunofluorescência para identificação de células de músculo liso. Os resultados são expressos como proporção de células α SMA positivas em relação às células totais. Os valores representam as médias \pm erro padrão de 6 experimentos independentes. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ vs. controle (HC 0uM) por ANOVA uma via seguido de teste de Bonferroni.

4.4.2 Neurônios

O fenótipo neuronal apresentou uma frequência inferior a 2% nas culturas,. Não observamos diferenças significativas na proporção de neurônios nas condições analisadas. No entanto, os resultados mostram uma tendência de aumento na proporção de neurônios na presença de HC nas concentrações de 75, 150 e 300 uM e AF a 90uM na ausência de HC(Figura 11).

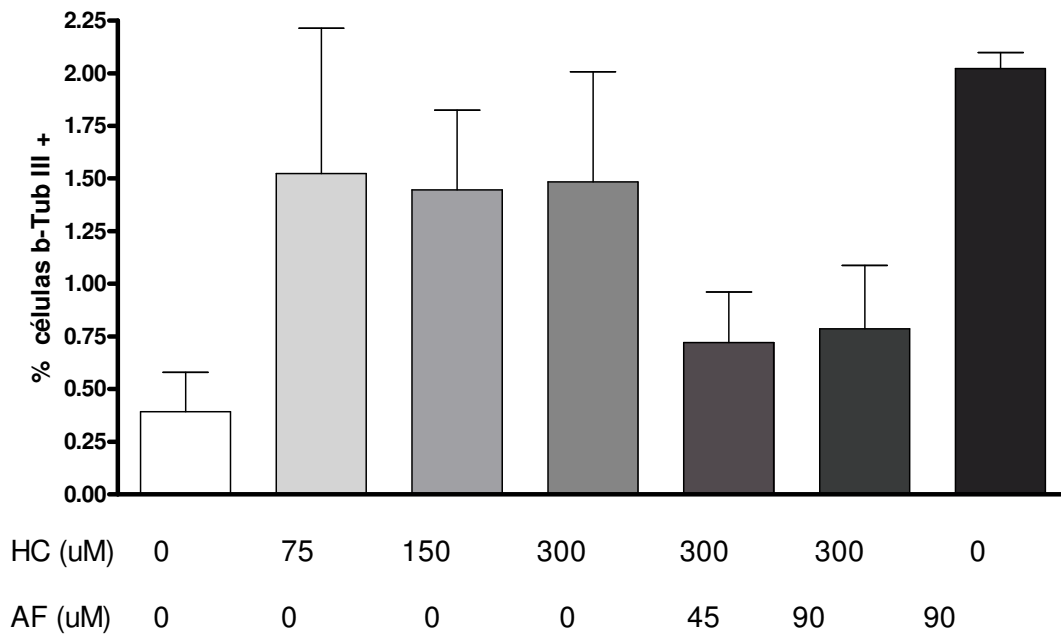


Figura 11. Análise quantitativa do efeito da HC e AF na expressão de neurônios. Culturas secundárias da CN de 12 dias foram analisadas por imunofluorescência indireta para identificação de células β -Tubulina III positivas. Os resultados são expressos como proporção de neurônios em relação às células totais. Os valores representam as médias \pm erro padrão de 6 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA uma via seguido de teste de Bonferroni.

4.4.3 Células gliais

A proporção das células gliais, identificadas pela presença do filamento de citoesqueleto GFAP, apresentou frequência inferior a 3% do total das células nas culturas. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas nas condições analisadas, verificamos uma tendência a aumento na proporção desse fenótipo após o tratamento com HC nas concentrações de 150 e 300 μ M (Figura 12).

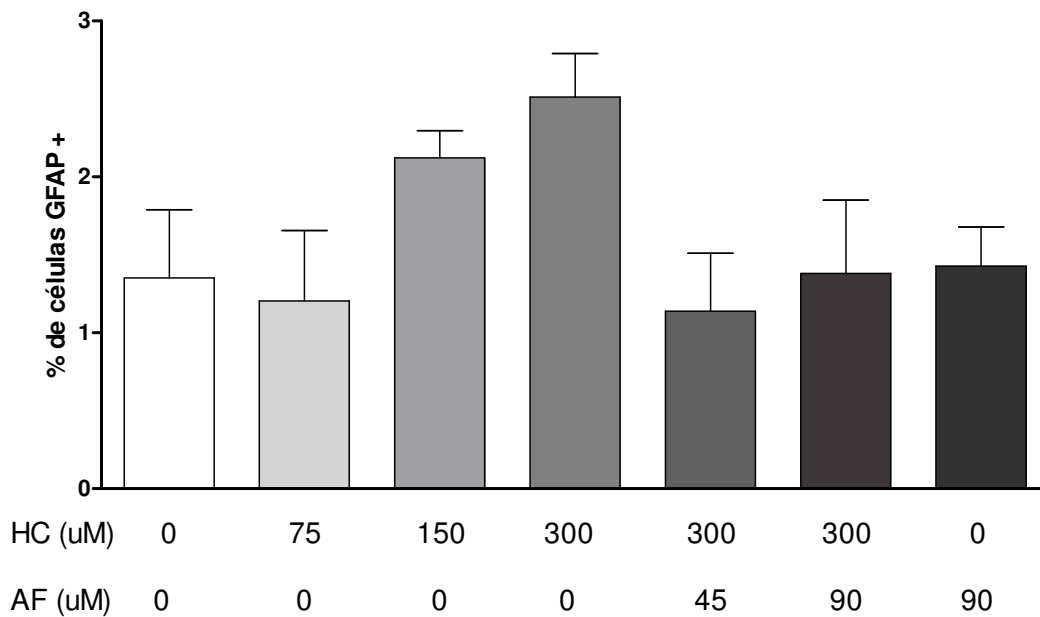


Figura 12. Análise quantitativa do efeito da HC e AF na expressão de células gliais. Culturas secundárias da CN de 12 dias foram analisadas por imunofluorescência indireta para identificação de células GFAP positivas. Os resultados são expressos como proporção de células gliais em relação às células totais. Os valores representam as médias \pm erro padrão de 6 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por ANOVA uma via seguido de teste de Bonferroni.

4.4.4 Células da CN indiferenciadas

Para verificar se a HC e o AF estariam mantendo as células da CN num estágio indiferenciado, foram analisadas a expressão de dois marcadores de CN indiferenciada: nestina e p75.

4.4.4.1 Células Nestina +

As células da CN expressaram nestina (Figura 13A), um marcador de filamento intermediário presente em células progenitoras, em uma frequência de 22,31% na condição controle. Observamos que a HC 300 μ M aumenta de forma significativa a proporção de células nestina positivas passando esse valor para cerca de 40%, o que representa um aumento de aproximadamente 2 vezes. A adição de AF previne esse efeito, mantendo a frequência das células nestina positivas nos níveis do controle. A adição de AF isoladamente não altera

estatisticamente o número de células nestina positivas quando comparada ao controle (Figura 13B).

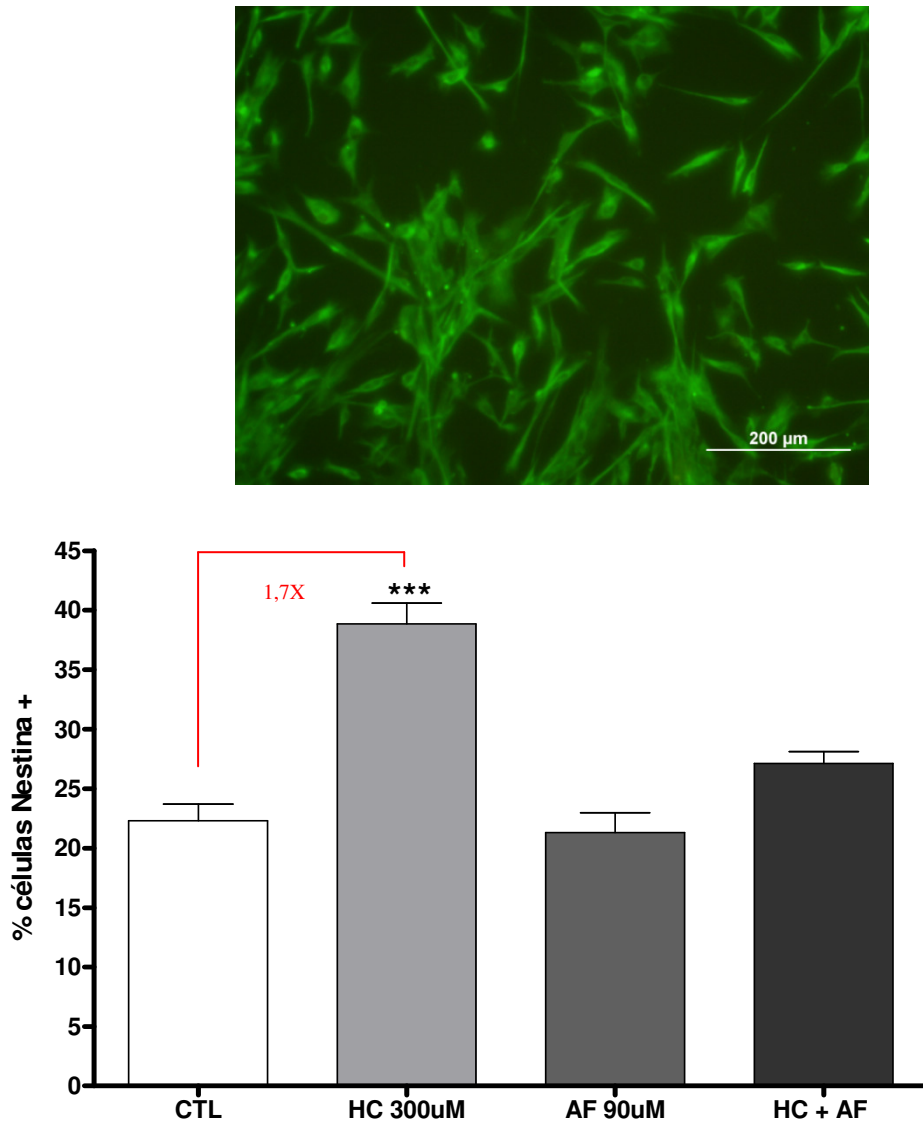


Figura 13. A- Fotografia representativa de células indiferenciadas da CN positivas para nestina aos 12 dias de cultura secundária. Aumento: 200x. **B-** Análise quantitativa do efeito da HC e AF na expressão de nestina. Culturas secundárias da CN de 12 dias foram analisadas por imunofluorescência indireta como descrito em Materiais e Métodos. Os resultados são expressos como proporção de células nestina positivas em relação às células totais. Os valores representam as médias \pm erro padrão de 3 experimentos independentes. *** $P < 0,001$ vs. controle (HC 0uM) por ANOVA uma via seguido de teste de Bonferroni.

4.4.4.2 Células p75+

Células expressando a proteína p75 (Figura 14A) foram observadas numa frequência de 12,80 e 12,44% na condição controle, em 4 e 12 dias de cultura, respectivamente.

Observamos que a HC aumenta a porcentagem de células p75 positivas para 31,52 e 21,94 % em 4 e 12 dias, respectivamente, representando aumentos de 2,5 vezes em 4 dias e 1,8 vezes em 12 dias. A adição de AF preveniu também esse efeito da HC, apresentando valores semelhantes a condição controle. O tratamento com AF isoladamente não apresentou diferenças significativas na porcentagem de células p75 positivas em relação ao controle (Figura 14B).

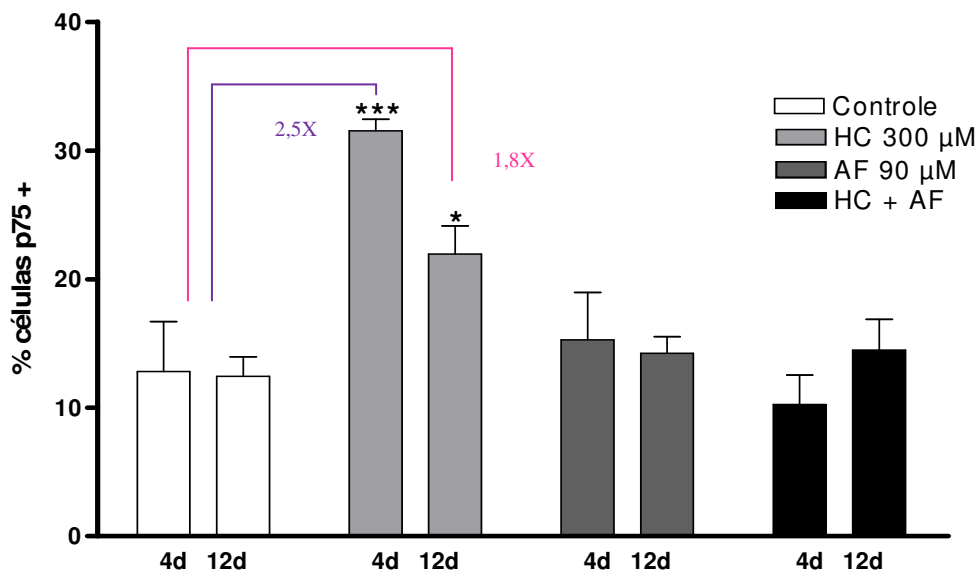
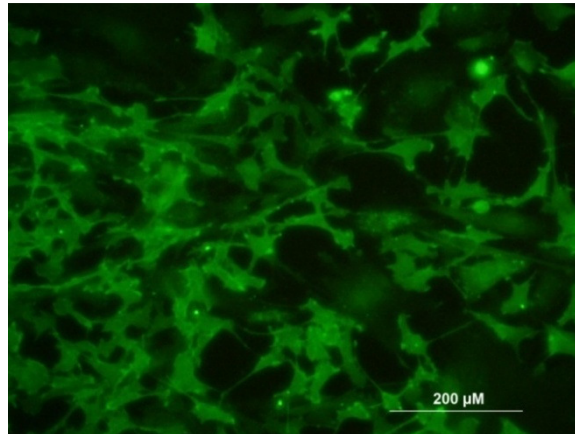


Figura 14. A- Fotografia representativa de células indiferenciadas da CN positivas para p75 aos 12 dias de cultura secundária. Imunofluorescência indireta utilizando anticorpo anti-p75 Aumento: 200x. **B- Análise quantitativa do efeito da HC e AF na expressão de células p75 positivas, aos 4 e 12 dias de cultura secundária.** Os resultados são expressos como proporção de células p75 positivas em relação às células totais. Os valores representam as médias \pm erro padrão de 3 experimentos independentes. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ vs. controle (HC 0µM) por ANOVA duas vias seguido de teste de Bonferroni.

5 DISCUSSÃO

Embora alguns estudos tenham sugerido que a redução de AF na corrente sanguínea esteja associada ao aumento dos níveis plasmáticos de HC, podendo levar a más-formações congênitas (defeitos no tubo e na CN), o mecanismo pelo qual a HC apresenta esse papel teratogênico ainda permanece desconhecido ver revisão: (BLOM *et al.*, 2006; GREENE; MASSA; COPP, 2009). No presente trabalho, nós demonstramos que a HC aumentou de maneira dependente da concentração a migração e a proliferação das células da CN cefálica de camundongo. Além disso, HC apresentou também efeito significativo na diferenciação celular, reduzindo o fenótipo de músculo liso e aumentando a proporção de células da CN indiferenciadas. Todos esses efeitos nas células da CN foram prevenidos pela adição de AF, quando administrado concomitantemente a HC.

A CN corresponde a uma população de células pluripotentes que migram a partir do tubo neural para sítios distantes, onde interagem com outros tecidos e se diferenciam em vários tipos celulares, incluindo neurônios autonômicos, sensoriais e entéricos do sistema nervoso periférico; células gliais (incluindo células de Schwann dos nervos periféricos, células satélites dos gânglios periféricos e glia entérica); melanócitos, e certos tipos de células endócrinas e glandulares. Em adição a estes fenótipos, a CN cefálica dá origem à maior parte dos ossos e das cartilagens da face e do crânio produzindo também a derme facial, tecido adiposo, células do tecido conjuntivo associados com músculos e glândulas da cabeça, e músculo liso e pericitos, componentes dos vasos sanguíneos que irrigam o prosencéfalo e a área facial (COULY; COLTEY; LE DOUARIN, 1993; DUPIN; CALLONI; LE DOUARIN, 2010, LE LIEVRE; LE DOUARIN, 1975; ETCHEVERS *et al.*, 2001; DUPIN; CALLONI; LE DOUARIN, 2010).

A migração das células da CN a partir do tubo neural é acompanhada por uma transição epitélio-mesenquimal, envolvendo a perda de junções intercelulares, perda ou alteração de moléculas de adesão celular, aumento da atividade de proteases, aumento da produção de moléculas de matriz extracelular como FN e outras, reorganização do citoesqueleto e da motilidade celular (veja revisão CAMPBELL; DAYTON; SOHAL, 1986; ERICKSON; PERRIS, 1993; SIEBER-BLUM; ZHANG, 1997). Estudos realizados *in vivo* e *in vitro* em diferentes modelos animais mostraram que a FN é a principal molécula da matriz extracelular presente nas vias de migração das células da CN e desempenham um papel fundamental na sua adesão e motilidade (DUBAND; THIERY, 1982; BILOZUR; HAY,

1988; COSTA-SILVA *et al.*, 2009). Alguns fatores de crescimento solúveis presentes nos locais onde as células da CN migram são fundamentais para o desenvolvimento de seus derivados. Esses fatores incluem endotelina-3 (ET3), que promove a sobrevivência e proliferação de precursores bipotentes glia-melanocíticos, bem como células gliais e melanócitos comprometidos (LAHAV *et al.*, 1996; TRENTIN *et al.*, 2004), a molécula sinalizadora Shh, que é necessária para o desenvolvimento craniofacial, sendo expressa na endoderme da faringe ventral e no arco branquial da ectoderme durante a migração das células da CN cefálica (TAPADIA; CORDERO; HELMS, 2005; BRITO; TEILLET; LE DOUARIN, 2006; CALLONI *et al.*, 2007). O fator Shh pode regular a sobrevivência, adesão e diferenciação neuronal em vários estágios do desenvolvimento (AHLGREN; THAKUR; BRONNER-FRASER, 2002; OTA; ITO, 2003; ABZHANOV; TABIN, 2004; CALLONI *et al.*, 2007), o fator EGF que induz a diferenciação da CN para os fenótipos neuronais e melanocíticos, e o FGF2 que promove a diferenciação da CN para células gliais (BITTENCOURT, 2007; GARCEZ *et al.*, 2009).

As células da CN devem estabelecer interações particulares célula-substrato para desenvolver as forças tradicionais necessárias para sua translocação. Isso envolve a formação de contatos de adesão focal, complexas ligações celulares entre o citoesqueleto e a matriz extracelular capazes de manter a adesão ao substrato (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999). Estudos *in vitro* demonstraram que elevados níveis de HC aumentam a expansão das células da CN e a área em que essas células migram sobre substrato de FN, sugerindo mudanças nos contatos de adesão focal na CN. Esses estudos sugerem que a consequência de níveis elevados de HC pode ser a perturbação da adesão normal na matriz extracelular (BRAUER; ROSENQUIST, 2002). Entretanto, outros estudos mostram que a migração celular da CN e o número de células são reduzidos *in vivo* quando embriões são tratados com HC nos estágios precoces de desenvolvimento da placa neural (TIERNEY *et al.*, 2004). Nossos resultados de migração celular sugerem que a HC *in vitro* produz um aumento significativo na migração das células da CN da região cefálica de camundongos em 48 horas de cultura, e quando administrado conjuntamente com AF na concentração 45 μ M a taxa de migração ainda permanece alta, passando a reduzir aos níveis do controle somente na concentração de 90 μ M de AF. O tratamento apenas com 90 μ M de AF não promoveu alterações notáveis na migração celular, confirmando o efeito da HC nesse processo celular.

Vários estudos têm demonstrado que a HC pode aumentar ou diminuir a proliferação celular *in vitro*, dependendo do tipo celular (TYAGI, 1998; NAGAI *et al.*, 2001; CHAVARRIA *et al.*, 2003). Esses efeitos divergentes podem estar relacionados com a origem

embrionária das células. Níveis elevados de HC têm pequeno efeito na proliferação das células vasculares de músculo liso que são derivadas embriologicamente da mesoderme, entretanto aumentam a proliferação de células vasculares de músculo liso derivadas da CN (DALTON *et al.*, 1997). De fato, em nossos experimentos observamos aumento significativo na proporção de células BrdU positivas após o tratamento com HC, sendo este efeito dose-dependente, sugerindo que a HC promove a proliferação de células da CN. É importante salientar que a adição de AF ao meio contendo 300uM de HC, foi capaz de prevenir o aumento da proliferação celular que permaneceu nos valores do controle.

O principal efeito da homocisteína em muitos sistemas é o aumento da apoptose (SULIK; COOK; WEBSTER, 1988; DUNTY *et al.*, 2001), não sendo o caso da ectoderme neural de embriões, onde o efeito da HC parece ser resultado de um mecanismo mais sutil, onde os principais efeitos estão relacionados com mudanças no tempo e na regulação dos padrões de diferenciação e migração celular, ao invés de um evento drástico, como a morte celular programada (BRAUER; ROSENQUIST, 2002; TIERNEY *et al.*, 2004). Nossos resultados estão de acordo com a hipótese de que HC não promove morte celular acentuada, uma vez que a proporção de núcleos picnóticos manteve-se baixa e sem alterações significativas em todas as condições testadas. Apesar disso, não podemos descartar um efeito específico da HC na morte celular de determinados progenitores.

A diferenciação celular das sublinhagens derivadas da CN envolve uma série de transições nas quais as propriedades das células progenitoras progressivamente se modificam (ANDERSON, 1989). O fenótipo expresso pelas células da CN *in vivo*, parece ser consequência de limitações graduais em suas potencialidades impostas à medida que encontram diferentes microambientes embrionários durante sua fase migratória (Le Douarin, 1982). De fato, em experimentos anteriores do laboratório verificamos que FN exibe uma atividade seletiva em promover a sobrevivência e a diferenciação das células progenitoras unipotentes e oligopotentes da CN com potencial para músculo liso sugerindo um papel importante da FN na regulação do desenvolvimento das estruturas cardiovasculares (COSTA-SILVA *et al.*, 2009). Nosso grupo de pesquisa avaliou também a influência de determinados fatores de crescimento na diferenciação da CN, como a molécula Shh, que induz a expressão de um conjunto de genes que são críticos para a padronização das estruturas faciais (CALLONI *et al.*, 2007; LE DOUARIN; BRITO; CREUZET, 2007), e embora favoreça a expressão de fenótipos mesenquimais, é particularmente eficaz na condução das células da CN cefálica ao longo de um programa de diferenciação condrogênico (TEILLET *et al.*, 1998; CALLONI *et al.*, 2007; DWYER *et al.*, 2007). Além disso, Garcez e colaboradores (2009),

demonstraram pela primeira vez que o EGF induz a diferenciação da CN para os fenótipos neuronais e melanocíticos, enquanto o FGF2 promove a diferenciação da CN para células de Schwann. Na presença de ambos FGF2 e EGF, a diferenciação neuronal predomina. Estes resultados sugerem que estes dois fatores de crescimento podem desempenhar um papel importante no destino da decisão de progenitores da CN e no desenvolvimento do sistema nervoso periférico (GARCEZ *et al.*, 2009). Vários experimentos têm demonstrado que o FGF2 é um mitógeno importante na manutenção e proliferação de progenitores multipotentes *in vitro* (GRITTI *et al.*, 1999; TROPEPE *et al.*, 1999). O FGF2 parece estimular a renovação e proliferação dos precursores mais indiferenciados e pluripotentes da CN mantendo-os indiferenciados. Ao mesmo tempo o fator estimula programas de diferenciação celular para as linhagens glial e neuronal em detrimento da diferenciação melanocítica e de músculo liso, cuja diferenciação terminal só ocorre com a retirada de FGF2 (BITTENCOURT, 2007). Estudos *in vitro* têm demonstrado que altas concentrações de HC aumentam a motilidade celular e a área de proliferação das células da CN, mas diminuem a diferenciação em células de músculo liso e células nervosas (BOOT *et al.*, 2003). Esses resultados mostram que a CN é altamente responsiva ao microambiente.

Em nossos experimentos, a análise dos fenótipos presentes em cada condição nos permite sugerir que a HC atua de maneira diferente nos diversos progenitores da CN. Os fenótipos célula glial e neurônio não apresentaram diferenças significativas de proporção nas diversas condições de cultura, o que sugere que a HC não apresenta influência sobre esses tipos celulares. Por outro lado, houve uma redução significativa na porcentagem do fenótipo de músculo liso na condição HC 300uM que foi prevenida pela adição de 45 e 90 uM de AF. O que sugere que a HC inibe a diferenciação dessas células ou pode estar aumentando a proliferação de progenitores bipotentes ou oligopotentes dessas células a partir da CN. As células de músculo liso, juntamente com os pericitos são os componentes das paredes musculares periendothelias de vasos sanguíneos maduros. Estas células têm sido mostradas como derivados da CN cefálica (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999) e em outras regiões do corpo, são derivadas da mesoderme ou a partir do epicárdio no caso dos vasos coronários (REAL *et al.*, 2005). As células nestina e p75 positivas são características da população de células multipotentes da CN, que possuem capacidade de auto-renovação e propriedades de diferenciação celular (CRANE; TRAINOR, 2006). Demonstramos que a HC apresenta um efeito notável nas células indiferenciadas da CN, uma vez que promoveu aumento significativo na proporção de células nestina e p75 positivas. A adição de AF preveniu esses efeitos. Em conjunto, nossos resultados sugerem que o efeito teratogênico da HC pode ocorrer

através do comprometimento do desenvolvimento do sistema vascular da região cefálica, por reduzir a expressão de células musculares lisas, diminuindo a sobrevivência ou a diferenciação de progenitores da CN comprometidos com esse fenótipo e levando a um aumento na proporção de progenitores indiferenciados, e desse modo levando ao surgimento de máis-formações crânio-faciais.

A morfogênese da CN requer eventos de padronização e determinação das células, proliferação (DALTON *et al.*, 1997), migração (BRAUER; ROSENQUIST, 2002; BOOT *et al.*, 2006), diferenciação celular (BOOT *et al.*, 2003) e apoptose (BOOT *et al.*, 2003; SACHDEV, 2005). O desenvolvimento embrionário é resultado da interação desses processos que ocorrem de forma rápida e coordenada. Portanto, o embrião é mais suscetível que o adulto a distúrbios nesses processos básicos (BRAUER; TIERNEY, 2004). Rosenquist e colaboradores (2007), assim como outros grupos de pesquisa têm demonstrado que a hiperhomocisteinemia tem um impacto significativo sobre uma variedade de funções celulares que são importantes no início do desenvolvimento. Pelo fato de a HC estar envolvida no metabolismo do DNA e de proteínas, e poder modificar proteínas e gerar radicais livres, o número de processos que sofrem distúrbios durante o desenvolvimento é inumerável. As características moleculares da HC e alguns de seus metabólitos lhes permitem provocar respostas celulares através de uma variedade de diferentes mecanismos, incluindo estresse oxidativo (TYAGI *et al.*, 2005), através de um receptor de glutamato (BRAUER; ROSENQUIST, 2002; BOLDYREV, 2005) ou através de perturbações no metabolismo da metionina (FINNELL *et al.*, 2002).

Investigações recentes têm identificado alvos moleculares e celulares para a ação direta de elevados níveis de HC nos processos celulares centrais do desenvolvimento (BRAUER; TIERNEY, 2004). Estudos *in vivo* onde altas concentrações de HC são administradas em embriões de galinha, resultaram em DTN, máis-formações orofaciais, defeitos no coração e no fechamento da linha média ventral, dependendo do tempo e concentração a que foram expostos. Assim como níveis elevados de HC no sangue materno e fluido amniótico estão relacionados à DTN, e defeitos congênitos do coração (BOOT *et al.*, 2004). Nossos resultados são coerentes com essas observações e nos permitem sugerir um comprometimento a nível de progenitores da CN. Neste trabalho não avaliamos a influência da HC na diferenciação da CN para os derivados ósseos e cartilagosos, mas o seu efeito sobre as células musculares lisas nos permite sugerir essa possibilidade uma vez que são todos derivados mesenquimais da CN.

O mecanismo pelo qual a HC parece influenciar a função celular varia com o tipo de

célula. Por exemplo, o endotélio embrionário parece ser mais afetado pelo estresse oxidativo (LATACHA; ROSENQUIST, 2005), enquanto a CN embrionária foi sugerida como sendo afetada através de um receptor de glutamato (BRAUER; ROSENQUIST, 2002). Há evidências de que em fases posteriores do desenvolvimento o receptor de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA) seja um dos principais reguladores da migração celular neuronal, da adesão célula-célula, do fluxo intracelular de cálcio, e da morte celular programada (CORNELL-BELL; THOMAS; SMITH, 1990; WANG *et al.*, 1996). A HC pode atuar como um antagonista do receptor NMDA (LIPTON *et al.*, 1997; ROSENQUIST *et al.*, 2007), e alguns estudos experimentais demonstram que antagonistas desse receptor estão associados com defeitos congênitos da CN e de derivados do tubo neural (ELMAZAR; NAU, 1995; CREWS *et al.*, 1996; ROSENQUIST; SCHNEIDER; MONOGHAM, 1999). Outra possível explicação seria que a HC poderia levar a perturbação de certos canais de cálcio ou a regulação de suas subunidades é conhecido como um fator inibitório do desenvolvimento de células da CN (CAREY; MATSUMOTO, 2000; KIOUS *et al.*, 2002; ROSENQUIST, *et al.*, 2007).

O aumento no nível de Ca^{2+} intracelular está ligado à muitas vias de sinalização mediadoras da adesão e migração celular (JIN *et al.*, 2005). A HC aumenta os níveis intracelulares de Ca^{2+} em plaquetas, células do gânglio da raiz dorsal, neurônios motores e células musculares lisas vasculares (MUJUMDAR *et al.*, 2000; LEONCINI *et al.*, 2006; HEIDENREICH *et al.*, 2008). Por isso, os efeitos da HC sobre as interações célula-célula e célula-substrato pode ser devido a um efeito na sinalização de Ca^{2+} intracelular. Heidenreich e colaboradores (2008) mostraram que a HC aumenta a adesão de células da CN de maneira dose e substrato dependente, sendo causado por um aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} , mediado provavelmente por um mecanismo dependente de inositol trifosfato (IP3), que causa uma liberação dos estoques de Ca^{2+} do retículo endoplasmático. A liberação de estoques de Ca^{2+} intracelular pode ativar e modular várias vias importantes que vão mediar principalmente a adesão e a migração celular (ROSEN *et al.*, 1994; PRICE *et al.*, 2003; LEBART; BENYAMIN, 2006).. Assim, a HC pode perturbar a sinalização normal de Ca^{2+} intracelular durante a morfogênese da CN, fornecendo uma possível explicação para os efeitos teratogênicos da HC (HEIDENREICH; REEDY; BRAUER, 2008).

Vários estudos têm mostrado que a hiperhomocisteinemia, assim como a deficiência de folato, podem induzir danos no DNA, quer por um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio ou por mecanismos biológicos diretamente associados com uma incorporação excessiva de uracila no DNA e no processo de metilação do DNA (FENECH,

2001; DUTHIE *et al.*, 2002), resultando em alterações genéticas, incluindo pontos de mutações, quebras cromossômicas, aumento da frequência de micronúcleos, recombinação de cromossomos defeituosos e aneuploidia (BRETELER, 2000). Assim, a manutenção da metilação do DNA é crucial para a expressão normal do gene e para a diferenciação celular (BOTTO *et al.*, 2003).

O anormal metabolismo do folato resulta em polimorfismos funcionais dos genes que codificam enzimas metabólicas, e tem sido associado a diversas doenças humanas, incluindo vários tipos de câncer (SKIBOLA *et al.*, 2004; KONO; CHEN, 2005), doenças cardiovasculares (SMULDERS; STEHOUWER, 2005; TRABETTI, 2008), doenças neurodegenerativas (ANELLO *et al.*, 2004) e defeitos no tubo neural (VAN DER PUT *et al.* 2001; COPPEDE, 2009; MOLLOY *et al.*, 2009). Os DTN podem ser causados a partir de anomalias genéticas relacionadas ao metabolismo do ácido fólico. Essas aberrações genéticas poderiam exercer sua influência através de defeitos de armazenamento, transporte, ou no próprio metabolismo do folato. O folato é uma molécula altamente hidrofílica, e, portanto, não consegue atravessar as membranas celulares por difusão, por isso existem sofisticados sistemas de transporte da membrana que evoluíram para facilitar a sua absorção pelas células de tecidos de mamíferos. Os receptores de folato, portanto, desempenhariam um papel crítico na internalização do folato pelas células. Assim, um transporte de folato defeituoso poderia estar envolvido na etiologia de DTN (VAN DER PUT *et al.*, 2001).

Outros estudos sugerem que o papel do AF durante a gravidez seria através do combate às espécies reativas de oxigênio, o AF estaria agindo como antioxidante e protegendo os bio-componentes como as membranas das células e o DNA, dos danos causados pelos radicais livres (JOSHI *et al.*, 2001; CETIN *et al.*, 2010). Alguns grupos sugerem que a ação do AF seria fornecer o grupo metil utilizado para a metilação pós-traducional de arginina e histidina nos domínios regulatórios altamente conservados do citoesqueleto, o que é necessário para a diferenciação do tecido neural. O tecido neural presuntivo necessita de elevados níveis de folato devido à atividade da fosfoetanolamina metil transferase, uma enzima envolvida na produção de lipídios específicos do tecido neural. O citoesqueleto compete por metilação com esta enzima, quando o fornecimento de folato é baixo e o citoesqueleto não é metilado corretamente, resulta em um tubo neural defeituoso (BJORKLUND; GORDON, 2006).

Nossos resultados reforçam a idéia de que a HC está diretamente ligada a defeitos congênitos do tubo neural e da CN, assim, a suplementação com AF durante a gravidez é de extrema importância para evitar esses defeitos, já que *in vitro*, pôde reverter os efeitos que

influenciaram os diversos aspectos da morfogênese da CN, estimulando a migração e a proliferação e comprometendo a diferenciação celular. Nós sugerimos um modelo (Figura 15) no qual a HC poderia estar provocando uma redução na proporção de células musculares lisas devido ao aumento da proliferação de progenitores mais indiferenciados, o que explicaria o aumento de células nestina e p75 positivas. Porém, ainda serão necessários outros estudos para verificar o mecanismo pelo qual a HC causa os defeitos no tubo neural e as neurocristopatias.

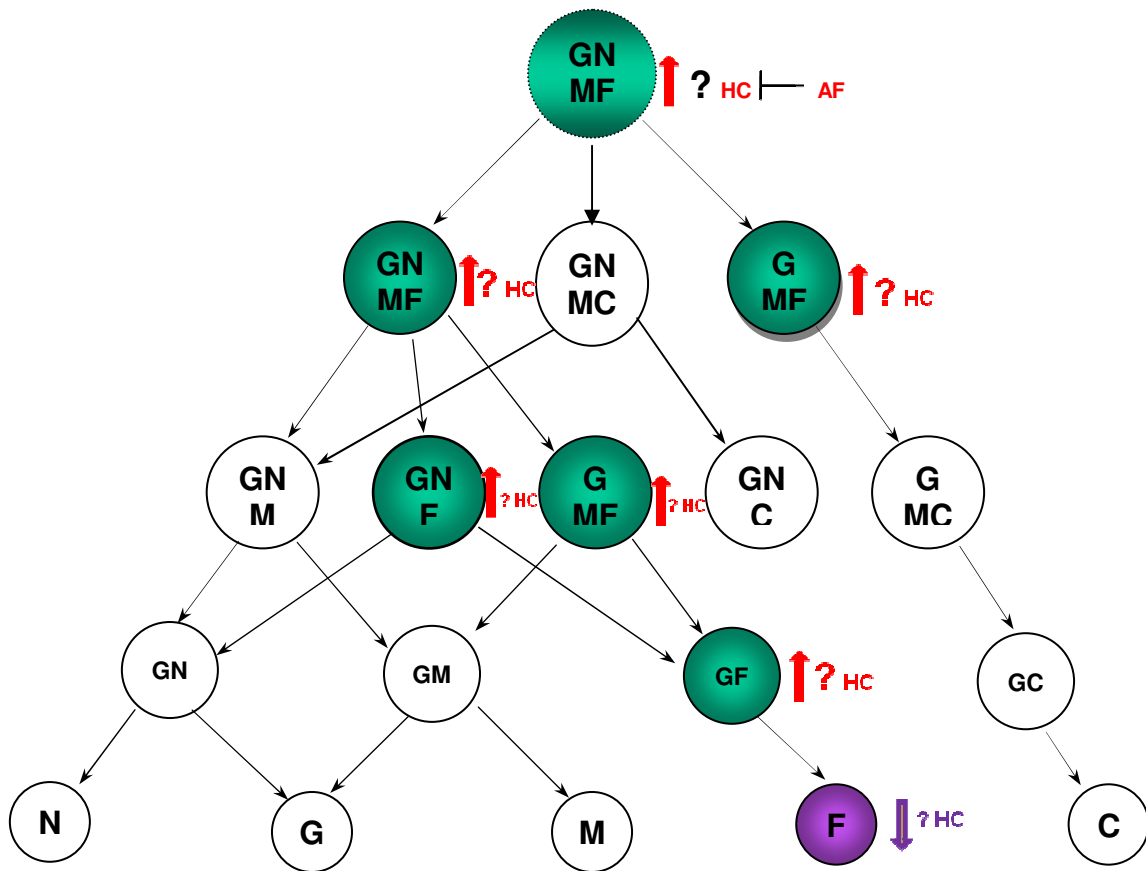


Figura 15. Modelo de linhagens celulares na CN. Progenitores são classificados de acordo com o número de potenciais de desenvolvimento. Células totipotentes da CN passam por restrições progressivas de desenvolvimento produzindo precursores intermediários oligopotententes e finalmente progenitores monopotententes que se diferenciam em neurônios (N), células gliais (G), melanócitos (M), miofibroblastos (F) e cartilagem (C). Adaptado de Barroffio et al (1991); Dupin et al. (2001) e Trentin et al. (2004). A existência do progenitor totipotente GMNFC é hipotética. Aqui nós demonstramos que os precursores GF, GMF, GNF e GMNF são estimulados pela HC (setas vermelhas) a se manterem indiferenciados. A HC também reduz a proporção de células de músculo liso (seta roxa). O ácido fólico reverte todos esses efeitos provocados pela HC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABZHANOV, A.; TABIN, C. J. Shh and Fgf8 act synergistically to drive cartilage outgrowth during cranial development. **Dev Biol**, v. 273, n. 1, p. 134-148, 2004.

AHLGREN, S. C.; THAKUR, V.; BRONNER-FRASER, M. Sonic hedgehog rescues cranial neural crest from cell death induced by ethanol exposure. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 16, p. 10476-10481, 2002.

ANDERSON, D. J. The neural crest cell lineage problem: neurogenesis? **Neuron**, v. 3, n. 1, p. 1-12, 1989.

BILOZUR, M. E.; HAY, E. D. Neural crest migration in 3D extracellular matrix utilizes laminin, fibronectin, or collagen. **Dev Biol**, v. 125, n. 1, p. 19-33, 1988.

BJORKLUND, N. K.; GORDON, R. A hypothesis linking low folate intake to neural tube defects due to failure of post-translation methylations of the cytoskeleton. **Int J Dev Biol**, v. 50, n. 2-3, p. 135-141, 2006.

BLOM, H. J.; SHAW, G. M.; DEN HEIJER, M.; FINNELL, R. H. Neural tube defects and folate: case far from closed. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 9, p. 724-731, 2006.

BOOT, M. J.; GITTENBERGER-DE GROOT, A. C.; POELMANN, R. E.; GOURDIE, R. G. Connexin43 levels are increased in mouse neural crest cells exposed to homocysteine. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v. 76, n. 2, p. 133-137, 2006.

BOOT, M. J.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P.; POELMANN, R. E.; VAN IPEREN, L.; GITTENBERGER-DE GROOT, A. C. Cardiac outflow tract malformations in chick embryos exposed to homocysteine. **Cardiovasc Res**, v. 64, n. 2, p. 365-373, 2004.

BOOT, M. J.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P.; POELMANN, R. E.; VAN IPEREN, L.; LINDEMANS, J.; GITTENBERGER-DE GROOT, A. C. Folic acid and homocysteine affect neural crest and neuroepithelial cell outgrowth and differentiation in vitro. **Dev Dyn**, v. 227, n. 2, p. 301-308, 2003.

BOTTO, L. D.; MOORE, C. A.; KHOURY, M. J.; ERICKSON, J. D. Neural-tube defects. **N Engl J Med**, v. 341, n. 20, p. 1509-1519, 1999.

BOTTO, L. D.; KHOURY, M. J.; MULINARE, J.; ERICKSON, J. D. Periconceptional multivitamin use and the occurrence of conotruncal heart defects: results from a population-based, case-control study. **Pediatrics**, v. 98, n. 5, p. 911-917, 1996.

BRANDA, R. F.; TRACY, P. B. Effects of nutritional folate deficiency on the adhesive properties of murine melanoma cells. **Cancer Lett**, v. 55, n. 2, p. 95-102, 1990.

BRAUER, P. R.; TIERNEY, B. J. Consequences of elevated homocysteine during embryonic development and possible modes of action. **Curr Pharm Des**, v. 10, n. 22, p. 2719-2732, 2004.

BRAUER, P. R.; ROSENQUIST, T. H. Effect of elevated homocysteine on cardiac neural crest migration in vitro. **Dev Dyn**, v. 224, n. 2, p. 222-230, 2002.

BRITO, J. M.; TEILLET, M. A.; LE DOUARIN, N. M. An early role for sonic hedgehog from foregut endoderm in jaw development: ensuring neural crest cell survival. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 31, p. 11607-11612, 2006.

CALLONI, G. W.; LE DOUARIN, N. M.; DUPIN, E. High frequency of cephalic neural crest cells shows coexistence of neurogenic, melanogenic, and osteogenic differentiation capacities. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 22, p. 8947-8952, 2009.

CALLONI, G. W.; GLAVIEUX-PARDANAUD, C.; LE DOUARIN, N. M.; DUPIN, E. Sonic Hedgehog promotes the development of multipotent neural crest progenitors endowed with both mesenchymal and neural potentials. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 50, p. 19879-19884, 2007.

CAMPBELL, L. R.; DAYTON, D. H.; SOHAL, G. S. Neural tube defects: a review of human and animal studies on the etiology of neural tube defects. **Teratology**, v. 34, n. 2, p. 171-187, 1986.

CHAVARRIA, T.; SANCHEZ-JIMENEZ, F.; QUESADA, A. R.; MEDINA, M. A. Homocysteine inhibits the proliferation and invasive potential of HT-1080 human fibrosarcoma cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 301, n. 2, p. 540-544, 2003.

CHOUDHARY, B.; ITO, Y.; MAKITA, T.; SASAKI, T.; CHAI, Y.; SUCOV, H. M. Cardiovascular malformations with normal smooth muscle differentiation in neural crest-specific type II TGFbeta receptor (Tgfb2) mutant mice. **Dev Biol**, v. 289, n. 2, p. 420-429, 2006.

CORCORAN, J. What are the molecular mechanisms of neural tube defects? **Bioessays**, v. 20, n. 1, p. 6-8, 1998.

CORNELL-BELL, A. H.; THOMAS, P. G.; SMITH, S. J. The excitatory neurotransmitter glutamate causes filopodia formation in cultured hippocampal astrocytes. **Glia**, v. 3, n. 5, p. 322-334, 1990.

COSTA-SILVA, B.; DA COSTA, M. C.; MELO, F. R.; NEVES, C. M.; ALVAREZ-SILVA, M.; CALLONI, G. W.; TRENTIN, A. G. Fibronectin promotes differentiation of neural crest progenitors endowed with smooth muscle cell potential. **Exp Cell Res**, v. 315, n. 6, p. 955-967, 2009.

COULY, G. F.; COLTEY, P. M.; LE DOUARIN, N. M. The triple origin of skull in higher vertebrates: a study in quail-chick chimeras. **Development**, v. 117, n. 2, p. 409-429, 1993.

CRANE, J. F.; TRAINOR, P. A. Neural crest stem and progenitor cells. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 22, n. p. 267-286, 2006.

CREWS, F. T.; MORROW, A. L.; CRISWELL, H.; BREESE, G. Effects of ethanol on ion channels. **Int Rev Neurobiol**, v. 39, n. p. 283-367, 1996.

CZEIZEL, A. E. Folic acid and prevention of birth defects. **JAMA**, v. 275, n. 21, p. 1635-1636, 1996.

DALTON, M. L.; GADSON, P. F., JR.; WRENN, R. W.; ROSENQUIST, T. H. Homocysteine signal cascade: production of phospholipids, activation of protein kinase C, and the induction of c-fos and c-myc in smooth muscle cells. **FASEB J**, v. 11, n. 8, p. 703-711, 1997.

DE LA CALLE, M.; USANDIZAGA, R.; SANCHA, M.; MAGDALENO, F.; HERRANZ, A.; CABRILLO, E. Homocysteine, folic acid and B-group vitamins in obstetrics and gynaecology. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 107, n. 2, p. 125-134, 2003.

DETRAIT, E. R.; GEORGE, T. M.; ETCHEVERS, H. C.; GILBERT, J. R.; VEKEMANS, M.; SPEER, M. C. Human neural tube defects: developmental biology, epidemiology, and genetics. **Neurotoxicol Teratol**, v. 27, n. 3, p. 515-524, 2005.

DUBAND, J. L.; THIERY, J. P. Distribution of fibronectin in the early phase of avian cephalic neural crest cell migration. **Dev Biol**, v. 93, n. 2, p. 308-323, 1982.

DUNTY, W. C., JR.; CHEN, S. Y.; ZUCKER, R. M.; DEHART, D. B.; SULIK, K. K. Selective vulnerability of embryonic cell populations to ethanol-induced apoptosis: implications for alcohol-related birth defects and neurodevelopmental disorder. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 25, n. 10, p. 1523-1535, 2001.

DUPIN, E.; CALLONI, G. W.; LE DOUARIN, N. M. The cephalic neural crest of amniote vertebrates is composed of a large majority of precursors endowed with neural, melanocytic, chondrogenic and osteogenic potentialities. **Cell Cycle**, v. 9, n. 2, p. 238-249, 2010.

DUTHIE, S. J.; NARAYANAN, S.; BRAND, G. M.; PIRIE, L.; GRANT, G. Impact of folate deficiency on DNA stability. **J Nutr**, v. 132, n. 8 Suppl, p. 2444S-2449S, 2002.

DWYER, J. R.; SEVER, N.; CARLSON, M.; NELSON, S. F.; BEACHY, P. A.; PARHAMI, F. Oxysterols are novel activators of the hedgehog signaling pathway in pluripotent mesenchymal cells. **J Biol Chem**, v. 282, n. 12, p. 8959-8968, 2007.

ELMAZAR, M. M.; NAU, H. Ethanol potentiates valproic acid-induced neural tube defects (NTDs) in mice due to toxicokinetic interactions. **Reprod Toxicol**, v. 9, n. 5, p. 427-433, 1995.

ERICKSON, C. A.; PERRIS, R. The role of cell-cell and cell-matrix interactions in the morphogenesis of the neural crest. **Dev Biol**, v. 159, n. 1, p. 60-74, 1993.

ESKES, T. K. From birth to conception. Open or closed. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 78, n. 2, p. 169-177, 1998.

ETCHEVERS, H. C.; VINCENT, C.; LE DOUARIN, N. M.; COULY, G. F. The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain. **Development**, v. 128, n. 7, p. 1059-1068, 2001.

FENECH, M. The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. **Mutat Res**, v. 475, n. 1-2, p. 57-67, 2001.

FINNELL, R. H.; GREER, K. A.; BARBER, R. C.; PIEDRAHITA, J. A. Neural tube and craniofacial defects with special emphasis on folate pathway genes. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 9, n. 1, p. 38-53, 1998.

FINNELL, R. H.; SPIEGELSTEIN, O.; WLODARCZYK, B.; TRIPLETT, A.; POGRIBNY, I. P.; MELNYK, S.; JAMES, J. S. DNA methylation in Folbp1 knockout mice supplemented with folic acid during gestation. **J Nutr**, v. 132, n. 8 Suppl, p. 2457S-2461S, 2002.

FLEMING, A.; COPP, A. J. Embryonic folate metabolism and mouse neural tube defects. **Science**, v. 280, n. 5372, p. 2107-2109, 1998.

GARCEZ, R. C.; TEIXEIRA, B. L.; SCHMITT SDOS, S.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A. G. Epidermal growth factor (EGF) promotes the in vitro differentiation of neural crest cells to neurons and melanocytes. **Cell Mol Neurobiol**, v. 29, n. 8, p. 1087-1091, 2009.

GREENE, N. D.; MASSA, V.; COPP, A. J. Understanding the causes and prevention of neural tube defects: Insights from the splotch mouse model. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v. 85, n. 4, p. 322-330, 2009.

HARRIS, M. J.; JURILOFF, D. M. Mini-review: toward understanding mechanisms of genetic neural tube defects in mice. **Teratology**, v. 60, n. 5, p. 292-305, 1999.

HEIDENREICH, D. J.; REEDY, M. V.; BRAUER, P. R. Homocysteine enhances cardiac neural crest cell attachment in vitro by increasing intracellular calcium levels. **Dev Dyn**, v. 237, n. 8, p. 2117-2128, 2008.

HERRERA, E.; SAMPER, E.; BLASCO, M. A. Telomere shortening in mTR^{-/-} embryos is associated with failure to close the neural tube. **EMBO J**, v. 18, n. 5, p. 1172-1181, 1999.

JIN, M.; GUAN, C. B.; JIANG, Y. A.; CHEN, G.; ZHAO, C. T.; CUI, K.; SONG, Y. Q.; WU, C. P.; POO, M. M.; YUAN, X. B. Ca²⁺-dependent regulation of rho GTPases triggers turning of nerve growth cones. **J Neurosci**, v. 25, n. 9, p. 2338-2347, 2005.

JOSHI, R.; ADHIKARI, S.; PATRO, B. S.; CHATTOPADHYAY, S.; MUKHERJEE, T. Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. **Free Radic Biol Med**, v. 30, n. 12, p. 1390-1399, 2001.

JURILOFF, D. M.; HARRIS, M. J. Mouse models for neural tube closure defects. **Hum Mol Genet**, v. 9, n. 6, p. 993-1000, 2000.

KIM, Y. I. Folate and colorectal cancer: an evidence-based critical review. **Mol Nutr Food Res**, v. 51, n. 3, p. 267-292, 2007.

KONO, S.; CHEN, K. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and colorectal cancer and adenoma. **Cancer Sci**, v. 96, n. 9, p. 535-542, 2005.

LAHAV, R.; ZILLER, C.; DUPIN, E.; LE DOUARIN, N. M. Endothelin 3 promotes neural crest cell proliferation and mediates a vast increase in melanocyte number in culture. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 9, p. 3892-3897, 1996.

LATACHA, K. S.; ROSENQUIST, T. H. Homocysteine inhibits extra-embryonic vascular development in the avian embryo. **Dev Dyn**, v. 234, n. 2, p. 323-331, 2005.

LE DOUARIN, N. M.; DUPIN, E. Multipotentiality of the neural crest. **Curr Opin Genet Dev**, v. 13, n. 5, p. 529-536, 2003.

LE DOUARIN, N. M.; BRITO, J. M.; CREUZET, S. Role of the neural crest in face and brain development. **Brain Res Rev**, v. 55, n. 2, p. 237-247, 2007.

LE LIEVRE, C. S.; LE DOUARIN, N. M. Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. **J Embryol Exp Morphol**, v. 34, n. 1, p. 125-154, 1975.

LEEDA, M.; RIYAZI, N.; DE VRIES, J. I.; JAKOBS, C.; VAN GEIJN, H. P.; DEKKER, G. A. Effects of folic acid and vitamin B6 supplementation on women with hyperhomocysteinemia and a history of preeclampsia or fetal growth restriction. **Am J Obstet Gynecol**, v. 179, n. 1, p. 135-139, 1998.

LIMPACH, A.; DALTON, M.; MILES, R.; GADSON, P. Homocysteine inhibits retinoic acid synthesis: a mechanism for homocysteine-induced congenital defects. **Exp Cell Res**, v. 260, n. 1, p. 166-174, 2000.

LIPTON, S. A.; KIM, W. K.; CHOI, Y. B.; KUMAR, S.; D'EMILIA, D. M.; RAYUDU, P. V.; ARNELLE, D. R.; STAMLER, J. S. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 11, p. 5923-5928, 1997.

MATTSON, M. P.; SHERMAN, M. Perturbed signal transduction in neurodegenerative disorders involving aberrant protein aggregation. **Neuromolecular Med**, v. 4, n. 1-2, p. 109-132, 2003.

NAGAI, Y.; TASAKI, H.; TAKATSU, H.; NIHEI, S.; YAMASHITA, K.; TOYOKAWA, T.; NAKASHIMA, Y. Homocysteine inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 281, n. 3, p. 726-731, 2001.

OTA, M.; ITO, K. Induction of neurogenin-1 expression by sonic hedgehog: Its role in development of trigeminal sensory neurons. **Dev Dyn**, v. 227, n. 4, p. 544-551, 2003.

PADMANABHAN, R. Etiology, pathogenesis and prevention of neural tube defects. **Congenit Anom (Kyoto)**, v. 46, n. 2, p. 55-67, 2006.

REAL, C.; GLAVIEUX-PARDANAUD, C.; VAIGOT, P.; LE-DOUARIN, N.; DUPIN, E. The instability of the neural crest phenotypes: Schwann cells can differentiate into myofibroblasts. **Int J Dev Biol**, v. 49, n. 2-3, p. 151-159, 2005.

ROSENQUIST, T. H.; FINNELL, R. H. Genes, folate and homocysteine in embryonic development. **Proc Nutr Soc**, v. 60, n. 1, p. 53-61, 2001.

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

ROSENQUIST, T. H.; BENNETT, G. D.; BRAUER, P. R.; STEWART, M. L.; CHAUDOIN, T. R.; FINNELL, R. H. Microarray analysis of homocysteine-responsive genes in cardiac neural crest cells in vitro. **Dev Dyn**, v. 236, n. 4, p. 1044-1054, 2007.

SACHDEV, P. S. Homocysteine and brain atrophy. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 29, n. 7, p. 1152-1161, 2005.

SELHUB, J.; JACQUES, P. F.; ROSENBERG, I. H.; ROGERS, G.; BOWMAN, B. A.; GUNTER, E. W.; WRIGHT, J. D.; JOHNSON, C. L. Serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey (1991-1994): population reference ranges and contribution of vitamin status to high serum concentrations. **Ann Intern Med**, v. 131, n. 5, p. 331-339, 1999.

SIEBER-BLUM, M.; ZHANG, J. M. Growth factor action in neural crest cell diversification. **J Anat**, v. 191 (Pt 4), n. p. 493-499, 1997.

SKIBOLA, C. F.; FORREST, M. S.; COPPEDE, F.; AGANA, L.; HUBBARD, A.; SMITH, M. T.; BRACCI, P. M.; HOLLY, E. A. Polymorphisms and haplotypes in folate-metabolizing genes and risk of non-Hodgkin lymphoma. **Blood**, v. 104, n. 7, p. 2155-2162, 2004.

SMULDERS, Y. M.; STEHOUWER, C. D. Folate metabolism and cardiovascular disease. **Semin Vasc Med**, v. 5, n. 2, p. 87-97, 2005.

STEEGERS-THEUNISSEN, R. P.; BOERS, G. H.; TRIJBELS, F. J.; FINKELSTEIN, J. D.; BLOM, H. J.; THOMAS, C. M.; BORM, G. F.; WOUTERS, M. G.; ESKEES, T. K. Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural-tube defects? **Metabolism**, v. 43, n. 12, p. 1475-1480, 1994.

SULIK, K. K.; COOK, C. S.; WEBSTER, W. S. Teratogens and craniofacial malformations: relationships to cell death. **Development**, v. 103 Suppl, n. p. 213-231, 1988.

TAPADIA, M. D.; CORDERO, D. R.; HELMS, J. A. It's all in your head: new insights into craniofacial development and deformation. **J Anat**, v. 207, n. 5, p. 461-477, 2005.

TEILLET, M.; WATANABE, Y.; JEFFS, P.; DUPREZ, D.; LAPOINTE, F.; LE DOUARIN, N. M. Sonic hedgehog is required for survival of both myogenic and chondrogenic somitic lineages. **Development**, v. 125, n. 11, p. 2019-2030, 1998.

TIERNEY, B. J.; HO, T.; REEDY, M. V.; BRAUER, P. R. Homocysteine inhibits cardiac neural crest cell formation and morphogenesis in vivo. **Dev Dyn**, v. 229, n. 1, p. 63-73, 2004.

TRABETTI, E. Homocysteine, MTHFR gene polymorphisms, and cardio-cerebrovascular risk. **J Appl Genet**, v. 49, n. 3, p. 267-282, 2008.

TRENTIN, A.; GLAVIEUX-PARDANAUD, C.; LE DOUARIN, N. M.; DUPIN, E. Self-renewal capacity is a widespread property of various types of neural crest precursor cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 13, p. 4495-4500, 2004.

TYAGI, N.; MOSHAL, K. S.; OVECHKIN, A. V.; RODRIGUEZ, W.; STEED, M.; HENDERSON, B.; ROBERTS, A. M.; JOSHUA, I. G.; TYAGI, S. C. Mitochondrial mechanism of oxidative stress and systemic hypertension in hyperhomocysteinemia. **J Cell Biochem**, v. 96, n. 4, p. 665-671, 2005.

TYAGI, S. C. Homocysteine redox receptor and regulation of extracellular matrix components in vascular cells. **Am J Physiol**, v. 274, n. 2 Pt 1, p. C396-405, 1998.

UELAND, P. M.; REFSUM, H.; STABLER, S. P.; MALINOW, M. R.; ANDERSSON, A.; ALLEN, R. H. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. **Clin Chem**, v. 39, n. 9, p. 1764-1779, 1993.

VAN DER PUT, N. M.; VAN STRAATEN, H. W.; TRIJBELS, F. J.; BLOM, H. J. Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 226, n. 4, p. 243-270, 2001.

WANG, C.; PRALONG, W. F.; SCHULZ, M. F.; ROUGON, G.; AUBRY, J. M.; PAGLIUSI, S.; ROBERT, A.; KISS, J. Z. Functional N-methyl-D-aspartate receptors in O-2A glial precursor cells: a critical role in regulating polysialic acid-neural cell adhesion molecule expression and cell migration. **J Cell Biol**, v. 135, n. 6 Pt 1, p. 1565-1581, 1996.

WONG, W. Y.; ESKES, T. K.; KUIJPERS-JAGTMAN, A. M.; SPAUWEN, P. H.; STEEGERS, E. A.; THOMAS, C. M.; HAMEL, B. C.; BLOM, H. J.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. Nonsyndromic orofacial clefts: association with maternal hyperhomocysteinemia. **Teratology**, v. 60, n. 5, p. 253-257, 1999.