



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

MANUELA SOZO CECCHINI

TOXICIDADE DA HOMOCISTEÍNA NO DESENVOLVIMENTO DAS VESÍCULAS
ÓPTICAS EM EMBRIÕES DE *Gallus domesticus*

FLORIANÓPOLIS

2019

MANUELA SOZO CECCHINI

TOXICIDADE DA HOMOCISTEÍNA NO DESENVOLVIMENTO DAS VESÍCULAS
ÓPTICAS EM EMBRIÕES DE *Gallus domesticus*

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em
Biologia Celular e do Desenvolvimento da
Universidade Federal de Santa Catarina, como
requisito parcial para a obtenção do título de
doutora em Biologia Celular e do
Desenvolvimento.

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

FLORIANÓPOLIS

2019

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

Cecchini, Manuela Sozo
Toxicidade da homocisteína no desenvolvimento das
vesículas ópticas em embriões de Gallus domesticus /
Manuela Sozo Cecchini ; orientador, Evelise Maria Nazari,
2019.
117 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento,
Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2.
Hiperhomocisteinemia. 3. Retina. 4. Mitocôndrias. 5.
Apoptose. I. Nazari, Evelise Maria. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

Manuela Sozo Cecchini

Toxicidade da homocisteína no desenvolvimento das vesículas ópticas em embriões de *Gallus domesticus*

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^ª. Dr^ª. Silvana Allodi

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Prof^ª. Dr^ª. Yara Maria Rauh Muller

Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Dr^ª. Carmen Simioni

Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Prof^ª. Dr^ª. Evelise Maria Nazari

Coordenadora do Programa

Prof^ª. Dr^ª. Evelise Maria Nazari

Orientadora

Florianópolis, 31 de julho de 2019

Dedico este trabalho ao homem da minha vida,
meu pai José Carlos Cecchini (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento pela infraestrutura e ensino de qualidade proporcionado ao longo destes 4 anos de formação, e à coordenação de aperfeiçoamento pessoal (CAPES) pela bolsa de doutorado concedida.

À minha querida orientadora Evelise Maria Nazari pelo seu profissionalismo, competência e dedicação ao longo desses anos trabalhando juntas, e por toda sua dedicação ao ensino superior e pós-graduação. Obrigada pelo acolhimento e ensinamentos científicos proporcionados durante este período...obrigada por tudo!

À professora Yara Maria Rauh Muller pelo exemplo de dedicação ao ensino, pelas experiências trocadas e por sua dedicação ao o Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Ao professor Fabiano Dahlke do Laboratório de Avicultura (CCA/UFSC) pelo fornecimento dos ovos fertilizados de *Gallus domesticus*.

Aos técnicos dos Laboratórios Multiusuários de Estudos em Biologia (LAMEB) e do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) pela disponibilidade e auxílio nas técnicas.

À toda equipe do Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (LRDA), pela troca de experiências, auxílios e momentos de descontração. Aos recém chegados e aos que já passaram durante este período: Aline, Cláudia, Eliane, Fabiana, Giuliam, Heloísa, Laíse, Luciane, Maico, Michael, Nathália, Neide, Thaline e Vanessa.

Aos queridos amigos Gilian, Madson, Maria Luísa, Thiciane por fazerem os momentos dentro e fora do laboratório serem mais prazerosos e divertidos. Muito obrigada!

Agradeço ao meu noivo Rafael Tavares pela paciência, sensibilidade, dedicação e suporte emocional durante este trajeto. Você fez a diferença no final desta trajetória.

A toda minha família, em especial minha mãe Inês e minha irmã Camila por sempre me incentivarem, pelas palavras de otimismo, por não me deixarem desanimar, pelo apoio incondicional e por entenderem minha ausência. Ao meu querido pai José Carlos (*in memoriam*), por toda sua dedicação e amor depositado em mim e por sempre me incentivar a ir além...minha eterna gratidão e saudade.

RESUMO

Elevados níveis do aminoácido homocisteína (Hcy) são caracterizados como uma desordem metabólica denominada – hiperhomocisteinemia, a qual está envolvida com a ocorrência de anomalias congênitas, principalmente no sistema nervoso central (SNC). Entretanto, os efeitos da Hcy durante o desenvolvimento das vesículas ópticas, sobretudo a retina, ainda não foram elucidados. O objetivo deste estudo foi caracterizar o efeito da elevada dose de Hcy durante o desenvolvimento das vesículas ópticas, utilizando como modelo experimental o embrião de *Gallus domesticus*. Ovos fertilizados de *G. domesticus* foram incubados (38°C) e tratados após 48 horas de incubação (E2). Foram organizados dois grupos experimentais: Controle - 50 µL salina; Hcy - 20 µmol Hcy/50 µL salina. As Análises foram realizadas nas vesículas ópticas dos embriões nas idades de E6 e E10. A Hcy reduziu a sobrevivência dos embriões nas duas idades de análise. Em E6 e E10 foi observado o aumento dos fatores vasculogênicos VEGF e VCAM, promovendo danos à integridade dos vasos sanguíneos. Proliferação e diferenciação neuronal foram reduzidas em E6 e E10 nos embriões tratados com Hcy, porém ocorreu uma maior modulação das proteínas envolvidas com a progressão e parada do ciclo na idade de E6. Dano ao DNA foi reconhecido apenas nos embriões tratados com Hcy em E6. Nas análises ultraestruturais, embriões tratados com Hcy apresentaram alterações como dilatação do envoltório nuclear, alterações mitocôndrias equivalentes a edemas, ruptura de membranas e de crista. No citoplasma foi observada a formação de membranas concêntricas e vesículas. Na idade de E10, além destas mesmas alterações, foi verificada a dilatação das cisternas do retículo endoplasmático nos embriões tratados com Hcy. A análise da dinâmica mitocondrial revelou o aumento da proteína Drp1 (fissão mitocondrial) e diminuição das proteínas Mfn1 e Mfn2 (fusão mitocondrial), nos embriões tratados com Hcy em E6 e E10. Essas alterações nas proteínas envolvidas com a dinâmica mitocondrial promoveram o aumento do número de perfis mitocondriais, bem como a redução da área destes, na idade de E10. Além disso, a Hcy reduziu a viabilidade celular nas duas idades de análise, mostrando seu efeito citotóxico principalmente para as mitocôndrias. Por fim, as alterações celulares encontradas nos embriões tratados com Hcy induziram dois mecanismos de resposta celular: autofagia, avaliada pela marcação com LC3II e apoptose, identificada pelo aumento de caspase-3 nos embriões em E10.

Palavras-chave: hiperhomocisteinemia; retina; mitocôndrias; dano ao DNA; apoptose.

ABSTRACT

High levels of amino acid homocysteine (Hcy) are characterized as a metabolic disorder named hyperhomocysteinemia, which is related to the occurrence of congenital anomalies, mainly in the nervous system (CNS). However, the effects of Hcy during the development of optic vesicles, especially the retina, have not been understood. The aim of this study was to characterize the effect of the high doses of Hcy during the development of the optical vesicles, using as an experimental model the embryo of *Gallus domesticus*. Fertilized eggs of *G. domesticus* were incubated (38 ° C), and treated after 48 hours of incubation (E2). Two experimental groups were organized: Control - 50 µl saline; Hcy - 20 µmol Hcy/50 µl saline. Embryos were analyzed at E6 and E10. Hcy reduced the survival of the embryos at both analysis ages. Increased vasculogenic factors VEGF and VCAM were observed at E6 and E10, promoting damage to the integrity of blood vessels. Proliferation and neuronal differentiation were reduced at E6 and E10 in the Hcy-treated embryos, however there was a greater modulation of the proteins involved with the progression and stopping of the cell cycle at E6. DNA damage was confirmed only in Hcy-treated embryos at E6. In ultrastructural analyses, embryos treated with Hcy showed alterations such as nuclear envelope dilation, mitochondrial alterations equivalent to edema, rupture of membranes and cristae. In the cytoplasm we observed the formation of concentric membranes and vesicles. At E10, in addition to these same alterations, dilation of the endoplasmic reticulum cisternae was verified in embryos treated with Hcy. The analysis of mitochondrial dynamics revealed the increase of Drp1 (mitochondrial fission) and decrease of Mfn1 and Mfn2 (mitochondrial fusion), in embryos treated with Hcy at E6 and E10. These changes in the proteins involved with the mitochondrial dynamics promoted an increase in the number of mitochondrial profiles as well as the reduction of the mitochondrial area at E10. In addition, Hcy reduced cell viability at both analysis ages, showing its cytotoxic effect mainly in mitochondria. Finally, cellular changes found in Hcy-treated embryos induced two cellular response mechanisms: autophagy, assessed by LC3II labeling and apoptosis, identified by the increase of caspase-3 in E10 embryos.

Keywords: hyperhomocysteinemia; retina; mitochondria; DNA damage; apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Via metabólica da Hcy.....	19
Figura 2	Desenvolvimento das vesículas encefálicas.....	25
Figura 3	Formação do olho em embrião de ave.....	27
Figura 4	Histogênese da retina em embrião de ave.....	29
Figura 5	Desenho experimental.....	40
Figura 6	Curvas de sobrevivência em embriões de <i>Gallus domesticus</i> após exposição aos tratamentos.....	47
Figura 7	Morfometria externa das vesículas ópticas em embriões de <i>Gallus domesticus</i> na idade de E6.....	48
Figura 8	Morfometria externa das vesículas ópticas em embriões de <i>Gallus domesticus</i> na idade de E10.....	49
Figura 9	Efeitos da Hcy sobre a espessura da retina neural de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E6 e E10.....	50
Figura 10	Quantificação das células positivas para as proteínas VEGF, VCAM- e IBA-1, nas vesículas ópticas de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E6.....	52
Figura 11	Quantificação das células positivas para as proteínas VEGF, VCAM- e IBA-1, nas vesículas ópticas de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10.....	52
Figura 12	Eletromicrografias do epitélio pigmentado da retina de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E6.....	53
Figura 13	Eletromicrografias do epitélio pigmentado da retina de embriões <i>Gallus domesticus</i> em E10.....	54
Figura 14	Eletromicrografias da retina neural em embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E6.....	55
Figura 15	Eletromicrografias das mitocôndrias das células da retina neural de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E6.....	56
Figura 16	Eletromicrografias das células da retina neural de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10.....	57
Figura 17	Eletromicrografias do RER e aparelho de Golgi das células da retina neural de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10.....	58
Figura 18	Eletromicrografias das vesículas das células da retina neural de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10.....	59
Figura 19	Eletromicrografias das mitocôndrias das células da retina neural de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10.....	60

Figura 20	Quantificação do número de células positivas para as proteínas p53, p21, PCNA e fosfo-histona H3, nas vesículas ópticas de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E6.....	62
Figura 21	Quantificação do número de células positivas para as proteínas p53, p21, PCNA e fosfo-histona H3, nas vesículas ópticas de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10.....	63
Figura 22	Quantificação do número de células positivas para a proteína γ -H2AX, nas vesículas ópticas de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E6 e E10.....	64
Figura 23	Quantificação do número de células positivas para as proteínas NeuN, vimentina, BDNF e GDNF, nas vesículas ópticas de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E6.....	66
Figura 24	Quantificação do número de células positivas para as proteínas β -tubulina III, GFAP, BDNF e GDNF, nas vesículas ópticas de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10.....	66
Figura 25	Viabilidade celular nas vesículas ópticas de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em idade de E6 e E10.....	67
Figura 26	Quantificação do número de células positivas para as proteínas Drp1, Mfn1, Mfn2, nas vesículas ópticas de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E6.....	69
Figura 27	Quantificação do número de células positivas para as proteínas Drp1, Mfn1, Mfn2, nas vesículas ópticas de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E10.....	69
Figura 28	Quantificação e morfometria dos perfis mitocondriais nas células da retina neural em embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E6 e E10.....	71
Figura 29	Efeito da Hcy sobre a interação entre mitocôndria e retículo endoplasmático.....	72
Figura 30	Efeito da Hcy sobre o conteúdo de vesículas autofágicas nas células da retina neural de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E6 e E10.....	73
Figura 31	Fragmentação de DNA em células das vesículas ópticas de <i>Gallus domesticus</i> após o tratamento com Hcy.....	74
Figura 32	Quantificação do número de células caspase-3-positivas nas vesículas ópticas de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em E6 e E10.....	75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Descrição dos anticorpos primários usados nas reações por citometria de fluxo.....	42
Quadro 2	Descrição dos anticorpos secundários usados nas reações por citometria de fluxo.....	43
Quadro 3	Alterações ultraestruturais da retina neural das vesículas ópticas de embriões de <i>Gallus domesticus</i> após o tratamento com Hcy.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	Ácido fólico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Bak	Proteína killer-antagonista homóloga a Bcl2, do inglês <i>Bcl2-antagonist killer</i>
Bcl2	Proteína da célula-B de linfoma 2, do inglês <i>B-cell lymphoma 2</i>
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro, do inglês <i>brain-derived neurotrophic factor</i>
CBS	Cistationa β -sintetase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>
Drp1	Proteína relacionada com dinamina 1, do inglês <i>dynammin-related protein 1</i>
DTN	Defeitos do tubo neural
EPM	Erro padrão da média
EPR	Epitélio pigmentado da retina
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FSC-A	Do inglês <i>forward scatter</i>
GDNF	Fator neurotrófico derivado do glia, do inglês <i>glial-derived neurotrophic factor</i>
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida, do inglês <i>Glial fibrillary acidic protein</i>
Hcy	Homocisteína, do inglês <i>homocysteine</i>
HE	Hematoxilina e Eosina
HH	Hamburger e Hamilton
LC3II	Do inglês <i>LC3-phosphatidylethanolamine conjugate</i>
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
Mfn1/2	Mitofusinas 1 e 2
MS	Metionina sintetase
NeuN	do inglês, <i>neuronal nuclei</i>
NMDA	N-metil D-Aspartato

Pax6	<i>Do inglês, Paired box protein-6</i>
PBS	Tampão fosfato salino, do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular, do inglês <i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PH3	Fosfohistona H3, do inglês <i>phospho histone H3</i>
$\Delta\psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
RE	Retículo endoplasmático
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RN	Retina neural
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SNC	Sistema nervoso central
TN	Tubo neural
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>
VEGF-R	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular, do inglês <i>receptor for vascular endothelial growth factor</i>

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 METABOLISMO DA HOMOCISTEINA.....	18
1.2 TOXICIDADE DA HIPERHOMOCISTEINEMIA.....	20
1.3 FORMAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM VERTEBRADOS: DESENVOLVIMENTO DAS VESÍCULAS ÓPTICAS.....	24
1.4 MORFOGÊNESE DA RETINA.....	27
1.5 IMPORTÂNCIA DA BARREIRA HEMATO-RETINIANA PARA O DESENVOLVIMENTO DAS VESÍCULAS ÓPTICAS.....	32
1.6 TOXICIDADE DA HOMOCISTEINA DURANTE O DESENVOLVIMENTO DAS VESÍCULAS ÓPTICAS.....	35
2 OBJETIVOS.....	38
2.1 OBJETIVO GERAL.....	38
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1 OBTENÇÃO E INCUBAÇÃO DOS OVOS DA ESPÉCIE DE <i>G. domesticus</i>	39
3.2 ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	39
3.3 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA.....	40
3.4 MORFOMETRIA DAS VESÍCULAS ÓPTICAS.....	41
3.5 PREPARO DOS EMBRIÕES PARA ANÁLISE MICROSCÓPICA.....	41
3.6 ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	42
3.7 ANÁLISES ULTRAESTRUTURAIS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	43
3.8 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	44
3.9 FRAGMENTAÇÃO DO DNA.....	45
3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	46
4 RESULTADOS.....	47

4.1 EFEITO DA HCY SOBRE A SOBREVIVÊNCIA DOS EMBRIÕES.....	47
4.2 ANÁLISE DA MORFOLOGIA EXTERNA DAS VESÍCULAS ÓPTICAS.....	47
4.3 EFEITO DA HCY NA ESPESSURA DA RETINA.....	49
4.4 EFEITO DA HCY NA INTEGRIDADE DA BARREIRA HEMATO-RETINIANA.....	51
4.5 EFEITO DA HCY NA ULTRAESTRUTURA DAS VESÍCULAS ÓPTICAS.....	53
4.6 EFEITO DA HCY NAS PROTEÍNAS RELACIONADAS AO CICLO CELULAR.....	61
4.7 EFEITO GENOTÓXICO DA HCY.....	63
4.8 EFEITO DA HCY SOBRE A DIFERENCIAÇÃO NEURAL.....	64
4.9 MITOCÔNDRIA COMO ALVO DA TOXICIDADE DA HOMOCISTEÍNA.....	67
4.9.1 Efeito da Hcy sobre a viabilidade celular.....	67
4.9.2 Efeitos da Hcy na dinâmica mitocondrial.....	67
4.9.3 Efeito da Hcy sobre o conteúdo e morfometria dos perfis mitocondriais durante o desenvolvimento das vesículas ópticas.....	70
4.9.4 Efeito da Hcy sobre a interação entre mitocôndria e retículo endoplasmático durante o desenvolvimento das vesículas ópticas.....	71
4.10. EFEITO DA HCY SOBRE O PROCESSO DE AUTOFAGIA.....	72
4.11 EFEITO DA HCY SOBRE A MORTE CELULAR NAS VESÍCULAS ÓPTICAS.....	74
4.11.1 Efeito da Hcy sobre a ativação da caspase-3 efetora da apoptose.....	75
5 DISCUSSÃO.....	77
5.1 EFEITO DA HCY NA SOBREVIVÊNCIA DOS EMBRIÕES E NA MORFOLOGIA DAS VESÍCULAS ÓPTICAS.....	77
5.2 EFEITO DA HCY NA INTEGRIDADE DOS VASOS SANGUÍNEOS...	79
5.3 EFEITO DA HCY SOBRE O CICLO CELULAR E DIFERENCIAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS NEURAIS.....	82
5.4 EFEITO DA HCY SOBRE A ULTRAESTRUTURA.....	87

5.5 EFEITO DA HCY NAS MITOCÔNDRIAS.....	89
5.6 EFEITO DA HCY SOBRE A MORTE CELULAR.....	92
6 CONCLUSÕES.....	94
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

1. INTRODUÇÃO

Os micronutrientes, vitaminas e minerais provenientes da dieta são elementos necessários para o crescimento, manutenção e reprodução dos indivíduos (DOWLING; WALD, 1961; BROOKE et al., 1980; HURLEY; DOANE, 1989). Durante o desenvolvimento embrionário de vertebrados, a nutrição materna é de extrema importância para o embrião em desenvolvimento, visto que seus órgãos em formação são mais suscetíveis e variações na disponibilidade ou a carência de determinado nutriente pode interferir no seu desenvolvimento natural (IYENGAR; RAJALAKSHMI, 1975; MCARDLE; ASHWORTH, 1999). As vitaminas são compostos orgânicos essenciais para o desenvolvimento, e embora sejam requeridas em pequenas quantidades, participam como coenzimas em importantes reações metabólicas, como a biossíntese de compostos essenciais (BENDER, 1984; ZEMPLINI et al., 2007). Devido a esta importante função, a carência de vitaminas durante o desenvolvimento pode provocar danos ao embrião, a exemplo do que ocorre quando há deficiência das vitaminas do complexo B, que acarreta diretamente o aumento dos níveis plasmáticos do aminoácido homocisteína (Hcy do inglês – *homocysteine*) (STEEGERS-THEUNISSEN et al., 1995; DE LA CALLE et al., 2003; OOSTERBAAN; STEEGERS; URSEM, 2012).

A relação entre deficiências nutricionais e o aumento dos níveis de Hcy no plasma sanguíneo tornou-se amplamente estudada após ser estabelecida a relação dessa condição com o aparecimento de anomalias congênitas (SMITHELLS; SHEPPARD; SCHORAH, 1976; STEEGERS-THEUNISSEN et al., 1995). Baseado neste fato e décadas após esta descoberta, inúmeras pesquisas foram realizadas para demonstrar a influência dos elevados níveis de Hcy em diversas condições, principalmente durante o desenvolvimento embrionário (ROSENQUIST; RATASHAK; SELHUB, 1996; VAN MIL; OOSTERBAAN; STEEGERS-THEUNISSEN, 2010; IACOBAZZI et al., 2014). Constata-se que devido a sua relevância clínica, os defeitos do tubo neural (DTN) e os outros acometimentos ao sistema nervoso central (SNC) são as alterações do desenvolvimento mais amplamente debatidas. A diferenciação e o desenvolvimento do SNC são processos coordenados e bastante complexos, sensíveis à ação de substâncias que podem comprometer tanto a sua morfologia quanto a fisiologia, levando ao comprometimento de diversas funções (TROEN, 2005). De maneira geral, os embriões são mais suscetíveis à ação de diferentes substâncias endógenas e exógenas, o que merece maior atenção quando se estudam as substâncias que afetam o SNC.

Ressalta-se que embora nos últimos anos uma gama de trabalhos têm demonstrado os efeitos nocivos da Hcy para órgãos e sistemas (VAN MIL; OOSTERBAAN; STEEGERS-

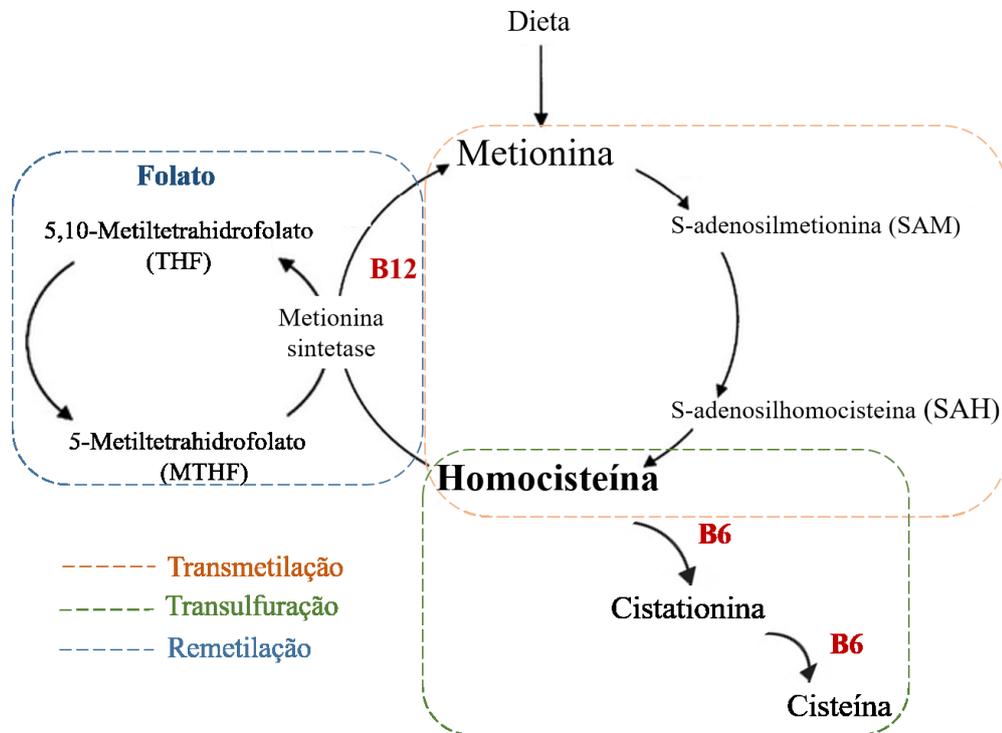
THEUNISSEN, 2010; GIVVIMANI et al., 2012; BOURCKHARDT et al., 2019), os mecanismos celulares e moleculares da toxicidade desta substância na formação dos tecidos e órgãos durante o desenvolvimento embrionário ainda carece de elucidação, com destaque para o desenvolvimento das vesículas ópticas. Diante disto, a presente tese buscou investigar o efeito de elevada dose de Hcy durante o desenvolvimento das vesículas ópticas, utilizando como modelo experimental o embrião de *Gallus domesticus*.

1.1 METABOLISMO DA HOMOCISTEINA

Elevados níveis de Hcy caracterizam uma desordem metabólica denominada hiperhomocisteinemia, a qual está envolvida na gênese de diversos processos patológicos como anomalias cardíacas, de face, de membros e do SNC, como apresentado por VAN MIL et al. (2010). A Hcy é um aminoácido sulfurado, não essencial e não constituinte de proteínas, que está presente como metabólito intermediário no ciclo da metionina (SELHUB, 1999; BLOM; SMULDERS, 2011). O metabolismo da Hcy é complexo, uma vez que requer a participação de diversas enzimas e seus cofatores enzimáticos e também porque este aminoácido participa de duas importantes vias metabólicas (metionina e folato), que visam manter constantes as concentrações de metionina, através da via de remetilação e transmetilação, e de cisteína, pela via de transulfuração (HAGUE, 2003; SELHUB, 2008).

Na via de transmetilação, a metionina derivada da dieta é metabolizada a S-adenosilmetionina (SAM), a qual pode ser desmetilada e gerar S-adenosilhomocisteína (SAH), que pode ser convertida em Hcy (HAGUE, 2003). Por sua vez, a Hcy recém-formada pode seguir para a via de transulfuração e remetilação. Na via de transulfuração as enzimas cistationa β -sintetase (CBS) e cistationa γ -liase (CGL) convertem respectivamente a Hcy à cistationa e posteriormente à cisteína, na presença de piridoxina ou vitamina B6 que atuam como co-fatores enzimáticos (SELHUB, 1999). Já a reação de remetilação requer a atividade da enzima metionina sintetase (MS), a qual adiciona grupamentos metil do ciclo dos folatos à Hcy, através da conversão de 5,10-metiltetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, na presença de cobalamina ou vitamina B12, produzindo metionina novamente (FINKELSTEIN, 1990; SELHUB, 1999) (Figura 1).

Figura 1: Via metabólica da Hcy. A metionina derivada da dieta é convertida em Hcy pela via de transmetilação. Na via de transulfuração a homocisteína é convertida irreversivelmente em cisteína. Nas reações de remetilação, a Hcy é convertida à metionina novamente. As vitaminas B6, B12 e o ácido fólico participam como co-fatores enzimáticos para a metabolização da Hcy.



Fonte: adaptado de CHAMBERS et al., (2001).

A Hcy é produzida em todos os tecidos, entretanto a via de transulfuração ocorre essencialmente no fígado, rins, intestino delgado e pâncreas. Quanto à sua disponibilidade, após os aumentos dos níveis de Hcy, esta é acumulada intracelularmente e posteriormente pode ser liberada para o meio extracelular, onde cerca de 3% da Hcy circula livremente no sangue, 75% permanece ligada à albumina, e o restante, 22% existe na forma de dissulfeto (AUBARD; DARODES; CANTALOUBE, 2000).

O equilíbrio dinâmico das reações de transmetilação, transulfuração e remetilação destacadas anteriormente garantem a eficiente manutenção dos níveis de metionina, além da remoção da Hcy em excesso. Entretanto, deficiências nutricionais nas vitaminas do complexo B que funcionam como co-fatores enzimáticos, fatores genéticos como os defeitos associados às enzimas ligadas ao ciclo da Hcy, uso de medicamentos e estilo de vida, podem alterar a dinâmica das vias metabólicas, levando ao acúmulo de Hcy (SCHWANINGER et al., 1999; SAW et al., 2001; ZHANG et al. 2008). Em humanos, os valores de referência normais para concentração plasmática de Hcy variam de 5-15 μM , já valores entre 15 - 50 μM correspondem à hiperhomocisteinemia (JACOBSEN, 1998).

Para a maioria dos fatores determinantes ao desenvolvimento da hiperhomocisteinemia, a suplementação com vitaminas do complexo B e sua forma sintética – ácido fólico (AF) e folatos tem reduzido significativamente os riscos associados à hiperhomocisteinemia, especialmente no que se refere à ocorrência de anomalias do SNC (SMITHELLS et al., 1981; OLNEY; MULINARE, 2002; SANTOS et al., 2016). Este fato levou a importantes mudanças em políticas públicas de saúde. No Brasil, visando à prevenção dos erros do desenvolvimento decorrentes da carência de vitaminas que acarretam no acúmulo de Hcy, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tornou obrigatória a fortificação das farinhas de trigo e milho com AF através da resolução (RDC-Anvisa nº 150/2017), nas quais cada 100 g do produto devem fornecer 140-220 µg de AF (ANVISA, 2017).

1.2 TOXICIDADE DA HIPERHOMOCISTEINEMIA

A hiperhomocisteinemia é considerada uma condição tóxica aos organismos. Durante o desenvolvimento embrionário, por exemplo, níveis elevados de Hcy podem causar anomalias congênitas orofaciais, DTN, bem como defeitos congênitos no coração (VERKLEIJ-HAGOORT et al., 2007; RATAN et al., 2008; IACOBAZZI et al., 2014; ABDULLA et al., 2016). Já em indivíduos adultos, esta condição é também associada como fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, Alzheimer, depressão, demência e perdas cognitivas (YOUNG, 2007; HINTERBERGER; FISCHER, 2013; ZHANG et al., 2014; ARAÚJO et al., 2015; OSTRAKHOVITCH; TABIBZADEH, 2019).

De um modo geral, a literatura científica descreve os efeitos da Hcy em diferentes modelos experimentais como ratos, camundongos e aves (GREENE; DUNLEVY; COPP, 2003; BROUNS et al., 2005; WANG et al., 2018), promovendo seus efeitos em diferentes órgãos e sistemas (MAESTRO DE LAS CASAS et al., 2003; PACANA et al., 2015; LONG; NIE, 2016). Durante o desenvolvimento de membros por exemplo, o excesso de Hcy mostrou-se tóxico para as células ao promover danos ao DNA e alterar os mecanismos de proliferação e diferenciação das células mesenquimais (BOURCKHARDT et al., 2015). Adicionalmente, a administração de Hcy parece interferir no crescimento dos ossos, promover a osteopenia além de diminuir o conteúdo de proteína responsável pela mineralização óssea durante a ossificação endocondral (LEVASSEUR, 2009; AZIZI et al., 2010; BOURCKHARDT et al., 2018). Efeitos da Hcy durante o desenvolvimento do coração, incluem defeitos na septação e nas células do músculo cardíaco (ROSENQUIST; RATASHAK; SELHUB, 1996). Além disso, o sistema cardiovascular é um importante alvo da ação da Hcy. Especificamente nas células do endotélio,

a Hcy promove a inibição do óxido nítrico, regula a produção de substâncias vasodilatadoras, altera a proliferação das células musculares e induz danos aos vasos sanguíneos. Em conjunto, essas alterações podem estar associadas a diferentes condições patológicas como aterosclerose, disfunção endotelial e doença vascular (CHENG; YANG; WANG, 2009; PUSHPAKUMAR; KUNDU; SEN, 2014). Vale ressaltar que as alterações nas células endoteliais são danosas não apenas para o sistema cardiovascular, mas também para outros sistemas, uma vez que a integridade do endotélio é essencial para a nutrição e o desenvolvimento de diferentes órgãos e tecidos.

A ocorrência de estresse oxidativo decorrente da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e peroxidação lipídica, é um fenômeno bem descrito em condições de hiperhomocisteinemia (FARACI; LENTZ, 2004; TYAGI et al., 2005; CHEN et al., 2017). Especificamente no SNC, um fator preponderante para indução de estresse oxidativo, é a grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, os quais são mais sensíveis à peroxidação (GRINTAL et al., 2009). Neste caso, o grupo sulfidril (-SH) presente na molécula de Hcy parece estar ligado ao mecanismo desencadeador do aumento de ERO, uma vez que este sofre auto-oxidação para formar Hcy e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SHARMA et al., 2006).

Devido à sua relevância clínica, os efeitos nocivos da Hcy são amplamente estudados no SNC. Além disso, nesse sistema, a vulnerabilidade do SNC frente aos efeitos neurotóxicos da Hcy pode ser explicada pela ausência de duas vias metabólicas responsáveis pela sua eliminação, a via que converte Hcy à metionina e a conversão de Hcy à cisteína. Deste modo, este aminoácido afeta as células do SNC de maneira mais efetiva, principalmente nos estágios iniciais do desenvolvimento (ŠKOVIEROVÁ et al., 2016), promovendo efeitos neurotóxicos. Entende-se como neurotoxicidade, a capacidade de substâncias exógenas ou endógenas causarem efeitos químicos, estruturais e funcionais sobre a atividade normal do SNC (COSTA, 1998). Na maioria dos casos, o SNC em desenvolvimento é mais suscetível aos efeitos de diferentes substâncias do que o SNC do adulto, isto porque nos estágios iniciais do desenvolvimento a barreira hematoencefálica não está completamente formada (WAKAI; HIROKAWA, 1978; RONCALI et al., 1986), tornando este sistema vulnerável à ação de diversas substâncias. Adicionalmente, em estudo com roedores, KAMATH et al., (2006) e LOMINADZE et al., (2006) demonstraram ainda que a Hcy pode comprometer a integridade e a permeabilidade da barreira hematoencefálica através da ativação das metaloproteinases, que levam ao remodelamento vascular, evidenciando seu poder neurotóxico.

A neurotoxicidade e o potencial genotóxico da Hcy foi demonstrada tanto *in vitro* quanto *in vivo*. LIPTON et al. (1997) descreveram a superestimulação de receptores

glutamatérgicos (metabotrópicos e ionotrópicos) em neurônios corticais de ratos após a administração de Hcy. Neste tipo de resposta, a estimulação dos receptores pode promover o aumento de cálcio citoplasmático, produção de radicais livres, estresse do retículo endoplasmático (RE), resultando em morte celular (BOLDYREV et al., 2013; PODDAR; PAUL, 2013). A morte celular por apoptose pode ser modulada por meio da ativação ou bloqueio de fatores pró-apoptóticos ou anti-apoptóticos, como por exemplo Bcl-2, Bax, p53 e caspase-3 (MILLER et al., 2003; KAMUDHAMAS et al., 2004; WANG et al., 2012). Além dos neurônios, células gliais como os astrócitos também são igualmente afetadas pelos efeitos tóxicos da Hcy (MALER et al., 2003; JIN; BRENNAN, 2008).

Níveis elevados de Hcy podem afetar diretamente a via biosintética da metionina devido à não remetilação de Hcy à metionina. Esta via é essencial para o fornecimento de grupamentos metil em diversos processos biológicos, como a síntese e reparo do DNA e na ativação de outras biomoléculas como lipídios e neurotransmissores (VAN DER PUT; BLOM 2000; IVANOV et al. 2007). Além disso, por meio da transferência de carbonos, a via da metilação é essencial para a síntese de serotonina, dopamina e acetilcolina (BOTTIGLIERI, 2005; IMBARD et al. 2013). A metilação de resíduos de arginina, proteína fundamental da composição da mielina também é essencial para a compactação da bainha de mielina em torno do neurônio. Alterações neste processo podem levar à redução da função de condução nervosa (AMUR et al. 1986).

Durante o desenvolvimento de estruturas embrionárias, o excesso de Hcy tem um impacto significativo sobre mecanismos celulares, como proliferação, diferenciação e migração celular (ROSENQUIST; RATASHAK; SELHUB, 1996; KOBUS-BIANCHINI et al., 2017; CECCHINI et al., 2019). Além dos mecanismos anteriormente citados, o acúmulo intracelular de Hcy é potencialmente tóxico para as células, principalmente por induzir quebras na fita de DNA (KRUMAN et al., 2000; BOURCKHARDT et al., 2015). Este tipo de dano pode ativar a via da proteína supressora de tumor p53, que desempenha um papel importante como facilitador do reparo do DNA, interrompendo o ciclo celular para ativar a maquinaria de reparo (WEI-FENG et al., 2006; FRANK; TSAI, 2009). Quando a lesão do DNA é identificada antes da entrada da célula na fase S, p53 tem seu nível aumentado e passa a atuar como fator de transcrição para determinados produtos gênicos, como a síntese da proteína p21, que bloqueia a progressão do ciclo celular até que o dano seja reparado. Caso o reparo não aconteça, a proteína p53 pode ativar a indução de morte celular programada (JOERGER; FERSHT, 2007)

A apoptose é um mecanismo inerente e essencial ao desenvolvimento (OPPENHEIM, 1985; JACOBSON; WEIL; RAFF, 1997; SUZANNE; STELLER, 2013), entretanto, o aumento

deste mecanismo pode ser desencadeado pela condição de hiperhomocisteinemia (KRUMAN et al., 2000a; MILLER et al., 2003a; WANG et al., 2012a). Embora a literatura mostre a estreita relação entre o aumento dos níveis de Hcy com a ativação da apoptose, o mecanismo desencadeador subjacente à apoptose ainda não está bem compreendido, uma vez que diferentes respostas celulares podem estar ligadas à sua ativação. Em neurônios corticais, por exemplo, perturbações na homeostase do glutamato foram responsáveis pela ativação do mecanismo de apoptose de uma maneira dose dependente (LIPTON et al., 1997). A Hcy também promoveu morte celular em resposta à quebras na fita de DNA, ativação de PARP (poly-ADP-ribose polymerase) e indução de p53 (KRUMAN et al., 2000). Morte celular através da ativação de caspases também foi reportada em neurônios dopaminérgicos (DUAN et al., 2002), no entanto, níveis elevados de Hcy também induziram morte celular pela via independente de caspases (FOISTER et al., 2005). Vale ressaltar, que nos mecanismos anteriormente citados há a participação ativa das mitocôndrias durante a ativação à apoptose.

Alterações na dinâmica mitocondrial assim como nas proteínas que controlam esse processo também estão relacionadas à indução da apoptose (KARBOWSKI; YOULE, 2003; SUEN; NORRIS; YOULE, 2008). A mitocôndria é uma organela celular altamente dinâmica, responsável pela produção de energia da célula, sendo essencial para o desenvolvimento embrionário (ERNSTER; SCHATZ, 1981). Dentro da célula, as mitocôndrias mudam constantemente sua morfologia, número e localização em resposta às exigências celulares, através dos processos de fissão e fusão mitocondrial (BEREITER-HAHN; VÖTH, 1994; YOULE; VAN DER BLIEK, 2012). O evento de fusão mitocondrial é mediado pelas proteínas mitofusinas Mfn1 e Mfn2, presentes na membrana externa da mitocôndria. Mfn1 e Mfn2 promovem a fusão entre mitocôndrias diferentes e permitem a criação de redes mitocondriais para aumentar a oferta de energia celular, além de misturar o conteúdo de mitocôndrias saudáveis e defeituosas (CHEN et al., 2003; CHAN, 2006). Adicionalmente, a molécula Mfn2 também encontra-se localizada no RE/RER, e participa da comunicação estrutural e funcional entre mitocôndrias e o RE/RER (DE BRITO; SCORRANO, 2008; ROWLAND; VOELTZ, 2012). Já o processo de fissão mitocondrial é mediado pela proteína Drp1, que possui localização citoplasmática, mas que é recrutada para membrana mitocondrial externa para promover a constrição mitocondrial durante o processo de fissão (SMIRNOVA et al., 2001; HOPPINS; LACKNER; NUNNARI, 2007).

A função mitocondrial é garantida pelo equilíbrio entre os eventos de fusão e fissão mitocondrial, os quais influenciam diretamente na morfologia desta organela. Alterações nos eventos de fissão e fusão podem gerar tanto mitocôndrias com morfologia alterada

(fragmentadas), quanto mitocôndrias disfuncionais, com a perda do potencial de membrana. Quando isto ocorre, as mitocôndrias disfuncionais são eliminadas via processo de autofagia (TWIG et al., 2008; WAI; LANGER, 2016). A autofagia é um processo fisiológico pelo qual organelas com danos, ou não funcionais são removidas da célula através da formação de vesículas autofágicas duplas ou multimembranares, que são posteriormente entregues aos lisossomos para digestão hidrolítica (DUNN, 1994; LEVINE; KLIONSKY, 2004).

A Hcy está relacionada com alterações na dinâmica mitocondrial tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Em células endoteliais cerebrais, a Hcy promoveu o aumento do conteúdo proteico de Mfn2 e Drp1, assim como dos níveis de transcritos para as mesmas moléculas. Estas alterações por sua vez induziram as células ao processo de autofagia, avaliado através do aumento da proteína e do gene LC3 (VACEK et al., 2017). Já nas células ganglionares, por exemplo, as alterações na dinâmica mitocondrial foram relacionadas ao aumento da fusão mitocondrial, avaliado pelo aumento da proteína Opa1 (GANAPATHY et al., 2011).

Elevados níveis de Hcy podem afetar diversos sistemas em desenvolvimento. Além dos efeitos classicamente relatados como aqueles ligados aos DTN, outros parecem ser igualmente relevantes, mas são menos abordados. A relação entre Hcy e o desenvolvimento das estruturas ópticas é escassa na literatura, os dados encontrados referem-se principalmente aos danos vasculares que este aminoácido promove, como oclusão da veia da retina, oclusão arterial da retina, alterações no nervo óptico, e arterosclerose retiniana (CORAL et al., 2006; AJITH; RANIMENON, 2015; SOWBHAGYA et al. 2015). Pouco se sabe como os níveis elevados de Hcy interferem na formação de uma estrutura tão complexa como o olho e seus componentes, sobretudo a retina.

Considerando que os elevados níveis de Hcy durante o desenvolvimento embrionário estão relacionados a danos celulares e à ocorrência de anomalias congênicas do SNC, faz-se necessário compreender o processo de formação deste tecido, para poder interpretar adequadamente os efeitos celulares da Hcy e sua relação com estas alterações.

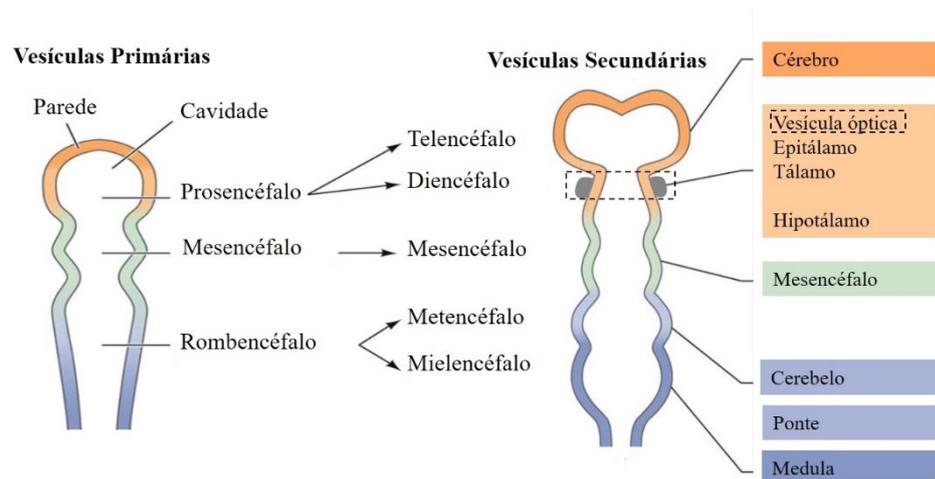
1.3 FORMAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM VERTEBRADOS: DESENVOLVIMENTO DAS VESÍCULAS ÓPTICAS

Nos embriões de vertebrados, a formação do SNC tem início com o processo de neurulação, um evento morfogênético coordenado que converte uma estrutura plana – o ectoderma neural, em uma estrutura tubular alongada – o tubo neural (TN). O TN recém formado é polarizado ao longo de dois eixos: rostro-caudal e dorso-ventral, onde o primeiro

refere-se à diferenciação anatômica de uma estrutura tubular em uma estrutura vesicular como o cérebro, e a medula. Já o segundo eixo refere-se à diferenciação das camadas celulares que compõem tanto o encéfalo, como a medula (SCHOENWOLF; SMITH, 1990; SMITH; SCHOENWOLF, 1997).

A regionalização e o crescimento acentuado da região anterior do tubo neural promove a formação das vesículas encefálicas primárias. Inicialmente, estas são reconhecidas como três dilatações denominadas prosencéfalo (cérebro anterior), mesencéfalo (cérebro médio) e rombencéfalo (cérebro posterior), onde cada uma das vesículas se desenvolve ainda mais e origina diferentes partes do encéfalo (HAMBURGER; HAMILTON, 1951; GILBERT, 2014) (Figura 2).

Figura 2: Desenvolvimento das vesículas encefálicas. As três vesículas primárias se subdividem para originar as cinco vesículas secundárias e diferentes partes do cérebro.



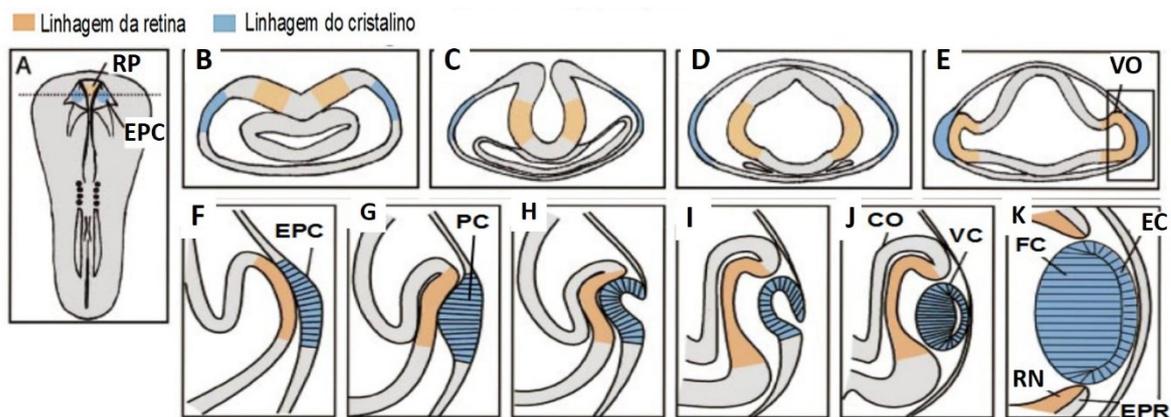
Fonte: adaptado de GILBERT (2014).

No contexto da neurulação sucintamente descrita acima, a formação do olho surge na região do prosencéfalo (futuro diencéfalo) como um evento que compreende mecanismos celulares e moleculares, além da participação de diferentes tecidos, como a região anterior do cérebro, ectoderma superficial, o mesoderma cefálico e a crista neural cranial em migração (JOHNSTON et al., 1979; GRAW, 1996; HEAVNER; PEVNY, 2012). A potencialidade do prosencéfalo em participar da formação de uma estrutura complexa como o olho é promovida através de domínios de expressão de diversos reguladores transcricionais como PAX6, OTX2, SIX3, os quais induzem e delimitam a região anterior do cérebro anterior como a área do desenvolvimento do futuro aparato óptico (WALTHER; GRUSS, 1991; SIMEONE et al., 1993; LI et al., 1994; OLIVER et al., 1995).

Após a especificação da região do prosencéfalo como futura região de desenvolvimento dos olhos, a primeira evidência morfológica da formação do olho em embriões de *Gallus domesticus* é a expansão bilateral do ectoderma neural, o qual ocorre com cerca de 33 h – 38 h de incubação, para formar duas vesículas ópticas simétricas (HAMBURGER; HAMILTON, 1951). A vesícula óptica recém formada se desenvolve em direção ao ectoderma superficial e entra em contato com este tecido. O contato entre a vesícula óptica e o ectoderma superficial induz a formação do placóide do cristalino, um tecido pseudoestratificado, resultante da proliferação e espessamento da ectoderme superficial (MCAVOY, 1980; KAUFMAN, 1992). O placóide invagina na sua região central e aproxima suas bordas para formar a vesícula do cristalino. Posteriormente, as células da vesícula passam por modificações que possibilitam a transformação da estrutura anteriormente vesicular, no cristalino transparente e definitivo. Estas modificações celulares incluem mudanças no formato da célula e a síntese da proteína cristalina, responsável pela formação das fibras do cristalino. A partir destes eventos, o ectoderma que agora recobre o cristalino, irá se diferenciar na córnea (PIATIGORSKY, 1981; KAUFMAN, 1992; GRAW, 1996; LOVICU; MCAVOY 2005).

Simultaneamente à formação do placóide do cristalino, ocorre a invaginação da vesícula óptica, que por sua vez origina o cálice óptico, o qual permanece ligado às vesículas cerebrais através do pedúnculo óptico (SCHOOK, 1980; ADLER; CANTO-SOLER 2007). No início da morfogênese do cálice óptico este se apresenta como uma estrutura epitelial em bicamada, onde a mais externa é denominada de epitélio pigmentado da retina (EPR) e a mais interna - retina neural (NR – do inglês - *neural retina*) (PATTEN, 1971; WOLFF et al., 1997). Ao longo deste coordenado processo de formação do sistema óptico, as estruturas formadas devem se relacionar de forma adequada com as estruturas vizinhas para permitir o desenvolvimento funcional do olho. Tanto a córnea quanto o cristalino devem se tornar transparentes e alinhados para permitir que a luz alcance a retina. Esta por sua vez, deve estar em correta configuração para transmitir os sinais visuais às regiões do encéfalo por meio dos processos neurais que ligam a retina ao nervo óptico (WOLFF et al., 1997; CARLSON, 2014) (Figura 3).

Figura 3: Formação do olho em embrião de galinha. (A) Vista dorsal de embrião de galinha. (B - E) Secções transversais de embrião de galinha demonstrando o início da formação das vesículas ópticas. Retângulo em (E) indica a região visualizada em 'F'. (F) Maior aumento mostrando a formação do epitélio pré-cristalino, que se espessa e origina o placóide do cristalino. (G-H) O placóide do cristalino invagina e forma a vesícula do cristalino. (I-J) Formação do cálice óptico e diferenciação do cristalino. (K) Diferenciação do epitélio pigmentar da retina e retina neural. A linhagem do cristalino é indicada na cor azul, enquanto a linhagem da retina é indicada na cor laranja. CO, cálice óptico; EC, epitélio do cristalino; EPC, epitélio presuntivo do cristalino; EPR, epitélio pigmentado da retina; FC, fibras do cristalino; PC, placóide do cristalino; RN, retina neural; RP, retina presuntiva; VO, vesícula óptica; VC, vesícula do cristalino.



Fonte: adaptado de OGINO; YASUDA (2000).

Simultaneamente à sua formação, a vesícula óptica torna-se circundada pelo mesênquima periocular, um tecido derivado da crista neural e do mesoderma cefálico, responsável pela formação das camadas mais externas do olho, coróide e esclera. A coróide é uma estrutura pigmentada e altamente vascularizada que fornece o aporte de sangue e nutrientes para o olho, já a esclera, situada mais externamente, constitui-se como uma camada fibrosa de revestimento do globo ocular (JOHNSTON et al., 1979). Assim, pode-se citar o olho como um órgão constituído por três camadas principais, a mais externa formada pela esclera, a camada média constituída pela coróide, e a mais interna formada pela retina.

Considerando que na literatura não há uma nomenclatura específica para caracterizar o olho em desenvolvimento, nesta tese, convencionou-se adotar o termo vesícula óptica para as duas idades embrionárias analisadas.

1.4 MORFOGÊNESE DA RETINA

A retina de embrião de ave como modelo experimental tem sido largamente utilizada para estudos do desenvolvimento do sistema nervoso, devido a algumas características que a tornam vantajosa: (a) é um tecido de fácil acesso pois localiza-se fora do eixo central; (b) possui

uma organização histológica bem ordenada e conhecida; (c) apresenta a maioria dos neurotransmissores encontrados no cérebro; (d) tem um padrão de organização em camadas sinápticas e nucleares com um desenvolvimento semelhante a outras estruturas do SNC (CALAZA; GARDINO, 2010).

O EPR é formado por uma única camada de células epiteliais que se localizam adjacentes à retina neural, o que possibilita o contato necessário entre essas duas camadas. O EPR medeia funções essenciais à retina neural, como a fagocitose dos segmentos externos dos fotorreceptores cones e bastonetes, absorção de energia luminosa para evitar a dispersão da luz, além da síntese e reciclagem dos fotopigmentos (BOK, 1993; BOULTON, 1998). Já retina neural de vertebrados é um tecido sensorial complexo, e sua formação adequada depende do tempo preciso e coordenação de processos celulares durante seu desenvolvimento. Estes incluem a geração em números e proporções adequadas dos diferentes tipos celulares e sua organização histológica em diferentes camadas (CEPKO et al., 1996; LIVESEY; CEPKO, 2001).

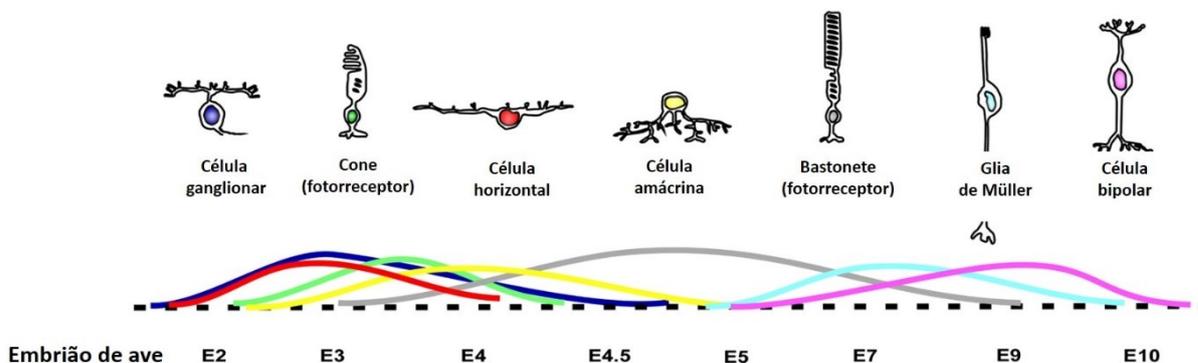
O desenvolvimento da retina neural se assemelha ao padrão estratificado do córtex cerebral, onde as células da camada mais interna originam as células da glia e uma diversidade de neurônios que se distribuem em diferentes camadas funcionais durante o desenvolvimento (KANEKO, 1979; KOLB, 2004). Um aspecto peculiar da histogênese da retina diz respeito à multipotencialidade de suas células progenitoras, as quais originam todos os sete tipos celulares encontrados na retina (TURNER; CEPKO, 1987; TURNER; SNYDER; CEPKO, 1990). Assim, a retina madura de vertebrados é comumente composta por seis tipos de neurônios (ganglionares, horizontais, amácrinas, bipolares, fotorreceptores (cones e bastonetes), além de um tipo de célula glial – a glia de Müller. Em conjunto, estes componentes celulares formam uma rede neuronal elaborada, que realiza as tarefas de detecção, processamento e transmissão de imagens ao SNC (YOUNG, 1985; PRADA et al., 1991; LIVESEY; CEPKO, 2001).

O comprometimento e a diferenciação das células progenitoras em neurônios e células da glia, é resultado de uma ordenada interação entre compostos sinalizadores, fatores de transcrição e alterações na expressão gênica destas células, que irão determinar o seu comprometimento em diferentes perfis celulares (CEPKO et al., 1996; HARRIS, 1997; EDLUND; JESSELL, 1999). Para que isto aconteça, as células progenitoras passam por repetidos ciclos de divisão celular os quais permitem a expansão em quantidade do grupo de células progenitoras, antes de sair do ciclo e se diferenciar em um fenótipo específico (CEPKO et al., 1996; LIVESEY; CEPKO, 2001). As células progenitoras da retina são competentes para produzir todos os tipos celulares, porém essa competência é progressivamente restrita,

garantindo uma sequência unidirecional da produção celular. As primeiras divisões das células progenitoras são divisões simétricas que expandem a população de progenitores em quantidade (YOUNG, 1985b; TURNER; SNYDER; CEPKO, 1990; LU; JAN; JAN, 2000). À medida que estas células aumentam sua quantidade, liberam sinais para permitir que um grupo de progenitoras deixe o ciclo celular e se diferencie. Neurônios recém gerados liberam sinais que restringem a produção dos mesmos tipos de células, direcionando as células geradas posteriormente para os destinos subsequentes (CEPKO et al., 1996; BELLIVEAU; CEPKO, 1999; EDLUND; JESSELL, 1999).

A cronologia da geração dos tipos celulares que compõem a retina é bem conservada entre as espécies e ocorre em fases temporalmente distintas, mas que se sobrepõem. Neste contexto, células ganglionares são geradas por primeiro, seguidas dos fotorreceptores do tipo cone, células horizontais, amácrinas, bastonetes, glia de Müller e célula bipolar (KAHN, 1974; YOUNG, 1985a; PRADA et al., 1991) (Figura 4).

Figura 4: Histogênese da retina em embrião de ave. A neurogênese da retina prossegue em uma sequência temporal, onde células ganglionares são geradas por primeiro, seguidas das células horizontais, amácrinas, cones, bastonetes, glia de Müller e célula bipolar. As ondas coloridas referem-se a cor do núcleo da célula, que corresponde à cor da onda de geração de cada tipo celular. E: dia embrionário.



Fonte: adaptado de MARTINS; PEARSON (2008).

Similarmente à outras partes do SNC, a retina madura mostra-se estruturada em 5 camadas bem estabelecidas, com neurônios fotorreceptores localizados na camada nuclear externa (CNE); a camada seguinte é a camada plexiforme externa (CPE) onde estão localizados os terminais sinápticos dos fotorreceptores e prolongamentos de células bipolares e de células horizontais; camada nuclear interna (CNI), onde encontram-se os corpos celulares das células horizontais, bipolares, amácrinas e ganglionares; camada plexiforme interna (CPI), região onde ocorrem as sinapses entre as células bipolares e amácrinas com as células ganglionares; por fim

a camada de células ganglionares (CCG) onde se localizam-se os corpos celulares das células ganglionares e células amácrinas deslocadas. A glia de Müller – um tipo específico de célula glial da retina, encontra-se distribuída ao longo de todas as camadas citadas a cima (DOWLING, 1987; PRADA et al., 1991; WÄSSLE, 2004).

A transformação do sinal de luminoso em sinal elétrico é realizada pelos neurônios fotorreceptores da retina, já a transmissão e o processamento adicional do sinal dentro da retina são conduzidos por diferentes classes funcionais de neurônios. As células bipolares e ganglionares transmitem os sinais ao longo de uma via direta "vertical", enquanto as células horizontais, amácrinas e bipolares modulam o sinal lateralmente. Neste padrão de transmissão de informação, os axônios das células ganglionares convergem entre si formando o nervo óptico, estrutura responsável pela captação e transmissão de informação da retina para o cérebro (DAW; JENSEN; BRUNKEN, 1990; KOLB, 2004).

Ao longo do desenvolvimento e estratificação da retina neural, as células em migração devem assumir suas posições e conexões corretas. Durante este processo, os neurônios passam por modificações morfológicas e bioquímicas para assumir sua forma madura. No plano morfológico, a emissão de prolongamentos como axônios e dendritos permite a interação com outros alvos celulares. No plano bioquímico, ocorre a síntese de moléculas, enzimas, entre outras proteínas, que permitem o início das atividades elétricas, o que possibilita ao neurônio receber, processar e enviar informações no ambiente que o circunda (WÄSSLE; RIEMANN, 1978; DOWLING, 1987a; MONTAGUE; FRIEDLANDER, 1989; HOON et al., 2014).

A diversidade celular que compõem a retina, assim como em outras áreas do sistema nervoso em desenvolvimento, é dependente em grande parte de sinais extracelulares, as chamadas neurotrofinas (LEVI-MONTALCINI; HAMBURGER, 1951; BARDE, 1989; HUANG; REICHARDT, 2001; SERNAGOR et al. 2006). De acordo com Purves (1988), o destino de morte ou sobrevivência de um neurônio depende da capacidade de seu axônio em obter quantidades adequadas de fatores neurotróficos liberados pelas células alvo. As células que durante o desenvolvimento conseguem atingir seus alvos sinápticos, têm mais chance de sobreviver pois podem receber os fatores neurotróficos adequados (OPPENHEIM, 1991). Adicionalmente, o papel das neurotrofinas não se restringe a um período inicial do desenvolvimento, uma vez que vários estudos indicam que esses fatores de crescimento desempenham papéis críticos em outros processos fundamentais do desenvolvimento do sistema nervoso, incluindo a proliferação celular e a diferenciação de neurônios (HUANG; REICHARDT, 2001; GÓMEZ-PALACIO-SCHJETNAN; ESCOBAR, 2013).

As neurotrofinas constituem uma família de fatores de crescimento que atuam como moléculas sinalizadoras, contribuindo para o crescimento, diferenciação, plasticidade neural, e sobrevivência neural, visto que neurônios sem o aporte adequado de neurotrofinas podem entrar em processo de apoptose (LEVI-MONTALCINI; HAMBURGER, 1951; MCALLISTER; KATZ; LO, 1999; CHAO, 2003; JOHNSON et al, 2009). A família das neurotrofinas consiste em membros como: neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4/5 (NT-4/5), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*) e fator neurotrófico derivado da glia (GDNF, do inglês *glial cell-line-derived neurotrophic factor*) (BARDE; EDGAR; THOENEN, 1982; HALLBÖÖK, 1999; CALVO; PASTOR; DE LA CRUZ, 2018). BDNF e GDNF especificamente, são expressos na retina neural de embrião de ave em grande parte das camadas da retina, tanto nos estágios mais precoces de desenvolvimento quanto nas fases mais tardias (FRADE et al. 1997; KARLSSON et al. 2002; VOLPERT et al. 2007).

No que se refere ao BDNF, estudos têm demonstrado que a presença desta proteína resulta em uma via de sinalização pró-sobrevivência, o que garante uma neuroproteção às células da retina. A administração exógena desta neurotrofina demonstrou um efeito inibitório no processo de apoptose, o qual ocorre normalmente em embriões de ave entre o período de E5-E7. Neste contexto, BDNF promoveu um aumento significativo do número de células ganglionares no período de neurogênese (FRADE et al. 1997). Já a ausência ou diminuição dos níveis de BDNF tem sido sugerida como um fator crítico subjacente à degeneração das células ganglionares e do nervo óptico, assim como a ativação da morte celular programada, corroborando o efeito neurotrófico desta proteína (GUPTA et al., 2014).

Quanto a neurotrofina GDNF, seus efeitos são demonstrados tanto nas células ganglionares como também no desenvolvimento dos fotorreceptores. Estudos têm demonstrado que a aplicação de GDNF após um dano induzido leva à diminuição da perda de fotorreceptores, bem como a um resgate funcional destas células. Adicionalmente, GDNF prolonga a sobrevivência dos fotorreceptores tanto *in vitro* como *in vivo* (POLITI et al. 2001; ROTHERMEL; LAYER, 2003).

Durante o desenvolvimento das estruturas embrionárias, um equilíbrio entre proliferação e morte celular contribui para a determinação do tamanho e a citoarquitetura de tecidos e órgãos em formação (LINDEN ET AL. 1999). A morte celular que ocorre neste período, é um tipo de morte celular programada por apoptose, um evento fisiológico bastante conservado que tem como principal estratégia a regulação do tamanho de populações celulares (OPPENHEIM R.W, 1981; HAMBURGER, 1992; BUSS et al. 2006). Durante o processo de

neurogênese, o sistema nervoso em desenvolvimento produz um número excedente de células neuronais e gliais àquelas já encontradas em estruturas maduras (PETTMANN; HENDERSON, 1998). Especificamente na retina, a morte celular programada por apoptose é inerente ao desenvolvimento neural e possibilita a eliminação de células em excesso. Esta também pode ocorrer devido à competição pelo espaço de arborização adequado, ou seja, se o número de fibras retiniais que chegam é maior do que o número de locais de terminação disponíveis, as fibras supranumerárias podem degenerar (RAGER; RAGER, 1978; OPPENHEIM, 1985). Adicionalmente, os neurônios que não conseguem estabelecer conexões neurais com seus alvos específicos, formando sinapses desnecessárias ou impróprias entram em apoptose. Este tipo de morte celular torna-se então fundamental para o refinamento neural na citoarquitetura do tecido em desenvolvimento (OPPENHEIM, 1991; BUSS et al., 2006).

Na retina neural de embriões de aves são reconhecidas duas ondas de apoptose durante o processo de neurogênese, a primeira ocorre entre os dias embrionários E4 – E7 na região do neuroepitélio em diferenciação (GARCÍA-PORRERO; OJEDA, 1979; CUADROS; RIOS, 1988). Já a segunda onda de apoptose ocorre mais tardiamente, entre os dias embrionários de E10 – E14 (RAGER; RAGER, 1978; HUGHES; MCLOON, 1979).

1.5 IMPORTÂNCIA DA BARREIRA HEMATO-RETINIANA PARA O DESENVOLVIMENTO DAS VESÍCULAS ÓPTICAS

Durante o desenvolvimento do olho, assim como em outros órgãos, a formação de um sistema vascular é essencial para garantir o aporte de nutrientes e oxigênio adaptado às necessidades fisiológicas do órgão (RISAU; WOLBURG, 1990; SERLIN et al., 2015). A formação do sistema vascular é um pré-requisito para a embriogênese, e ocorre por dois processos: vasculogênese, definida como a geração de vasos através da formação de um plexo capilar primário, e angiogênese, que é o surgimento de novos capilares a partir de vasos pré-existentes (RISAU; FLAMME, 1995; RISAU, 1997).

No olho especificamente, este aporte é fornecido pelos vasos coroides, localizados entre a esclera e a retina, os quais se originam do mesoderma cefálico durante a formação do cálice óptico (JOHNSTON et al., 1979). Além da coroide, outra estrutura com função vascular tem igual importância para o desenvolvimento do sistema ocular, a barreira hemato-retiniana (CUNHA-VAZ, 1979; CUNHA-VAZ; BERNARDES; LOBO, 2011).

A barreira hemato-retiniana ou barreira hemato-ocular, consiste em uma estrutura altamente seletiva e restritiva que atua na preservação e manutenção do olho e sua função visual.

A barreira controla o transporte e a troca de substâncias entre o sangue circulante e a retina, preservando sua homeostase através do fornecimento de nutrientes essenciais e eliminando toxinas, metabólitos ou outras substâncias potencialmente nocivas que podem afetar o desenvolvimento do olho (LIEBNER; GERHARDT; WOLBURG, 1997; CUNHA-VAZ; BERNARDES; LOBO, 2011).

Classicamente, a barreira é descrita sendo composta por uma parte interna e outra externa. A externa refere-se à barreira formada pela camada de células do RPR e funciona, em parte, para regular o movimento de solutos e nutrientes da coroide para o espaço sub-retiniano. Em contraste, a barreira interna localiza-se na microvasculatura da retina interna, sendo formada por junções oclusivas entre as células endoteliais da retina (CUNHA-VAZ, 1979). Em aves, incluindo a espécie *Gallus domesticus*, os vasos sanguíneos da barreira interna estão ausentes, ou seja, a retina é avascular, e o suprimento funcional da barreira interna é realizado pelo pecten ocular (MANN, 1924; BAWA; YASHROY, 1974).

O pecten ocular é uma estrutura análoga a barreira hemato-retiniana, que emerge da coroide projetando-se para dentro do humor vítreo e pode variar de tamanho e formato, dependendo da espécie (SEAMAN, 1966; SCHROEDL et al., 2004). Esta estrutura contém inúmeros vasos sanguíneos que servem principalmente como suporte nutricional, atuando como uma barreira sanguínea para a retina das aves (LIEBNER; GERHARDT; WOLBURG, 1997). O pecten ocular é formado principalmente por dois tipos de células, as células pigmentadas, provavelmente originadas do epitélio pigmentar da retina e as células endoteliais, originadas dos vasos coroides, que adquirem junções aclusivas e outras propriedades de barreira (SEAMAN, 1966a). Desta forma, alguns autores consideram o pecten ocular como um componente verdadeiro da barreira hemato-retiniana, uma vez que esta estrutura possui junções celulares oclusivas e impermeáveis para algumas substâncias. (WOLBURG et al., 1999; SERLIN et al., 2015).

Em *G. domesticus* na idade de E6, tem-se o início da formação do pecten, sendo considerado o primórdio do pecten, que coincide com o início da formação dos vasos sanguíneos. Em E10-11, o pecten apresenta-se como uma estrutura levemente pigmentada com o início da sua maturação, atingindo sua funcionalidade e morfologia completa até o 1º dia pós eclosão (LIEBNER; GERHARDT; WOLBURG, 1997; LINDNER et al., 2017).

Alterações na barreira hemato-retiniana estão associadas com modificações na permeabilidade dos vasos e alterações teciduais, as quais podem ter consequências sobre o desenvolvimento da vesícula óptica (KAMATH et al., 2006; TAWFIK et al., 2014). Nesse contexto, fatores vasculogênicos como VEGF e a molécula de adesão celular vascular-1

(VCAM-1, do inglês *vascular cell adhesion molecule 1*) podem atuar na permeabilidade dos vasos promovendo efeitos adversos (LARRIVÉE et al., 2009; DONG et al., 2011).

Diversos estudos têm demonstrado tanto *in vivo* quanto *in vitro* que o VEGF atua como um potente mitógeno específico para as células endoteliais, além de atuar na diferenciação e indução da permeabilidade das células endoteliais (LEUNG et al., 1989; BREIER et al., 1992; FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997). Na vesícula óptica especialmente, VEGF é expresso pelas células do EPR, e está envolvido com a formação do sistema vascular da coroide, através de um efeito mitogênico nas células precursoras do endotélio, no mesênquima periocular. Alternativamente, a deficiência de VEGF resulta na ausência da vascularização da coroide (MARNEROS et al., 2005). Células ganglionares e a glia de Muller também expressam VEGF, onde participam do desenvolvimento da vasculatura das camadas superficiais e internas da retina.

A molécula VCAM-1 é um membro da família das imunoglobulinas de adesão celular. Expressa constitutivamente nas células endoteliais, esta proteína participa da interação célula-célula através da ligação com as proteínas α integrinas (CHAN et al., 2000). Entretanto, durante o processo inflamatório a presença de células T ativadas produzem citocinas pró-inflamatórias induzindo a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas, que permitem o recrutamento de células do sistema imunológico, responsável pelo dano tecidual. Neste contexto, VCAM-1 pode participar do recrutamento dos leucócitos, sua adesão ao endotélio e migração para o tecido (CYBULSKY et al., 2001).

A superexpressão de VCAM-1 tem sido relatada em diversas condições patológicas (WANG et al., 2015; TERPOS et al., 2016; KONG et al., 2018), assim como na participação da angiogênese tanto *in vivo* quanto *in vitro* (KOCH et al., 1995). No olho especificamente, o aumento dos níveis de VCAM-1 no endotélio vascular e no EPR está associado com a inflamação intraocular (BHARADWAJ et al., 2013), além disso, células endoteliais em cultura participam da regulação da expressão de VCAM-1 em resposta a estímulos inflamatórios. Neste cenário, o aumento dos níveis de VCAM-1 pode ser considerado com um biomarcador inflamatório (TANG; LE-RUPPERT; GABEL, 1994; HERNANDEZ et al., 2001; UDDIN et al., 2018).

No SNC especificamente, o processo de resposta inflamatória pode ser mediado pelas células da microglia. Estas células constituem a primeira linha de defesa imunitária do SNC, e estão localizadas no cérebro, nervo óptico, coroide e retina, desempenhando papel integral na manutenção da homeostase dos tecidos, através liberação de fatores neuroprotetores e anti-

inflamatórios e proteção contra infecções e demais insultos (GRAEBER; STREIT, 1990; LING; WONG, 1993; RATHNASAMY et al., 2019).

Durante sua ativação em resposta a algum dano tecidual, a microglia passa por uma série de mudanças morfológicas e funcionais a fim de mobilizar o sistema de defesa celular e molecular. No plano morfológico, ocorre a retração dos processos celulares, aumento do soma transformando a microglia em uma célula com formato amebóide (LING; WONG, 1993; KARPERIEN; AHAMMER; JELINEK, 2013). No plano funcional, ocorre o aumento da expressão de citocinas, fatores de crescimento, além das moléculas como CD45, molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizado -1 (IBA-1, do inglês *Ionized calcium-binding adaptor molecule 1*) e CD11b (FORD et al., 1995; MAGNI et al., 2012). Nos olhos, as células da microglia são ativadas em determinadas condições patológicas como, angiogênese retinal patológica, glaucoma, degeneração da retina e uveíte autoimune (CONNOR et al., 2007; DAGKALIS et al., 2009; BOSCO; STEELE; VETTER, 2011).

1.6 TOXICIDADE DA HOMOCISTEINA DURANTE O DESENVOLVIMENTO DAS VESÍCULAS ÓPTICAS

Elevados níveis de Hcy são frequentemente relatados como tóxicos para diferentes sistemas do organismo (GOH et al. 2006; VAN MIL et al., 2010; IMBARD, BENOIST; BLOM, 2013). Para o SNC, destacam-se a citotoxicidade neuronal via estimulação do receptor NMDA (SHI et al., 2003; ZIEMIŃSKA; STAFIEJ; ŁAZAREWICZ, 2003; PODDAR; PAUL, 2013), estresse oxidativo através da geração de ERO e danos ao DNA, que desencadeiam apoptose (KRUMAN et al., 2000; MCCULLY, 2009) e prejuízo na síntese de neurotransmissores (BOTTIGLIERI, 2005; GARIBALLA, 2011). Esses efeitos aqui relatados, podem afetar tanto células neuronais, quanto gliais, assim como seus progenitores, levando a comprometimentos relevantes para o sistema nervoso em formação (LOUREIRO et al., 2010; CECCHINI et al., 2019).

No sistema visual, estudos clínicos fornecem evidências que a hiperhomocisteinemia é um fator de risco para uma variedade de doenças oculares, incluindo aterosclerose arterial retiniana, atrofia macular e óptica, oclusão da veia e artéria da retina (STANGER et al., 2005; AJITH; RANIMENON, 2015; SOWBHAGYA et al., 2015). O mecanismo molecular desencadeador a essas doenças oculares tem sido principalmente aqueles relacionados a danos à vascularização, como por exemplo, disfunção da função endotelial. Neste contexto, a disfunção endotelial tem sido atribuída a alterações na síntese e biodisponibilidade do óxido

nítrico (ON) (STÜHLINGER et al., 2001). Além dos danos vasculares, outros mecanismos como apoptose dos neurônios ganglionares da retina, diminuição da atividade dos fotorreceptores, estresse oxidativo e remodelamento da matriz extracelular são relatados em doenças do sistema visual em resposta à condição de hiperhomocisteinemia (POLOSCHEK et al., 2005; CORAL et al., 2006; MALAGUARNERA et al., 2014; AJITH; RANIMENON, 2015). Alternativamente, aumento nos níveis de Hcy podem causar alterações na microvasculatura do nervo óptico e prejudicar o fluxo sanguíneo através de um efeito vasoconstritor (STANGER et al., 2005; GHORBANIHAGHJO et al. 2008).

Os estudos aqui citados são na sua maioria epidemiológicos, enfocando indivíduos adultos, ou ainda estudos com exposição à Hcy *in vitro*. Neste contexto, pouco se sabe sobre a influência de como os elevados níveis de Hcy interferem sobre o desenvolvimento das estruturas ópticas, principalmente numa abordagem celular *in situ*.

Recentemente, em estudo realizado no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (LRDA) com embriões de *G. domesticus* com seis dias de incubação, a análise da morfologia dos embriões tratados com Hcy mostrou uma elevada prevalência de anomalias nas vesículas ópticas, como por exemplo, assimetrias em tamanho, microoftalmia unilateral ou bilateral, ou até mesmo sua completa ausência. Durante os experimentos, a taxa de anomalias mostrou-se superior até mesmo aos defeitos do tubo neural (incluindo encéfalo e medula), as anomalias de membros e deformidades no tronco. Esses dados nos surpreenderam, uma vez que dentre os dados epidemiológicos e experimentais, as anomalias de olhos são pouco relatadas (VAN MIL et al. 2010). Adicionalmente, resultados demonstram que elevados níveis de Hcy apontaram para alterações na proliferação celular e na expressão de proteínas relacionadas à diferenciação de neurônios e células da glia no mesencéfalo e telencéfalo dos embriões (CECCHINI et al., 2019). Estes resultados levaram a novos questionamentos sobre os efeitos da Hcy no desenvolvimento do SNC, considerando que apenas o mesencéfalo foi analisado. Por exemplo, a Hcy atua de modo semelhante sobre as vesículas ópticas dos embriões? Pode a Hcy alterar também o conteúdo proteico de proteínas necessárias para o desenvolvimento das vesículas ópticas?

Vale ressaltar também, que dentre os estudos que relacionam os elevados índices de Hcy com anomalias do SNC, na sua grande maioria enfocam a gênese dos defeitos do tubo neural, principalmente aqueles relacionados à medula espinhal. Por tanto, há uma lacuna a ser preenchida, que visa elucidar como os elevados níveis de Hcy podem interferir na formação das estruturas ópticas durante o desenvolvimento.

Levando em consideração o panorama apresentado, a presente tese visa investigar como os elevados níveis de Hcy interferem na expressão das proteínas do ciclo celular e da diferenciação neuronal e glial durante o desenvolvimento das vesículas ópticas de embriões de *G.domesticus*. Para tal, foram estabelecidas as seguintes hipóteses científicas: (i) a Hcy causa arresto no ciclo celular, promovendo diminuição das moléculas envolvidas com a diferenciação e sobrevivência neuronal e glial; (ii) as alterações no ciclo celular levam à diminuição da morfometria da vesícula óptica e da espessura da retina; (iii) a Hcy promove alterações ultraestruturais nas células neurais da retina; (iv) A Hcy induz danos ao DNA que ativam o processo de morte celular.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a toxicidade da dose elevada de Hcy sobre os eventos celulares envolvidos no desenvolvimento das vesículas ópticas, utilizando embriões de *Gallus domesticus* como modelo experimental.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da Hcy sobre a sobrevivência e verificar a ocorrência de anomalias nas vesículas ópticas dos embriões submetidos à dose elevada de Hcy;
- Identificar os efeitos da Hcy sobre a morfometria das vesículas ópticas, assim como a espessura da retina;
- Avaliar os efeitos da Hcy sobre a integridade da barreira hemato-retiniana;
- Analisar as estruturas subcelulares alvo do tratamento com Hcy, na ultraestrutura das células da retina;
- Verificar a ocorrência de danos ao DNA induzidos pelo tratamento com Hcy;
- Avaliar o efeito do tratamento com Hcy sobre a proliferação, ponto de checagem e progressão do ciclo celular das células neurais através da análise das proteínas, fosfo-histona H3, p53, p21, PCNA;
- Investigar o efeito do tratamento com Hcy na diferenciação e sobrevivência neural e glial, através da expressão das proteínas NeuN, β -tubulina III, GFAP, BDNF e GDNF;
- Reconhecer o efeito da Hcy sobre a dinâmica mitocondrial e viabilidade celular;
- Investigar a capacidade da Hcy em induzir o processo de autofagia e apoptose nas células das vesículas ópticas;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO E INCUBAÇÃO DOS OVOS DA ESPÉCIE DE *G. domesticus*

Neste trabalho foram utilizados embriões de galinha doméstica da espécie *G. domesticus*, obtidos a partir de ovos fertilizados cedidos pela Avícola Polastri – Brusque /SC e pelo Laboratório de Avicultura do Centro de Ciências Agrárias - CCA/UFSC. Os ovos foram transportados em bandejas com acomodações individuais ao Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal – BEG/CCB - UFSC, onde foram higienizados com água destilada e numerados, permanecendo em repouso por um período médio de 48 horas em temperatura entre 15 e 20°C. Em seguida, os ovos foram incubados na posição vertical em incubadora Golden® com condições de temperatura a 37,5 °C ($\pm 0,5$ °C) e a 65% de umidade, controladas e diariamente monitoradas.

Para as análises do desenvolvimento, os estágios embrionários foram determinados a cada 24 horas, sendo denominados dias embrionários (E), a partir do início da incubação (E1). Para a realização deste estagiamento foram consideradas as características descritas por Hamburger; Hamilton (1951).

Todos os procedimentos adotados nesta pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais nº 175/CEUA/UFSC.

3.2 ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para contemplar os objetivos deste estudo foram estabelecidos dois grupos experimentais, nos quais foram utilizadas as doses de Hcy adotadas por Kobus et al. (2013), como segue:

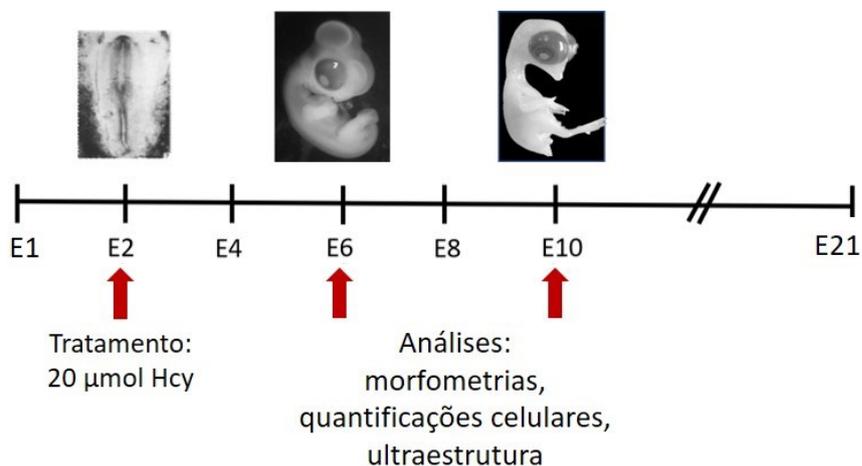
- Grupo controle: embriões em E2 tratados com 50 μ L de salina a 0,9%;
- Grupo Hcy: embriões em E2 tratados com 20 μ mol D,L-Hcy diluídos em 50 μ L de salina a 0,9%;

Após 48 horas de incubação (E2), os ovos foram retirados da estufa e com auxílio de uma pinça de ponta extrafina foi realizada uma pequena abertura na casca do ovo com cerca 1cm de diâmetro, na região da câmara de ar (parte mais arredondada do ovo). Após, as substâncias foram administradas com auxílio de micropipeta (50 μ L) através da abertura na câmara de ar sobre a membrana interna da casca. Além de permitir a administração dos tratamentos, esta abertura possibilitou o acompanhamento do desenvolvimento do embrião

diariamente. Concluída a realização dos tratamentos, a abertura na casca foi fechada com fita adesiva transparente não tóxica, os ovos recolocados na incubadora, e monitorados diariamente, até o 6° e 10° dias embrionários (E6 e E10).

Decorrido o tempo de exposição à Hcy, os embriões foram dessensibilizados a 4°C por 15 minutos, removidos do ovo e das membranas extraembrionárias, lavados em solução salina a 0,9% e analisados ao estereomicroscópio para confirmação do estágio do desenvolvimento, e para observação de possíveis alterações externas induzidas pelo tratamento com a Hcy (Figura 5).

Figura 5: Desenho experimental. Embriões foram tratados em E2 e analisados em E6 e E10. Para cada idade foram realizadas análises morfométricas, ultraestruturais e quantificações celulares. (E): dia embrionário



3.3 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA

Após a realização dos tratamentos em E2, os embriões foram monitorados diariamente e os registros de sobrevivência foram utilizados para a determinação da porcentagem de sobrevivência a cada 24 horas de desenvolvimento, até o décimo dia de incubação (E10). A morte dos embriões foi confirmada quando não se podia constatar a vascularização extraembrionária, ou quando não foi possível visualizar os batimentos cardíacos ao estereomicroscópio. A partir dos dados coletados, foram calculadas as curvas de sobrevivência pelo método de Kaplan-Meier (RICH et al., 2010).

3.4 MORFOMETRIA DAS VESÍCULAS ÓPTICAS

A análise morfométrica foi realizada para verificar se a Hcy foi capaz de alterar as dimensões das vesículas ópticas esquerdas e direitas. Para isto, os embriões foram analisados e fotografados no estereomicroscópio (1,5 X) com o sistema de captura Nikon DS-Fi2 Color 5.0 acoplado ao programa NIS-D Documentantion Imaging. A partir da aquisição das fotos, foram realizadas medidas do diâmetro das vesículas ópticas através de um plano transversal de uma extremidade até a outra, passando pelo centro do cristalino, utilizando o software de imagem ImageJ, pacote Fiji (n = 25 embriões por tratamento).

3.5 PREPARO DOS EMBRIÕES PARA ANÁLISE MICROSCÓPICA

Para verificar a organização estrutural e tecidual das vesículas ópticas, os embriões em E6 e E10 foram removidos dos ovos, fixados em Bouin alcoólico por 24 horas, lavados em álcool 70% até a solução tornar-se límpida sem vestígios de Bouin, onde permaneceram até o processamento das amostras. Para a confecção dos cortes, as vesículas ópticas foram dissecadas, desidratadas em série etanólica crescente (70 até 100%) e diafanizadas em xilol. Posteriormente, as peças foram emblocadas em parafina e seccionadas em micrótomo rotativo a 7 µm para a montagem de lâminas histológicas contendo secções seriadas. Cada lâmina foi organizada por idade de análise, de modo a conter os dois tratamentos na mesma lâmina, proporcionando as mesmas condições metodológicas para as técnicas histológicas.

As lâminas coradas por hematoxilina e eosina (HE) foram utilizadas para controle histológico, que visou evidenciar a qualidade da preparação histológica e realizar a morfometria da retina. As secções foram desparafinizadas em xilol por 10 minutos e rehidratadas em sequência decrescente de álcool (100% - 70%) por 10 minutos cada. A seguir, as lâminas foram lavadas em água corrente, imersas em hematoxilina de Harris por 1 minuto e 15 segundos, lavadas novamente em água corrente, imersas em eosina aquosa a 1% por 25 segundos e lavadas em água destilada por 5 minutos. Posteriormente, seguiu-se com a desidratação em sequência etanólica crescente (70% - 100%) por 10 minutos cada banho, finalizando com dois banhos consecutivos de xilol por 5 minutos cada. As lâminas foram montadas com Entelan® (Merck).

Para a morfometria da espessura da retina, os cortes seriados foram analisados no microscópio Olympus BX41, e a aquisição de fotos foi realizada pelo programa de captura de imagens Q-capture Pro 5.1 da Q-imaging (LAMEB/CCB/UFSC – Laboratório Multiusuário de

Estudos em Biologia). Para esta análise, a quantificação da espessura da retina foi mensurada utilizando o software de imagem ImageJ, pacote Fiji (n = 12 embriões por tratamento).

3.6 ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para a quantificação das células positivas para as proteínas de interesse, as vesículas ópticas dos grupos controle e Hcy nas idades de E6 e E10 foram enucleadas, homogeneizadas e submetidas a lavagens com PBS a 0,1 M (pH 7,6). Posteriormente, as células foram dissociadas em tripsina a 0,25% e incubadas com 100 µL de soro fetal bovino (BFS, do inglês *bovine fetal serum*) sob agitação. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 640 xg, o sobrenadante foi coletado e incubado com anticorpo primário (1:1000) durante 1 hora (Quadro 1), seguidas da incubação com anticorpo secundário correspondente (1:1000) por 45 minutos (Quadro 2). As leituras foram realizadas no Citômetro de Fluxo FACSCanto II no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB/CCB). A análise dos dados foi realizada pelo programa Flowing Software[®] 2, tendo sido analisadas previamente células não marcadas. Gráficos de dispersão de pontos com 10.000 células (eventos) foram obtidos, considerando os parâmetros de dispersão lateral (SSC-A, do inglês *side scatter*) e dispersão frontal (FSC-A, do inglês *forward scatter*). Os dados foram apresentados em valores de contagem absoluta em percentuais de células imunomarcadas em relação ao número total de células analisadas (10.000 células). (n= 9 embriões por tratamento).

Quadro 1: Descrição dos anticorpos primários usados nas reações por citometria de fluxo

Anticorpo	Espécie Desenvolvida	Isotipo	Diluição
anti - VEGF	Camundongo	IgG	1:1000
anti - VCAM	Camundongo	IgG	1:1000
anti-IBAI	Coelho	IgG	1:1000
anti-fosfo-histona H3	Coelho	IgG	1:1000
anti-p53	Camundongo	IgG	1:1000
anti-p21	Coelho	IgG1	1:1000
anti-PCNA	Coelho	IgG	1:1000
anti-NeuN	Coelho	IgG	1:1000
anti-β tubulina III	Camundongo	IgG	1:1000
anti-vimentina	Camundongo	IgG	1:1000
anti-GFAP	Coelho	IgG	1:1000

anti-BDNF	Camundongo	IgG1	1:1000
anti-GDNF	Coelho	IgG	1:1000
anti-Drp-1	Coelho	IgG	1:1000
anti-Mfn-1	Coelho	IgG	1:1000
anti-Mfn-2	Coelho	IgG	1:1000
anti- γ -H2AX	Coelho	IgG	1:1000
Anti-LC3II	Camundongo	IgG	1:1000
Anti-caspase-3	Coelho	IgG	1:1000

 Integridade de vasos	 Microglia	 Ciclo celular	 Dano ao DNA	 Diferenciação neural
 Sobrevivência neural	 Fissão/fusão mitocondrial	 Autofagia	 Apoptose	

Quadro 2: Descrição dos anticorpos secundários usados nas reações por citometria de fluxo

Anticorpo	Isotipo	Diluição
Anti-camundongo Alexa-fluor 488	IgG	1:1000
Anti-camundongo Alexa-fluor 633	IgG1	1:1000
Anti-coelho Alexa-fluor 568	IgG	1:1000
Anti-coelho Alexa-fluor 488	IgG1	1:1000

3.7 ANÁLISES ULTRAESTRUTURAIS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Para a análise das estruturas subcelulares, as vesículas ópticas foram enucleadas, seccionadas e fixadas em glutaraldeído a 2,5% + paraformaldeído a 4,5% por 24 h a 4°C. Posteriormente foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1M e pós fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida foi realizada a desidratação em série crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) por 30 minutos cada. A infiltração das amostras foi realizada em resina Spurr® nas proporções de acetona:resina de 2:1, 1:1, 1:2 e resina pura por 24 horas cada, seguida de duas infiltrações em resina pura por 12 horas e 4 horas em temperatura ambiente respectivamente. A última infiltração foi realizada em estufa a 70°C por 24 horas para a polimerização da resina.

Os blocos de resina foram seccionados em ultramicrotomo com navalha de vidro para a obtenção de secções semifinas (700 nm - 1 μ m), e coradas com solução de azul de toluidina a 1% e observadas ao microscópio de luz, para controle da orientação e observação da qualidade do material. As secções ultrafinas (60 - 70 nm) foram realizadas em ultramicrotomo com navalha de diamante, coletadas em *grids* de 200-300 *mesh*, contrastadas com acetato de uranila a 5% por 10 minutos e citrato de chumbo a 1% durante 5 minutos. As secções foram observadas e fotografadas no microscópio eletrônico de transmissão, modelo Jeol (JEM)1011 no Laboratório central de Microscopia (LCME/UFSC).

Para a análise quantitativa do número de perfis mitocondriais e da morfometria dos perfis mitocondriais, assim como da quantificação das vesículas, foram utilizados três animais para cada grupo experimental. Para tal, foram adquiridas 10 eletromicrografias por animal, totalizando 30 eletromicrografias por análise por grupo experimental e idade. A análise da quantificação do número dos perfis mitocondriais foi realizada por contagem direta, já a análise da morfometria dos perfis mitocondriais foi realizada através do software ImageJ utilizando o pacote Fiji. Para as análises mitocondriais, foram consideradas mitocôndrias em perfis longitudinais. Para a avaliação do contato entre mitocôndria-RER, o número de perfis mitocondriais em justaposição ao RER foi contado e dividido pelo número total de perfis mitocondriais na mesma célula, para gerar um índice de interação entre mitocôndria-RER, conforme o trabalho de SCHNEEBERGER et al., (2013).

3.8 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Para analisar a viabilidade celular das vesículas ópticas após o tratamento com Hcy, foi utilizado o ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5)-dimetilialzólil-2,5 difeniltetrazólio), de acordo com metodologia proposta por MOSMANN (1983) com modificações. Os embriões foram crioanestesiados, as vesículas ópticas enucleadas, pesadas e mantidas em PBS 0.1 M PBS (pH 7.4). Após, foi realizada a dissociação mecânica do tecido seguida de centrifugação a 640 x g por 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante contendo 50 μ L da fração de células em suspensão foi coletado, distribuído em duplicatas em placas de 96-poços e incubado com 100 μ L MTT (0,5 mg/mL, Sigma Aldrich) a 37 °C por 30 minutos. Os cristais de formazan foram solubilizados em 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO - Nuclear) e quantificados em espectrofotômetro a 570 nm (Multileitora Infinite M200 TECAN; LAMEB/CCB/UFSC). Para cada ensaio realizado, as vesículas ópticas foram previamente pesadas para a normalização dos dados de cada indivíduo. Amostras não tratadas com MTT foram utilizadas para os cálculos da

média de absorvância. Por fim, os resultados foram expressos em percentagem dos controles, nos quais foram considerados 100% de viabilidade. (n = 6 embriões por tratamento).

3.9 FRAGMENTAÇÃO DO DNA

O teste de fragmentação de DNA foi utilizado para avaliar a integridade estrutural do DNA em amostras das vesículas ópticas de embriões expostos à Hcy na idade de E6 e E10. Após a eutanásia dos embriões por crioanestesia, as vesículas ópticas foram enucleadas, dissecadas e aproximadamente 2,0 mg de tecido foi retirado e homogeneizado em 0,5 mL de tampão TKM (10,0 mM Tris, 10,0 mM KCl, 2,0 mM EDTA, 4 mM MgCl₂, pH 7,6). Após, foram adicionados 0,5 mL do tampão TKM contendo Triton X-100 a 2,5% e as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g, por 5 minutos em temperatura ambiente. O precipitado foi suspenso em 0,3 mL de tampão TKM contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,75% e incubado a 55°C por 15 minutos. Em seguida foi adicionado 0,13 mL de NaCl a 5,0 M e centrifugado a 12.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante (350 µL) contendo o DNA foi precipitado usando 0,7 mL de etanol absoluto gelado e centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos a temperatura de 4°C. O precipitado foi ressuspenso em 0,5 mL de etanol a 70% gelado e centrifugado a 12.000 x g por 5 minutos. Após, o precipitado foi secado a 55°C e ressuspenso em 15 µL de água livre de DNase e incubados a 50°C por 5 minutos.

As concentrações e pureza do DNA foram determinadas por espectrofotometria, utilizando as razões de densidade óptica de 260/280 e 260/230 $\geq 1,8$, e a integridade e fragmentação do DNA foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose (Kasvi) a 1,5%. A concentração de 1,0 µg de DNA de cada amostra foi adicionada nos poços do gel de agarose contendo 3 µL de GelRed (1:500, Biotium). Os géis foram visualizados e fotodocumentados utilizando o Fotodocumentador ChemiDoc MP (Bio-Rad; LAMEB/UFSC). O DNA íntegro e as bandas de interesse foram quantificadas e expressas por densidade óptica usando o programa ImageJ pacote Fiji. Foram consideradas amostras com fragmentação de DNA quando as bandas com tamanhos de 180, 360, 540 e 720 pares de bases (pb) foram visualizadas no gel de agarose (MATASSOV et al., 2004). Os dados foram apresentados pela média de densidade óptica \pm erro padrão da média. (n = 3 embriões por tratamento).

3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados quantitativos foram analisados no programa estatístico Statistica® versão 12.0 para Windows. Após a realização do teste de normalidade Shapiro-Wilk, as amostras com distribuição normal foram avaliadas pelo teste t de Student e os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM).

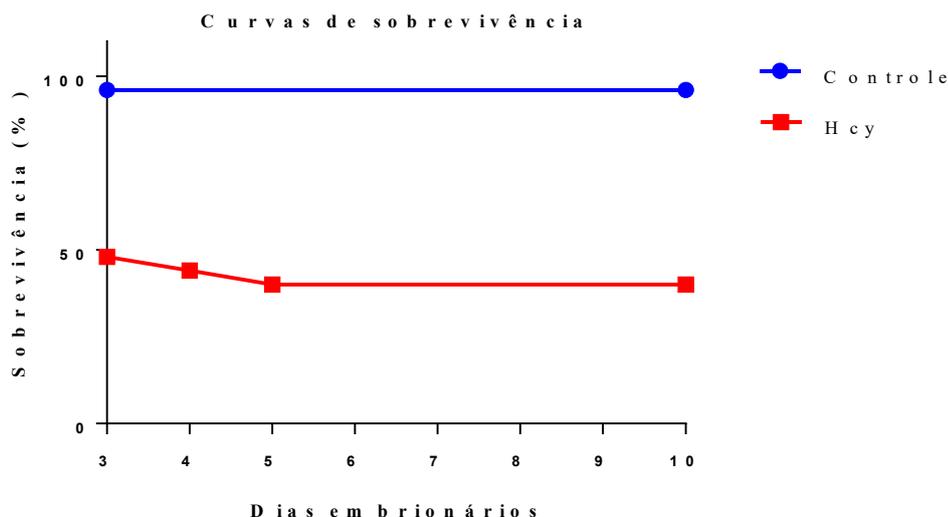
Para comparar a sobrevivência dos embriões através da curva de sobrevivência pelo método de Kaplan-Meier, foi realizado o teste de Log-rank através do software GraphPad Prism 7®. Para todas as análises, o valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1 EFEITO DA HCY SOBRE A SOBREVIVÊNCIA DOS EMBRIÕES

Segundo o teste de Log-rank, o tratamento com Hcy reduziu a taxa de sobrevivência dos embriões durante o período de incubação. As curvas de sobrevivência obtidas pelo método de Kaplan-Meier revelaram que em E3, ou seja, 24 horas decorridas do tratamento dos embriões, cerca de 48% dos embriões do grupo Hcy sobreviveram, contra 96% do grupo controle. Ao final do experimento, em E10, a porcentagem de sobrevivência dos embriões do grupo Hcy foi de aproximadamente 40% e do grupo controle permaneceu com 96%. A análise estatística mostrou que o tratamento com Hcy reduziu significativamente a taxa de sobrevivência dos embriões ($\chi^2 = 17,35$; $df = 1$; $P = 0,0001$) (Figura 6).

Figura 6: Curvas de sobrevivência em embriões de *Gallus domesticus* após exposição aos tratamentos. Os pontos na curva indicam a porcentagem média de sobrevivência nos dias embrionários (E3 – E10). Nota-se uma redução significativa na sobrevivência dos embriões do grupo Hcy. $P = 0,0001$.



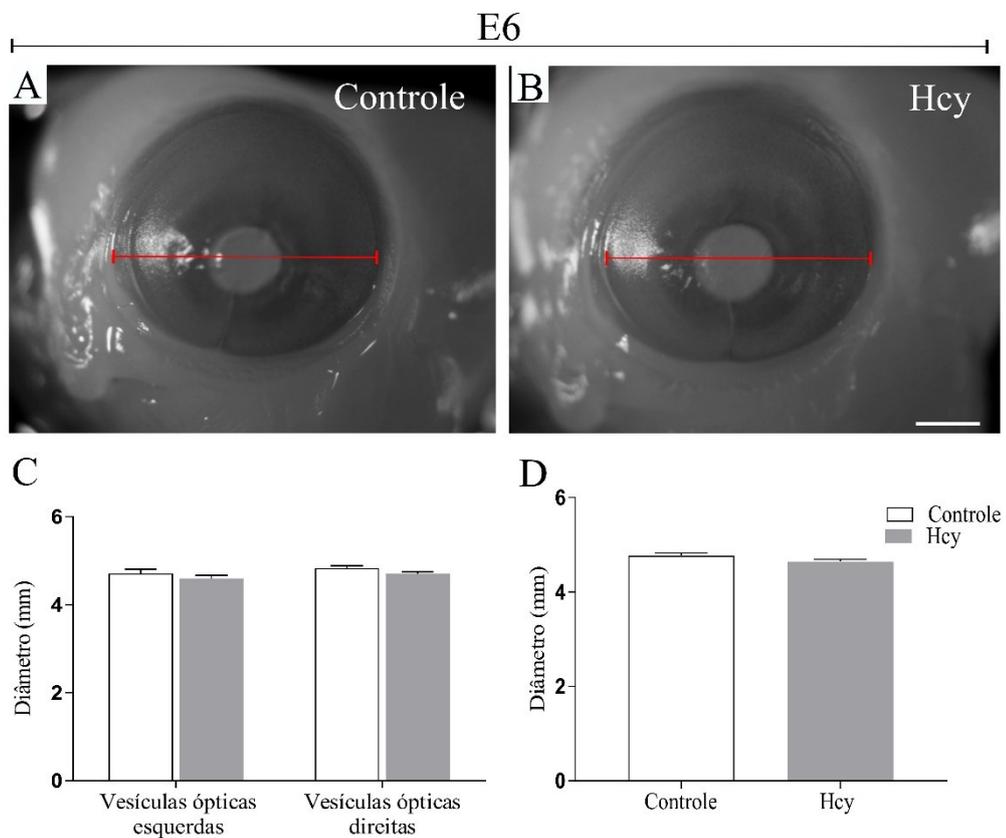
4.2 ANÁLISE DA MORFOLOGIA EXTERNA DAS VESÍCULAS ÓPTICAS

A análise da morfologia externa dos embriões revelou que a dose de 20 μmol D,L-Hcy utilizada nesta pesquisa não alterou a morfologia externa das vesículas ópticas dos embriões nos dois grupos analisados, tanto na idade de E6 quanto em E10. Todos os embriões analisados e utilizados nos experimentos apresentaram padrão morfológico esperado tanto para as idades de análise, quanto para possíveis alterações morfológicas nas vesículas ópticas causadas pelo tratamento com Hcy. Primeiramente, foram realizadas morfometrias das vesículas ópticas do lado esquerdo e direito, com o objetivo de investigar se o tratamento com Hcy afetou

diferencialmente as vesículas ópticas, ou seja, se o resultado foi influenciado pela lateralidade da estrutura.

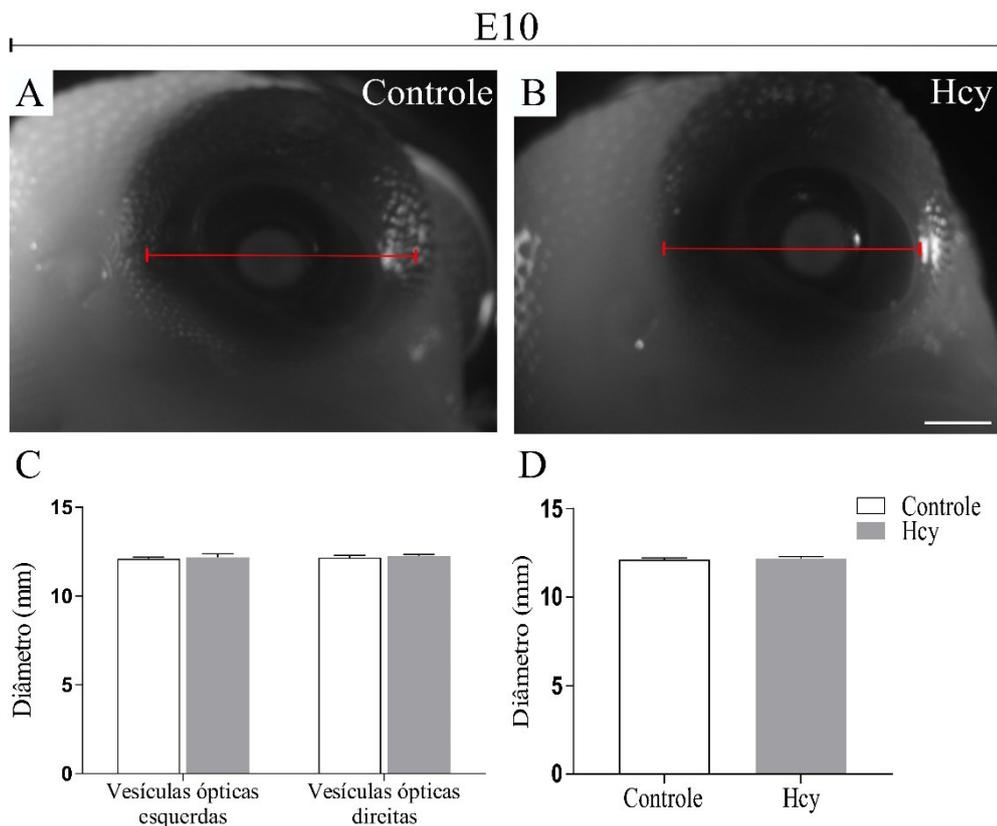
Na idade de E6, nos embriões controle, o diâmetro das vesículas ópticas do lado esquerdo foi de 4,712 mm ($\pm 0,10$), e nos embriões tratados com Hcy foi de 4,59 mm ($\pm 0,07$). Para a morfometria das vesículas ópticas do lado direito, os embriões controle exibiram um diâmetro de 4,83 mm ($\pm 0,06$), e os embriões tratados com Hcy 4,70 mm ($\pm 0,05$), os quais não diferiram significativamente. Nas análises morfométricas citadas acima, não foram encontradas diferenças significativas entre embriões controle e tratados com Hcy, tanto nas vesículas ópticas do lado esquerdo, quanto do lado direito, logo, considerando as similaridades dos lados esquerdo/direito, os dados foram agrupados e comparados na sua totalidade. Quando analisamos os dados agrupados (vesículas ópticas - lado esquerdo e direito), o diâmetro das vesículas ópticas em embriões controle foi de 4,77 mm ($\pm 0,06$) e 4,65 mm ($\pm 0,07$) nos embriões tratados com Hcy (Figura 7).

Figura 7: Morfometria externa das vesículas ópticas em embriões de *Gallus domesticus* na idade de E6. (A e B) Embrião controle e tratado com Hcy respectivamente, exibindo padrão morfológico normal das vesículas ópticas. (C) Gráfico representando média \pm erro padrão do diâmetro das vesículas ópticas do lado esquerdo e direito. (D) Gráfico representando média \pm erro padrão do diâmetro das vesículas ópticas agrupadas pelo tratamento. Barra de escala = 2,5 mm. (n = 25 embriões por tratamento).



Para a análise dos embriões controle na idade de E10, o diâmetro das vesículas ópticas do lado esquerdo foi de 12,11mm ($\pm 0,08$), e nos embriões tratados com Hcy foi de 12,18 mm ($\pm 0,20$). Já o diâmetro das vesículas ópticas do lado direito foi de 12,17 ($\pm 0,12$) em embriões controle, e 12,25 ($\pm 0,09$) em embriões tratados com Hcy. Para estas análises morfométricas, não foram encontradas diferenças significativas entre embriões controle e tratados com Hcy, portanto, os dados para a idade de E10 foram agrupados e comparados na sua totalidade. Quando analisamos os dados agrupados o diâmetro das vesículas ópticas em embriões controle foi de 12,14 mm ($\pm 0,07$) e 12,17 mm ($\pm 0,11$) nos embriões tratados com Hcy (Figura 8).

Figura 8: Morfometria externa das vesículas ópticas em embriões de *Gallus domesticus* na idade de E10. (A e B) Embrião controle e tratado com Hcy respectivamente, exibindo padrão morfológico normal das vesículas ópticas. (C) Gráfico representando média \pm erro padrão do diâmetro das vesículas ópticas do lado esquerdo e direito. (D) Gráfico representando média \pm erro padrão do diâmetro das vesículas ópticas agrupadas pelo tratamento. Barra de escala = 1mm. (n = 25 embriões por tratamento).



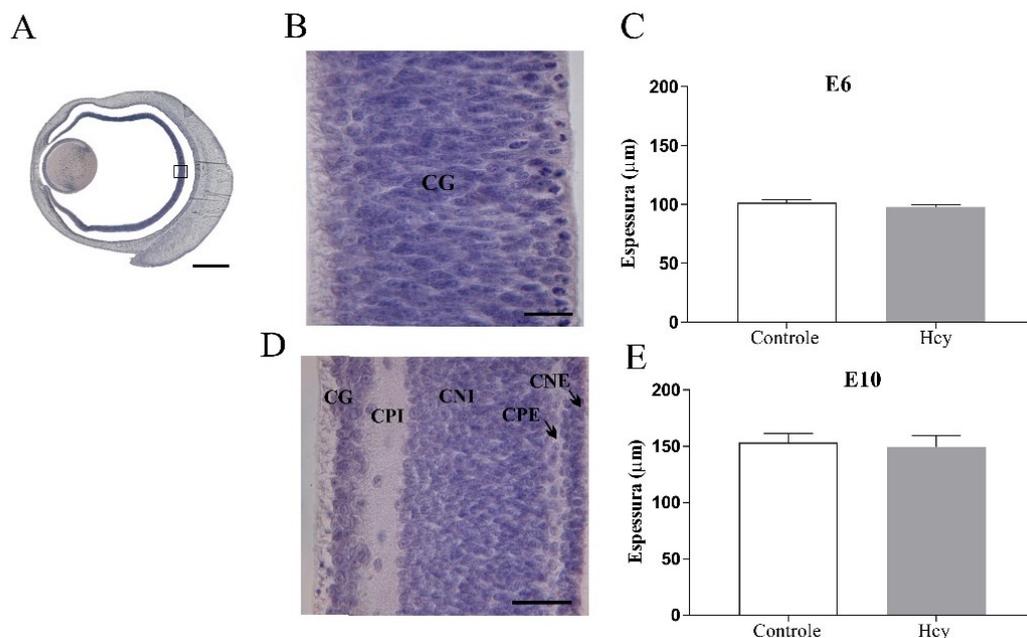
4.3 EFEITO DA HCY NA ESPESSURA DA RETINA

Considerando que os embriões dos dois grupos experimentais não apresentaram alterações morfológicas externas, nem diferiram nas médias dos diâmetros das vesículas ópticas, foram realizadas análises micromorfológicas para verificar se a Hcy interferiu na

espessura da retina. Quando comparados os dois grupos experimentais, não foram observadas mudanças morfológicas nas camadas da retina neural. Em E6, a retina apresenta-se como uma camada celular delgada contendo células em estado proliferativo, com inúmeras figuras mitóticas e células em processo de diferenciação, formando a CG (Figura 9 B). Na idade de E10, são reconhecidas diferentes camadas, como: CG, onde são observadas células ganglionares com núcleos grandes e axônios formando uma camada fibrosa; CPE, contendo algumas células horizontais deslocadas; CNI, contendo inúmeros corpos celulares de neurônios; e, mais internamente, CPE e CNE (Figura 9 D).

Para a idade de E6, a morfometria realizada não identificou diferenças significativas na espessura da retina neural dos embriões do grupo controle ($101,41 \mu\text{m} \pm 2,35$), quando comparado às espessuras da retina dos embriões do grupo tratado com Hcy ($97,90 \mu\text{m} \pm 1,84$). Na idade de E10, não foram observadas diferenças nas espessuras da retina de embriões controle ($153,19 \mu\text{m} \pm 8,31$), e tratados com Hcy ($149,50 \mu\text{m} \pm 10,12$).

Figura 9: Efeitos da Hcy sobre a espessura da retina neural de embriões de *Gallus domesticus* em E6 e E10. (A) Secção sagital da vesícula óptica demonstrando a região onde as medidas foram realizadas. (B e D) Ampliação da área do retângulo em (A) a região onde foram feitas as medidas. (C e E) Gráficos de barras representam média \pm erro padrão da espessura da retina neural em E6 e E10. CG: camada ganglionar; CNE: camada nuclear externa; CNI: camada nuclear interna; CPE: camada plexiforme externa; CPI: camada plexiforme interna. Barras de escala: $20\mu\text{m}$. (n = 10 embriões por tratamento).



4.4 EFEITO DA HCY NA INTEGRIDADE DA BARREIRA HEMATO-RETINIANA

Para avaliar os efeitos da Hcy na integridade dos vasos sanguíneos que compõem a estrutura vascular da vesícula óptica, avaliamos o conteúdo de três proteínas importantes para a integridade dos vasos sanguíneos da barreira hemato-retiniana, VEGF, VCAM-1 e IBA-1.

Em E6, foi verificado um aumento no número de células VEGF-positivas nas vesículas ópticas dos embriões tratados com Hcy (2.271,11 células \pm 218,19) quando comparado às vesículas ópticas dos embriões do grupo controle (1.144,11 células \pm 149,09; $P = 0,0005$). Para a análise da proteína VCAM-1, também foi verificado um aumento no número de células VCAM-1-positivas das vesículas ópticas dos embriões tratados com Hcy (904,89 células \pm 32,07), em comparação às células das vesículas ópticas dos embriões do grupo controle (800,33 células \pm 28,74; $P = 0,02$). No entanto, não foram encontradas diferenças significativas no número de células IBA-1-positivas nas vesículas ópticas dos embriões controle (448 células \pm 43,11), e tratados com Hcy (511,67 células \pm 45,10) (Figura 10).

Quando avaliados os efeitos da Hcy na idade de E10, verificamos respostas celulares semelhantes às encontradas na idade de E6. Para proteína VEGF, foi verificado um aumento significativo de células VEGF-positivas nos embriões tratados com Hcy (3.337,78 células \pm 192,03), em comparação aos embriões do grupo controle (2469,11 células \pm 300,28; $P = 0,02$). Similarmente, para a molécula VCAM-1 também foi verificado um aumento significativo no número de células VCAM-positivas nos embriões do grupo tratado com Hcy (1.295,78 células \pm 103,41), quando comparados aos embriões do grupo controle (1.046,34 células \pm 33,89; $P = 0,03$). Entretanto, a quantificação da proteína IBA-1 não mostrou diferenças significativas entre as vesículas ópticas dos embriões controle (519,83 células \pm 56,94), e as vesículas ópticas dos embriões tratados com Hcy (505,67 células \pm 77,24) (Figura 11).

Figura 10: Quantificação das células positivas para as proteínas VEGF, VCAM- e IBA-1, nas vesículas ópticas de embriões de *Gallus domesticus* em E6. (A, B, C) Histogramas de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células positivas. (D, E e F) Gráficos de barras representando o número absoluto de células positivas para VEGF, VCAM-1 e IBA-1 respectivamente. Os dados foram apresentados com média \pm erro padrão. (*) indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre embriões do grupo controle e tratados com Hcy. (n= 9 embriões por tratamento).

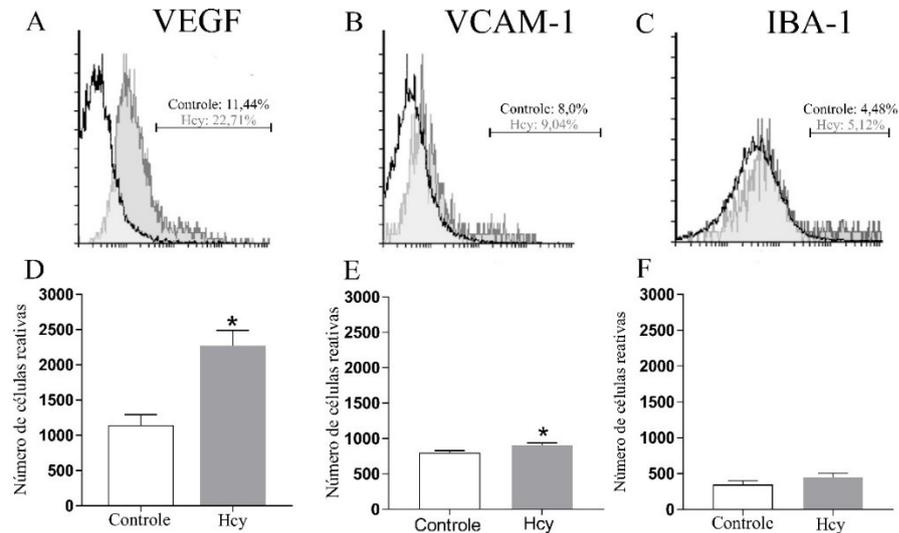
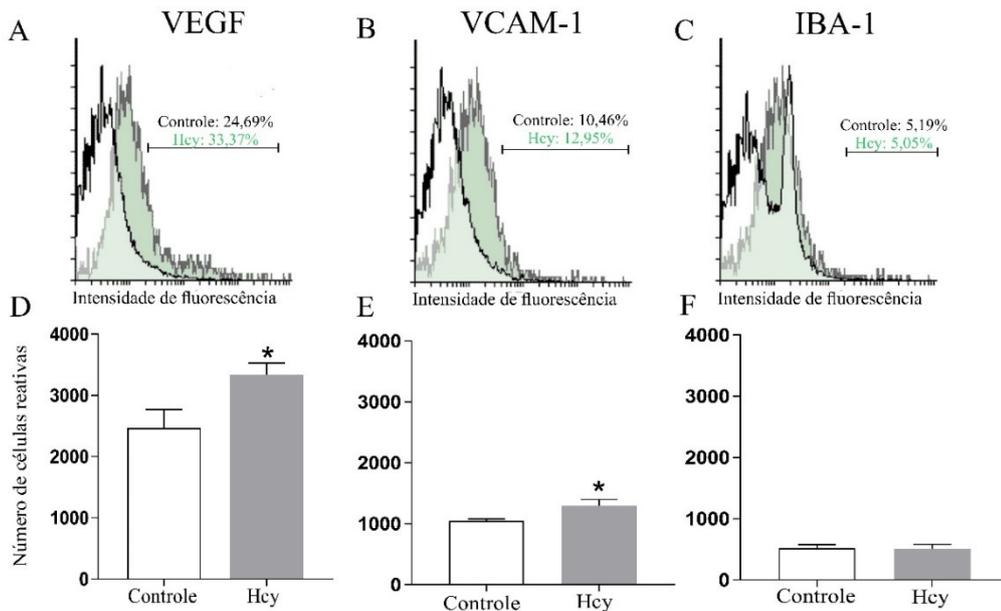


Figura 11: Quantificação das células positivas para as proteínas VEGF, VCAM- e IBA-1, nas vesículas ópticas de embriões de *Gallus domesticus* em E10. (A, B, C) Histogramas de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células positivas. (D, E e F) Gráficos de barras representando o número absoluto de células positivas para VEGF, VCAM-1 e IBA-1 respectivamente. Os dados foram apresentados com média \pm erro padrão. (*) indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre embriões do grupo controle e tratados com Hcy. (n= 9 embriões por tratamento).



4.5 EFEITO DA HCY NA ULTRAESTRUTURA DAS VESÍCULAS ÓPTICAS

Para análise ultraestrutural das vesículas ópticas, foram reconhecidas duas regiões de análise: o EPR e a RN.

Nas duas idades de análise (E6 e E10), o EPR foi reconhecido como uma única camada de células justapostas, com formato oval e alongado, com um arranjo com pouco espaço intercelular e com inúmeros grânulos de pigmentos ou melanossomos. Nesta análise, os grânulos de pigmento apareceram com formato alongado ou esférico, dependendo do plano de corte. Não foram encontradas diferenças na morfologia do epitélio pigmentar da retina dos embriões do grupo controle e tratados com Hcy tanto para idade de E6 (Figura 12), quanto para idade de E10 (Figura 13).

Figura 12: Ultraestrutura do epitélio pigmentado da retina de embriões de *Gallus domesticus* em E6. Células justapostas com núcleo oval e grande quantidade de grânulos de pigmento nos embriões do grupo controle (A) e tratados com Hcy (B). (C e D) grânulos em maior aumento, evidenciando os dois planos de corte dos grânulos de pigmentos – oval e alongado. GP: grânulos de pigmento; N: núcleo. (n = 3 embriões por tratamento).

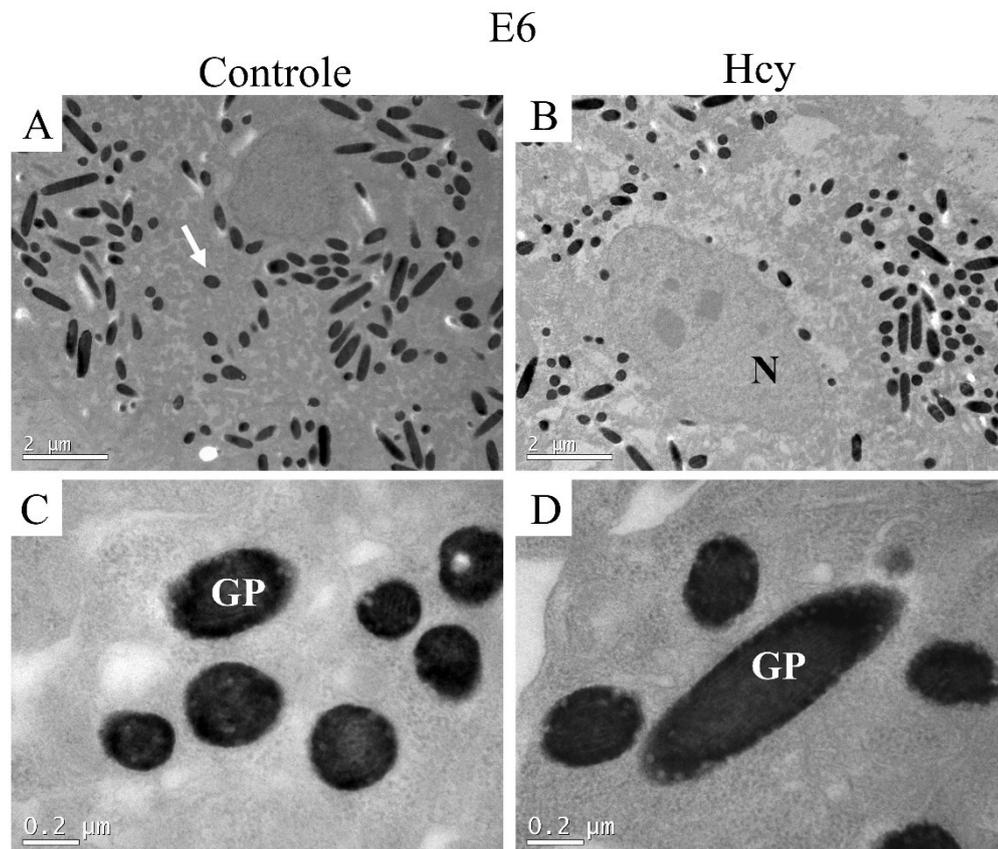
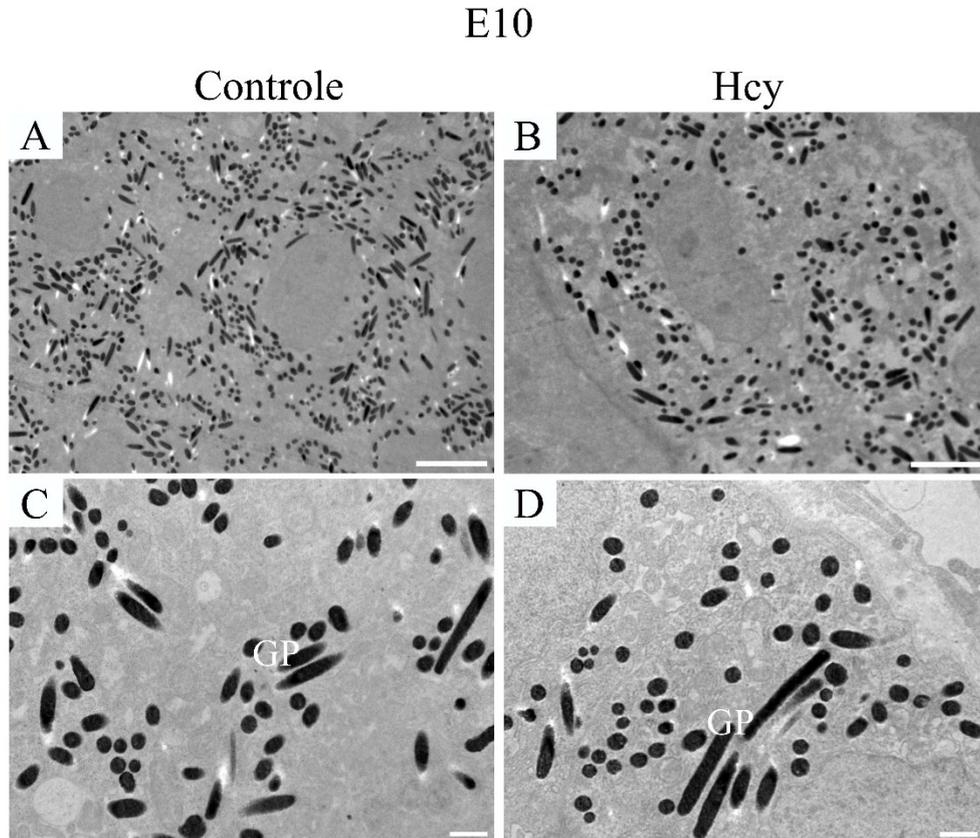


Figura 13: Ultraestrutura do epitélio pigmentado da retina de embriões de *Gallus domesticus* em E10. Células justapostas com núcleo oval e grande quantidade de grânulos de pigmento nos embriões do grupo controle (A) e tratados com Hcy (B). (C e D) grânulos em maior aumento, evidenciando os dois planos de corte dos grânulos de pigmentos – oval e alongado. GP: Grânulos de pigmento. Barras de escala em A e B= 5 μ m; em C e D= 1 μ m. (n = 3 embriões por tratamento).

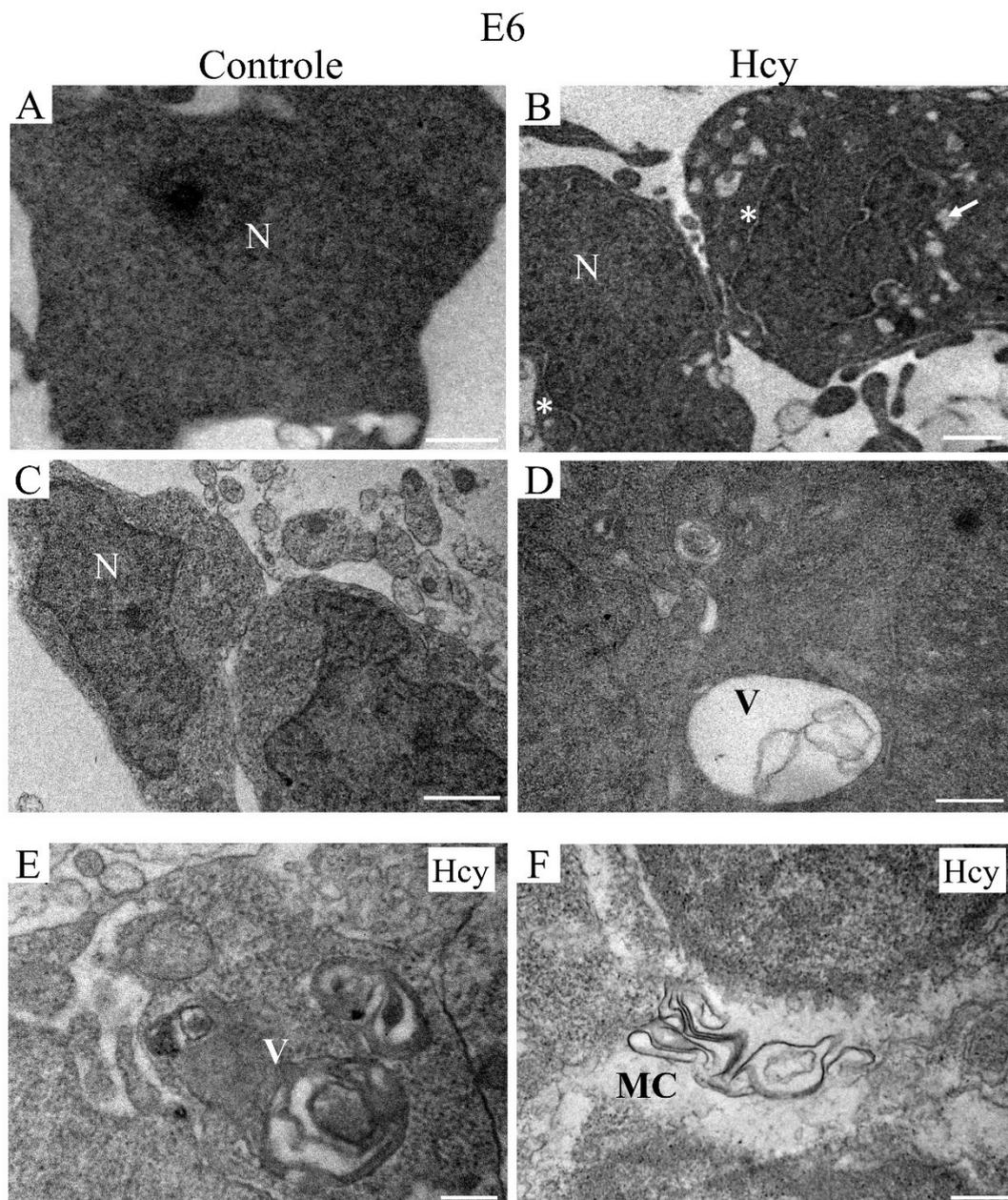


A retina neural foi reconhecida na secção ultrafina por conter camadas celulares mais espessas, contendo células neurais com prolongamentos citoplasmáticos, núcleo volumoso e pela ausência de grânulos de pigmento. Na idade de E6, a retina neural é constituída principalmente por células neuroblásticas e ganglionares, em processo de diferenciação (Figura 14 e 15).

As células dos embriões do grupo controle apresentaram núcleos com eucromatina e heterocromatina bem evidentes, ausência de dilatações no envoltório nuclear, e poucas organelas, sendo reconhecidas em sua maioria mitocôndrias (Figura 14 A e C). Nos embriões tratados com Hcy, as alterações mais evidentes foram observadas no núcleo, citoplasma e nas mitocôndrias. O núcleo apresentou envoltório nuclear dilatado com heterocromatina bem evidente. No citoplasma, foram reconhecidas inclusões semelhantes a vesículas autofágicas com a presença de corpos residuais em seu interior. Ainda no citoplasma, foram observadas formações de membranas concêntricas nos embriões expostos à Hcy (Figura 14 B, D-F).

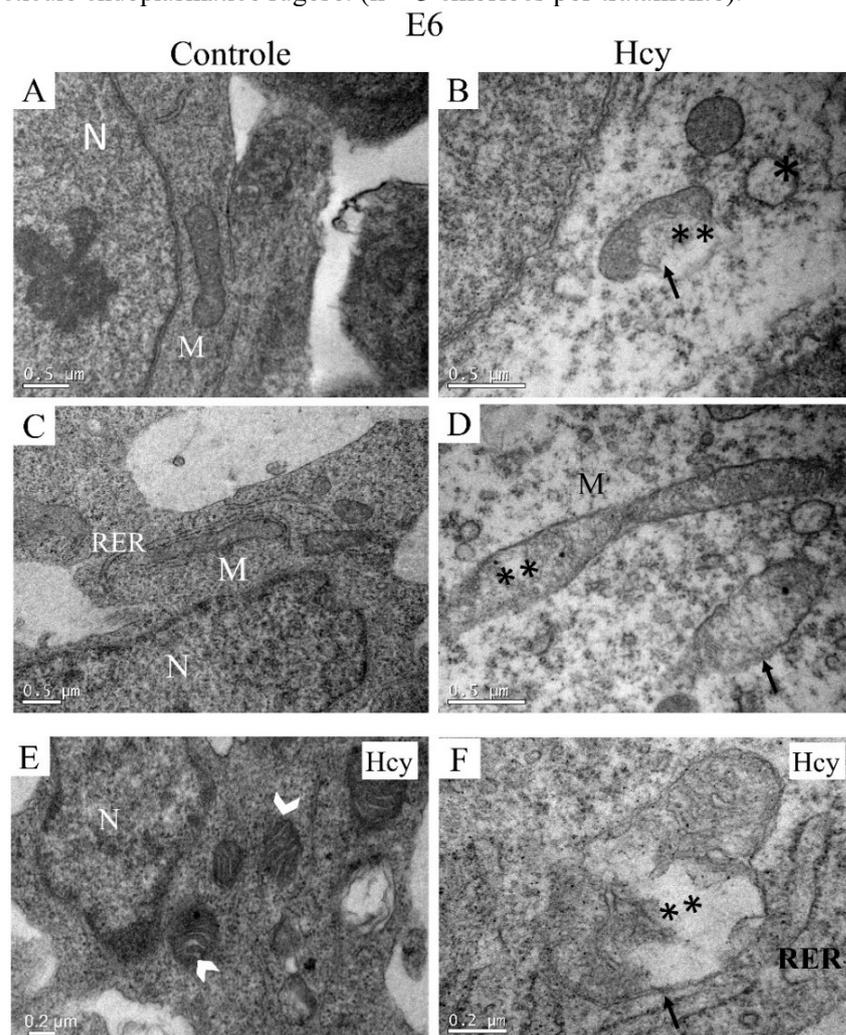
Adicionalmente, para os embriões do grupo controle não foram observadas a presença de inclusões citoplasmáticas semelhantes a vesículas autofágicas ou a formação de membranas concêntricas.

Figura 14: Eletromicrografias da retina neural em embriões de *Gallus domesticus* em E6. (A) Célula neural de embrião controle sem alteração nos compartimentos subcelulares. (B) Célula neural de embrião tratado com Hcy com inclusões citoplasmáticas semelhantes a vesículas autofágicas e membrana perinuclear dilatada. (C) Célula neural de embrião controle demonstrando o citoplasma sem inclusões citoplasmáticas e núcleo sem dilatação. (D-F) Embriões tratados com Hcy, evidenciando formação de inclusões citoplasmáticas como vesículas com corpos residuais em seu interior e a formação de membranas concêntricas. *: Membrana perinuclear dilatada. Seta branca: vesículas autofágicas. MC: membranas concêntricas; N: núcleo; V: vesícula. Barras de escala em A-C = 1 μ m; em D-F = 0,5 μ m. (n = 3 embriões por tratamento).



Na idade de E6, dentre os tipos de alterações encontrados nas células neurais dos embriões tratados com Hcy, a mais evidente foi observada nas mitocôndrias. Nos embriões controle, essas organelas exibiram perfis arredondados e alongados dependendo do plano de corte, foram observadas distribuídas pelo citosol do corpo celular e em alguns prolongamentos, sendo observada a integridade das membranas interna e externa, bem como a organização das cristas mitocondriais (Figura 15 A e C). Nos embriões tratados com Hcy, as mitocôndrias também apresentaram perfis arredondados e alongados, algumas com alterações caracterizadas como dilatação e desorganização das cristas mitocondriais, turgor, rompimento das membranas interna e externa (Figura 15 D-F).

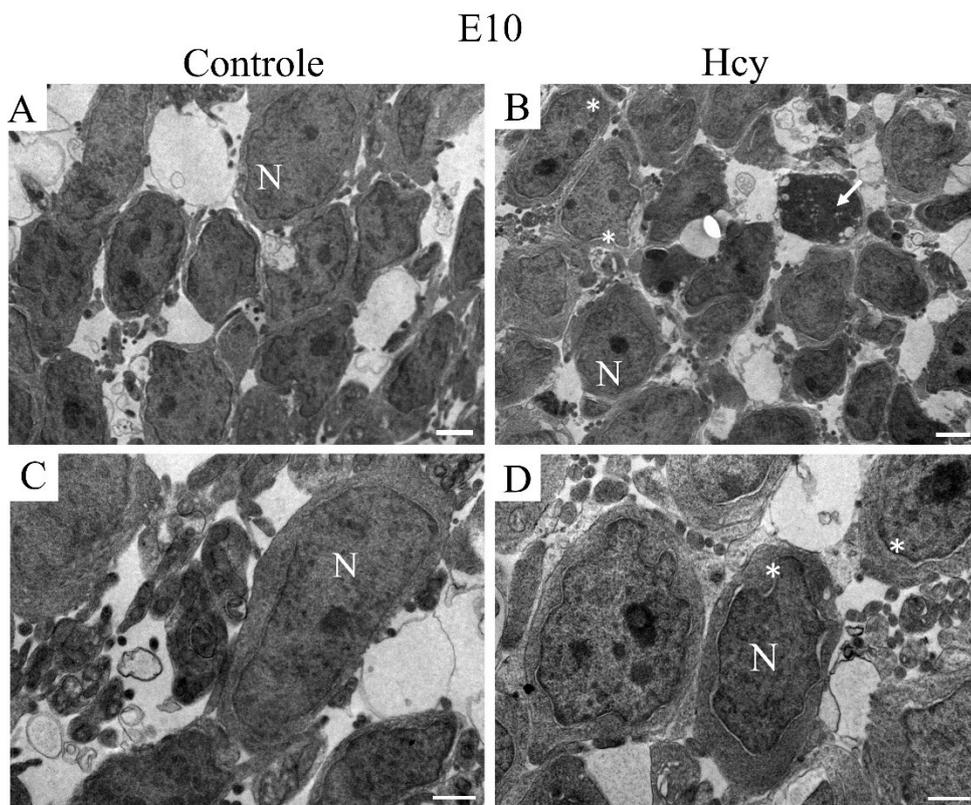
Figura 15: Eletromicrografias das mitocôndrias das células da retina neural de embriões de *Gallus domesticus* em E6. (A) Embrião controle sem alterações na estrutura mitocondrial. (B) embrião tratado com Hcy com a presença de mitocôndria com rupturas nas membranas (seta preta), perda das cristas mitocondriais (*), turgor (**) e dilatação das cristas mitocondriais (cabeça de seta branca). (C) Embrião controle com mitocôndria íntegra. (D-F) Embriões tratados com Hcy apresentando mitocôndrias com edema, perda da integridade das membranas mitocondriais, alteração e dilatação das cristas mitocondriais. M: mitocôndria; N: núcleo; RER: retículo endoplasmático rugoso. (n = 3 embriões por tratamento).



Na idade de E10, a retina neural é composta por diferentes camadas celulares contendo células diferenciadas com diferentes tipos de neurônios e a glia de Müller, que se organizam em padrão estratificado. Porém, para esta análise não conseguimos identificar com segurança os tipos neuronais e glias.

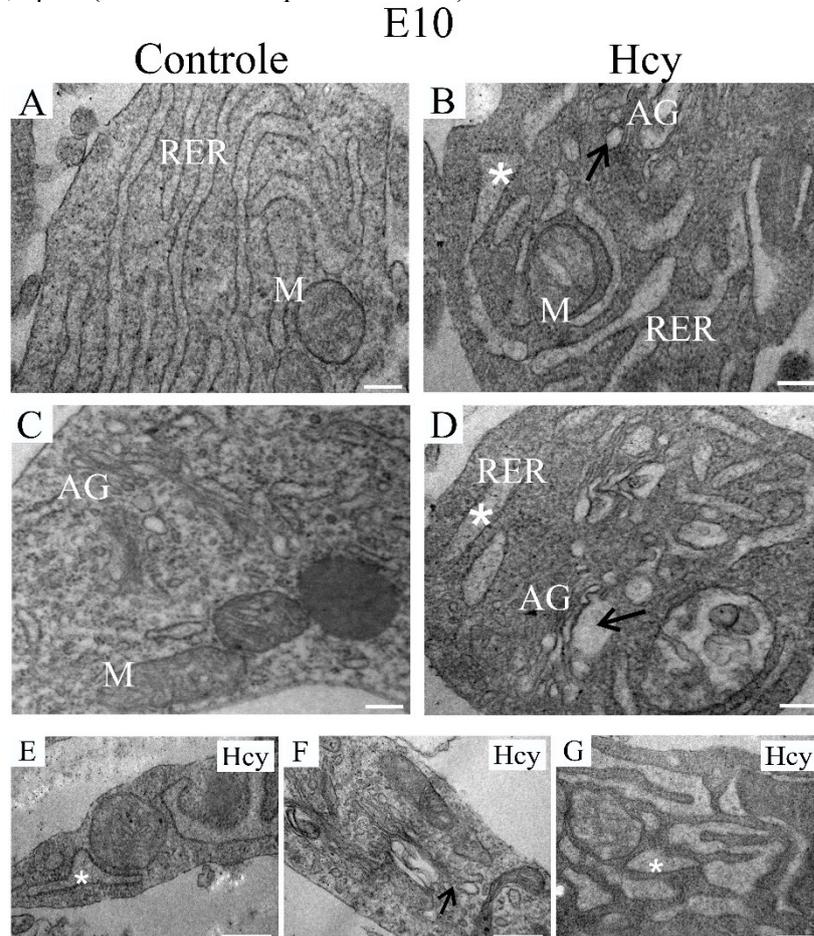
As células dos embriões controle exibiram organização justaposta, com núcleo volumoso e envelope nuclear preservado, heterocromatina evidente, e organelas citoplasmáticas escassas. Nestas células, podemos observar a integridade de todos os componentes celulares, sem alterações aparentes (Figura 16 A e C). As células dos embriões tratados com Hcy apresentaram um arranjo justaposto com pouco espaço extracelular e organelas escassas. O núcleo mostrou-se volumoso com heterocromatina evidente, contudo, foi observada dilatação da membrana perinuclear (Figura 16 B e D).

Figura 16: Eletromicrografias das células da retina neural de embriões de *Gallus domesticus* em E10. (A) Embrião do grupo controle sem alterações nucleares. (B) Embrião tratado com Hcy com dilatações no espaço perinuclear. (C) Embrião do grupo controle exibindo membrana perinuclear sem alterações. (D) Embrião tratado com Hcy exibindo dilatação da membrana perinuclear. N: núcleo; *: dilatação do envelope nuclear. Barras de escala em A-B = 2 μ m; em C-D = 1 μ m. (n = 3 embriões por tratamento).



Foram observados outros tipos celulares neuronais com organização, formatos distintos e a presença de prolongamentos celulares. As células neurais dos embriões controle exibiram organelas bem distribuídas por todo citoplasma. As cisternas aparelho de Golgi (AG) apresentaram morfologia normal e organização de sacos lamelares. O RER apresentou um sistema de membranas bem desenvolvido, composto por cisternas achatadas e com ribossomos aderidos e dispersos pelo citosol (Figura 17 A e C). As mitocôndrias apresentaram perfis arredondados e alongados, dependendo do plano de corte, e em sua maior parte estavam associadas ao RER. As células dos embriões tratados com Hcy exibiram as cisternas do aparelho de Golgi dilatadas e seus sacos lamelares desorganizados. O RER apresentou dilatação no lúmen das cisternas tubulares. As mitocôndrias apresentaram perfis arredondados e alongados, algumas com perda das cristas mitocondriais (Figura 17 B e D-F).

Figura 17: Eletromicrografias do retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi das células da retina neural de embriões de *Gallus domesticus* em E10. (A e C) Organização normal do RER e AG em embriões do grupo controle. (B, D-G) Embriões tratados com Hcy exibindo dilatações nas cisternas do RER, desorganização dos sacos lamelares do AG e alterações nas cristas mitocondriais. AG: aparelho de Golgi; M: mitocôndria; RER: retículo endoplasmático rugoso; *: cisternas do RER; Seta preta: desorganização dos sacos lamelares do aparelho de Golgi. Barras de escala em A-D = 0,5 μ m; em D-F = 0,2 μ m. (n = 3 embriões por tratamento).



As alterações mais evidentes encontradas nos embriões na idade de E10, foram às relacionadas a presença de vesículas no citosol e alterações mitocondriais. Nas células dos embriões controle, não foram identificadas a prevalência de vesículas autofágicas. As mitocôndrias apresentaram perfis alongados e arredondados com membranas externa e interna preservadas, além da preservação das cristas mitocondriais. Para os embriões tratados com Hcy foram identificadas células com uma grande quantidade de vesículas, algumas com corpos residuais em seu interior. Além disso, muitos estavam próximos às mitocôndrias. As mitocôndrias apresentaram alterações como ruptura de membrana, turgor e perda das cristas mitocondriais (Figura 18 e 19).

Figura 18. Eletromicrografias das vesículas autofágicas das células da retina neural de embriões de *Gallus domesticus* em E10. (A e C) Citoplasma sem a presença de vesículas autofágicas em embriões do grupo controle. (B e D) Embriões tratados com Hcy exibindo várias vesículas autofágicas. M: mitocôndria; N: núcleo; *: vesículas autofágicas com corpos residuais. (n = 3 embriões por tratamento).

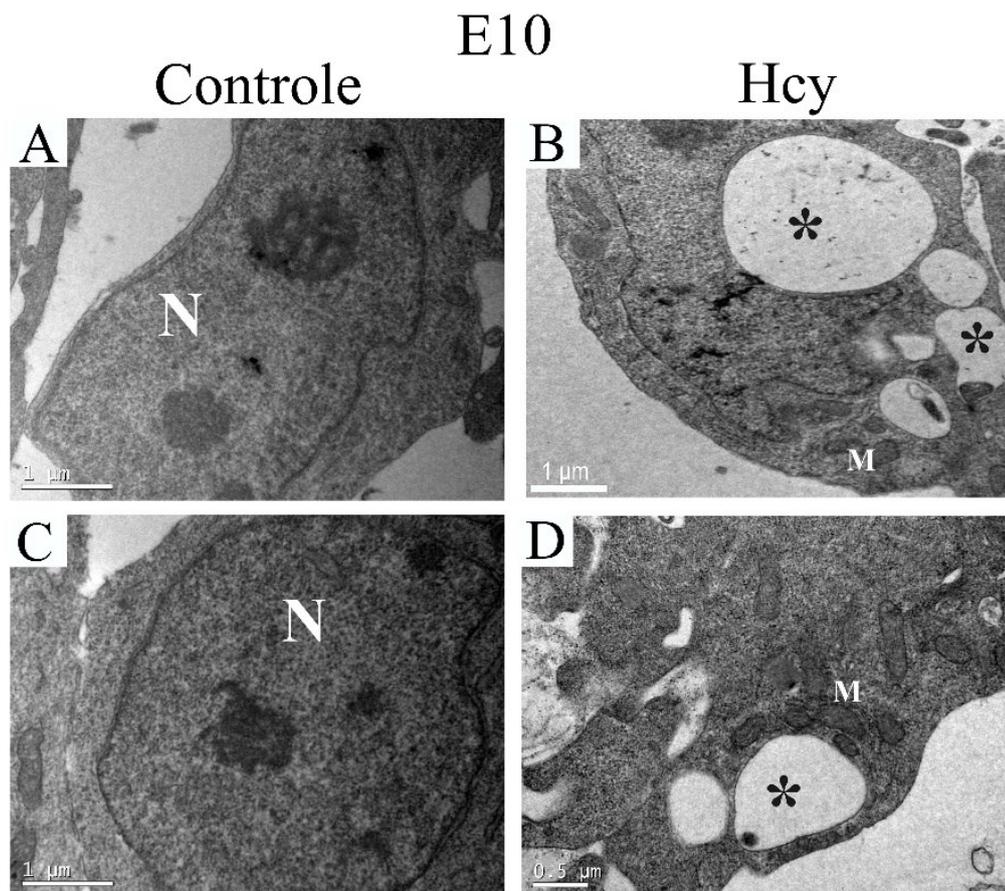
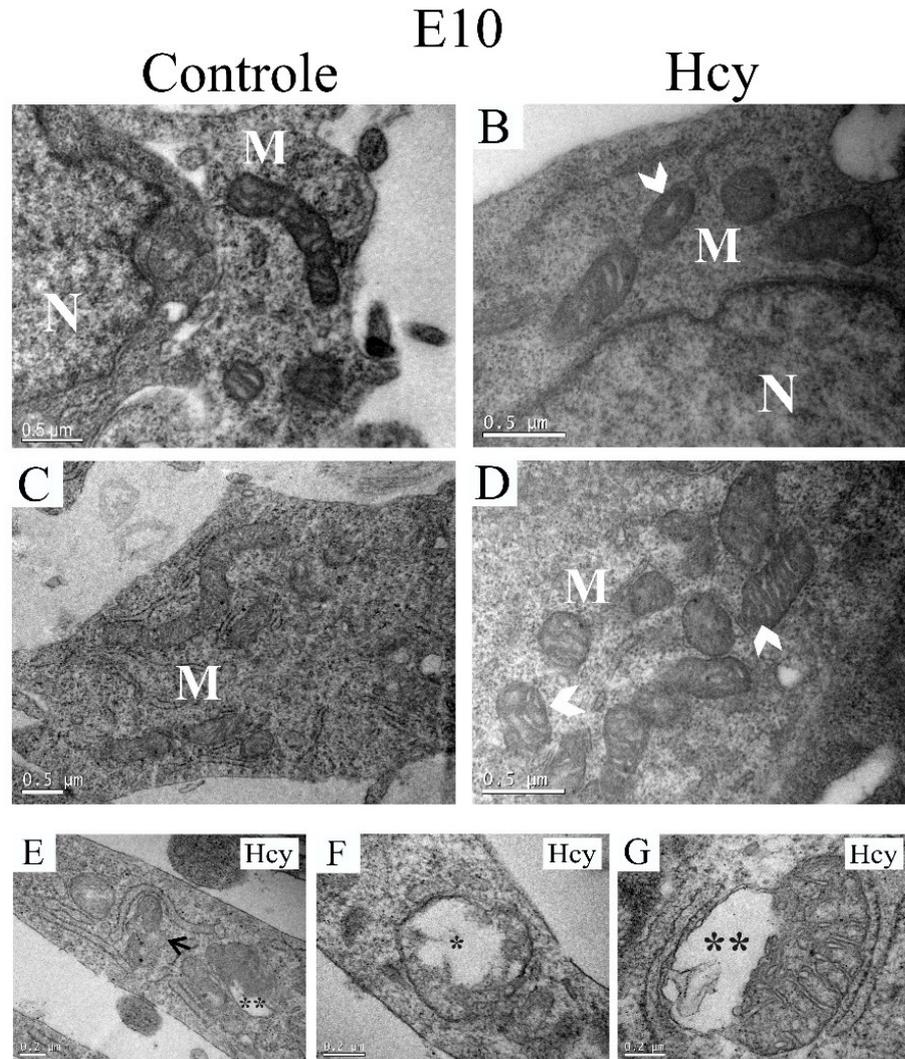


Figura 19. Eletromicrografias das mitocôndrias das células da retina neural de embriões de *Gallus domesticus* em E10. (A) Embrião controle sem alterações na estrutura mitocondrial. (B) embrião tratado com Hcy exibindo mitocôndria com dilatação das cristas mitocondriais. (C) Embrião controle com mitocôndria íntegra. (D-G) Embriões tratados com Hcy apresentando mitocôndrias com turgor, perda da integridade das membranas mitocondriais e dilatação das cristas mitocondriais. M: mitocôndria; N: núcleo; Seta preta: ruptura de membrana; *: perda das cristas mitocondriais; **: turgor; Cabeça de seta branca: dilatação das cristas mitocondriais. (n = 3 embriões por tratamento).



O resumo da análise das alterações ultraestruturais presentes em cada componente subcelular dos grupos analisados (controle e Hcy) nas duas idades embrionárias encontram-se resumidas no quadro 3.

Quadro 3: Alterações ultraestruturais da retina neural das vesículas ópticas de embriões de *Gallus domesticus*. Para cada tipo de alteração encontrada, foram estabelecidos escores que refletem o grau de intensidade das alterações.

Compartimento subcelular	Dano ultraestrutural	Controle	Hcy	
			E6	E10
Núcleo	Dilatação do envoltório nuclear	-	+	++
Mitocôndria	Alteração de cristas	-	+++	+++
	Ruptura de membrana	-	+	+
	Turgor	-	+	+++
Retículo endoplasmático rugoso	Dilatação das cisternas	-	-	+++
Formações anômalas	Formação de membranas concêntricas	-	++	-
	Formação de vesículas	-	++	+++

Símbolos indicam intensidade das alterações: ausente (-), fraca (+), intensa (++), muito intensa (+++).

4.6 EFEITO DA HCY NAS PROTEÍNAS RELACIONADAS AO CICLO CELULAR

Sendo a proliferação um dos mecanismos mais básicos e inerentes à estruturação de órgãos e tecidos durante o desenvolvimento embrionário, buscou-se avaliar as proteínas envolvidas no controle e progressão do ciclo celular, como fosfo-histona H3, p53, p21 e PCNA.

Na idade de E6, a quantificação das células positivas para a proteína fosfo-histona H3, um marcador que avalia células em fase de mitose, mostrou-se significativamente menor nas vesículas ópticas dos embriões do grupo tratado com Hcy (226, 67 células \pm 27,27), quando comparada às células dos embriões do grupo controle (387,67 células \pm 61,10; P = 0,01). A análise da quantificação das células p53-positivas foi maior nas vesículas ópticas dos embriões tratados com Hcy (153,33 células \pm 26,10), em comparação com embriões do grupo controle (82,33 células \pm 13,05; P = 0,01). Além disso, foi reconhecido um aumento significativo no número de células p21-positivas nas vesículas ópticas dos embriões tratados com Hcy (247,66 células \pm 24,18), quando comparado às vesículas ópticas dos embriões do grupo controle (146,00 células \pm 37,16; P = 0,01). Quando analisamos as quantificações das células PCNA-positivas, não foi verificada diferença significativa entre o grupo controle (521,33 células \pm 52,64), e o grupo tratado com Hcy (449,67 células \pm 60,01) (Figura 20).

Na idade de E10, efeitos semelhantes foram encontrados na quantificação de células marcadas com fosfo-histona H3. Neste caso, foi observada uma redução no número de células

positivas nos embriões tratados com Hcy ($407,67$ células $\pm 38,02$), quando comparados aos embriões do grupo controle ($511,66$ células $\pm 38,42$; $P = 0,02$).

Na quantificação das células p53-positivas, não foram encontradas diferenças significativas no número de células positivas nas vesículas ópticas dos embriões controle ($465,00$ células $\pm 38,72$), e dos embriões tratados com Hcy ($351,33$ células $\pm 43,30$). Do mesmo modo, não foram encontradas diferenças significativas no número de células p21-positivas nas vesículas ópticas de embriões controle ($212,33$ células $\pm 42,88$), e dos embriões tratados com Hcy ($228,67$ células $\pm 11,48$). Quando avaliamos a quantificação das células PCNA-positivas, também não encontramos diferenças significativas no número de células nas vesículas ópticas dos embriões controle ($443,67$ células $\pm 69,04$), e dos embriões tratados com Hcy ($427,00$ células $\pm 16,09$) (Figura 21).

Figura 20: Quantificação do número de células positivas para as proteínas p53, p21, PCNA e fosfo-histona H3, nas vesículas ópticas de embriões de *Gallus domesticus* em E6. (A, C, E e G) Histogramas de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células positivas. (B, D, F e H) Gráficos de barras representando o número absoluto de células positivas para cada marcador. Os dados foram apresentados com média \pm erro padrão. (*) indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre embriões do grupo controle e tratados com Hcy. (n= 9 embriões por tratamento).

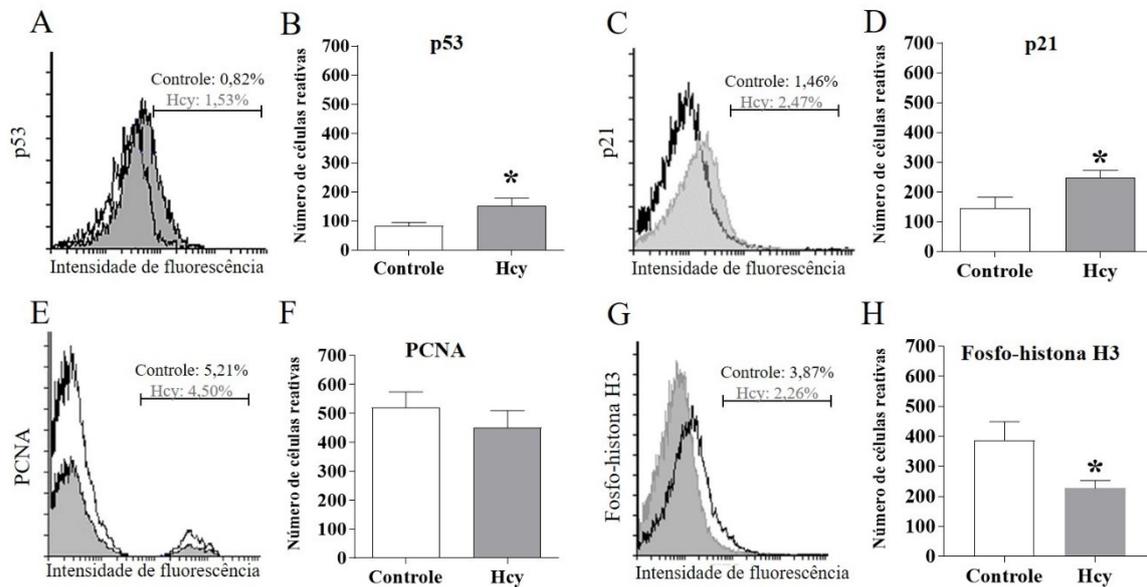
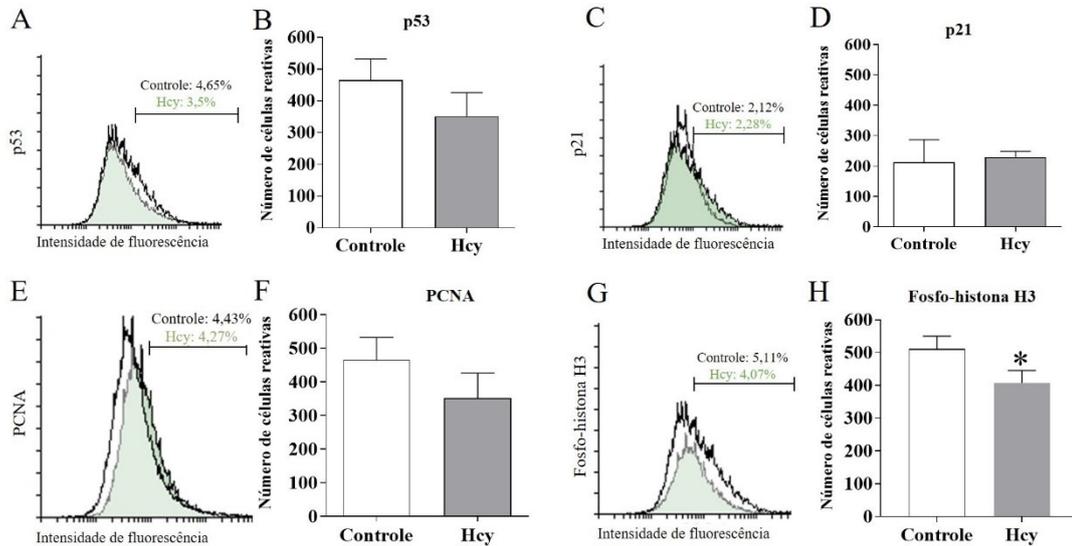


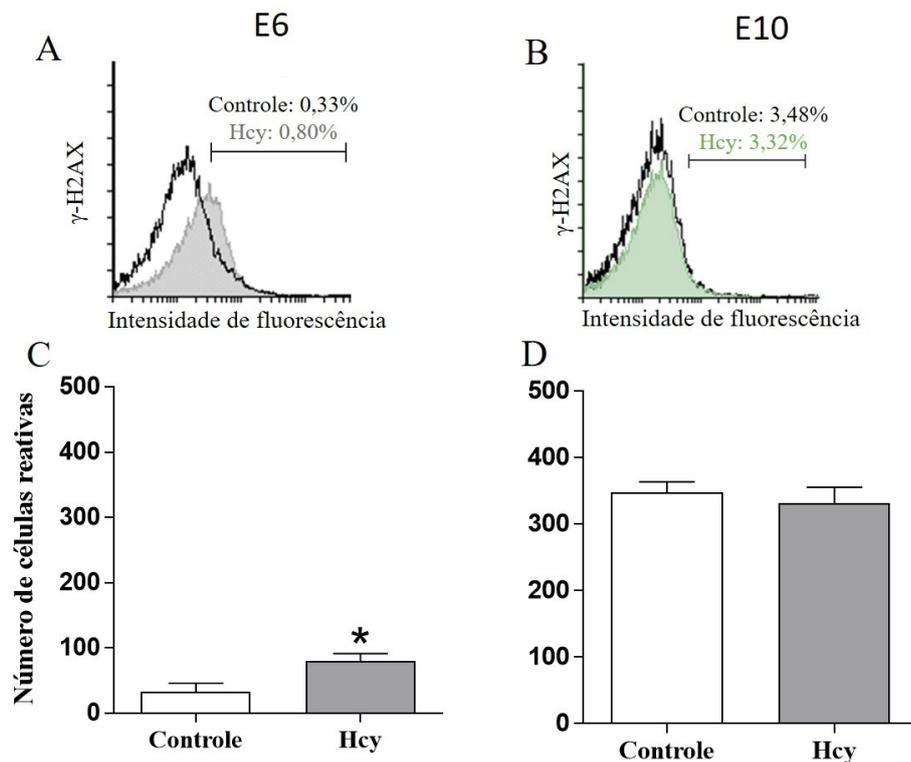
Figura 21: Quantificação do número de células positivas para as proteínas p53, p21, PCNA e fosfo-histona H3, nas vesículas ópticas de embriões de *Gallus domesticus* em E10. (A, C, E e G) Histogramas de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células positivas. (B, D, F e H) Gráficos de barras representando o número absoluto de células positivas para cada marcador. Os dados foram apresentados com média \pm erro padrão. (*) indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre embriões do grupo controle e tratados com Hcy. (n = 9 embriões por tratamento).



4.7 EFEITO GENOTÓXICO DA HCY

Considerando os resultados da análise das proteínas do ciclo celular, que demonstrou que a Hcy promoveu o aumento dos níveis de p53 – proteína que pode ser ativada em resposta a danos ao DNA, foi realizada a quantificação das células positivas para a proteína histona γ -H2AX. A expressão de γ -H2AX é comumente reconhecida quando ocorrem quebras na fita de DNA, indicando assim, danos a esta molécula. Na idade de E6, a quantificação de células positivas para γ -H2AX revelou um aumento significativo de células reativas nas vesículas ópticas de embriões tratados com Hcy (80,33 células \pm 19,04), quando comparado aos embriões do grupo controle (33,33 células \pm 22,00; $P = 0,04$). Para a análise de embriões na idade de E10, o tratamento com Hcy não foi capaz de alterar o número de células γ -H2AX, sendo quantificadas (348,33 \pm 15,39) células positivas nas vesículas ópticas dos embriões controle, e (332,00 \pm 23,47) células nas vesículas ópticas dos embriões tratados com Hcy (Figura 22).

Figura 22: Quantificação do número de células positivas para a proteína γ -H2AX, nas vesículas ópticas de embriões de *Gallus domesticus* em E6 e E10. Histograma de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células positivas na idade de E6 em (A) e idade de E10 em (B). (C e D) Gráficos de barras representando o número absoluto de células positivas para o marcador em E6 e E10 respectivamente. Os dados foram apresentados com média \pm erro padrão. (*) indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre embriões do grupo controle e tratados com Hcy. (n= 9 embriões por tratamento).



4.8 EFEITO DA HCY SOBRE A DIFERENCIAÇÃO NEURAL

Uma vez que foram reconhecidos os efeitos da Hcy sobre os mecanismos envolvidos na proliferação celular, passou-se a investigar se as alterações encontradas no ciclo celular poderiam interferir na diferenciação das células neurais e assim, modificar a composição celular da vesícula óptica. Assim, foram realizadas quantificações de proteínas envolvidas na diferenciação e sobrevivência de neurônios e da célula da glia: NeuN, β -tubulina III, vimentina, GFAP, BDNF e GDNF.

O número de células positivas para proteína NeuN – um marcador para neurônios pós mitóticos, mostrou-se significativamente menor nas vesículas ópticas dos embriões tratados com Hcy (102,67 células \pm 4,50) quando comparado às vesículas ópticas dos embriões controle (149,00 \pm 20,44, $P = 0,04$). Para a molécula de vimentina, proteína utilizada para identificar células gliais imaturas, não foram encontradas diferenças significativas entre o número de

células positivas nas vesículas ópticas dos embriões controle ($192,03 \pm 24,13$) e das vesículas ópticas dos embriões tratados com Hcy ($166,76 \pm 12,12$).

A análise das moléculas envolvidas com a sobrevivência das células neurais foi realizada através da quantificação do número de células positivas para as neurotrofinas BDNF e GDNF. Essas proteínas desempenham um importante papel no crescimento, plasticidade, diferenciação e sobrevivência neuronal nos tecidos em desenvolvimento. Para a proteína BDNF, não foram encontradas diferenças significativas no número de células positivas das vesículas ópticas de embriões controle ($75,00$ células $\pm 21,21$), quando comparamos às vesículas ópticas dos embriões tratados com Hcy ($102,00$ células $\pm 9,19$). Porém, ao analisarmos as quantificações das células GDNF positivas, as vesículas ópticas dos embriões tratados com Hcy mostraram uma redução significativa de células positivas ($203,67$ células $\pm 45,96$) em comparação ao grupo controle ($302,33 \pm 23,33$; $P = 0,03$) (Figura 23).

Para embriões na idade de E10, o marcador utilizado para avaliar a diferenciação de neurônios foi a β -tubulina III, um marcador para neurônios maduros, visto que nesta idade a retina é composta por uma diversidade de neurônios já diferenciados. Em E10 foi reconhecida uma redução significativa no número de células β -tubulina III-positivas nas vesículas ópticas dos embriões tratados com Hcy ($842,68$ células $\pm 36,38$), comparado às vesículas ópticas dos embriões do grupo controle ($998,00$ células $\pm 32,70$; $P = 0,01$). Para o marcador glial GFAP, não foram verificadas diferenças significativas o número de células positivas nas vesículas ópticas dos embriões controle ($582,00$ células $\pm 53,54$), e dos embriões tratados com Hcy ($476,67$ células $\pm 12,26$). Para a proteína BDNF também não foram verificadas diferenças significativas nas vesículas ópticas dos embriões controle ($864,66$ células $\pm 38,83$), e dos embriões tratados com Hcy ($831,33$ células $\pm 2,86$). Entretanto, a quantificação do número de células GDNF-positivas, revelou uma diminuição significativa das células positivas nas vesículas ópticas dos embriões tratados com Hcy ($844,33$ células $\pm 0,41$), em comparação aos embriões controle ($1421,32$ células $\pm 214,18$; $P = 0,04$) (Figura 24).

Figura 23: Quantificação do número de células positivas para as proteínas NeuN, GFAP, BDNF e GDNF, nas vesículas ópticas de embriões de *Gallus domesticus* em E6. (A, C, E e G) Histogramas de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células positivas. (B, D, F e H) Gráficos de barras representando o número absoluto de células positivas para cada marcador. Os dados foram apresentados com média \pm erro padrão. (*) indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre embriões do grupo controle e tratados com Hcy. (n= 9 embriões por tratamento).

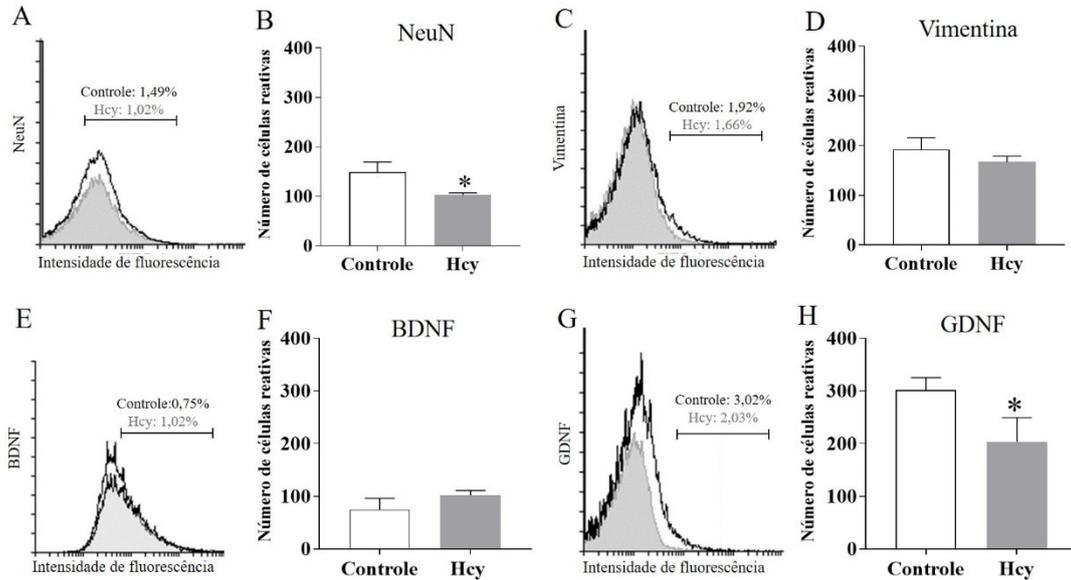
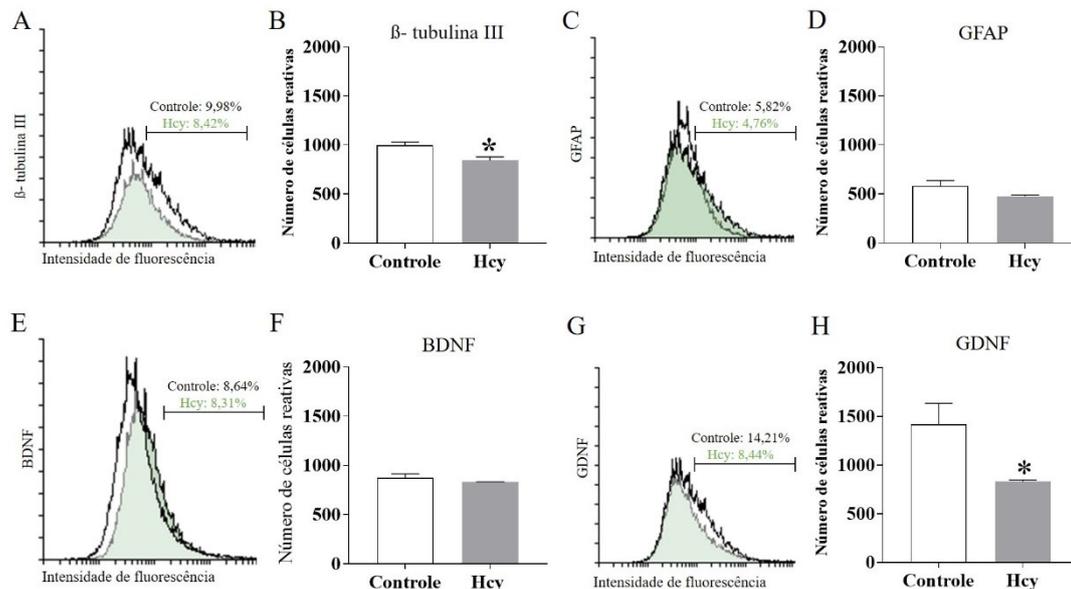


Figura 24: Quantificação do número de células positivas para as proteínas β -tubulina III, GFAP, BDNF e GDNF, nas vesículas ópticas de embriões em idade E10. (A, C, E e G) Histogramas de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células imunomarcadas. (B, D, F e H) Gráficos de barras representando o número absoluto de células positivas para cada marcador. Os dados foram apresentados com média \pm erro padrão. (*) indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre embriões do grupo controle e tratados com Hcy. (n= 9 embriões por tratamento).



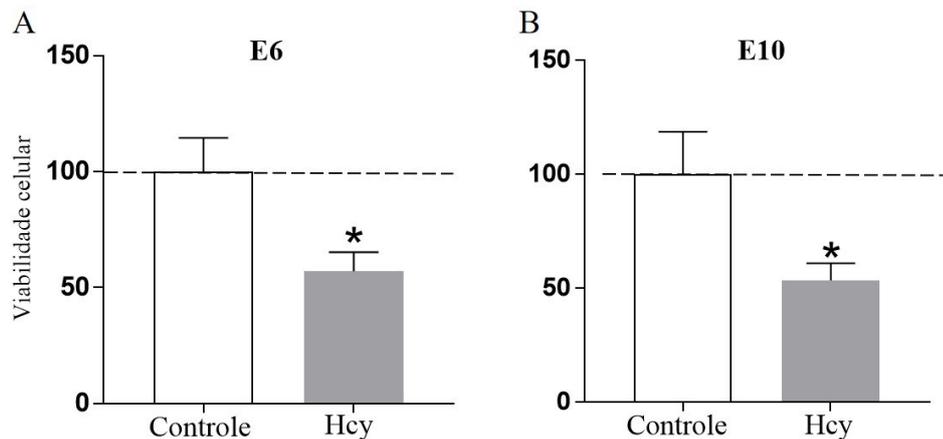
4.9 MITOCÔNDRIA COMO ALVO DA TOXICIDADE DA HOMOCISTEÍNA

Considerando as alterações ultraestruturais visualizadas nas mitocôndrias dos embriões tratados com Hcy, foram realizadas análises adicionais, a fim de melhor caracterizar a resposta desta organela à dose elevada de Hcy.

4.9.1 Efeito da Hcy sobre a viabilidade celular

O teste de MTT foi realizado com o objetivo de reconhecer os efeitos da Hcy sobre a viabilidade celular através da avaliação da atividade das desidrogenases mitocondriais nas vesículas ópticas de embriões de *Gallus domesticus*. Após o tratamento e período de incubação, pode-se constatar que a Hcy induziu uma redução significativa de 57% da viabilidade celular em embriões em idade de E6, quando comparados ao controle ($P = 0,02$), e uma redução de 54% na viabilidade celular em embriões tratados com Hcy na idade de E10 ($P = 0,04$) (Figura 25).

Figura 25: Viabilidade celular nas vesículas ópticas de embriões de *Gallus domesticus* em E6 e E10. (A) Redução do MTT em embriões em E6. (B) Redução do MTT em embriões em E10. Os resultados estão apresentados como porcentagem do controle e em média (\pm erro padrão). (*) indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre embriões dos grupos controle e Hcy. ($n = 6$ embriões por tratamento).



4.9.2 Efeitos da Hcy na dinâmica mitocondrial

Os eventos de fissão e fusão mitocondrial são essenciais durante o processo da dinâmica mitocondrial, que por sua vez refletem diretamente na funcionalidade desta organela. Neste sentido, foi realizada a quantificação do número de células positivas para as proteínas

envolvidas no processo de fusão mitocondrial, Mfn1 e Mfn2, e a proteína de fissão mitocondrial, Drp1, nas vesículas ópticas de embriões em idades de E6 e E10.

Em E6, a quantificação de células reativas para Drp1 mostrou-se significativamente maior nas vesículas ópticas dos embriões tratados com Hcy ($620,67 \pm 11,25$) quando comparados aos embriões controle ($525,33 \pm 32,61$; $P = 0,002$). Para a quantificação da proteína Mfn1 foi observada uma redução de células imunomarcadas nas vesículas ópticas dos embriões tratados com Hcy ($370,67 \pm 8,95$), em comparação às vesículas ópticas dos embriões do grupo controle ($452,33 \pm 21,65$, $P = 0,001$). Para a quantificação da proteína Mfn2, não foram observadas diferenças significativas entre as vesículas ópticas dos embriões controle ($570,66 \pm 41,27$), e dos embriões tratados com Hcy ($556,33 \pm 9,52$) (Figura 26).

Quando analisamos os mesmos marcadores mitocondriais para idade de E10, observamos um aumento significativo no número de células Drp-1-positivas nas células das vesículas ópticas dos embriões tratados com Hcy ($720,33 \pm 20,22$) em comparação aos embriões controle ($591,45 \pm 13,46$; $P = 0,0007$). Já para a quantificação da proteína Mfn1, foi encontrada uma redução significativa no número de células positivas nas vesículas ópticas dos embriões tratados com Hcy ($792,44 \pm 32,18$) em comparação com os embriões controle ($1509,56 \pm 133,60$; $P = 0,0003$). Do mesmo modo, a quantificação de células positivas para Mfn2 mostrou-se menor nas células das vesículas ópticas de embriões tratados com Hcy ($806,11 \pm 16,99$), do que nas do grupo controle ($899,78 \pm 18,77$; $P = 0,0008$) (Figura 27).

Figura 26: Quantificação do número de células positivas para as proteínas Drp1, Mfn1, Mfn2, nas vesículas ópticas de embriões de *Gallus domesticus* em E6. (A, B e C) Histogramas de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células imunomarcadas. (D, E e F) Gráficos de barras representando o número absoluto de células positivas para cada marcador. Os dados foram apresentados com média \pm erro padrão. (*) indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre embriões do grupo controle e tratado com Hcy. (n= 9 embriões por tratamento).

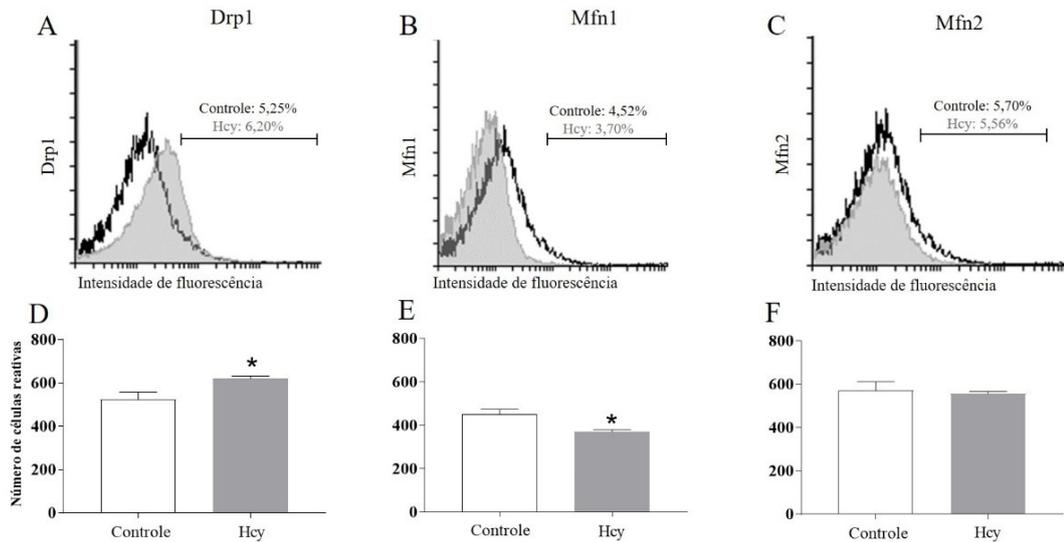
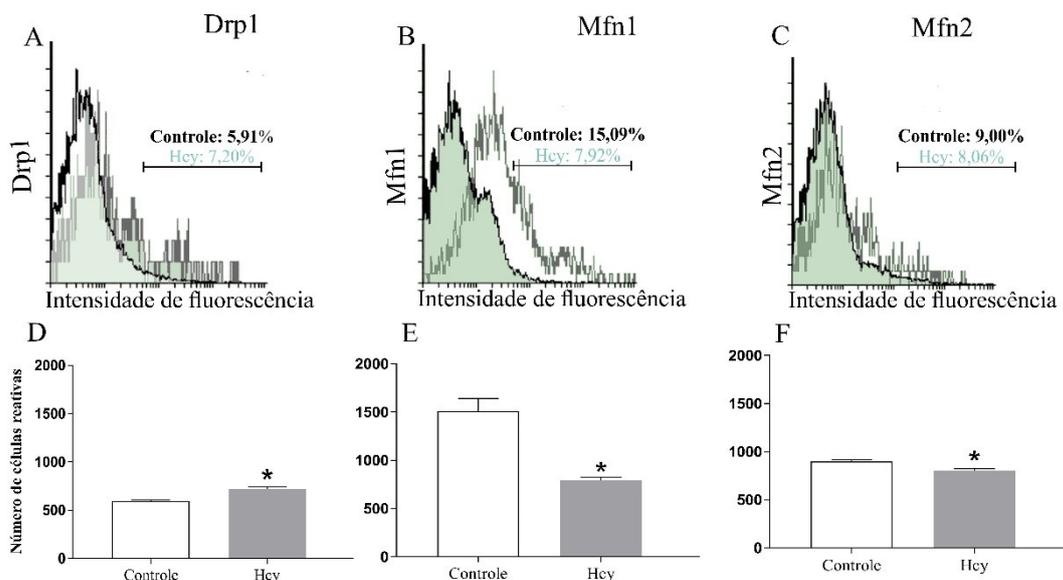


Figura 27: Quantificação do número de células positivas para as proteínas Drp1, Mfn1, Mfn2, nas vesículas ópticas de embriões de *Gallus domesticus* em E10. (A, B e C) Histogramas de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células imunomarcadas. (D, E e F) Gráficos de barras representando o número absoluto de células positivas para cada marcador. Os dados foram apresentados com média \pm erro padrão. (*) indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre embriões do grupo controle e tratado com Hcy. (n= 9 embriões por tratamento).



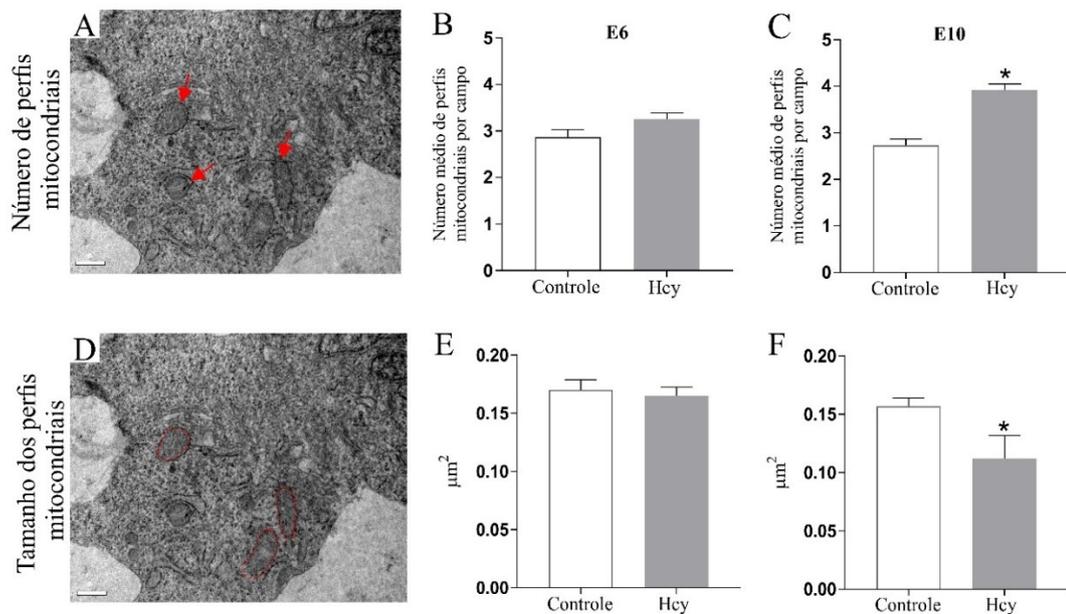
4.9.3 Efeito da Hcy sobre o conteúdo e morfometria dos perfis mitocondriais durante o desenvolvimento das vesículas ópticas

Considerando que as alterações nos processos de fissão e fusão mitocondrial podem alterar o número e tamanho dos perfis mitocondriais, foram realizadas análises quantitativas do conteúdo e dos tamanhos dos perfis mitocondriais.

As análises quantitativas realizadas a partir das micrografias eletrônicas das células neurais das vesículas ópticas não revelaram diferenças significativas no número de perfis mitocondriais em embriões controle ($2,87 \pm 0,16$), quando comparados com as células neurais das vesículas ópticas de embriões tratados com Hcy ($3,26 \pm 0,13$) na idade de E6. Já na idade de E10, as análises do conteúdo dos perfis mitocondriais demonstraram um aumento significativo no número de perfis mitocondriais em embriões tratados com Hcy ($3,93 \pm 0,13$), quando comparados aos embriões controle ($2,73 \pm 0,14$; $P = 0,0001$). (Figura 28 A - C).

Quando analisamos a morfometria dos perfis mitocondriais na idade de E6, não encontramos diferenças significativas em relação à área das mitocôndrias das células da retina neural de embriões controle ($0,170 \mu\text{m}^2 \pm 0,09$) e tratados com Hcy ($0,165 \mu\text{m}^2 \pm 0,10$). Já na idade de E10, verificamos uma redução significativa no tamanho dos perfis mitocondriais das células neurais das vesículas ópticas dos embriões tratados com Hcy ($0,112 \mu\text{m}^2 \pm 0,02$) e embriões do grupo controle ($0,157 \pm 0,007$; $P = 0,002$). (Figura 28 D - F).

Figura 28: Quantificação e morfometria dos perfis mitocondriais nas células da retina neural de embriões de *Gallus domesticus* em E6 e E10. (A) Eletromicrografia exibindo perfis mitocondriais (setas). (B e C) Gráficos de barras representando média \pm erro padrão da média do número médio de mitocôndrias por campo em E6 e E10 respectivamente. (D) Eletromicrografia exibindo área mitocondrial delimitada em vermelho. (E e F) Gráficos de barras representando média \pm erro padrão da média da área mitocondrial em E6 e E10 respectivamente. (*) indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre embriões do grupo controle e tratados com Hcy nas duas idades analisadas. Barras de escalas = 0,5 μm . (n= 3 embriões por tratamento).

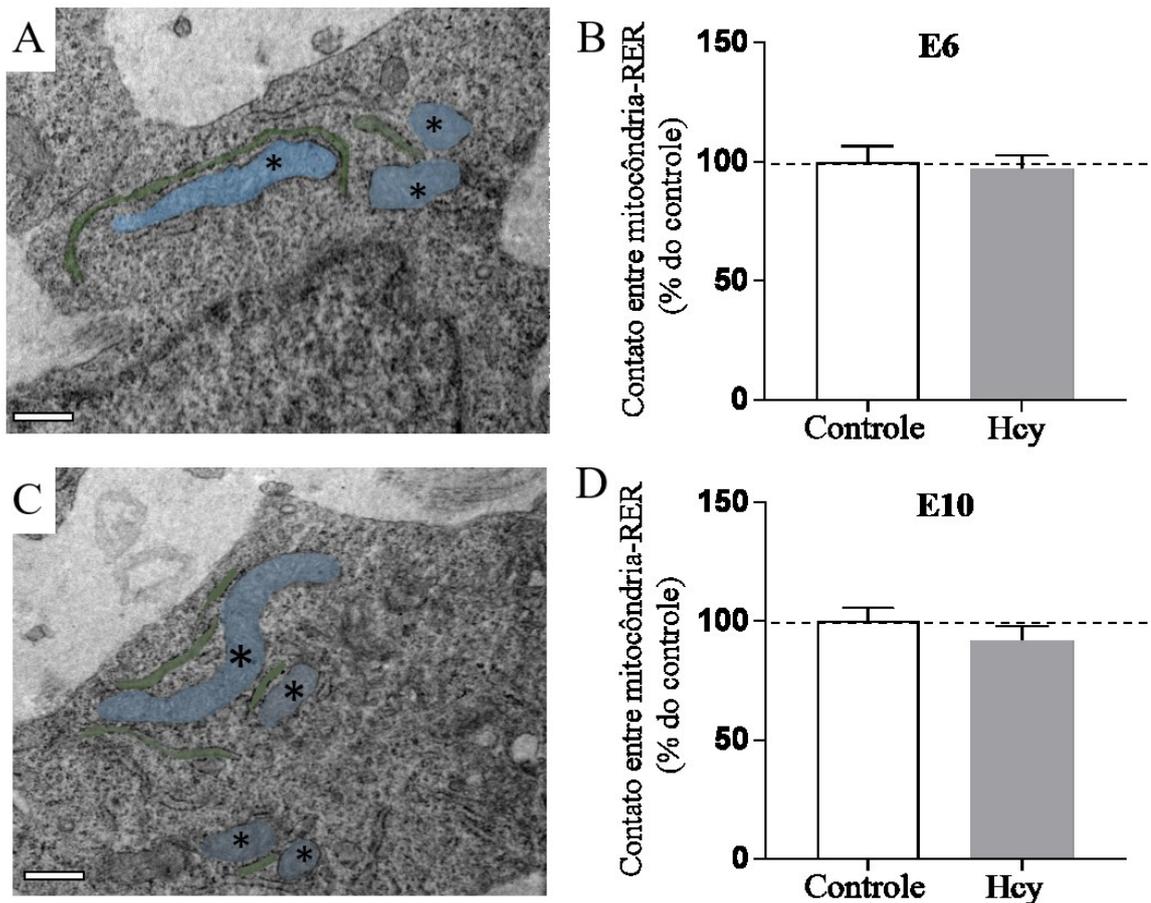


4.9.4 Efeito da Hcy sobre a interação entre mitocôndria e retículo endoplasmático durante o desenvolvimento das vesículas ópticas

As alterações encontradas nos embriões tratados com Hcy podem promover adaptações celulares que envolvem principalmente a função mitocondrial, a qual está intimamente ligada à dinâmica mitocondrial e à interação entre as mitocôndrias e o RER. A perda do contato entre essas duas organelas pode refletir diretamente na homeostase celular, levando à prejuízos na dinâmica mitocondrial. Uma proteína essencial à interação entre mitocôndria-RER é a proteína Mfn2, que se mostrou reduzida nos embriões tratados com Hcy. Portanto, considerando as alterações celulares anteriormente citadas, foi realizada a quantificação do contato entre mitocôndria-RER nos embriões controle e tratados com Hcy nas duas idades de análise.

Na idade de E6, não foram encontradas diferenças significativas entre embriões controle e tratados com Hcy para análise da interação entre mitocôndria-RER ($P = 0,7$). Em E10, também não foram encontradas diferenças significativas na análise de interação entre as duas organelas ($P = 0,1$) (Figura 29).

Figura 29: Efeito da Hcy sobre a interação entre mitocôndria e retículo endoplasmático rugoso. (A) Eletromicrografia exibindo contatos entre mitocôndrias-RER em embriões na idade de E6 (asteriscos). (B) Gráficos de barras representando média \pm erro padrão da porcentagem de interação entre mitocôndrias-RER. (C) Eletromicrografia apresentando contatos entre mitocôndrias-RER em embriões na idade de E10 (asteriscos). (D) Gráficos de barras representando média \pm erro padrão da porcentagem de mitocôndrias em contato com o retículo endoplasmático. Barras de escala = 0,5 μ m (n= 3 embriões por tratamento).



4.10. EFEITO DA HCY SOBRE O PROCESSO DE AUTOFAGIA

A partir das observações obtidas através da análise ultraestrutural, a qual demonstrou a presença frequente de vesículas citoplasmáticas nos embriões tratados com Hcy nas duas idades, foi realizada a análise quantitativa para a confirmação do processo de autofagia, utilizando a proteína LC3 como marcador. Além desta análise, foi realizada a quantificação vesículas autofágicas através das eletromicrografias.

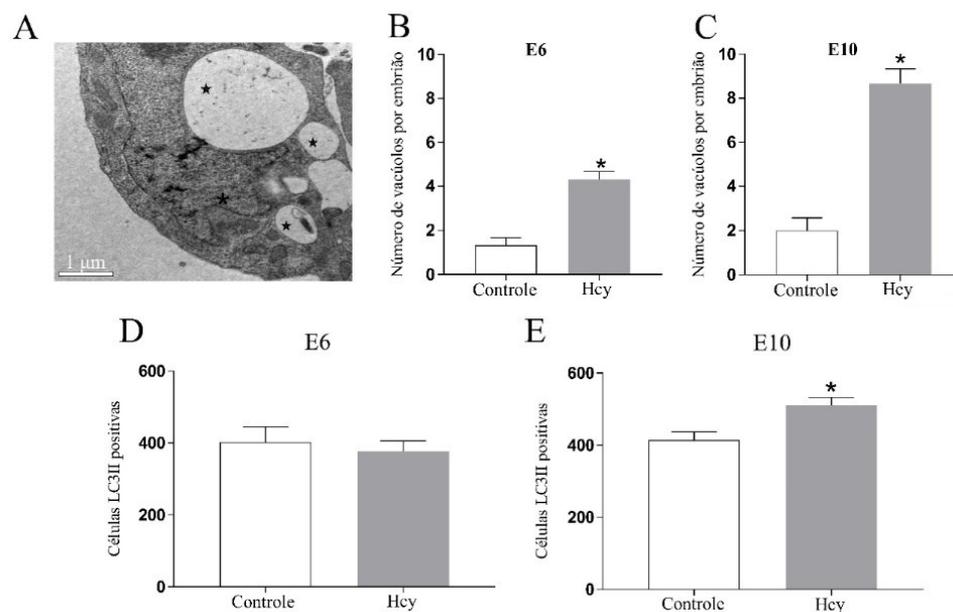
Para confirmação do processo de autofagia via formação de autofagossomos, quantificamos por citometria de fluxo as células positivas para proteína LC3II. Para idade de E6, não foram encontradas diferenças significativas na quantificação das células LC3II-

positivas nas vesículas ópticas dos embriões controle (402,50 células \pm 42,01), em comparação às células das vesículas ópticas dos embriões tratados com Hcy (376,5 células \pm 29,14). Entretanto, quando avaliamos a quantificação das células LC3-positivas nos embriões em idade de E10, foi detectado um aumento significativo de células positivas nas vesículas ópticas dos embriões tratados com Hcy (510,05 células \pm 21,70), em comparação aos embriões do grupo controle. (414,33 células \pm 22,61; $P = 0,01$).

Já para a quantificação das vesículas através das micrografias, na idade de E6 observamos um aumento significativo no número de vesículas das células neurais das vesículas ópticas dos embriões tratados com Hcy (4,33 vesículas \pm 0,33), em comparação ao número de vesículas das células neurais das vesículas ópticas dos embriões do grupo controle (1,33 vesículas \pm 0,34; $P = 0,012$). Para E10, a análise mostrou um aumento significativo no número de vesículas das células neurais das vesículas ópticas de embriões tratados com Hcy (8,66 vesículas \pm 0,67), em comparação com os embriões controle (2,00 vesículas \pm 0,58; $P = 0,00026$ (Figura 30).

Figura 30: Efeito da Hcy sobre o conteúdo de vesículas autofágicas nas células da retina neural de embriões de *Gallus domesticus* em E6 e E10. (A) eletromicrografia demonstrando o perfil ultraestrutural das vesículas quantificadas (estrelas). (B e C) Gráficos de barras representam média \pm erro padrão da média do número de vesículas por embrião em E6 e E10 respectivamente. (D e E) Gráficos de barras representando o número absoluto de células positivas para a proteína LC3II. (*) indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre embriões do grupo controle e tratado com Hcy. (n= 3 embriões por tratamento).

Análise de autofagia



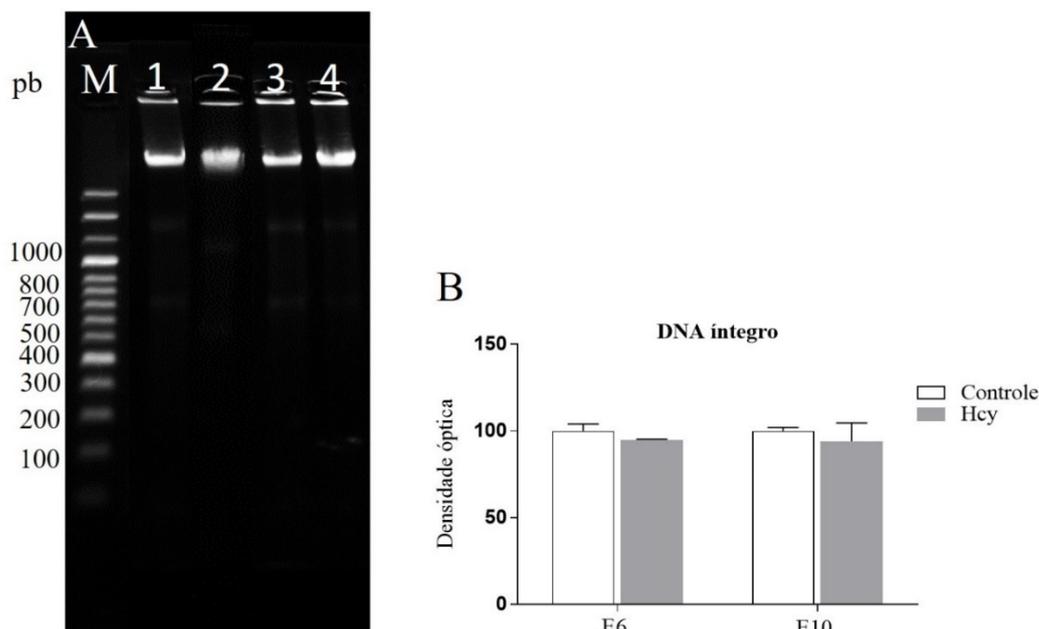
4.11 EFEITO DA HCY SOBRE A MORTE CELULAR NAS VESÍCULAS ÓPTICAS

Considerando os efeitos da Hcy principalmente sobre o aumento do dano ao DNA, avaliado pela quantificação da molécula γ -H2AX, diminuição da viabilidade celular, interferência na dinâmica mitocondrial e aumento do processo de autofagia, foi avaliado se estas interferências nos processos descritos acima, poderiam ativar o processo celular de apoptose.

O teste de fragmentação de DNA foi utilizado como um indicativo da ocorrência de morte celular nas células das vesículas ópticas, uma vez que a perda da integridade desta molécula pode ser um indicativo de morte celular, tanto por apoptose quanto por necrose.

Não foi observada fragmentação do DNA das células das vesículas ópticas de *G. domesticus* no grupo tratado com Hcy nas duas idades de análise. A análise estatística das médias de densidade óptica do gel de agarose para a região de DNA íntegro não apresentou diferença entre os grupos analisados ($P = 0,35$) para idade de E6 e ($P = 0,60$) para idade de E10 (Figura 31).

Figura 31: Fragmentação de DNA em células das vesículas ópticas de *Gallus domesticus* após o tratamento com Hcy. (A) eletroforese em gel de agarose. M- Marcador de peso molecular (100 pb); 1- grupo controle na idade de E6; 2 – grupo tratado com Hcy na idade de E6; 3 – grupo controle na idade de E10; 4- grupo tratado com Hcy na idade de E10. (B) Gráfico de barras representando média \pm erro padrão da média de intensidade óptica da região de DNA íntegro. (n = 3 embriões por tratamento).

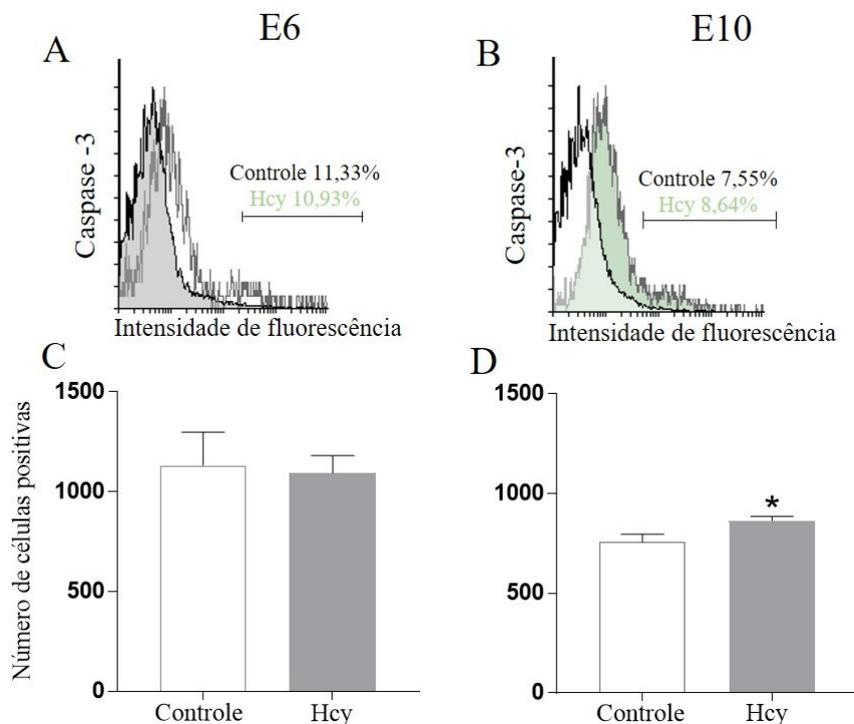


4.11.1 Efeito da Hcy sobre a ativação da caspase efetora da apoptose

Considerando que o teste de fragmentação do DNA realizado nesta pesquisa é um teste pouco sensível para avaliação da indução de morte celular quando este processo não é intenso, foi quantificado o número de células positivas para proteína caspase-3, considerada uma das caspases efetoras do apoptose.

Em E6, não houve diferença significativa no número de células positivas nas vesículas ópticas de embriões controle (1.133,5 células \pm 166,42) e de embriões tratados com Hcy (1.093,8 células \pm 88,31). No entanto, na idade de E10 foi observado um aumento significativo no número de células caspase-3-positivas nas vesículas ópticas dos embriões tratados com Hcy (755,17 células \pm 42,33), em comparação com as vesículas ópticas dos embriões do grupo controle (864,0 células \pm 22,18; $P = 0,04$) (Figura 32).

Figura 32: Quantificação do número de células caspase-3-positivas nas vesículas ópticas de embriões em E6 e E10. (A e B) Histogramas de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células positivas. (C e D) Gráficos de barras representando a média do número absoluto de células positivas para caspase-3 em E6 e E10 respectivamente. Os dados foram apresentados com média \pm erro padrão. (*) indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre embriões do grupo controle e tratado com Hcy. (n= 9 embriões por tratamento).



Em síntese, nossos resultados demonstram que a dose elevada de Hcy foi capaz de interferir na dinâmica celular da vesícula óptica. Estas alterações foram reconhecidas primeiramente através da redução da sobrevivência dos embriões tratados com Hcy. Porém, contrariando nossa hipótese, a Hcy não alterou a morfometria das vesículas ópticas nem da espessura da retina. Para as análises celulares, encontramos um aumento de células reativas para as proteínas p53, p21 e da diminuição de células positivas para fosfo-histona H3, confirmando nossa hipótese científica que a Hcy promove a redução da proliferação celular. Adicionalmente, os resultados demonstram que a Hcy promove alterações no conteúdo proteico das proteínas envolvidas com a diferenciação e sobrevivência das células neurais, como NeuN, β -Tubulina III e GDNF, o que também confirma a hipótese científica proposta. Entretanto, contrariando a hipótese, vimentina, GFAP e BDNF não foram alteradas pela exposição à Hcy. Confirmamos também as hipóteses de que a Hcy altera a ultraestrutura das células neurais e promove danos ao DNA. Além desses efeitos, a Hcy promoveu danos às mitocôndrias das células neurais, alterando o processo de dinâmica mitocondrial, o conteúdo e a morfologia desta organela. Por fim, foram evidenciados dois mecanismos de resposta celular frente ao insulto da Hcy, a ativação do processo de autofagia e a indução à morte celular, este último confirmado pela nossa hipótese.

5. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho de tese demonstram que uma única dose de 20 μmol D,L-Hcy administrada *in ovo* no segundo dia do desenvolvimento embrionário (E2) de *Gallus domesticus*, foi capaz de promover importantes alterações celulares essenciais para o desenvolvimento das vesículas ópticas. Dentre estas alterações, destacam-se a redução da proliferação e diferenciação celular, aumento dos fatores vasculogênicos, diminuição na viabilidade celular, alteração na dinâmica mitocondrial e indução à apoptose.

Estudos sobre os efeitos tóxicos da Hcy nas vesículas ópticas utilizando embriões de galinha como modelo experimental tornam-se vantajosos uma vez que os embriões se desenvolvem na ausência da influência materna, não é necessária técnica operatória para a obtenção dos embriões, além da aplicação da substância de interesse ser tecnicamente simples (*in ovo*). Além disto, o completo sequenciamento gênico de *G. domesticus* viabiliza a condução de pesquisas no âmbito molecular (BOARDMAN et al., 2002). Outro fator interessante está relacionado à conservação dos eventos celulares, moleculares e fisiológicos que fundamentam o desenvolvimento das estruturas oculares, permitindo estudos comparativos entre as espécies (SCHOENWOLF, 1999; BOARDMAN et al., 2002). Neste sentido, o modelo biológico experimental utilizado nesta pesquisa se destaca como um bom modelo para estudos nos quais se pode simular a condição de hiperhomocisteinemia.

5.1 EFEITO DA HCY NA SOBREVIVÊNCIA DOS EMBRIÕES E NA MORFOLOGIA DAS VESÍCULAS ÓPTICAS

O primeiro passo em nossa análise de embriões controles e tratados com Hcy, foi avaliar a interferência do tratamento com Hcy na sobrevivência dos embriões. A análise de sobrevivência é uma interessante abordagem que permite inferir o grau de toxicidade de determinada substância. Neste caso, este parâmetro foi utilizado para avaliar a proporção de indivíduos que responderam ao efeito da Hcy em vários intervalos de tempo após a sua administração na idade de E2. Embriões tratados com Hcy demonstraram uma redução significativa na taxa de sobrevivência de 48% em E6 e 40% E10, demonstrando o efeito tóxico da Hcy sobre o desenvolvimento embrionário. A maioria das mortes em resposta ao tratamento aconteceram na idade de E3, ou seja, 24h após o tratamento, o que demonstra o potencial tóxico durante os períodos iniciais do desenvolvimento da espécie.

Quando buscamos na literatura dados sobre o efeito da Hcy na sobrevivência de embriões de galinha ou ainda em outros modelos experimentais, encontramos diferentes percentuais de sobrevivência (ROSENQUIST; RATASHAK; SELHUB, 1996; LATACHA; ROSENQUIST, 2005; HAN et al., 2009; KOBUS et al., 2013). Geralmente, diferenças na apresentação química da Hcy administrada, o tipo procedimento utilizado no tratamento, a idade de tratamento dos embriões, a duração da exposição à Hcy, bem como os mecanismos de detoxificação entre as espécies testadas podem ser determinantes para a variação nas respostas encontradas.

O mecanismo fisiopatológico pelo qual a Hcy causa diminuição da sobrevivência dos embriões durante o início do desenvolvimento está associado à redução da expressão da molécula de VEGF e seu respectivo receptor VEGFR-2, os quais são necessários para os processos de vasculogênese e angiogênese. Neste contexto, níveis baixos desta molécula afetam diretamente a vascularização extraembrionária ao reduzir a área total, o comprimento e distribuição dos vasos sanguíneos, além de reduzir o fluxo sanguíneo durante o desenvolvimento embrionário (OOSTERBAAN; STEEGERS; URSEM, 2012a). Além disso, dados da literatura científica têm demonstrado que a Hcy pode causar danos às células endoteliais através do estresse oxidativo, produção de radicais livres, diminuição da enzima óxido nítrico sintase 3 e ativação do processo de apoptose via caspases (AU-YEUNG et al., 2004; LATACHA; ROSENQUIST, 2005; LEE et al., 2005a; BOURCKHARDT et al., 2019). Como consequência desses eventos, os processos necessários para a formação de vasos intraembrionários e extraembrionários podem ser afetados.

A relação entre níveis elevados de Hcy e seus efeitos em diferentes sistemas tem sido reportada em diversos estudos nas últimas décadas (VAN AERTS et al., 1993; MAESTRO DE LAS CASAS et al., 2003; LATACHA; ROSENQUIST, 2005; VAN MIL; OOSTERBAAN; STEEGERS-THEUNISSEN, 2010). Nestes estudos, a Hcy administrada promoveu efeitos variados nas espécies estudadas e demonstrou exercer seu efeito dependente da dose utilizada e do período de exposição. Embora a relação entre níveis elevados de Hcy e o aparecimento de anomalias congênitas seja bem descrita na literatura (SHAW et al., 1995; VAN MIL; OOSTERBAAN; STEEGERS-THEUNISSEN, 2010; MALDONADO et al., 2011), nesta tese, todos os embriões utilizados exibiram padrão morfológico externo normal para as idades de análise, bem como para possíveis alterações provocadas pela administração de Hcy.

Os resultados obtidos através das análises morfométricas das vesículas ópticas demonstraram que a Hcy não foi capaz de alterar as dimensões das vesículas do lado esquerdo e direito nos embriões em E6 e E10. Poucos estudos têm abordado a ação teratogênica da Hcy

durante formação das vesículas ópticas com o enfoque na morfologia destas estruturas. Em estudo realizado por MAESTRO DE LAS CASAS et al. (2003), a administração de 20 μmol de L-homocisteína tiolactona foi capaz de promover malformação como microftalmia bilateral, além do deslocamento do cristalino. Adicionalmente, embriões de galinha tratados com 5 μmol de L-homocisteína tiolactona também exibiram malformações nas vesículas ópticas como redução do tamanho ou sua completa ausência, além de alterações no cristalino (ROSENQUIST; SCHNEIDER; MONAGHAN, 1999). Nesses estudos, uma cascata de eventos independentes pareceu afetar o desenvolvimento das vesículas ópticas, que incluem desde fatores vasculogênicos, até alterações na migração das células da crista neural.

A análise da espessura da retina possibilitou investigar a ação da Hcy na organização das camadas celulares deste tecido. Os dados obtidos pela morfometria mostraram que o tratamento com Hcy não alterou a espessura da retina nas duas idades de análise. A avaliação da espessura das camadas celulares é um importante parâmetro de análise da retina, uma vez que durante o desenvolvimento desta estrutura o equilíbrio entre os mecanismos de proliferação, diferenciação, migração e apoptose são necessários para o estabelecimento de camadas funcionais, e qualquer alteração nesses processos pode trazer comprometimentos relevantes ao desenvolvimento (MEY; THANOS, 2000; FARAH, 2006). Sabe-se que a Hcy é tóxica para o desenvolvimento do tecido neural, no telencéfalo de *G. domesticus* em seis dias de desenvolvimento por exemplo, a Hcy promoveu redução da camada do manto – essencial para a diferenciação e migração dos neurônios (CECCHINI et al., 2019). Já em um estudo com pacientes, foi evidenciada uma relação positiva entre o aumento dos níveis de Hcy com a redução da camada de fibras nervosas da retina, levando inclusive a comprometimentos na acuidade visual (SRIVASTAV et al., 2016). Além disso, camundongos mutantes para enzima responsável pela degradação da Hcy apresentaram retinas com alterações histológicas como redução do número de células nas camadas, porém, sem comprometer o padrão estratificado do tecido (GANAPATHY et al., 2009). Esses dados demonstram padrões diferentes de resposta aos elevados níveis de Hcy, possivelmente relacionados a dose empregada, o tecido analisado, ou a espécie estudada.

5.2 EFEITO DA HCY NA INTEGRIDADE DOS VASOS SANGUÍNEOS

Nesta tese, foram utilizadas as moléculas de VEGF e VCAM como marcadores para avaliar a integridade da barreira hemato-retiniana nas duas idades embrionárias de análise – E6 e E10. Como resultado, foi verificado um aumento destes dois fatores vasculogênicos em ambas

idades. Tanto VEGF quanto VCAM são necessários para o desenvolvimento da vasculatura da coroide através da formação dos vasos sanguíneos, os quais são essenciais para a formação, desenvolvimento, manutenção e reparo das estruturas oculares. As vesículas ópticas em formação necessitam de uma vascularização precoce em sua formação para garantir o aporte adequado de oxigênio e nutrientes aos progenitores neurais, neurônios recém gerados e às células da glia. Assim, a expressão adequada de fatores vasculogênicos é necessária desde o início do desenvolvimento. Nos embriões de *G. domesticus*, a vascularização da vesícula óptica é garantida pela coroide e pela estrutura do pecten ocular, que em conjunto participam da vascularização do olho.

O aumento de VEGF tem sido reportado em diversas condições patológicas (AZZOLINI et al., 2013; CAMPOCHIARO, 2013; VEMPATI; POPEL; MAC GABHANN, 2014), incluindo condições de hiperhomocisteinemia (LEE et al., 2018b). Nesses casos citados, o aumento de VEGF está comumente relacionado a um processo de neovascularização tecidual, que ocorre como uma tentativa de reparação de danos teciduais através da formação local de neovasos. Nas estruturas ópticas, a neovascularização pode acontecer de duas maneiras, pela retina e pela coroide (SPILSBURY et al., 2000). Embora a neovascularização seja uma resposta ao aumento de VEGF, no presente trabalho, não foi possível confirmar este mecanismo pela técnica empregada na avaliação de VEGF. O que fica claro é que a Hcy promoveu um aumento de VEGF e isso pode estar associado à perturbação da barreira ocular sanguínea. Ainda, embora VEGF seja produzido principalmente pelo EPR e células da glia, os resultados apresentados não demonstram o aumento correspondente destas células, o que poderia elucidar a respeito do aumento de células VEGF-positivas. Logo considera-se haver um mecanismo subjacente ao aumento de células VEGF-positivas, que seja independente das células que o secretam.

Além do processo de formação de neovasos, níveis elevados de VEGF podem induzir o aumento da permeabilidade dos vasos, levando a uma hiperpermeabilidade, situação que está frequentemente relacionada a processos inflamatórios, e suas consequências fisiológicas, como extravasamento de fluidos e edema (NAGY et al., 2008). Nas vesículas ópticas, o aumento dos níveis de transcritos de VEGF tem sido associado com danos a barreira sanguínea e aumento da permeabilidade dos vasos (PE'ER et al., 1995). Níveis elevados de VEGF no plasma sanguíneo e no humor vítreo de pacientes também estão associados como uveíte inflamatória (PAROLI et al., 2007). Alternativamente, a injeção intravítrea do anticorpo anti-VEGF previne a formação da neovascularização da retina (ISHIDA et al., 2003) e da coroide (KRZYSTOLIK et al., 2002).

Durante um processo patológico, as células endoteliais podem liberar diversos mediadores inflamatórios e expressar várias moléculas de adesão, como por exemplo, VCAM-1. VCAM-1 especificamente, é uma proteína expressa em células endoteliais e se faz necessária durante o ancoramento de leucócitos à parede do vaso durante a disfunção endotelial em condições inflamatórias (MAKHOUL et al., 2012). Durante a inflamação do tecido ocular, VCAM-1 é suprexpressa em vasos sanguíneos, e está relacionada ao desenvolvimento de uveíte inflamatória, por exemplo, além de estar envolvida na migração de linfócitos para dentro do olho, caracterizando um processo inflamatório (DEVINE; LIGHTMAN; GREENWOOD, 1996; HILL et al., 1997). Adicionalmente, o tecido ocular com severa inflamação também mostrou superexpressão de VCAM na barreira-hemato retiniana, através do endotélio dos vasos sanguíneos da retina, corpo cíliar, EPR e prolongamentos das células de Müller (MAKHOUL et al., 2012). Níveis elevados da proteína VCAM-1 também foram observados no tecido ocular de camundongos diabéticos, neste caso o aumento de VCAM-1 está relacionado também ao estresse oxidativo e aumento de citocinas inflamatórias, que podem atuar em um mecanismo subjacente ao aumento de VCAM-1 (DONG et al., 2011).

Em condição de hiperhomocisteinemia, diferentes padrões de resposta teciduais são encontrados quando avaliadas as moléculas VEGF e VCAM-1. Diminuição da expressão de VEGF e seu respectivo receptor VEGFR-2 foi observado durante o desenvolvimento da vascularização extraembrionária de embriões de *G. domesticus* (OOSTERBAAN; STEEGERS; URSEM, 2012b). Além disso, durante a ossificação endocondral, a Hcy promoveu uma redução no conteúdo proteico de VEGF e VCAM nos membros de embriões de galinha (BOURCKHARDT et al., 2019). Em estudo conduzido *in vitro*, a Hcy aumentou o conteúdo de VCAM em células endoteliais cerebrais, levando a uma modulação de resposta. Adicionalmente, os autores relacionam este resultado ao prejuízo da barreira sanguínea no tecido nervoso (HOHSFIELD; HUMPEL, 2010).

Nesta pesquisa, foi utilizado o anticorpo IBA-1 como um marcador específico para confirmar a inflamação do tecido nervoso, uma vez que esta proteína está presente em células microgлияis, as quais possuem funções similares aos macrófagos, como fagocitose, apresentação de antígenos, produção de citocinas e quimiocinas (BENVENISTE; NGUYEN; O'KEEFE, 2001). Embora seja reconhecido que a Hcy esteja relacionada à indução de microglia durante a neuroinflamação (CHEN et al., 2017a), no presente estudo não foram observadas diferenças significativas para esse marcador. Uma possível resposta para isso pode estar relacionada ao fato de a microglia ter uma resposta transitória. Em condições normais, estas células encontram-se em estado quiescente, porém após um insulto, tornam-se ativadas, modulam a expressão de

diversos marcadores e atuam de modo a recuperar o tecido, retornando ao seu estado quiescente novamente (BARRON, 1995; JEONG et al., 2013).

5.3 EFEITO DA HCY SOBRE O CICLO CELULAR E DIFERENCIAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS NEURAIS

Durante o desenvolvimento da retina de vertebrados, o ajuste fino dos mecanismos de proliferação, neurogênese, diferenciação e migração cooperam para o desenvolvimento e estratificação de um tecido funcional (MARQUARDT; GRUSS, 2002; BAYE; LINK, 2007). Sabe-se que o excesso de Hcy pode interferir na síntese e regulação da metilação do DNA, evento extremamente necessário para a manutenção dos ciclos contínuos de proliferação celular durante o desenvolvimento embrionário (MANDAVIYA; STOLK; HEIL, 2014).

A avaliação do ciclo celular foi realizada através análise das proteínas fosfo-histona H3, p53, p21 e PCNA. A fosforilação da histona H3 é requerida durante a condensação da cromatina na fase M do ciclo celular, logo, células positivas para esse marcador estão em plena proliferação (HENDZEL et al., 1997). Em nossos resultados, por meio da técnica de citometria de fluxo foi verificada a redução do conteúdo de fosfo-histona H3 nos embriões tratados com Hcy nas duas idades analisadas, indicando uma redução da proliferação celular.

A redução da proliferação celular frente a níveis elevados de Hcy é uma resposta bem relatada em tecidos embrionários. Em um estudo realizado com o mesmo modelo experimental biológico, e utilizando tecido de mesma origem embrionária ectodérmica, KOBUS; NAZARI; MÜLLER (2009) demonstraram uma redução na proliferação das células da medula espinhal em embriões com 96 h de desenvolvimento. Do mesmo modo, CECCHINI et al., (2019) reportaram uma redução na proliferação celular no cérebro anterior e médio de embriões de *G. domesticus* com seis dias de desenvolvimento. Estudos *in vitro* também demonstram esse mesmo padrão anti-mitótico da Hcy ao reduzir a proliferação celular, porém em células não neurais (NAGAI et al., 2001; CHAVARRÍA et al., 2003). Este padrão de redução da proliferação celular pode estar relacionado ao fato da Hcy alterar os mecanismos de modificação pós-traducionais das histonas, os quais são necessários para a metilação da sua região N-terminal. Esta reação de metilação é possível devido a transferência dos grupamentos metil gerados através do metabolismo da Hcy. Dessa forma, elevados níveis de Hcy podem atuar nas modificações de histonas que atuam na regulação da expressão gênica, controle da replicação celular e reparo do DNA (BHAUMIK; SMITH; SHILATIFARD, 2007; XU et al., 2015).

O rigoroso controle do ciclo celular durante o processo de neurogênese é necessário para a replicação de cada célula, sua posterior diferenciação e migração, assegurando a formação e o desenvolvimento de um tecido nervoso funcional. Durante este processo, uma intrincada maquinaria de moléculas atuam em cada fase a fim de promover ou inibir a progressão do ciclo conforme as condições do ambiente celular (OHNUMA; HARRIS, 2003; BILITOU; OHNUMA, 2010). Em nossa análise da quantificação das proteínas envolvidas no ciclo celular, foi verificado o aumento das proteínas p53 e p21 nos embriões tratados com Hcy na idade de E6. Isto demonstra que houve uma parada no ciclo celular, possivelmente por algum dano causado pela Hcy. Adicionalmente, a quantificação da proteína PCNA não revelou diferenças significativas.

Classicamente, a superexpressão de p53 é reconhecida como uma resposta fisiológica relacionada ao estresse celular, incluindo dano ao DNA, onde a quebra da homeostase do tecido pode promover o aumento desta proteína (SCHWARTZ, 1998; ATTARDI, 2010). Uma vez ativada, p53 exerce sua função ao recrutar p21 e PCNA, as quais bloqueiam a progressão do ciclo celular. Deste modo, p21 e PCNA desempenham um papel central na resposta celular ao dano ao DNA, inibindo o início da sua replicação na fase S e permitindo o reparo (LEVINE, 1997; ZILFOU; LOWE, 2009). Nossos resultados estão de acordo com estudo que reportou o aumento da expressão de genes relacionados a progressão e ponto de checagem do ciclo celular na retina de camundongos com hiperhomocisteinemia (GANAPATHY et al., 2009). Além disso, células de neuroblastoma tratadas com Hcy por cinco dias expressam níveis elevados de p21, porém em um mecanismo independente de p53, mas que promove a parada do ciclo celular (CURRÒ et al., 2014).

Em conjunto, os efeitos da Hcy na diminuição da proliferação celular juntamente com os respectivos aumentos das proteínas p53 e p21 podem ser consequência de quebras na dupla fita de DNA. De fato, nossos resultados apontam para o aumento do dano ao DNA em embriões tratados com Hcy na idade de E6 avaliados pela quantificação da proteína γ -H2AX. No tecido neural especificamente, a Hcy é rapidamente captada por neurônios através do transportador de membrana sinaptossomal, resultando no acúmulo intracelular de Hcy (GRIEVE; BUTCHER; GRIFFITHS, 1992). Observa-se que dano ao DNA é frequentemente relatado em condições de acúmulo intracelular de Hcy devido à inibição das reações de transferência dos grupamentos metil, os quais são necessárias para a síntese de purinas, timidina e na formação de nucleotídeos (KRUMAN et al., 2002; OIKAWA; MURAKAMI; KAWANISHI, 2003). Em células tronco neurais submetidas a três concentrações diferentes de Hcy, o dano ao DNA é referido como uma resposta ao estresse oxidativo e geração de espécies reativas de oxigênio. Neste cenário, a

avaliação do dano foi realizada pela expressão de γ -H2AX e teste cometa, e a quantificação do dano mostrou ser dose dependente (WANG et al., 2016). Além disso, também foi verificado durante o desenvolvimento de membros de embriões de *G. domesticus*, que a Hcy ativou uma cascata de respostas celulares que envolveram o aumento de p53 e PCNA, a diminuição de p21, convergindo a constatação do dano ao DNA (BOURCKHARDT et al., 2015). Assim, alterações na integridade do DNA podem comprometer mecanismos vitais, como a replicação do DNA, a transcrição de genes e mecanismos epigenéticos, os quais afetam os mecanismos de proliferação, diferenciação e reparo celular durante a embriogênese.

Quando avaliamos o resultado da análise do ciclo celular em embriões na idade de E10, verificamos que a redução da proliferação celular se manteve nesta idade. Adicionalmente, os níveis das proteínas p53 e 21 que estão relacionadas ao dano ao DNA não apresentaram diferenças significativas, fato este que está relacionado à ausência do dano ao DNA confirmado pela quantificação de γ -H2AX, que não diferiu significativamente entre os grupos. Vale ressaltar também, que na idade de E10 os processos de diferenciação celular se sobressaem aos de proliferação, visto que a retina nesta idade está mais desenvolvida.

Durante o desenvolvimento do tecido nervoso, a aquisição do fenótipo neuronal e glial é garantida pela expressão de diversas proteínas específicas, as quais são expressas em diferentes momentos da maturação celular. A proteína NeuN (do inglês *Neuronal Nuclei*), é considerada um marcador de neurônios pós-mitóticos, marcando células amácrinas e ganglionares da retina (MULLEN; BUCK; SMITH, 1992; DOH et al., 2010). Já a proteína do citoesqueleto, β -tubulina III, marca neurônios diferenciados, sendo encontrada em células ganglionares, amácrinas, horizontais e nos processos dos fotorreceptores da retina diferenciada (SHARMA; NETLAND, 2007). Já a especificação das células gliais requer a expressão das proteínas vimentina e proteína glial fibrilar ácida (GFAP, do inglês *glial fibrillar acid protein*). Especificamente, na retina, essas proteínas são os principais tipos de filamentos intermediários presentes na glia de Muller (SEO et al., 2008; DOH et al., 2010).

Através da análise de citometria de fluxo, foi verificado que as células neuronais e gliais respondem de maneira distinta à Hcy. Para os marcadores neuronais, NeuN e β -tubulina III foi observada uma redução na quantificação de células positivas em E6 e E10 respectivamente. Na idade de E6, a retina é constituída principalmente por neuroblastos em processo de proliferação, diferenciação e células ganglionares. Assim, a redução destes grupos celulares pode, ou interferir no pool de células progenitoras, as quais mantem a capacidade proliferativa das camadas, ou interferir ainda nas células já diferenciadas (ganglionares).

Já na idade de E10, a retina é composta por diferentes camadas contendo neurônios diferenciados, e a redução da proteína β -tubulina III em qualquer grupo neuronal poderia interferir na dinâmica dessas células, já que esta proteína atua em funções como tráfego de organelas, formação e alongamento dos prolongamentos neurais essenciais para a migração durante o desenvolvimento e para a regeneração tecidual (GOZES, 1982; SHARMA; NETLAND, 2007). Adicionalmente, quando verificamos os resultados referentes ao ciclo celular em conjunto com os resultados da diferenciação, podemos perceber as alterações das proteínas neurais podem estar relacionadas com as alterações das proteínas reguladoras do ciclo celular (p53, p21 e PH3). Nesse caso específico, o atraso no ciclo celular pode ter retardado a diferenciação das células neuronais. KOBUS-BIANCHINI et al., (2017) ao avaliarem a expressão de β -tubulina III na medula de embriões tratados com Hcy também relataram a diminuição da diferenciação neuronal. Neste caso, essa redução estava relacionada também a alterações no ciclo celular, evidenciados pela marcação de PCNA. Alternativamente, análise *in vitro* utilizando diferentes concentrações de Hcy (10, 100 e 500 Mm) mostraram que a Hcy não teve efeito sobre o remodelamento do citoesqueleto de neurônios em cultura (LOUREIRO et al., 2010). Em contrapartida, o efeito de Hcy sobre os neurônios parece ser realizado também pela estimulação do receptor NMDA, que induz estresse oxidativo, formação de radicais livres, ativação de óxido nítrico sintase, levando à morte celular (PODDAR; PAUL, 2009).

As células gliais, como a glia de Müller, são conhecidas por responderem à danos no SNC. Em condições normais, as células de Müller contêm baixos níveis de GFAP, no entanto, sua expressão é fortemente regulada sob uma variedade de condições, incluindo degeneração, deslocamento da retina, e isquemia, através de um processo denominado gliose reativa (LEWIS; FISHER, 2003). Durante este processo, as células gliais passam do estado de quiescência e tornam-se ativadas, proliferam, alteram sua morfologia e aumentam a produção de GFAP, vimentina ou nestina (BUFFO; ROLANDO; CERUTI, 2010; GRACA; HIPPERT; PEARSON, 2018). A Hcy é reconhecida por promover gliose reativa no tecido neural. Entretanto esta resposta está frequentemente associada a outros efeitos danosos da Hcy, como por exemplo dano ao DNA, estresse oxidativo, geração de ROS e redução da atividade da glutathione peroxidase, que convergem para uma resposta glial (BAYDAS et al., 2006; TAWFIK et al., 2013; CECCHINI et al., 2019). Embora a resposta glial seja comumente relatada na literatura, a dose de 20 μ mol de Hcy usada nesta tese não foi capaz de afetar as proteínas gliais nas duas idades analisadas. Assim, poderíamos presumir que a resposta glial seja dependente do grau de dano tecidual, ou ainda que esteja relacionada a regiões específicas do tecido nervoso. Adicionalmente, sabe-se que os astrócitos participam da recuperação da homeostase do tecido

sintetizando substâncias, como citocinas e fatores neurotróficos, que poderiam atuar com uma ação neuroprotetora (LIBERTO et al., 2004).

Os fatores neurotróficos têm sido amplamente estudados por participarem de importantes mecanismos celulares durante o desenvolvimento, como sobrevivência, diferenciação e manutenção das células neurais. Além disso, a diminuição destes fatores, especificamente BDNF e GDNF tem sido implicada em algumas condições patológicas do SN, como glaucoma, doença de Parkinson e doença de Alzheimer (HUNOT et al., 1996; ALMASIEH et al., 2012; NAGATA et al., 2015). Na retina, BDNF demonstra papel neuroprotetor ao atenuar a ação fagocítica das células da microglia após lesão do nervo óptico, protegendo as células ganglionares (GALINDO-ROMERO et al., 2013). Em nossos resultados, não observamos diferenças significativas na quantificação de BDNF em E6 e E10. Já para a proteína GDNF observamos uma redução nos embriões tratados com Hcy, na idade de E10.

No olho, o GDNF é primariamente expresso na retina, e seu valor terapêutico tem sido comprovado por fornecer neuroproteção durante a degeneração da retina. KOEBERLE; BALL, (1998) demonstraram que GDNF retarda a apoptose das células ganglionares da retina após lesão axonal. Em modelo de retinose pigmentar, foi observado um efeito protetor de GDNF nos fotorreceptores (FRASSON et al., 1999). Além disso, GDNF atua como um fator mitógeno ao aumentar a capacidade proliferativa de neuroblastos (POLITI; ROTSTEIN; CARRI, 2001b). Devido a estas relevantes atividades, acredita-se que a redução desta neurotrofina durante o desenvolvimento possa levar a comprometimentos na proliferação e diferenciação de alguns grupos celulares.

Alterações nos níveis de BDNF e GDNF em resposta aos elevados níveis de Hcy têm sido pouco relatadas na literatura. Embora esta relação e seu mecanismo de ação não tenham sido completamente elucidados, acredita-se que a alteração das reações de re-metilação e transferência de grupamentos metil em condições de hiperhomocisteinemia, estejam influenciando na diminuição dos níveis desta neurotrofina. A via metabólica da Hcy e metionina produz grupamentos metil necessários para a síntese de DNA. Condições de hiperhomocisteinemia e deficiência de folato prejudicam a metilação do DNA, a qual pode alterar a expressão genica de diversos genes, incluindo BDNF e GDNF. Adicionalmente, o estresse oxidativo provocado pela Hcy também poderia afetar na redução das neurotrofinas (KAPCZINSKI et al., 2008).

5.4 EFEITO DA HCY SOBRE A ULTRAESTRUTURA

Ao analisar a ultraestrutura da retina nos embriões tratados com Hcy, encontramos alterações no núcleo, mitocôndrias, RER, e alterações relacionadas ao citoplasma, cada uma com maior ou menor grau de intensidade nas duas idades analisadas.

Segundo a literatura científica, as alterações ultraestruturais das células neurais em casos de hiperhomocisteinemia são refletidas principalmente em alterações na morfologia dos neurônios, aumento da eletrondensidade do núcleo, disformidades da membrana nuclear, diminuição das organelas citoplasmáticas e aumento de vesículas. Frequentemente, esses efeitos na ultraestrutura são reflexo de mudanças bioquímicas, celulares, moleculares e de danos a biomoléculas, que têm como consequência a alteração da célula a nível ultraestrutural (GANAPATHY et al., 2009; CHEN et al., 2017b; DE S. MOREIRA et al., 2018).

Alterações na estrutura do envoltório nuclear podem comprometer a dinâmica celular e afetar processos intranucleares, uma vez que esta estrutura é necessária para o transporte de moléculas do núcleo para o citosol e vice e versa, além de agir como uma barreira seletiva de componentes, exercendo papel importante na regulação da transcrição gênica (LODISH, 2000). A dilatação do espaço perinuclear é relatada na literatura como uma modificação morfológica decorrente do processo de apoptose (FALCIERI et al., 1994; SAKAMOTO et al., 2004) e pode ser consequência do rearranjo do poro nuclear durante o processo de morte celular programada (SAKAMOTO et al., 2004).

Outro alvo potencial da Hcy na ultraestrutura celular é o RER. Na idade de E10, foram visualizadas dilatações no lúmen das cisternas tubulares dos embriões tratados Hcy, que pode ser um indicativo de estresse desta organela, provavelmente desencadeado pelo acúmulo de proteínas mal dobradas. O RER é uma rede tubular que participa do dobramento e transporte de proteínas necessárias para o funcionamento celular normal, e qualquer perturbação neste processo pode resultar na quebra da homeostase celular, assim como desencadear estresse desta organela (HOSOI; OZAWA, 2010). A dilatação do RER é evidenciada em situações patológicas em que o influxo ou acúmulo de proteínas mal dobradas no RER é aumentada. Este acúmulo é tóxico para as células e, para se adaptar, ou eliminar o dano, as células podem ativar mecanismos reparatórios como a ativação de chaperonas, ou dependendo da extensão do dano, ativar os mecanismos de apoptose (DESMOTS et al., 2008). Em um estudo com cultura celular neuronal, ALTHAUSEN; PASCHEN (2000) relataram que a exposição à Hcy induziu o aumento da expressão de genes de resposta ao estresse do RER, como *grp78* e *grp94*, e o aumento nos níveis de suas respectivas proteínas GRP78 e GRP94, levando a crer que esta

resposta de estresse pode contribuir para o desenvolvimento de algumas condições patológicas. Além disso, foi relatado que o estresse no RER causado pela Hcy pode ser provocado por alterações no potencial redox e na quebra de ligações dissulfeto de algumas proteínas, as quais poderiam ficar mal dobradas (KOKAME; KATO; MIYATA, 1996).

A formação de membranas concêntricas foi observada no citoplasma dos embriões tratados com Hcy na idade de E6. Estas estruturas são formadas por bicamadas lipídicas associadas à membrana celular e podem estar envolvidas com o processo de degradação celular, onde partes da bicamada ficam livres e tendem a se associar (JAO et al., 1983). Além disso, HRUBAN; SLESERS; HOPKINS, (1972) sugerem que estas membranas concêntricas possivelmente são lisossomos secundários formados como resultado da degradação de partes da membrana que são então transformadas em estruturas semelhantes à mielina em vesículas autofágicas. Na idade de E10, não foram encontradas estruturas semelhantes às membranas concêntricas, desta forma, acredita-se que suas formações sejam transitórias, como após o processo de autólise ou apoptose, nos quais o tecido consegue se recuperar. Estudos que abordam a formação destas estruturas em condições de hiperhomocisteinemia são escassos na literatura, assim, acreditamos que esta seja uma resposta pontual e transitória durante a resposta à toxicidade da Hcy.

A vesiculação do citoplasma também foi observada em embriões tratados com Hcy nas duas idades de análise. Além disso, a contagem de vesículas autofágicas através das eletromicrografias revelou um aumento significativo no número de vesículas nos embriões tratados com Hcy nas idades de análise - E6 e E10. Durante nossa análise percebeu-se que muitas vezes as vesículas continham conteúdo semelhantes a membranas em seu interior, o que pode estar ligado ao processo de autofagia. Com o intuito de comprovar se a Hcy estaria induzindo o processo de autofagia, procedemos com marcações para a proteína LC3II através da técnica de citometria de fluxo.

A maquinaria do processo autofágico pode ser descrita em algumas etapas como: formação do fagóforo, dependente da proteína Beclina, alongamento da membrana do fagóforo via família de proteínas Atgs; inserção da proteína LC3 na membrana do fagóforo, ligação com os alvos celulares e fusão do autofagossomo com o lisossomo, culminando com degradação proteolítica (MIZUSHIMA, 2007; GLICK; BARTH; MACLEOD, 2010). Em células eucarióticas, a proteína LC3II é encontrada na membrana do autofagossomo maduro, logo, é utilizada como um marcador para identificar o processo de autofagia (MIZUSHIMA, 2004).

Em neurônios corticais, a hiperhomocisteinemia induziu o processo de autofagia evidenciado pela alteração da expressão da proteína p62 que se liga a proteína LC3II durante a

formação do autofagossomo. O mecanismo pelo qual a Hcy promove autofagia nessas condições ainda não está bem estabelecido, mas supõem-se que tenha relação com alterações ultraestruturais das mitocôndrias, aumento de vesículas citoplasmáticas, e indução à apoptose, evidenciada por células TUNEL-positivas. Deste modo, várias vias de sinalização e moléculas parecem atuar na indução à autofagia em condições de hiperhomocisteinemia (ZHANG et al., 2017). Já em células endoteliais cerebrais, o tratamento com Hcy parece induzir a autofagia em resposta a produção de EROS via ativação NMDA. Nesse caso especificamente, um tipo de autofagia é favorecido – a mitofagia, que consiste na remoção de mitocôndrias danificadas via autofagossomos (KAMAT et al., 2015).

Em nosso estudo, embora o número das vesículas quantificadas nas eletromicrografias tenha sido maior nos embriões tratados com Hcy nas duas idades, a quantificação da proteína LC3II mostrou diferenças significativas apenas na idade de E10. Isto pode ter acontecido pois o processo de autofagia é transitório, com fases bem definidas e sequenciais. Assim, mesmo que os embriões em idade de E6 tenham revelado a presença de muitas vesículas, o mecanismo de autofagia poderia estar sendo requerido em alguma fase em que a proteína LC3II não é identificada.

5.5 EFEITO DA HCY NAS MITOCÔNDRIAS

O potencial citotóxico da Hcy pode ser refletido nas alterações encontradas nas mitocôndrias, que mostrou ser um importante alvo da Hcy. Neste trabalho, observamos alterações relacionadas à ultraestrutura, às proteínas envolvidas na dinâmica mitocondrial e na viabilidade celular.

Quanto às alterações ultraestruturais, observamos mitocôndrias com dilatação das cristas mitocondriais, rupturas de membrana e turgor. A interrupção das membranas mitocondriais principalmente a membrana interna, afeta diretamente o $\Delta\Psi_m$ devido à ruptura da barreira física e o prejuízo ao transporte de íons. Além disso, alterações nas cristas mitocondriais podem comprometer a função mitocondrial afetando o fornecimento de energia para a célula, podendo induzi-la ao processo de apoptose (KARBOWSKI; YOULE, 2003). Assim, alterações estruturais desta natureza podem comprometer a função mitocondrial e seu metabolismo energético. Ainda em relação às análises ultraestruturais, foi observado um aumento do número de perfis mitocondriais, assim como uma redução da área das mitocôndrias nos embriões tratados com Hcy na idade de E10. Essa modificação no número e tamanho dos

perfis mitocondriais parece estar relacionada à dinâmica mitocondrial, que foi alterada nos embriões tratados com Hcy.

Sob condições fisiológicas normais, as mitocôndrias mantêm o equilíbrio dos eventos de fusão e fissão mitocondrial, essenciais à dinâmica mitocondrial. Através destas transições, as mitocôndrias regulam seu número, formato, podendo mudar de um perfil alongado, para um estado fragmentado. Assim, modulam também suas funções e atuam no controle de qualidade mitocondrial dependendo do requerimento fisiológico da célula (BEREITER-HAHN; VÖTH, 1994; TWIG; HYDE; SHIRIHAI, 2008).

Os processos de fissão e fusão mitocondrial são altamente regulados pelas GTPases, Mfn1 e Mfn2, envolvidas no processo de fusão, e Drp1 e Opa1, relacionadas à fissão mitocondrial (WESTERMANN, 2002; CHEN et al., 2003b) e podem ser modulados em resposta a fatores endógenos e exógenos, a fim de reparar eventuais danos mitocondriais. Nossos resultados mostraram que após o tratamento com Hcy nos embriões em idade de E6 houve um aumento no processo de fissão, identificado pela proteína Drp1 e uma redução do processo de fusão, identificado pela proteína Mfn1, porém, não foi identificada alteração no conteúdo da proteína Mfn2. Já nos embriões em E10 foi observado aumento de Drp1 e redução de Mfn1/2, assim sugere-se uma resposta temporal, principalmente para o processo de fusão mitocondrial. Adicionalmente, o tempo decorrido entre E6 e E10 não foi suficiente para estabelecer um mecanismo de reparo.

O desequilíbrio entre os ciclos de fissão e fusão mitocondrial afetam diretamente a morfologia das mitocôndrias. Em geral, quando os eventos de fissão são superiores aos de fusão, são geradas mitocôndrias menores, esféricas, fragmentadas e com eventual indução à apoptose. Já o excesso de favorece a geração de mitocôndrias maiores e alongadas, com prejuízo na geração de energia (YOON et al., 2011; LIESA; SHIRIHAI, 2013). Este padrão de resposta mitocondrial foi observado no presente estudo, onde o aumento da proteína de fissão (Drp1) e a diminuição das proteínas de fusão (Mfn1/2) promoveu o aumento no número de perfis mitocondriais com o tamanho reduzido, em embriões expostos à Hcy na idade de E10.

Em condição de hiperhomocisteinemia, as mitocôndrias regulam os ciclos de fissão e fusão nas células ganglionares da retina de camundongos. Neste estudo, a superexpressão do gene relacionado à proteína de fusão, OPA1, e fissão, FIS1, demonstrou a participação deste evento também na indução à apoptose nas células ganglionares da retina neural, sugerindo que Opa1 e Fis1 atuam como reguladores do processo apoptótico (GANAPATHY et al., 2011). Adicionalmente estudo *in vitro* demonstrou que a Hcy atua de maneira dose dependente ao promover o aumento concomitante de Drp1 e Mfn2, além de induzir o processo de mitofagia

para remover as mitocôndrias disfuncionais em células endoteliais cerebrais (VACEK et al., 2017).

Além de participar do processo de fusão mitocondrial, Mfn2 é crítica para o estabelecimento do contato entre mitocôndria e retículo endoplasmático. O contato entre essas duas organelas está envolvido em inúmeros processos fisiológicos, como o tráfego de lipídios de membrana, transferência de cálcio, autofagia e fissão mitocondrial (ROWLAND; VOELTZ, 2012; LÓPEZ-CRISOSTO et al., 2015; SZYMAŃSKI et al., 2017) e a perda do contato entre essas duas organelas pode refletir na homeostase celular, além de prejudicar a dinâmica mitocondrial. Considerando que a proteína Mfn2 participa do processo de fusão mitocondrial, e do contato entre mitocôndria e retículo endoplasmático, e que esta foi reduzida nos embriões tratados com Hcy, avaliamos se esta redução poderia interferir no contato entre as duas organelas. Nossos resultados não demonstraram diferenças significativas para esta análise nas duas idades – E6 e E10.

Estudo conduzido por SCHNEEBERGER et al., (2013) mostrou que em ratos, alterações nutricionais levam à perda do contato entre mitocôndria e RER em neurônios hipotalâmicos. Além disso, neste mesmo estudo a deleção de Mfn2 comprovou que a perda do contato está igualmente associada a alterações das cristas mitocondriais, dilatação das mitocôndrias, indução ao estresse do RER, alteração na capacidade respiratória mitocondrial e aumento da produção de ROS, comprovando assim que a participação de Mfn2 é essencial para o contato entre as duas organelas, e que este contato é necessário para o equilíbrio energético mitocondrial. Embora nossos resultados tenham apontado para uma redução de Mfn2 nos embriões tratados com Hcy, não visualizamos alterações no contato entre essas duas organelas, possivelmente porque outras proteínas estejam atuando de modo a compensar a falta de Mfn2 nas células da retina expostas à Hcy.

Considerando as alterações mitocondriais (ultraestrutura e dinâmica mitocondrial) observadas nos embriões expostos à Hcy, procedemos com a avaliação da atividade das desidrogenases mitocondriais a fim de avaliar se as alterações encontradas nas mitocôndrias comprometeram a viabilidade das células neurais. A redução do MTT a formazam pela atividade das desidrogenases mitocondriais ocorre apenas em células metabolicamente viáveis. Assim, a produção de formazam ou sua inibição reflete o estado funcional da cadeia respiratória (LIU et al., 1997). A diminuição significativa do metabolismo do MTT foi observada em embriões tratados com Hcy nas duas idades de análise – E6 e E10 indicando a perda da viabilidade celular e da atividade mitocondrial nesses grupos. Estudos demonstram a perda de 45 – 58% da viabilidade celular em cultura de neurônios corticais submetidos a diferentes

concentrações de Hcy. Já em células HT22 submetidas às mesmas condições, a perda da viabilidade foi de 35 – 52%, mostrando um efeito diferencial da neurotoxicidade da Hcy em diferentes linhagens celulares (CURRÒ et al., 2014). Além disso, a perda da viabilidade celular está frequentemente associada a outras alterações celulares, como a aumento de transcritos de genes relacionados ao estresse celular e de retículo (ALTHAUSEN; PASCHEN, 2000).

5.6 EFEITO DA HCY SOBRE A MORTE CELULAR

Considerando que as alterações celulares relatadas anteriormente, como diminuição da proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, dano ao DNA, além de alterações mitocondriais podem ativar mecanismos de apoptose, avaliamos esse mecanismo através da técnica de fragmentação de DNA em gel de agarose.

Durante o processo de apoptose, o DNA é clivado por enzimas em pequenos fragmentos nucleossômicos específicos, que refletem um padrão de ‘escada’ quando submetidos à eletroforese em gel de agarose (MATASSOV et al., 2004). Em nosso estudo, não foram verificadas bandas de fragmentação nos embriões tratados com Hcy, nas duas idades analisadas. Segundo KASIBHATLA et al., (2006), o processo de apoptose nem sempre resulta em um padrão de escadas de DNA, pois isto pode depender do tipo de célula que está sendo avaliada. Além disso, este teste pode ser pouco sensível se o processo de apoptose não for acentuado.

Considerando às limitações descritas pela técnica, e levando em conta que a literatura relata a indução à apoptose como uma resposta celular em condição de hiperhomocisteinemia (MOORE et al., 2001; KNOTT et al., 2003; SACHDEV, 2005; KOZ et al., 2010), avaliamos pela técnica de citometria de fluxo a quantificação de caspase-3, uma proteína efetora da apoptose. As caspases pertencem a uma família de proteases que podem ser ativadas por duas vias, via extrínseca, mediada pelos receptores de membrana, e via intrínseca, relacionada a alterações celulares, como, por exemplo, dano ao DNA, que convergem principalmente para a participação mitocondrial, culminando com a liberação de proteínas pró-apoptóticas por esta organela (MCILWAIN; BERGER; MAK, 2013). Indépende da via ativada pelo estímulo apoptótico, a participação das caspases têm papel fundamental no processo de morte celular, essencialmente a caspase-3, que é executora da apoptose (PORTER; JA; NICKE, 1999).

Em nosso estudo, não foi evidenciado o processo de apoptose na idade de E6, porém em E10 os embriões tratados com Hcy apresentaram maior taxa de apoptose. A apoptose em células nervosas em condições de hiperhomocisteinemia é bem descrita na literatura, porém diferentes mecanismos celulares podem desencadeá-la. MOORE et al., (2001) observaram morte celular

por apoptose nas células ganglionares da retina após a estimulação do receptor *N-metil D-aspartato* (NMDA) e consequente liberação e aumento de $[Ca^{2+}]$ citoplasmáticos. Além disso, BOTTIGLIERI (2005) demonstrou que a Hcy pode induzir danos celulares através da geração de ROS, que provocam estresse oxidativo, que por sua vez pode levar à apoptose. Em cultura de neurônios, a Hcy também provocou apoptose por quebra de DNA, ativação da via-caspase 3 e liberação de citocromo c para o citoplasma das células (MILLER et al., 2003; VAN MIL; OOSTERBAAN; STEEGERS-THEUNISSEN, 2010). Alterações nas proteínas envolvidas com a dinâmica mitocondrial, em conjunto com a perda do potencial de membrana também promoveram apoptose em células da retina neural de camundongos em condições de hiperhomocisteinemia (GANAPATHY et al., 2011). Neste cenário, dependendo do tipo celular afetado e da quantidade de células que entram em processo apoptótico, podem ocorrer alterações na composição celular do tecido, trazendo consequências funcionais. Do contrário, caso haja algum dano celular acentuado e o processo de apoptose não seja ativado, células com danos podem continuar no ciclo e perpetuando esta condição.

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados nesta tese demonstram que uma única dose de Hcy (20 μ mol) administrada na idade de E2, promoveu efeitos celulares relevantes que interferiram na dinâmica celular das vesículas ópticas de *G. domesticus*.

A elevada dose de Hcy reduziu a sobrevivência dos embriões nas duas idades analisadas. Quanto ao padrão morfológico, a Hcy não induziu alterações nas vesículas ópticas, nem na espessura e organização tecidual da retina.

Foram verificadas alterações na integridade dos vasos sanguíneos através do aumento dos marcadores VEGF e VCAM, que podem estar relacionados com a perturbação da barreira ocular sanguínea. Estas alterações podem trazer consequências ao desenvolvimento da vesícula óptica, uma vez que a integridade dos vasos é essencial ao desenvolvimento de estruturas embrionárias. Além deste fato, o aumento da molécula VCAM é um processo característico em casos de inflamação. Porém, ao analisar um marcador específico para inflamação do tecido nervoso, não encontramos diferenças entre os grupos testados.

Também observamos a diminuição da proliferação celular, na qual o aumento da proteína p53 e p21 promoveu a retenção da célula na fase G1 do ciclo. Além disso, o aumento de p53 está relacionado a danos ao DNA, o que foi confirmado pelo aumento das células positivas para γ -H2AX. Essas alterações foram mais predominantes na idade de E6, onde foi verificada uma maior modulação das proteínas envolvidas com a parada e progressão do ciclo celular. Em E10, foi verificada apenas a diminuição das células em mitose, mas que também caracteriza uma diminuição da proliferação celular.

As alterações no ciclo celular, como a parada das células no ciclo, tiveram como consequência a redução da diferenciação das células neurais. Adicionalmente, a redução do fator neurotrófico GDNF também pode ter influenciado na redução da diferenciação das células neurais.

Na ultraestrutura foram observadas alterações como dilatação do envoltório nuclear, alterações mitocondriais equivalentes à turgor, ruptura de membranas e de cristas. No citoplasma foi observada a formação de membranas concêntricas e vesículas nos embriões em idade de E6. Na idade de E10, além destas mesmas alterações, foi ainda verificada a dilatação das cisternas do retículo endoplasmático.

Verificamos também que a mitocôndria é um potencial alvo da toxicidade da Hcy, uma vez que foram encontradas alterações relacionadas à ultraestrutura e à redução da atividade das desidrogenases, que levaram à redução da viabilidade celular nas duas idades. Modificações

no conteúdo das proteínas envolvidas nos processos de fissão e fusão mitocondriais, Drp-1, Mfn-1 e Mfn2, respectivamente, alteraram a dinâmica mitocondrial nas duas idades. Entretanto, para o dano nas mitocôndrias, o fator tempo foi determinante, uma vez que a modulação das proteínas envolvidas na dinâmica mitocondrial promoveu um aumento do número de perfis mitocondriais e conseqüentemente, a redução do tamanho dos perfis. Adicionalmente, as alterações encontradas na dinâmica mitocondrial não modificaram o contato entre mitocôndria e o RER.

Por fim, como resposta aos danos celulares encontrados, verificamos a indução de dois mecanismos, aumento do processo de autofagia, possivelmente para eliminar as mitocôndrias alteradas, e apoptose, identificada pelo aumento de caspase-3 nos embriões em E10.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLA, R. et al. Evaluation of homocysteine levels in individuals having nonsyndromic cleft lip with or without palate. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP**, v. 20, n. 3, p. 390, 2016.
- ADLER, R.; CANTO-SOLER, M. V. Molecular mechanisms of optic vesicle development: Complexities, ambiguities and controversies. **Developmental Biology**, v. 305, n. 1, p. 1–13, 2007.
- AJITH, T. A.; RANIMENON. Homocysteine in ocular diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 450, p. 316–321, 2015.
- ALMASIEH, M. et al. The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 31, n. 2, p. 152–181, 2012.
- ALTHAUSEN, S.; PASCHEN, W. Homocysteine-induced changes in mRNA levels of genes coding for cytoplasmic- and endoplasmic reticulum-resident stress proteins in neuronal cell cultures. **Brain research. Molecular brain research**, v. 84, n. 1–2, p. 32–40, 2000.
- AMUR, S. G. et al. Correlation between inhibition of myelin basic protein (arginine) methyltransferase by sinefungin and lack of compact myelin formation in cultures of cerebral cells from embryonic mice. **Journal of neuroscience research**, v. 16, n. 2, p. 367–76, 1986.
- ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária -ANVISA**, 2017.
- ARAÚJO, J. R. et al. Folates and Ageing: role in mild cognitive impairment, dementia and depression. **Ageing research reviews**, v. 22, p. 9–19, 2015.
- AU-YEUNG, K. K. W. et al. Hyperhomocysteinemia Activates Nuclear Factor- κ B in Endothelial Cells via Oxidative Stress. **Circulation Research**, v. 94, n. 1, p. 28–36, 2004.
- AUBARD, Y.; DARODES, N.; CANTALOUBE, M. Hyperhomocysteinemia and pregnancy--review of our present understanding and therapeutic implications. **European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology**, v. 93, n. 2, p. 157–65, 2000.
- AZIZI, Z. A. et al. Effects of hyperhomocysteinemia during the gestational period on ossification in rat embryo. **Bone**, v. 46, n. 5, p. 1344–1348, 2010.
- AZZOLINI, C. et al. Expression of VEGF-A, Otx homeobox and p53 family genes in proliferative vitreoretinopathy. **Mediators of inflammation**, v. 2013, p. 857380, 2013.
- BARDE, Y. A. Trophic factors and neuronal survival. **Neuron**, v. 2, n. 6, p. 1525–34, 1989.
- BARDE, Y. A.; EDGAR, D.; THOENEN, H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. **The EMBO journal**, v. 1, n. 5, p. 549–53, 1982.
- BARRON, K. D. The microglial cell. A historical review. **Journal of the neurological sciences**, v. 134 Suppl, p. 57–68, 1995.
- BAWA, S. R.; YASHROY, R. C. Structure and function of vulture pecten. **Cells Tissues Organs**, v. 89, n. 3, p. 473–480, 1974.

- BAYDAS, G. et al. Melatonin prevents oxidative stress and inhibits reactive gliosis induced by hyperhomocysteinemia in rats. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 71, n.1, p. S91-5, 2006.
- BAYE, L. M.; LINK, B. A. Interkinetic Nuclear Migration and the Selection of Neurogenic Cell Divisions during Vertebrate Retinogenesis. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 38, p. 10143–10152, 2007.
- BELLIVEAU, M. J.; CEPKO, C. L. Extrinsic and intrinsic factors control the genesis of amacrine and cone cells in the rat retina. **Development (Cambridge, England)**, v. 126, n. 3, p. 555–66, 1999.
- BENDER, D. A. B vitamins in the nervous system. **Neurochemistry international**, v. 6, n. 3, p. 297–321, 1984.
- BENVENISTE, E. N.; NGUYEN, V. T.; O'KEEFE, G. M. Immunological aspects of microglia: relevance to Alzheimer's disease. **Neurochemistry International**, v. 39, n. 5–6, p. 381–391, 2001.
- BEREITER-HAHN, J.; VÖTH, M. Dynamics of mitochondria in living cells: Shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. **Microscopy Research and Technique**, v. 27, n. 3, p. 198–219, 1994.
- BHARADWAJ, A. S. et al. Role of the retinal vascular endothelial cell in ocular disease. **Progress in retinal and eye research**, v. 32, p. 102–80, 2013.
- BHAUMIK, S. R.; SMITH, E.; SHILATIFARD, A. Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. **Nature structural & molecular biology**, v. 14, n. 11, p. 1008–16, 2007.
- BILITOU, A.; OHNUMA, S. The role of cell cycle in retinal development: Cyclin-dependent kinase inhibitors co-ordinate cell-cycle inhibition, cell-fate determination and differentiation in the developing retina. **Developmental Dynamics**, v. 239, n. 3, p. 727–736, 2010.
- BLOM, H. J.; SMULDERS, Y. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 34, n. 1, p. 75–81, 2011.
- BOARDMAN, P. E. et al. A comprehensive collection of chicken cDNAs. **Current biology : CB**, v. 12, n. 22, p. 1965–9, 2002.
- BOK, D. The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. **Journal of cell science. Supplement**, v. 17, p. 189–95, 1993.
- BOLDYREV, A. et al. Why Is Homocysteine Toxic for the Nervous and Immune Systems? **Current Aging Science**, v. 6, n. 1, p. 29–36, 2013.
- BOSCO, A.; STEELE, M. R.; VETTER, M. L. Early microglia activation in a mouse model of chronic glaucoma. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 519, n. 4, p. 599–620, 2011.
- BOTTIGLIERI, T. Homocysteine and folate metabolism in depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 29, n. 7, p. 1103–1112, 2005.

- BOULTON, M. **Retinal Pigment Epithelium and Macular Diseases**. SPRINGER SCIENCE+BUSINESS MEDIA, BV, p. 554, 1998.
- BOURCKHARDT, G. F. et al. Effects of homocysteine on mesenchymal cell proliferation and differentiation during chondrogenesis on limb development. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, p. 1390-1397, 2015.
- BOURCKHARDT, G. F. Impact of homocysteine on vasculogenic factors and bone formation in chicken embryos. **Cell Biology and Toxicology**, v. 35, n. 1, p. 49–58, 2019.
- BRADY, C.; ATTARDI, L. D. P53 At a Glance. **Journal of cell science**, v. 123, n. Pt 15, p. 2527–32, 2010.
- BREIER, G. et al. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. **Development (Cambridge, England)**, v. 114, n. 2, p. 521–32, 1992.
- BROOKE, O. G. et al. Vitamin D supplements in pregnant Asian women: effects on calcium status and fetal growth. **British medical journal**, v. 280, n. 6216, p. 751–4, 1980.
- BROUNS, M. R. et al. Morphogenetic movements during cranial neural tube closure in the chick embryo and the effect of homocysteine. **Anatomy and Embryology**, v. 210, n. 2, p. 81–90, 2005.
- BUFFO, A.; ROLANDO, C.; CERUTI, S. Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. **Biochemical pharmacology**, v. 79, n. 2, p. 77–89, 2010.
- BUSS, R. R.; SUN, W.; OPPENHEIM, R.W. Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. **Annual Review of Neuroscience**, v. 29, n. 1, p. 1–35, 2006.
- CALAZA, K. C.; GARDINO, P. F. Neurochemical phenotype and birthdating of specific cell populations in the chick retina. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 82, n. 3, p. 595–608, 2010.
- CALVO, P. M; PASTOR, A. M; DE LA CRUZ, R. Vascular endothelial growth factor: an essential neurotrophic factor for motoneurons? **Neural Regeneration Research**, v. 13, n. 7, p. 1181, 2018.
- CAMPOCHIARO, P.A. Ocular neovascularization. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, v. 91, n. 3, p. 311–21, 2013.
- CARLSON, B. M. **Embriologia Humana e Biologia do Desenvolvimento**. Elsevier Health Sciences Brazil, 2014.
- CECCHINI, M. S. et al. Exposure to homocysteine leads to cell cycle damage and reactive gliosis in the developing brain. **Reproductive Toxicology**, v. 87, p. 60–69, 2019.
- CEPKO, C. L. et al. Cell fate determination in the vertebrate retina. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 2, p. 589–595, 1996.

- CHAMBERS, J. C. et al. Investigation of Relationship Between Reduced, Oxidized, and Protein-Bound Homocysteine and Vascular Endothelial Function in Healthy Human. **Circulation Research**, v.89, n.2, p. 187-192, 2001.
- CHAN, D. C. Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development. **Cell**, v. 125, n. 7, p. 1241–1252, 2006.
- CHAN, J. R. et al. Alpha 4 beta 1 integrin/VCAM-1 interaction activates alpha L beta 2 integrin-mediated adhesion to ICAM-1 in human T cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 164, n. 2, p. 746–53, 2000.
- CHAO, M. V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 4, n. 4, p. 299–309, 2003.
- CHAVARRÍA, T. et al. Homocysteine inhibits the proliferation and invasive potential of HT-1080 human fibrosarcoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 301, n. 2, p. 540–544, 2003.
- CHEN, H. et al. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. **The Journal of Cell Biology**, v. 160, n. 2, p. 189–200, 2003.
- CHEN, S. et al. Homocysteine exaggerates microglia activation and neuroinflammation through microglia localized STAT3 overactivation following ischemic stroke. **Journal of Neuroinflammation**, v. 14, n. 1, p. 187, 2017. a.
- CHEN, S. et al. Homocysteine induces mitochondrial dysfunction involving the crosstalk between oxidative stress and mitochondrial pSTAT3 in rat ischemic brain. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 6932, 2017. b.
- CHENG, Z.; YANG, X.; WANG, H.. Hyperhomocysteinemia and Endothelial Dysfunction. **Current hypertension reviews**, v. 5, n. 2, p. 158–165, 2009.
- CONNOR, K. M. et al. Increased dietary intake of ω -3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. **Nature Medicine**, v. 13, n. 7, p. 868–873, 2007.
- CORAL, K. et al. Plasma homocysteine and total thiol content in patients with exudative age-related macular degeneration. **Eye**, v. 20, n. 2, p. 203–207, 2006.
- COSTA, L. G. Neurotoxicity testing: a discussion of in vitro alternatives. **Environmental health perspectives**, v. 106 Suppl 2, n. Suppl 2, p. 505–10, 1998.
- CUADROS, M. A.; RIOS, A. Spatial and temporal correlation between early nerve fiber growth and neuroepithelial cell death in the chick embryo retina. **Anatomy and embryology**, v. 178, n. 6, p. 543–51, 1988.
- CUNHA-VAZ, J. The blood-ocular barriers. **Survey of Ophthalmology**, v. 23, n. 5, p. 279–296, 1979.
- CUNHA-VAZ, J.; BERNARDES, R.; LOBO, C. Blood-Retinal Barrier. **European Journal of Ophthalmology**, v. 21, n. 6_suppl, p. 3–9, 2011.

- CURRÒ, M. et al. Toxic Effects of Mildly Elevated Homocysteine Concentrations in Neuronal-Like Cells. **Neurochemical Research**, v. 39, n. 8, p. 1485–1495, 2014.
- CYBULSKY, M. I. et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. **The Journal of clinical investigation**, v. 107, n. 10, p. 1255–62, 2001.
- DAGKALIS, A. et al. CX3CR1-deficiency is associated with increased severity of disease in experimental autoimmune uveitis. **Immunology**, v. 128, n. 1, p. 25–33, 2009.
- DAW, N. W.; JENSEN, R. J.; BRUNKEN, William J. Rod pathways in mammalian retinae. **Trends in Neurosciences**, v. 13, n. 3, p. 110–115, 1990.
- DE BRITO, O. M.; SCORRANO, Luca. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. **Nature**, v. 456, n. 7222, p. 605–610, 2008.
- DE LA CALLE, M. et al. Homocysteine, folic acid and B-group vitamins in obstetrics and gynaecology. **European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology**, v. 107, n. 2, p. 125–34, 2003.
- DE S. MOREIRA, D. et al. Chronic Mild Hyperhomocysteinemia Alters Inflammatory and Oxidative/Nitrative Status and Causes Protein/DNA Damage, as well as Ultrastructural Changes in Cerebral Cortex: Is Acetylsalicylic Acid Neuroprotective? **Neurotoxicity Research**, v. 33, n. 3, p. 580–592, 2018.
- DESMOTS, F. et al. Scythe Regulates Apoptosis-inducing Factor Stability during Endoplasmic Reticulum Stress-induced Apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 6, p. 3264–3271, 2008.
- DEVINE, L.; LIGHTMAN, S. L.; GREENWOOD, J. Role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1 in lymphocyte migration across retinal pigment epithelial monolayers *in vitro*. **Immunology**, v. 88, n. 3, p. 456–462, 1996.
- DOH, S. et al. Analysis of retinal cell development in chick embryo by immunohistochemistry and in ovo electroporation techniques. **BMC Developmental Biology**, v. 10, n. 1, p. 8, 2010.
- DONG, A. et al. Vascular cell-adhesion molecule-1 plays a central role in the proangiogenic effects of oxidative stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 35, p. 14614–9, 2011.
- DOWLING, J. E. The retina. An approachable part of the brain. Cambridge: Harvard University Press, 1987.
- DOWLING, J. E.; WALD, G.. The Role of Vitamin A Acid. **Vitamins & Hormones**, v. 18, p. 515–541, 1961.
- DUAN, W. et al. Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 80, n. 1, p. 101–10, 2002.
- DUNN, W. A. Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. **Trends in Cell Biology**, v. 4, n. 4, p. 139–143, 1994.

- EDLUND, T.; JESSELL, T. M. Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system. **Cell**, v. 96, n. 2, p. 211–24, 1999.
- ERNSTER, L.; SCHATZ, G. Mitochondria: a historical review. **The Journal of cell biology**, v. 91, n. 3, p. 227s-255s, 1981.
- FALCIERI, E. et al. Ultrastructural features of apoptosis. **Scanning microscopy**, v. 8, n. 3, p. 653–65, 1994.
- FARACI, F. M.; LENTZ, S. R. Hyperhomocysteinemia, Oxidative Stress, and Cerebral Vascular Dysfunction. **Stroke**, v. 35, n. 2, p. 345–347, 2004.
- FARAH, M. H. Neurogenesis and cell death in the ganglion cell layer of vertebrate retina. **Brain Research Reviews**, v. 52, n. 2, p. 264–274, 2006.
- FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 1, p. 4–25, 1997.
- FINKELSTEIN, J. D. Methionine metabolism in mammals. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 1, n. 5, p. 228–237, 1990.
- FOISTER, N. S. L. et al. Embryonic cerebellar granule cells are resistant to necrosis induced by homocysteine. **Developmental Brain Research**, v. 160, n. 1, p. 85–89, 2005.
- FORD, A. L. et al. Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4⁺ T cells compared. **Journal of immunology (Baltimore)**, v. 154, n. 9, p. 4309–21, 1995.
- FRADE, J. M. et al. Control of early cell death by BDNF in the chick retina. **Development (Cambridge, England)**, v. 124, n. 17, p. 3313–20, 1997.
- FRANK, C. L.; TSAI, L. Alternative Functions of Core Cell Cycle Regulators in Neuronal Migration, Neuronal Maturation, and Synaptic Plasticity. **Neuron**, v. 62, n. 3, p. 312–326, 2009.
- FRASSON, M. et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces histologic and functional protection of rod photoreceptors in the rd/rd mouse. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 40, n. 11, p. 2724–34, 1999.
- GALINDO-ROMERO, C. et al. Effect of Brain-Derived Neurotrophic Factor on Mouse Axotomized Retinal Ganglion Cells and Phagocytic Microglia. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 54, n. 2, p. 974, 2013.
- GANAPATHY, P. S. et al. Endogenous Elevation of Homocysteine Induces Retinal Neuron Death in the Cystathionine- β -Synthase Mutant Mouse. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 50, n. 9, p. 4460, 2009.
- GANAPATHY, P. S. et al. Homocysteine-Mediated Modulation of Mitochondrial Dynamics in Retinal Ganglion Cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 52, n. 8, p. 5551, 2011.

- GARCÍA-PORRERO, J. A.; OJEDA, J. L. Cell death and phagocytosis in the neuroepithelium of the developing retina. A TEM and SEM study. **Experientia**, v. 35, n. 3, p. 375–6, 1979.
- GARIBALLA, S. Testing homocysteine-induced neurotransmitter deficiency, and depression of mood hypothesis in clinical practice. **Age and Ageing**, v. 40, n. 6, p. 702–705, 2011.
- GHORBANIHAGHJO, A. et al. Lipoprotein(a), homocysteine, and retinal arteriosclerosis. **Molecular vision**, v. 14, p. 1692–7, 2008.
- GILBERT, S. F. **Developmental Biology**. Sinauer Associates, 2014.
- GIVVIMANI, S. et al. Hyperhomocysteinemia decreases intestinal motility leading to constipation. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 303, n. 3, p. 281–290, 2012.
- GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **The Journal of Pathology**, v. 221, n. 1, p. 3–12, 2010.
- GÓMEZ-PALACIO-SCHJETNAN, A.; ESCOBAR, M. L. Neurotrophins and synaptic plasticity. **Current topics in behavioral neurosciences**, v. 15, n. 1949, p. 117–36, 2013.
- GOZES, I. Tubulin in the nervous system. **Neurochemistry International**, v. 4, n. 2–3, p. 101–120, 1982.
- GRACA, A. B.; HIPPERT, C.; PEARSON, R. A. Müller Glia Reactivity and Development of Gliosis in Response to Pathological Conditions. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1047, p. 303–308, 2018.
- GRAEBER, M. B.; STREIT, W. J. Microglia: immune network in the CNS. **Brain pathology (Zurich, Switzerland)**, v. 1, n. 1, p. 2–5, 1990.
- GRAW, J. Genetic aspects of embryonic eye development in vertebrates. **Developmental Genetics**, v. 18, n. 3, p. 181–197, 1996.
- GREENE, N. D.; DUNLEVY, L. P.; COPP, A. J. Homocysteine is embryotoxic but does not cause neural tube defects in mouse embryos. **Anatomy and Embryology**, v. 206, n. 3, p. 185–191, 2003.
- GRIEVE, A.; BUTCHER, S. P.; GRIFFITHS, Roger. Synaptosomal plasma membrane transport of excitatory sulphur amino acid transmitter candidates: Kinetic characterisation and analysis of carrier specificity. **Journal of Neuroscience Research**, v. 32, n. 1, p. 60–68, 1992.
- GRINTAL, B. et al. Inhibition of astroglial glutamate transport by polyunsaturated fatty acids: Evidence for a signalling role of docosahexaenoic acid. **Neurochemistry International**, v. 54, n. 8, p. 535–543, 2009.
- GUPTA, V. et al. BDNF impairment is associated with age-related changes in the inner retina and exacerbates experimental glaucoma. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 9, p. 1567–1578, 2014.
- HAGUE, W. M. Homocysteine and pregnancy. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 17, n. 3, p. 459–469, 2003.

- HALLBÖÖK, F. Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. **Current opinion in neurobiology**, v. 9, n. 5, p. 616–21, 1999.
- HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 195, n. 4, p. 231–72, 1951.
- HAMBURGER, V. History of the discovery of neuronal death in embryos. **Journal of Neurobiology**, v. 23, n. 9, p. 1116–1123, 1992.
- HAN, M. et al. Folate rescues lithium-, homocysteine- and Wnt3A-induced vertebrate cardiac anomalies. **Disease models & mechanisms**, v. 2, n. 9–10, p. 467–78, 2009.
- HARRIS, W. A. Cellular diversification in the vertebrate retina. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 7, n. 5, p. 651–658, 1997.
- HEAVNER, W.; PEVNY, L. Eye development and retinogenesis. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 12, 2012.
- HENDZEL, M. J. et al. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. **Chromosoma**, v. 106, n. 6, p. 348–360, 1997.
- HERNANDEZ, C. et al. Vitreous Levels of Vascular Cell Adhesion Molecule and Vascular Endothelial Growth Factor in Patients With Proliferative Diabetic Retinopathy: A case-control study. **Diabetes Care**, v. 24, n. 3, p. 516–521, 2001.
- HILL, T. A. et al. A new method for studying the selective adherence of blood lymphocytes to the microvasculature of human retina. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 38, n. 12, p. 2608–18, 1997.
- HINTERBERGER, M.; FISCHER, P. Folate and Alzheimer: when time matters. **Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)**, v. 120, n. 1, p. 211–24, 2013.
- HOHSFIELD, L. A.; HUMPEL, C. Homocysteine enhances transmigration of rat monocytes through a brain capillary endothelial cell monolayer via ICAM-1. **Current neurovascular research**, v. 7, n. 3, p. 192–200, 2010.
- HOON, M. et al. Functional architecture of the retina: development and disease. **Progress in retinal and eye research**, v. 42, p. 44–84, 2014.
- HOPPINS, S.; LACKNER, L.; NUNNARI, J. The Machines that Divide and Fuse Mitochondria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 76, n. 1, p. 751–780, 2007.
- HOSOI, T.; OZAWA, K. Endoplasmic reticulum stress in disease: mechanisms and therapeutic opportunities. **Clinical Science**, v. 118, p. 19–29, 2010.
- HRUBAN, Z.; SLESERS, A.; HOPKINS, E. Drug-induced and naturally occurring myeloid bodies. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 27, n. 1, p. 62–70, 1972.

- HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, n. 1, p. 677–736, 2001.
- HUGHES, W. F.; MCLOON, S. C. Ganglion cell death during normal retinal development in the chick: Comparisons with cell death induced by early target field destruction. **Experimental Neurology**, v. 66, n. 3, p. 587–601, 1979.
- HUNOT, S. et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) gene expression in the human brain: A post mortem in situ hybridization study with special reference to Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 103, n. 8–9, p. 1043–1052, 1996.
- HURLEY, W. L.; DOANE, R. M. Recent Developments in the Roles of Vitamins and Minerals in Reproduction. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 3, p. 784–804, 1989.
- IACOBAZZI, Vito et al. Hyperhomocysteinemia: Related genetic diseases and congenital defects, abnormal DNA methylation and newborn screening issues. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 113, p. 27–33, 2014.
- IMBARD, A.; BENOIST, J.; BLOM, H. J. Neural tube defects, folic acid and methylation. **International journal of environmental research and public health**, v. 10, n. 9, p. 4352–89, 2013.
- INGRID GOH, Y. et al. Prenatal Multivitamin Supplementation and Rates of Congenital Anomalies: A Meta-Analysis. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada**, v. 28, n. 8, p. 680–689, 2006.
- ISHIDA, S. et al. VEGF164-mediated inflammation is required for pathological, but not physiological, ischemia-induced retinal neovascularization. **The Journal of experimental medicine**, v. 198, n. 3, p. 483–9, 2003.
- IVANOV, G. S. et al. Methylation-acetylation interplay activates p53 in response to DNA damage. **Molecular and cellular biology**, v. 27, n. 19, p. 6756–6769, 2007.
- IYENGAR, L.; RAJALAKSHMI, K. Effect of folic acid supplement on birth weights of infants. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 122, n. 3, p. 332–336, 1975.
- JACOBSEN, D. W. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. **Clinical chemistry**, v. 44, n. 8 Pt 2, p. 1833–43, 1998.
- JACOBSON, M. D.; WEIL, M.; RAFF, M. C. Programmed Cell Death in Animal Development. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 347–354, 1997.
- JAO, W. et al. Myeloid bodies in drug-induced acute tubular necrosis. **The Journal of Pathology**, v. 139, n. 1, p. 33–40, 1983.
- JEONG, H. et al. Brain inflammation and microglia: facts and misconceptions. **Experimental neurobiology**, v. 22, n. 2, p. 59–67, 2013.
- JIN, Y.; BRENNAN, L. Effects of homocysteine on metabolic pathways in cultured astrocytes. **Neurochemistry International**, v. 52, n. 8, p. 1410–1415, 2008.

- JOERGER, A C.; FERSHT, A R. Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants. **Oncogene**, v. 26, n. 15, p. 2226–42, 2007.
- JOHNSON, E. C. et al. Neurotrophin roles in retinal ganglion cell survival: lessons from rat glaucoma models. **Experimental eye research**, v. 88, n. 4, p. 808–15, 2009.
- JOHNSTON, M. C. et al. Origins of avian ocular and periocular tissues. **Experimental Eye Research**, v. 29, n. 1, p. 27–43, 1979.
- KAHN, A. J. An autoradiographic analysis of the time of appearance of neurons in the developing chick neural retina. **Developmental Biology**, v. 38, n. 1, p. 30–40, 1974.
- KAMAT, P. K. et al. Hydrogen Sulfide Epigenetically Attenuates Homocysteine-Induced Mitochondrial Toxicity Mediated Through NMDA Receptor in Mouse Brain Endothelial (bEnd3) Cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 230, n. 2, p. 378–394, 2015.
- KAMATH, A. F. et al. Elevated levels of homocysteine compromise blood-brain barrier integrity in mice. **Blood**, v. 107, n. 2, p. 591–593, 2006.
- KAMUDHAMAS, A. et al. Homocysteine thiolactone induces apoptosis in cultured human trophoblasts: a mechanism for homocysteine-mediated placental dysfunction? **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 191, n. 2, p. 563–571, 2004.
- KANEKO, A. Physiology of the Retina. **Annual Review of Neuroscience**, v. 2, n. 1, p. 169–191, 1979.
- KAPCZINSKI, F. et al. Increased oxidative stress as a mechanism for decreased BDNF levels in acute manic episodes. **Revista brasileira de psiquiatria**, v. 30, n. 3, p. 243–5, 2008.
- KARBOWSKI, M.; YOULE, R. J. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, v. 10, n. 8, p. 870–880, 2003.
- KARLSSON, M. et al. Overlapping and specific patterns of GDNF, c-ret and GFR alpha mRNA expression in the developing chicken retina. **Mechanisms of development**, v. 114, n. 1–2, p. 161–5, 2002.
- KARPERIEN, A.; AHAMMER, H.; JELINEK, H. F. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, p. 3, 2013.
- KASIBHATLA, S. et al. Analysis of DNA Fragmentation Using Agarose Gel Electrophoresis. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2006, n. 1, p. 4429, 2006.
- KAUFMAN, M. H. **The atlas of mouse development**: Academic Press, 1992.
- KNOTT, L. et al. Homocysteine oxidation and apoptosis: a potential cause of cleft palate. **In vitro cellular & developmental biology. Animal**, v. 39, n. 1–2, p. 98–105, 2003.
- KOBUS-BIANCHINI, K. et al. Homocysteine-induced changes in cell proliferation and differentiation in the chick embryo spinal cord: implications for mechanisms of neural tube defects (NTD). **Reproductive Toxicology**, v. 69, p. 167–173, 2017.

- KOBUS, K. et al. 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**, v. 97, n. 6, p. 386–397, 2013.
- KOBUS, K.; NAZARI, E. M.; MÜLLER, Y. M. R. Effects of folic acid and homocysteine on spinal cord morphology of the chicken embryo. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 132, n. 5, p. 525–532, 2009.
- KOCH, A. E. et al. Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. **Nature**, v. 376, n. 6540, p. 517–519, 1995.
- KOEBERLE, P. D.; BALL, A. K. Effects of GDNF on retinal ganglion cell survival following axotomy. **Vision research**, v. 38, n. 10, p. 1505–15, 1998.
- KOKAME, K.; KATO, H.; MIYATA, T. Homocysteine-respondent genes in vascular endothelial cells identified by differential display analysis. GRP78/BiP and novel genes. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 47, p. 29659–65, 1996.
- KOLB, H.. How the retina works. **American Scientist**, v. 91, n. 1, p. 28–35, 2004.
- KONG, D. et al. Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 19, n. 4, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29614819>>. Acesso em: 29 jun. 2019.
- KOZ, S. T. et al. Effects of maternal hyperhomocysteinemia induced by methionine intake on oxidative stress and apoptosis in pup rat brain. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 28, n. 4, p. 325–329, 2010.
- KRUMAN, I. I. et al. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 18, p. 6920–6926, 2000.
- KRUMAN, I. I. et al. Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 5, p. 1752–62, 2002.
- KRZYSTOLIK, M. G. et al. Prevention of Experimental Choroidal Neovascularization With Intravitreal Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Antibody Fragment. **Archives of Ophthalmology**, v. 120, n. 3, p. 338, 2002.
- LARRIVÉE, B. et al. Guidance of vascular development: Lessons from the nervous system. **Circulation Research**, v. 104, n. 4, p. 428–441, 2009.
- LATACHA, K. S.; ROSENQUIST, T. H. Homocysteine inhibits extra-embryonic vascular development in the avian embryo. **Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 234, n. 2, p. 323–31, 2005.
- LEE, S. et al. Nitric Oxide Inhibition of Homocysteine-induced Human Endothelial Cell Apoptosis by Down-regulation of p53-dependent Noxa Expression through the Formation of S-Nitrosohomocysteine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 7, p. 5781–5788, 2005.

- LEE, Y. et al. Hyperhomocysteinemia Causes Chorioretinal Angiogenesis with Placental Growth Factor Upregulation. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 15755, 2018.
- LEUNG, D. et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. **Science**, v. 246, n. 4935, p. 1306–1309, 1989.
- LEVASSEUR, R. Bone tissue and hyperhomocysteinemia. **Joint Bone Spine**, v. 76, n. 3, p. 234–240, 2009.
- LEVI-MONTALCINI, R.; HAMBURGER, V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. **Journal of Experimental Zoology**, v. 116, n. 2, p. 321–361, 1951.
- LEVINE, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 323–31, 1997.
- LEVINE, B.; KLIONSKY, D. J. Development by Self-Digestion: Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy. **Developmental Cell**, v. 6, n. 4, p. 463–477, 2004.
- LEWIS, G. P.; FISHER, S. K. Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. **International review of cytology**, v. 230, p. 263–90, 2003.
- LI, H. et al. Pax-6 Is First Expressed in a Region of Ectoderm Anterior to the Early Neural Plate: Implications for Stepwise Determination of the Lens. **Developmental Biology**, v. 162, n. 1, p. 181–194, 1994.
- LIBERTO, C. M. et al. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. **Journal of Neurochemistry**, v. 89, n. 5, p. 1092–1100, 2004.
- LIEBNER, S.; GERHARDT, H.; WOLBURG, H. Maturation of the blood-retina barrier in the developing pecten oculi of the chicken. **Brain research. Developmental brain research**, v. 100, n. 2, p. 205–19, 1997.
- LIESA, M.; SHIRIHAI, O. S. Mitochondrial Dynamics in the Regulation of Nutrient Utilization and Energy Expenditure. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 4, p. 491–506, 2013.
- LINDEN, R.; REHEN, S. K.; CHIARINI, L. B. Apoptosis in developing retinal tissue. **Progress in retinal and eye research**, v. 18, n. 2, p. 133–65, 1999.
- LINDNER, T. et al. Morphologic and biometric evaluation of chick embryo eyes in ovo using 7 Tesla MRI. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 2647, 2017.
- LING, E.; WONG, W. The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: A historical review and current concepts. **Glia**, v. 7, n. 1, p. 9–18, 1993.
- LIPTON, S. a et al. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 11, p. 5923–5928, 1997.
- LIU, Y. et al. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. **Journal of Neurochemistry**, v. 69, n. 2, p. 581–593, 2002.

- LIVESEY, F. J.; CEPKO, C. L. Vertebrate neural cell-fate determination: Lessons from the retina. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 2, p. 109–118, 2001.
- LODISH, H. F. **Molecular cell biology**: W.H. Freeman, 2000.
- LOMINADZE, D. et al. Homocysteine causes cerebrovascular leakage in mice. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 290, n. 3, p. H1206-13, 2006.
- LONG, Y.; NIE, J. Homocysteine in Renal Injury. **Kidney Diseases**, v. 2, n. 2, p. 80, 2016.
- LÓPEZ-CRISOSTO, C. et al. ER-to-mitochondria miscommunication and metabolic diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1852, n. 10, p. 2096–2105, 2015.
- LOUREIRO, S. O. et al. Homocysteine induces cytoskeletal remodeling and production of reactive oxygen species in cultured cortical astrocytes. **Brain research**, v. 1355, p. 151–64, 2010.
- LOVICU, F. J.; MCAVOY, J. W. Growth factor regulation of lens development. **Developmental biology**, v. 280, n. 1, p. 1–14, 2005.
- LU, B.; JAN, L.; JAN, Y. Control of Cell Divisions in the Nervous System: Symmetry and Asymmetry. **Annual Review of Neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 531–556, 2000.
- MAESTRO DE LAS CASAS, C. et al. High exogenous homocysteine modifies eye development in early chick embryos. **Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology**, v. 67, n. 1, p. 35–40, 2003.
- MAKHOUL, M. et al. Characterization of retinal expression of vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) during experimental autoimmune uveitis. **Experimental Eye Research**, v. 101, p. 27–35, 2012.
- MALAGUARNERA, G. et al. Homocysteine Serum Levels in Diabetic Patients with Non Proliferative, Proliferative and without Retinopathy. **BioMed Research International**, v.
- MALDONADO, E. et al. Occurrence of Cleft-Palate and Alteration of Tgf- β (3) expression and the mechanisms leading to palatal fusion in mice following dietary folic-acid deficiency. **Cells Tissues Organs**, v. 194, n. 5, p. 406–420, 2011. b.
- MALER, J. M. et al. Homocysteine induces cell death of rat astrocytes in vitro. **Neuroscience letters**, v. 347, n. 2, p. 85–8, 2003.
- MANDAVIYA, P. R.; STOLK, L.; HEIL, S. G. Homocysteine and DNA methylation: A review of animal and human literature. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 113, n. 4, p. 243–252, 2014.
- MANN, I. C. THE FUNCTION OF THE PECTEN. **British Journal of Ophthalmology**, v. 8, n. 5, p. 209–226, 1924.
- MARNEROS, A. G. et al. Vascular Endothelial Growth Factor Expression in the Retinal Pigment Epithelium Is Essential for Choriocapillaris Development and Visual Function. **The American Journal of Pathology**, v. 167, n. 5, p. 1451–1459, 2005.

- MARQUARDT, T.; GRUSS, P. Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. **Trends in Neurosciences**, v. 25, n. 1, p. 32–38, 2002.
- MARTINS, R. A. P.; PEARSON, R. A. Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate retina. **Brain Research**, v. 1192, p. 37–60, 2008.
- MATASSOV, D. et al. Measurement of Apoptosis by DNA Fragmentation. In: **Apoptosis Methods and Protocols**. New Jersey: Humana Press, 2004. v. 282, p. 001–018.
- MCALLISTER, A. K.; KATZ, L. C.; LO, D. C. NEUROTROPHINS AND SYNAPTIC PLASTICITY. **Annual Review of Neuroscience**, v. 22, n. 1, p. 295–318, 1999.
- MCARDLE, H. J.; ASHWORTH, C. J. Micronutrients in fetal growth and development. **British Medical Bulletin**, v. 55, n. 3, p. 499–510, 1999.
- MCAVOY, J. W. Induction of the Eye Lens. **Differentiation**, v. 17, n. 1–3, p. 137–149, 1980.
- MCCULLY, K. S. Chemical pathology of homocysteine. IV. Excitotoxicity, oxidative stress, endothelial dysfunction, and inflammation. **Annals of clinical and laboratory science**, v. 39, n. 3, p. 219–32, 2009.
- MCILWAIN, D. R.; BERGER, T.; MAK, T. W. Caspase functions in cell death and disease. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 4, p. a008656, 2013.
- MEY, J.; THANOS, S. Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis. **Brain research. Brain research reviews**, v. 32, n. 2–3, p. 343–379, 2000.
- MILLER, R. R. et al. Homocysteine-induced changes in brain membrane composition correlate with increased brain caspase-3 activities and reduced chick embryo viability, v. 136, p. 521–532, 2003.
- MIZUSHIMA, N. Methods for monitoring autophagy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 12, p. 2491–2502, 2004.
- MIZUSHIMA, N. Autophagy: process and function. **Genes & development**, v. 21, n. 22, p. 2861–73, 2007.
- MONTAGUE, P. R.; FRIEDLANDER, M. J. Expression of an intrinsic growth strategy by mammalian retinal neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 18, p. 7223–7, 1989.
- MOORE, P. et al. Apoptotic Cell Death in the Mouse Retinal Ganglion Cell Layer is Induced in vivo by the Excitatory Amino Acid Homocysteine. **Experimental Eye Research**, v. 73, n. 1, p. 45–57, 2001.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- MULLEN, R. J.; BUCK, C. R.; SMITH, A. M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. **Development (Cambridge, England)**, v. 116, n. 1, p. 201–11, 1992.

- NAGAI, Y. et al. Homocysteine Inhibits Angiogenesis in Vitro and in Vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 281, n. 3, p. 726–731, 2001.
- NAGATA, T. et al. Association between DNA Methylation of the BDNF Promoter Region and Clinical Presentation in Alzheimer's Disease. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Extra**, v. 5, n. 1, p. 64–73, 2015.
- NAGY, J. A. et al. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 11, n. 2, p. 109–119, 2008.
- OGINO, H.; YASUDA, K. Sequential activation of transcription factors in lens induction. **Development Growth and Differentiation**, v. 42, n. 5, p. 437–448, 2000.
- OHNUMA, S.; HARRIS, W. A. Neurogenesis and the Cell Cycle. **Neuron**, v. 40, n. 2, p. 199–208, 2003.
- OIKAWA, S.; MURAKAMI, K.; KAWANISHI, S. Oxidative damage to cellular and isolated DNA by homocysteine: implications for carcinogenesis. **Oncogene**, v. 22, n. 23, p. 3530–8, 2003.
- OLIVER, G. et al. Six3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development. **Development (Cambridge, England)**, v. 121, n. 12, p. 4045–55, 1995.
- OLNEY, R. S.; MULINARE, J. Trends in neural tube defect prevalence, folic acid fortification, and vitamin supplement use. **Seminars in perinatology**, v. 26, n. 4, p. 277–285, 2002.
- OOSTERBAAN, A. M.; STEEGERS, E. A. P.; URSEM, N. T. C. The effects of homocysteine and folic acid on angiogenesis and VEGF expression during chicken vascular development. **Microvascular Research**, v. 83, n. 2, p. 98–104, 2012.
- OPPENHEIM, R. W. Cell death during development of the nervous system. **Annual review of neuroscience**, v. 14, p. 453–501, 1991.
- OPPENHEIM R.W. Neuronal cell death and some related regressive phenomena during neurogenesis. A selective historical review and progress report Studies. **In developmental neurobiology : essays in honor of Viktor Hamburger**. New York: Oxford Univ. Press, 1981.
- OPPENHEIM, R. W. Naturally occurring cell death during neural development. **Trends in Neurosciences**, v. 8, p. 487–493, 1985.
- OSTRAKHOVITCH, E. A.; TABIBZADEH, S. Homocysteine and age-associated disorders. **Ageing Research Reviews**, v. 49, p. 144–164, 2019.
- PACANA, T. et al. Dysregulated Hepatic Methionine Metabolism Drives Homocysteine Elevation in Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0136822, 2015.
- PAROLI, M. P. et al. Increased Vascular Endothelial Growth Factor Levels in Aqueous Humor and Serum of Patients with Quiescent Uveitis. **European Journal of Ophthalmology**, v. 17, n. 6, p. 938–942, 2007.

- PATTEN, B. M. **Early Embryology of the Chick**. 5th. ed. New York: McGraw-Hill, 1971.
- PE'ER, J. et al. Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal cells is a common factor in neovascularizing ocular diseases. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 72, n. 6, p. 638–45, 1995.
- PETTMANN, B.; HENDERSON, C. E. Neuronal cell death. **Neuron**, v. 20, p.633-647, 1998.
- PIATIGORSKY, J. Lens differentiation in vertebrates. A review of cellular and molecular features. **Differentiation; research in biological diversity**, v. 19, n. 3, p. 134–53, 1981.
- PODDAR, R.; PAUL, S. Homocysteine-NMDA receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase leads to neuronal cell death. **Journal of neurochemistry**, v. 110, n. 3, p. 1095–106, 2009.
- PODDAR, R.; PAUL, S. Novel crosstalk between ERK MAPK and p38 MAPK leads to homocysteine-NMDA receptor-mediated neuronal cell death. **Journal of Neurochemistry**, v. 124, n. 4, p. 558–570, 2013.
- POLITI, L. E.; ROTSTEIN, N. P.; CARRI, N. G. Effect of GDNF on neuroblast proliferation and photoreceptor survival: additive protection with docosahexaenoic acid. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 42, n. 12, p. 3008–15, 2001.
- POLOSCHEK, C. M. et al. Disturbed visual system function in methionine synthase deficiency. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 243, n. 5, p. 497–500, 2005.
- PORTER, A. G.; JA, R. U.; NICKE, È. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. Cell death and differentiation, v.2, p. 99-104, 1999.
- PRADA, C. et al. Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina. **European Journal of Neuroscience**, v. 3, n. 6, p. 559–569, 1991.
- PURVES, D. **Body and brain : a trophic theory of neural connections**: Harvard University Press, 1988.
- PUSHPAKUMAR, S.; KUNDU, S.; SEN, U. Endothelial dysfunction: the link between homocysteine and hydrogen sulfide. **Current medicinal chemistry**, v. 21, n. 32, p. 3662–72, 2014.
- RAGER, G.; RAGER, U. Systems-matching by degeneration. I. A quantitative electron microscopic study of the generation and degeneration of retinal ganglion cells in the chicken. **Experimental brain research**, v. 33, n. 1, p. 65–78, 1978.
- RATAN, S. K. et al. Evaluation of the levels of folate, vitamin B12, homocysteine and fluoride in the parents and the affected neonates with neural tube defect and their matched controls. **Pediatric Surgery International**, v. 24, n. 7, p. 803–808, 2008.
- RATHNASAMY, G. et al. Retinal microglia – A key player in healthy and diseased retina. **Progress in Neurobiology**, v. 173, p. 18–40, 2019.
- RICH, J. T. et al. A practical guide to understanding Kaplan-Meier curves. **Otolaryngology--**

- head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 143, n. 3, p. 331–6, 2010.
- RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, v. 386, n. 6626, p. 671–674, 1997.
- RISAU, W.; FLAMME, I. Vasculogenesis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 11, n. 1, p. 73–91, 1995.
- RISAU, W.; WOLBURG, H. Development of the blood-brain barrier. **Trends in Neurosciences**, v. 13, n. 5, p. 174–178, 1990.
- RONCALI, L. et al. Microscopical and ultrastructural investigations on the development of the blood-brain barrier in the chick embryo optic tectum. **Acta neuropathologica**, v. 70, n. 3–4, p. 193–201, 1986.
- ROSENQUIST, T. H.; RATASHAK, S. A.; SELHUB, J. Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: Effect of folic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 26, p. 15227–15232, 1996.
- ROSENQUIST, T. H.; SCHNEIDER, A. M.; MONAGHAN, D. T. N-methyl-D-aspartate receptor agonists modulate homocysteine-induced developmental abnormalities. **The FASEB Journal**, v. 13, n. 12, p. 1523–1531, 1999.
- ROTHERMEL, A.; LAYER, Paul G. GDNF regulates chicken rod photoreceptor development and survival in reaggregated histotypic retinal spheres. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, [s. l.], v. 44, n. 5, p. 2221–2228, 2003.
- ROWLAND, A. A.; VOELTZ, G. K. Endoplasmic reticulum–mitochondria contacts: function of the junction. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 10, p. 607–615, 2012.
- SACHDEV, P. S. Homocysteine and brain atrophy. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 29, n. 7, p. 1152–1161, 2005.
- SAKAMOTO, M. K. et al. Sequential morphological changes of erythrocyte apoptosis in *Xenopus* larvae exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). **The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology**, v. 279, n. 1, p. 652–63, 2004.
- SANFTNER, L. H. M. et al. Glial Cell Line Derived Neurotrophic Factor Delays Photoreceptor Degeneration in a Transgenic Rat Model of Retinitis Pigmentosa. **Molecular Therapy**, v. 4, n. 6, p. 622–629, 2001.
- SANTOS, L. M. P. et al. Prevention of neural tube defects by the fortification of flour with folic acid: a population-based retrospective study in Brazil. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 1, p. 22, 2016.
- SAW, S. et al. Genetic, dietary, and other lifestyle determinants of plasma homocysteine concentrations in middle-aged and older Chinese men and women in Singapore. **Am J Clin Nutr**, v. 73, n. 2, p. 232–239, 2001.
- SCHNEEBERGER, M. et al. Mitofusin 2 in POMC Neurons Connects ER Stress with Leptin Resistance and Energy Imbalance. **Cell**, v. 155, n. 1, p. 172–187, 2013.

- SCHOENWOLF, G. C.; SMITH, J. L. Mechanisms of neurulation: traditional viewpoint and recent advances. **Development (Cambridge, England)**, v. 109, n. 2, p. 243–70, 1990.
- SCHOENWOLF, G. C. The Avian Embryo: A Model for Descriptive and Experimental Embryology. **Cell Lineage and Fate Determination**, p. 429–436, 1999.
- SCHOOK, P. Morphogenetic movements during the early development of the chick eye. A light microscopic and spatial reconstructive study. **Acta morphologica Neerlando-Scandinavica**, v. 18, n. 1, p. 1–30, 1980.
- SCHROEDL, F. et al. Comparative anatomy of nitrenergic intrinsic choroidal neurons (ICN) in various avian species. **Experimental Eye Research**, v. 78, n. 2, p. 187–196, 2004.
- SCHWANINGER, M. et al. Elevated plasma concentrations of homocysteine in antiepileptic drug treatment. **Epilepsia**, v. 40, n. 3, p. 345–50, 1999.
- SCHWARTZ, D.; U, V. R. p53-dependent cell cycle control : response to genotoxic stress, v. 8, 1998.
- SEAMAN, A. R. Ultrafine architecture of the avian pecten oculi. **Albrecht von Graefes Archiv for Klinische und Experimentelle Ophthalmologie**, v. 170, n. 1, p. 1–15, 1966. b.
- SELHUB, J. Homocysteine metabolism. **Annual review of nutrition**, v. 19, p. 217–246, 1999.
- SELHUB, J. Public health significance of elevated homocysteine. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 29, n. 2, p. 116–125, 2008.
- SEO, J. H. et al. Spatiotemporal Gradient of Astrocyte Development in the Chick Optic Tectum: Evidence for Multiple Origins and Migratory Paths of Astrocytes. **Neurochemical Research**, v. 33, n. 7, p. 1346–1355, 2008.
- SERLIN, Y. et al. Anatomy and physiology of the blood–brain barrier. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 38, p. 2–6, 2015.
- SERNAGOR, E. et al. (EDS.). **Retinal Development**. Cambridge: Cambridge University Press, 2006.
- SHARMA, P. et al. Mining literature for a comprehensive pathway analysis: a case study for retrieval of homocysteine related genes for genetic and epigenetic studies. **Lipids in health and disease**, v. 5, p. 1, 2006.
- SHARMA, R. K.; NETLAND, P. A. Early born lineage of retinal neurons express class III β -tubulin isotype. **Brain Research**, v. 1176, p. 11–17, 2007.
- SHAW, G. M. et al. Maternal periconceptional use of multivitamins and reduced risk for conotruncal heart defects and limb deficiencies among offspring. **American Journal of Medical Genetics**, v. 59, n. 4, p. 536–545, 1995.
- SHI, Q. et al. L-Homocysteine Sulfinic Acid and Other Acidic Homocysteine Derivatives Are Potent and Selective Metabotropic Glutamate Receptor Agonists. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 305, n. 1, p. 131–142, 2003.

- SIMEONE, A. et al. A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. **The EMBO journal**, v. 12, n. 7, p. 2735–47, 1993.
- ŠKOVIEROVÁ, H. et al. The Molecular and Cellular Effect of Homocysteine Metabolism Imbalance on Human Health. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 10, 2016.
- SMIRNOVA, E. et al. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. **Molecular biology of the cell**, v. 12, n. 8, p. 2245–56, 2001.
- SMITH, J. L.; SCHOENWOLF, Gary C. Neurulation: Coming to closure. **Trends in Neurosciences**, v. 20, n. 11, p. 510–517, 1997.
- SMITHELLS, R. W. et al. Apparent prevention of neural tube defects by periconceptual vitamin supplementation. **Archives of disease in childhood**, v. 56, n. 12, p. 911–918, 1981.
- SMITHELLS, R. W.; SHEPPARD, S.; SCHORAH, C. J. Vitamin deficiencies and neural tube defects. **Archives of Disease in Childhood**, v. 51, n. 12, p. 944–950, 1976.
- SOWBHAGYA, H. N. et al. Ocular Manifestations of Hyperhomocysteinemia and their Response to Therapeutic Modalities. **International Journal of Scientific Study**, v. 3, n. 3, 2015.
- SPILSBURY, K. et al. Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in the Retinal Pigment Epithelium Leads to the Development of Choroidal Neovascularization. **The American Journal of Pathology**, v. 157, n. 1, p. 135–144, 2000.
- SRIVASTAV, K. et al. Increased serum level of homocysteine correlates with retinal nerve fiber layer thinning in diabetic retinopathy. **Molecular vision**, v. 22, p. 1352–1360, 2016.
- STANGER, O. et al. Impairment of homocysteine metabolism in patients with retinal vascular occlusion and non-arteritic ischemic optic neuropathy. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 43, n. 10, 2005.
- STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. et al. Neural tube defects and elevated homocysteine levels in amniotic fluid. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 172, n. 5, p. 1436–1441, 1995.
- STÜHLINGER, M. C. et al. Homocysteine Impairs the Nitric Oxide Synthase Pathway. **Circulation**, v. 104, n. 21, p. 2569–2575, 2001.
- SUEN, D. F.; NORRIS, K. L.; YOULE, R. J. Mitochondrial dynamics and apoptosis. **Genes & Development**, v. 22, n. 12, p. 1577–1590, 2008.
- SUZANNE, M.; STELLER, H. Shaping organisms with apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, v. 20, n. 5, p. 669–675, 2013.
- SZYMAŃSKI, J. et al. Interaction of Mitochondria with the Endoplasmic Reticulum and Plasma Membrane in Calcium Homeostasis, Lipid Trafficking and Mitochondrial Structure. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1576, 2017.
- TANG, S.; LE-RUPPERT, K. C.; GABEL, V. P. Expression of intercellular adhesion molecule-

- 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) on proliferating vascular endothelial cells in diabetic epiretinal membranes. **British Journal of Ophthalmology**, v. 78, n. 5, p. 370–376, 1994.
- TAWFIK, A. et al. Alterations of Retinal Vasculature in Cystathionine-Beta-Synthase Mutant Mice, a Model of Hyperhomocysteinemia. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 54, n. 2, p. 939, 2013.
- TAWFIK, A. et al. Alterations of retinal vasculature in cystathionine- β -synthase heterozygous mice: a model of mild to moderate hyperhomocysteinemia. **The American journal of pathology**, v. 184, n. 9, p. 2573–85, 2014.
- TERPOS, E. et al. Increased circulating VCAM-1 correlates with advanced disease and poor survival in patients with multiple myeloma: reduction by post-bortezomib and lenalidomide treatment. **Blood Cancer Journal**, v. 6, n. 5, p. e428–e428, 2016.
- TROEN, A M. The central nervous system in animal models of hyperhomocysteinemia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 29, n. 7, p. 1140–1151, 2005.
- TURNER, D. L.; CEPKO, C. L. A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. **Nature**, v. 328, n. 6126, p. 131–136, 1987.
- TURNER, D. L.; SNYDER, E. Y.; CEPKO, Constance L. Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. **Neuron**, v. 4, n. 6, p. 833–845, 1990.
- TWIG, G. et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. **The EMBO Journal**, v. 27, n. 2, p. 433–446, 2008.
- TWIG, G.; HYDE, B.; SHIRIHAI, O. S. Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: The bioenergetic view. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1777, n. 9, p. 1092–1097, 2008.
- TYAGI, N. et al. Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n. 6, p. 2649–2656, 2005.
- UDDIN, MD I. et al. Targeted Imaging of VCAM-1 mRNA in a Mouse Model of Laser-Induced Choroidal Neovascularization Using Antisense Hairpin-DNA-Functionalized Gold-Nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 15, n. 12, p. 5514–5520, 2018.
- VACEK, J. C. et al. Tetrahydrocurcumin ameliorates homocysteine-mediated mitochondrial remodeling in brain endothelial cells. **Journal of cellular physiology**, v.4, p.3080-3092, 2018.
- VAN AERTS, L. A. et al. Stereospecific in vitro embryotoxicity of l-homocysteine in pre- and post-implantation rodent embryos. **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, v. 7, n. 6, p. 743–9, 1993.
- VAN DER PUT, N. M. J.; BLOM, Henk J. Neural tube defects and a disturbed folate dependent homocysteine metabolism. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 92, n. 1, p. 57–61, 2000.

- VAN MIL, N. H.; OOSTERBAAN, A. M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. M. Teratogenicity and underlying mechanisms of homocysteine in animal models: A review. **Reproductive Toxicology**, v. 30, n. 4, p. 520–531, 2010.
- VEMPATI, P.; POPEL, A. S.; MAC GABHANN, F.. Extracellular regulation of VEGF: isoforms, proteolysis, and vascular patterning. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 25, n. 1, p. 1–19, 2014.
- VERKLEIJ-HAGOORT, A. et al. Hyperhomocysteinemia and MTHFR polymorphisms in association with orofacial clefts and congenital heart defects: A meta-analysis. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 143A, n. 9, p. 952–960, 2007.
- VOLPERT, K. N.; ROTHERMEL, A.; LAYER, P. G. GDNF stimulates rod photoreceptors and dopaminergic amacrine cells in chicken retinal reaggregates. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 48, n. 11, p. 5306–5314, 2007.
- WAI, T.; LANGER, T. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 27, n. 2, p. 105–117, 2016.
- WAKAI, S.; HIROKAWA, N. Development of the blood-brain barrier to horseradish peroxidase in the chick embryo. **Cell and tissue research**, v. 195, n. 2, p. 195–203, 1978.
- WALTHER, C.; GRUSS, P. Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. **Development (Cambridge, England)**, v. 113, n. 4, p. 1435–49, 1991.
- WANG, D. et al. Homocysteine inhibits neural stem cells survival by inducing DNA interstrand cross-links via oxidative stress. **Neuroscience Letters**, v. 635, p. 24–32, 2016.
- WANG, J. et al. Homocysteine Induces Apoptosis of Rat Hippocampal Neurons by Inhibiting 14-3-3 ϵ Expression and Activating Calcineurin. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.
- WANG, LAIFANG et al. Role and mechanism of vascular cell adhesion molecule-1 in the development of rheumatoid arthritis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 10, n. 3, p. 1229–1233, 2015.
- WANG, X. et al. Reversal of homocysteine-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons by astaxanthin: evidences for mitochondrial dysfunction and signaling crosstalk. **Cell Death Discovery**, v. 4, n. 1, p. 50, 2018.
- WÄSSLE, H.; RIEMANN, H. J. The mosaic of nerve cells in the mammalian retina. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences**, v. 200, n. 1141, p. 441–461, 1978.
- WÄSSLE, H. Parallel processing in the mammalian retina. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 10, p. 747–757, 2004.
- WEI-FENG, L. I. U. et al. DNA Damage Checkpoint , Damage Repair , and Genome Stability, v. 33, n. May, p. 381–390, 2006.
- WESTERMANN, B. Merging mitochondria matters: cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion. **EMBO reports**, v. 3, n. 6, p. 527–31, 2002.

- WOLBURG, H. et al. The Pecten Oculi of the Chicken: A Model System for Vascular Differentiation and Barrier Maturation. **International Review of Cytology**, v. 187, p. 111–159, 1999.
- WOLFF, E. et al. **Wolff's anatomy of the eye and orbit**. 8th ed. ed. London : Chapman & Hall medical, 1997.
- XU, L. et al. Crosstalk of homocysteinylation, methylation and acetylation on histone H3. **The Analyst**, v. 140, n. 9, p. 3057–63, 2015.
- YOON, Y. et al. Mitochondrial dynamics in diabetes. **Antioxidants & redox signaling**, v. 14, n. 3, p. 439–57, 2011.
- YOULE, R. J.; VAN DER BLIEK, Alexander M. Mitochondrial fission, fusion, and stress. **Science (New York, N.Y.)**, v. 337, n. 6098, p. 1062–5, 2012.
- YOUNG, R. W. Cell differentiation in the retina of the mouse. **The Anatomical Record**, v. 212, n. 2, p. 199–205, 1985.
- YOUNG, R. W. Cell proliferation during postnatal development of the retina in the mouse. **Developmental Brain Research**, v. 21, n. 2, p. 229–239, 1985.
- YOUNG, S. N. Folate and depression--a neglected problem. **Journal of psychiatry & neuroscience : JPN**, v. 32, n. 2, p. 80–2, 2007.
- ZEMPLÉNI, Janos. et al. **Handbook of vitamins**: Taylor & Francis, 2007.
- ZHANG, H. Y. et al. Neural tube defects and disturbed maternal folate- and homocysteine-mediated one-carbon metabolism. **Experimental Neurology**, v. 212, n. 2, p. 515–521, 2008.
- ZHANG, J. et al. Hyperhomocysteinemia-induced autophagy and apoptosis with downregulation of hairy enhancer of split 1/5 in cortical neurons in mice. **International journal of immunopathology and pharmacology**, v. 30, n. 4, p. 371–382, 2017a.
- ZHANG, S. et al. Association between serum homocysteine and arterial stiffness in elderly: a community-based study. **Journal of geriatric cardiology : JGC**, v. 11, n. 1, p. 32–8, 2014b.
- ZIEMIŃSKA, E.; STAFIEJ, A.; ŁAZAREWICZ, J. W. Role of group I metabotropic glutamate receptors and NMDA receptors in homocysteine-evoked acute neurodegeneration of cultured cerebellar granule neurones. **Neurochemistry International**, v. 43, n. 4–5, p. 481–492, 2003.
- ZILFOU, J. T.; LOWE, S. W. Tumor suppressive functions of p53. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 1, n. 5, p. a001883, 2009.