

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CCB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS - PGN

**AÇÃO DA HOMOCISTEÍNA E DO ÁCIDO FÓLICO SOBRE O
PADRÃO MORFOLÓGICO E ESTRUTURA ORGANIZACIONAL DO
TELENCÉFALO E MEDULA ESPINHAL DE EMBRIÕES DE *GALLUS*
*DOMESTICUS***

KAROLINE KOBUS

FLORIANÓPOLIS / Fevereiro / 2007

**AÇÃO DA HOMOCISTEÍNA E DO ÁCIDO FÓLICO SOBRE O
PADRÃO MORFOLÓGICO E ESTRUTURA ORGANIZACIONAL DO
TELENCÉFALO E MEDULA ESPINHAL DE EMBRIÕES DE *GALLUS*
*DOMESTICUS***

Dissertação de mestrado apresentada à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Neurociências – PGN, do Centro de Ciências Biológicas – CCB, da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Neurociências.

FLORIANÓPOLIS / Fevereiro / 2007

**AÇÃO DA HOMOCISTEÍNA E DO ÁCIDO FÓLICO SOBRE O
PADRÃO MORFOLÓGICO E ESTRUTURA ORGANIZACIONAL DO
TELENCÉFALO E MEDULA ESPINHAL DE EMBRIÕES DE *GALLUS*
*DOMESTICUS***

ELABORADA POR
Karoline Kobus

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dra. Yara Maria Rauh Müller (UFSC)
Orientadora / Presidente

Prof. Dra. Andréa Gonçalves Trentin (UFSC)
Membro

Prof. Dra. Eliane Maria Goldfeder (UFSC)
Membro

Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal (UFSC)
Suplente

FLORIANÓPOLIS / Fevereiro / 2007

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pela graça da fé, pelo eterno amor e por fazer de mim uma pessoa melhor a cada dia.

Aos meus pais, pelo exemplo de amor, respeito e trabalho, e pelo apoio incondicional em todos os instantes. Aos meus irmãos, Junior e Fabio, pelo companheirismo e amizade, e por tornar minha vida mais alegre. Agradeço sempre por existirem...E a toda minha família, que sempre se fez presente, nas vitórias ou derrotas.

Às amigas que foram capazes de sobreviver aos anos, encontros e desencontros e continuam por perto, compartilhando comigo momentos inesquecíveis: Mel, Nanda, Miri, Nadi, Pri, Marina, Amanda, Jackson e Kátia. Às amigas de pessoas especiais, que apesar da distância, guardo no coração: Jacque, Toni, Sil e Ricardo. E também às novas amigas e à alegria de nossos encontros: Cris, Nay, Sury, Marcel, Lúcio, Pena, Murilo e Totó.

À professora Yara, pela dedicação, exemplo e amizade durante todo o período de mestrado, em que muito acrescentei a minha formação não só acadêmica, mas também pessoal. Aos muitos amigos do LAB: Eve e Dib, pela companhia, amizade e disponibilidade sempre...Lizia e Márcia, companheiras de estudo e também amigas que jamais esquecerei...E os pequenos: Helo, Fran e Kauê, que sempre estiveram por perto dando uma mãozinha e também alegrando as tardes no laboratório.

Às amigas que conquistei durante o mestrado: Liliana, Patrícia, Mah, Manu e Dani, pessoas muito especiais com as quais dividi momentos alegres durante esta fase da minha vida...

E finalmente, aos mestres, coordenadores e servidores, que fazem a PGN existir.

Muito Obrigada!

RESUMO

O objetivo do estudo foi verificar a ação da homocisteína (HC) e do ácido fólico (AF), isoladamente e em conjunto, no desenvolvimento embrionário, com ênfase no padrão morfológico, neurulação e estrutura organizacional do telencéfalo (TEL) e medula espinhal embrionária (ME); para tanto, utilizamos o modelo de *Gallus domesticus*. Foram constituídos 5 grupos experimentais: 2 controles – Controle Fechado (GC1) e Controle Salina (GC2) – e 3 tratados – HC (G3), HC e AF (G4) e AF (G5), cada um com N=10. Ovos fertilizados foram numerados, pesados e incubados em estufa apropriada (38°C e 65% de umidade). Após 32 horas (8-9HH), foram retirados da estufa e efetuou-se uma abertura na face superior mediana do ovo (1,5cm de diâmetro). Esta permitiu a visualização do embrião e o tratamento: 25µl de salina (GC2), 10µmol de D,L-HC/25µl de salina (G3), 0,5µg de AF+10µmol de D,L-HC/25µl de salina (G4) e 0,5µg de AF/25µl de salina (G5). Concluída a manipulação, a abertura era fechada com filme PVC atóxico e o ovo recolocado na estufa. O GC1 não foi submetido aos procedimentos de abertura e tratamento. Após 96 horas (23-25HH), os embriões foram dessensibilizados à 4°C e posteriormente analisados ao estereomicroscópio, para detecção de alterações do padrão morfológico, determinação do estágio de desenvolvimento (HH) e mensuração cefálica e corporal (14, 20 e 30X). Em seguida, foram fixados em formol 10% (24h) e conservados em etanol 70%, tendo a massa corporal aferida após 5 dias. A região cefálica e truncal dos embriões foi preparada para microscopia, e os cortes (8µm) foram submetidos às técnicas de hematoxilina-eosina (HE), para descrição geral e posterior morfometria das camadas celulares do TEL e ME, e quantificação celular da notocorda e mesoderma apical à ME; técnica de Hoescht (33258), para evidenciar células em apoptose; e técnicas imuno-histoquímicas, para localizar dos filamentos intermediários vimentina e GFAP. A partir da análise estereomicroscópica, foi possível identificar que a porcentagem de embriões que apresentaram padrão morfológico normal foi de 100% em GC1 e GC2, e de 70% em G5. Já em G3 e G4 a porcentagem foi de 20 e 30%, respectivamente, e a diferença significativa entre estes dois e os demais grupos. Através da análise morfométrica realizada nos embriões, observamos que os grupos GC1 e GC2, geralmente, apresentaram valores médios superiores aos demais grupos tratados, com exceção de G5, que exibiu médias semelhantes a dos grupos controle. Em contrapartida, G3 exibiu quase sempre as menores médias, embora as diferenças não fossem significativas. Comportamento semelhante foi apresentado, quanto à morfometria das camadas celulares – ventricular e do manto –, tanto do TEL, quanto da ME. A espessura média destas camadas, foi, quase sempre, significativamente superior nos grupos controle em comparação aos grupos G3 e G4. Os cortes da região truncal exibiram abertura da região apical da ME – G4 – acompanhada de falha na fusão do mesoderma apical à ME – G3. Através das técnicas imuno-histoquímicas, foi possível identificar diferenças na intensidade e localização dos filamentos intermediários vimentina e GFAP, tanto no TEL quanto na ME e adjacências, entre os grupos controle (GC1 e GC2) e tratados (G3, G4 e G5). Com relação à apoptose, foi possível evidenciá-la, no TEL e ME, somente em G4. Portanto, o tratamento com HC (G3) foi o que mais interferiu, tanto no padrão morfológico, quanto na estrutura organizacional do TEL e ME. Já o tratamento com AF (G5) não interferiu, de forma significativa, nestes mesmos parâmetros. E o AF, administrado concomitantemente com a HC (G4), não foi capaz de anular os efeitos nocivos desta substância, provavelmente, em decorrência da imaturidade metabólica dos embriões.

Palavras-chave: homocisteína, ácido fólico, embriões de *Gallus domesticus*, padrão morfológico, telencéfalo, medula espinhal.

ABSTRACT

The objective of the study was to verify the action of homocysteine (HC) and folic acid (AF), separately and in set, in the embryonic development, with emphasis in morphologic pattern, neurulation and organization of telencephalon (TEL) and embryonic spinal cord (SP); for this, we used the model of *Gallus domesticus*. Five experimental groups had been constituted: 2 controls – Closed Control (CG1) and Saline Control (CG2) - and 3 treated - HC (G3), HC + FA (G4) and FA (G5), each one with N=10. Fertilized eggs had been numbered, weighed and incubated at 38°C and 65% humidity. After 32h in stove (8-9HH), a window was opened on the egg's surface (1.5 cm diameter), that allowed the visualization of embryo and the treatment: 25µl saline (CG2), 10µmol D, L-HC/25µl saline (G3), 0,5µg FA + 10µmol D, L-HC/25µl saline (G4) and 0,5µg AF/25µl saline (G5). After egg window was closed with film atoxic PVC and the eggs returned for the incubator. The CG1 was not submitted to the procedures of opening and treatment. After 96 hours (23-25HH) embryos were dessensibilized at 4°C, removed from egg and analyzed to stereomicroscope (20X), for detention of alterations of morphologic pattern, determination of development stage (HH) and morphometrical analysis (14, 20 and 30X). After the embryos were fixed in formaldehyde 10% (24h) and maintained in ethanol 70%. After the corporal mass was measured and embryos were prepared for microscopy. The serial sections (8µm) were submitted to techniques of Hematoxylin-eosin (HE), for general description, morphometrical analysis of the cellular layers of the TEL and SC, and cellular quantification of notochord and apical mesoderm; Hoescht (33258) to evidence cells in apoptose; and immunohistochemistry techniques to locate of intermediate filaments vimentin and GFAP. From the stereomicroscopical analysis it was possible to identify that the percentage of embryos that had showed normal morphologic pattern in GC1 and GC2 (100%) and in G5 (70%). Already in G3 and G4 the percentage was respectively of 20 and 30% with significant difference between these two and too much groups. In morphometrical analysis of the embryos we observe that CG1 and CG2 generally had showed superior average values when compared with too much groups, with exception of G5, that showed similar averages to control groups. On the other hand, G3 almost always showed the average inferiors even so the differences were not significant. Similar behavior was presented also in the morphometrical analysis of the cellular layers - ventricular and of the mantle -, as much of the TEL how much of SC. The average thickness of these layers was almost always significantly superior in the control groups when compared with groups G3 and G4. The slices of the trunk region had shown opening of the apical region of SC - G4 – and also failure in the fusion of the apical mesoderm - G3. Through immunohistochemistry techniques it was possible to identify differences in the intensity and localization of intermediate filaments vimentin and GFAP between the control groups (GC1 and GC2) and treated groups (G3, G4 and G5), as much in the TEL how much in SC and surroundings. Apoptosis had been evidenced only in the TEL and SC of G4. The treatment with HC (G3) interfered more, as much in morphologic pattern how much in organization of TEL and SC. Although treatment with FA (G5) did not interfere of significant form in these same parameters, when managed in set with HC (G4), it was not capable to annul the harmful effect of this substance, probably due to metabolic immaturity of embryos.

Key-words: homocysteine, folic acid, embryos of *Gallus domesticus*, morphologic pattern, telencephalon, spinal cord.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 A Origem do Sistema Nervoso.....	14
1.1.1 Organização e Diferenciação do Tubo Neural.....	16
1.2 Os Filamentos Intermediários Vimentina e GFAP.....	20
1.3 A Morte Celular e o Desenvolvimento do Sistema Nervoso.....	22
1.4 O Modelo Biológico Experimental.....	23
1.5 Defeitos do Tubo Neural – Conceito e Incidência.....	24
1.6 Ácido Fólico, Homocisteína e Malformações Congênitas.....	26
2 OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivo Geral.....	31
2.2 Objetivos Específicos.....	31
3 METODOLOGIA.....	32
3.1 O Modelo Biológico Experimental.....	32
3.2 Condições de Incubação.....	32
3.3 Procedimentos Realizados com os Ovos.....	33
3.4 Análise dos Embriões: Morfologia e Morfometria.....	35
3.5 Procedimentos e Análise Microscópica.....	37
3.6 Análise dos Resultados.....	39
3.6.1 Morfologia e Morfometria dos Embriões.....	39
3.6.2 Morfometria do Telencéfalo e Medula Espinhal.....	40
3.6.3 Quantificação das Células da Notocorda e Mesoderma.....	41
3.6.4 Tratamento Estatístico.....	41

4 RESULTADOS	42
4.1 Análise dos Embriões: Padrão Morfológico Externo e Morfometria.....	42
4.2 Estudo do Telencéfalo.....	48
4.2.1 Microscopia e Morfometria.....	48
4.2.2 Imuno-localização da Vimentina e GFAP.....	52
4.3 Estudo da Medula Espinhal, Notocorda e Mesoderma Adjacente.....	53
4.3.1 Microscopia, Morfometria e Quantificação Celular.....	53
4.3.2 Imuno-localização da Vimentina e GFAP.....	58
4.4 Detecção de Apoptose no Telencéfalo, Medula Espinhal e Mesoderma.....	59
5 DISCUSSÃO	62
6 CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
ANEXO.....	84

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** (A–D) Microscopia eletrônica de varredura mostrando o processo de neurulação primária em embrião de ave.....15
- FIGURA 2:** Representação esquemática das vesículas encefálicas primárias e secundárias.....18
- FIGURA 3:** (A) Esquema mostrando a organização do córtex encefálico durante o processo de desenvolvimento. (B) Esquema da medula espinhal de embrião de galinha em E4.....19
- FIGURA 4:** Embrião de *Gallus domesticus* com 96 horas de desenvolvimento.....25
- FIGURA 5:** Ciclo de re-metilação e trans-sulfuração da homocisteína.....28
- FIGURA 6:** Esquema didático de ovo de *Gallus domesticus* no momento da postura.....34
- FIGURA 7:** Estágio em que se encontra o embrião com 26-29 horas de desenvolvimento (estágio 8HH)35
- FIGURA 8:** Ilustração e denominação das medidas estabelecidas e determinadas nos embriões com auxílio de graticula milimetrada acoplada ao estereomicroscópio.....37
- FIGURA 9:** Visualização das mensurações das camadas celulares realizadas nos cortes histológicos do telencéfalo e da medula espinhal.....40

FIGURA 10: Cortes histológicos da medula espinhal mostrando delimitação da região onde foi realizada a contagem de células do mesoderma apical (A) e visualização da notocorda indicando as células quantificadas (B).....	41
FIGURA 11: (A–G) Fotos dos embriões dos diferentes grupos experimentais, mostrando o padrão morfológico.....	44
FIGURA 12: Média (\bar{x}) e desvio padrão (sd) das medidas da região cefálica dos embriões dos diferentes grupos experimentais.....	46
FIGURA 13: Média (\bar{x}) e desvio padrão (sd) das medidas corporais embriões dos diferentes grupos experimentais.....	47
FIGURA 14: (A–H) Cortes frontais do telencéfalo dos embriões dos diferentes grupos experimentais (HE).....	49
FIGURA 15: Média (\bar{x}) e desvio padrão (sd) das medidas da espessura das camadas ventricular e do manto e das razões camada do manto/camada ventricular, das regiões dorsal e lateral do telencéfalo, dos cortes histológicos dos embriões dos diferentes grupos experimentais.....	50
FIGURA 16: Medida da espessura da camada ventricular da região dorsal do telencéfalo.....	51
FIGURA 17: (A–C) Cortes frontais do telencéfalo de embriões de diferentes grupos experimentais submetidos à técnica de imunohistoquímica para vimentina.....	52

FIGURA 18: (A–F) Cortes histológicos frontais do telencéfalo de embriões de diferentes grupos experimentais submetidos à técnica de imuno-histoquímica com GFAP.....	54
FIGURA 19: (A–G) Cortes transversais da região trunca dos embriões dos diferentes grupos experimentais corados com HE.....	55
FIGURA 20: Média (\bar{x}) e desvio padrão (sd) das medidas da espessura das camadas ventricular e do manto e da razão camada do manto/camada ventricular da região basal da medula espinhal dos cortes histológicos dos embriões dos diferentes grupos experimentais.....	56
FIGURA 21: Medida da espessura da camada ventricular da região basal da medula espinhal.....	57
FIGURA 22: (A–B) Média (\bar{x}) e desvio padrão (sd) do número absoluto de células presentes no interior da notocorda dos embriões dos diferentes grupos experimentais. Média (\bar{x}) e desvio padrão (sd) do número absoluto de células presentes na região do mesoderma apical da medula espinhal dos embriões dos diferentes grupos experimentais.....	58
FIGURA 23: (A–D) Cortes transversais da região trunca de embriões de diferentes grupos experimentais submetidos à técnica de imuno-histoquímica para vimentina.....	58
FIGURA 24: (A–F) Cortes transversais da região trunca de embriões de diferentes grupos experimentais submetidos à técnica de imuno-histoquímica para GFAP.....	59

FIGURA 25: (A–D) Cortes frontais do telencéfalo dos embriões de diferentes grupos experimentais submetidos à técnica de Hoescht 33258.....60

FIGURA 26: (A–D) Cortes transversais da medula espinhal dos embriões de diferentes grupos experimentais submetidos à técnica de Hoescht 33258.....61

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1:** Padrão morfológico externo normal e alterado exibido pelos embriões dos diferentes grupos experimentais.....43
- TABELA 2:** Valores de média (\bar{x}) e desvio padrão (sd) da massa corporal (g) e do estágio de desenvolvimento (HH) dos embriões. Número de embriões com alteração (s) do padrão morfológico e frequência absoluta das alterações exibidas pelos embriões dos diferentes grupos experimentais.....45
- TABELA 3:** Quantificação da marcação imuno-histoquímica para GFAP no telencéfalo dos embriões dos diferentes grupos experimentais.....53
- TABELA 4:** Quantificação da marcação imuno-histoquímica para vimentina e GFAP na medula espinhal e estruturas próximas dos embriões dos diferentes grupos experimentais.....60

LISTA DE ABREVIATURAS

AF:	Ácido Fólico
AP:	Ântero-posterior
D,L-HC:	D,L-homocisteína
DTN:	Defeito do tubo neural (s)
GC1:	Grupo Controle Fechado
GC2:	Grupo Controle Salina
G3:	Grupo Homocisteína
G4:	Grupo Homocisteína e Ácido Fólico
G5:	Grupo Ácido Fólico
GFAP:	Proteína glial fibrilar ácida
HC:	Homocisteína
HE:	Hematoxilina-eosina
HH:	Hamburguer e Hamilton
L-HC:	L-homocisteína
ME:	Medula espinhal
shh:	sonic hedgehog
SN:	Sistema nervoso
SNC:	Sistema Nervoso Central
SNP:	Sistema Nervoso Periférico
TEL:	Telencéfalo
TN:	Tubo neural

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Origem do Sistema Nervoso

O desenvolvimento do sistema nervoso (SN) ocorre em seis etapas, a saber: a determinação da identidade neural do ectoderma; a proliferação celular controlada; a migração das células precursoras, resultando na formação das diferentes regiões do sistema nervoso; a diferenciação celular, com a aquisição da forma e das propriedades das células maduras; a formação dos circuitos neurais e a eliminação programada de células e circuitos extranumerários (Lent, 2002). A primeira estrutura do sistema nervoso presente nos vertebrados é a placa neural, uma área espessada do ectoderma dorsal localizada em frente à linha primitiva (Sadler, 1997; Wolpert *et al.*, 1998).

No processo de neurulação há o direcionamento da expressão gênica das células ectodérmicas para a síntese de proteínas específicas do tecido nervoso, resultando na gradativa transformação destas em células neurais. Moléculas de sinalização presentes no nó de Hensen, linha primitiva, notocorda e mesoderma adjacente, induzem a formação da placa neural, pois inibem os fatores de crescimento essenciais à formação da epiderme. Algumas dessas moléculas já foram identificadas, como a *folistatina*, *noguina* e *cordina* (Lent, 2002).

O processo de neurulação é constituído por duas fases: a primária, pela qual o encéfalo e grande parte da medula espinhal são constituídos e a secundária, em que a partir de uma estrutura denominada cordão medular é formada a porção caudal da medula espinhal (Catala, 2003). Em aves, as porções mais rostrais do tubo neural tem origem através da neurulação primária, e a porção caudal ao 27º par de somitos (na altura dos brotos dos membros posteriores) é originada a partir da neurulação secundária (Lawson *et al.*, 2001).

A neurulação primária é subdividida em quatro etapas bem definidas: estabelecimento da placa neural, formação do sulco e pregas neurais, dobramento da placa neural e fechamento da goteira neural através da fusão das pregas na linha média (Smith e Schoenwolf, 1997) (figura 1). Estas envolvem uma série de movimentos coordenados, tanto da placa neural quanto do ectoderma adjacente e,

embora sejam descritas separadamente, constituem um processo contínuo, essencial à formação adequada do sistema nervoso ao longo do eixo rostro-caudal do embrião (Lawson *et al.*, 2001).

A crista neural é uma estrutura embrionária formada durante a fusão das pregas neurais e é constituída por células localizadas na região de transição entre o ectoderma superficial e a placa neural. Estas células migram para fora do tubo neural e dão origem a tipos celulares variados, como os melanócitos da epiderme e a cartilagem da região cefálica, além de serem responsáveis pela formação dos neurônios e células da glia no sistema nervoso periférico (SNP) (Aybar e Mayor, 2002).

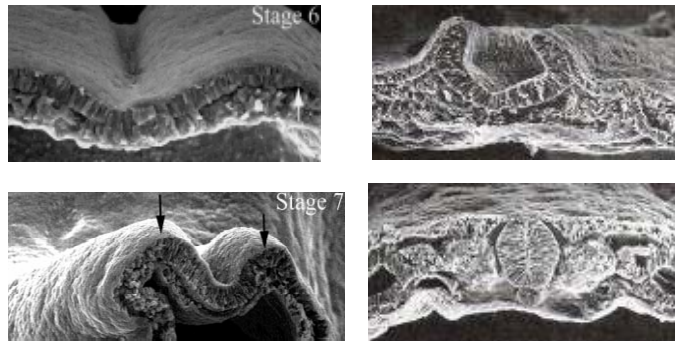


Figura 1: (A) Corte transversal de embrião de ave em estágio 6HH, mostrando a formação do sulco neural na região cefálica. (B) Corte transversal de embrião de ave em estágio 7HH, mostrando a formação das pregas neurais na mesma região. (C) Corte transversal de embrião de ave, mostrando a convergência das pregas neurais na linha média. (D) Corte transversal de embrião de ave mostrando o TN fechado e separado da ectoderme (A e B modificado de Lawson *et al.*, 2001; C e D modificado de Gilbert, 2000).

Em embriões humanos, a fusão das pregas neurais inicia na região do 4^o ao 6^o par de somitos (Moore e Persaud, 2004), em embriões de ave, o processo inicia na região do mesencéfalo, por volta do estágio 8HH (26 a 29 horas) e avança em direção cefálica e caudal, até que em ambas as extremidades, somente pequenas áreas permaneçam abertas, os neuróporos. No embrião de *Gallus domesticus*, o *neuróporo rostral* fecha-se entre 45 e 49 horas de desenvolvimento e o *caudal* em torno de 55 horas (Sanes, 1992).

O tubo neural (TN) está localizado na região dorsal do embrião, abaixo do ectoderma superficial, acima da notocorda e entre os pares de somitos (figura 1D). Sua separação definitiva do ectoderma superficial é mediada pela expressão de moléculas de adesão celular (CAM), como as caderinas. Embora as células do ectoderma que darão origem ao TN expressem inicialmente *E-caderina*, durante a

neurulação elas cessam a produção desta proteína e passam a sintetizar *N-caderina*, enquanto o ectoderma superficial prospectivo mantém a produção de *E-caderina*. O não reconhecimento destas estruturas entre si leva a separação definitiva entre a epiderme e o TN e alterações na expressão dessas moléculas podem interferir neste processo (Wolpert *et al.*, 1998).

Os mecanismos envolvidos na morfogênese do TN são complexos e ainda não foram totalmente elucidados. As razões para isso incluem o fato de que em diferentes níveis rostro-caudais, os movimentos morfogenéticos são diferenciados ao mesmo estágio de desenvolvimento (Schoenwolf e Smith, 1990). Entretanto, é atualmente aceito que a formação das pregas neurais é coordenada por uma combinação de forças intrínsecas e extrínsecas ao neuroepitélio (Smith e Schoenwolf, 1997). Enquanto as forças intrínsecas são geradas por comportamentos celulares, como mudanças na forma, posição e número, responsáveis pelo controle na formação do sulco e pregas neurais, forças extrínsecas, geradas pelo ectoderma, mesoderma e endoderma e sua associação com a matriz extracelular, também são capazes de interferir no dobramento da placa neural (Lawson *et al.*, 2001).

Existe também uma conexão direta entre citoesqueleto e diferenciação celular. Até o momento não há um modelo de diferenciação único, mas o modelo de diferenciação do tecido nervoso proposto por Björklund e Gordon (2006), que postula que a combinação de actina, microtúbulos e filamentos intermediários, vistos na região apical das células da placa neural, forma uma organela bi-estável – “*the cell state splitter*” –, responsável por propagar a onda de contração ou expansão no epitélio presumidamente neural, tem sido bastante aceita.

1.1.1 Organização e Diferenciação do Tubo Neural

O tubo neural é polarizado ao longo do eixo dorso-ventral, sendo sua especificação mediada por componentes externos a ele. Um agente ventralizante, a proteína *sonic hedgehog (shh)*, que tem origem na notocorda (Gilbert e Raunio, 1997) – estrutura embrionária característica de cordados e derivada de células que invaginam da região do nó de Hensen durante a gastrulação (Schoenwolf,

1999) – estabelece um gradiente ao longo do eixo rostro-caudal, de forma que diferentes níveis desta proteína geram diferentes tipos celulares (Wilson e Maden, 2005). Assim, o tubo neural apresenta dois eixos de diferenciação, o dorso-ventral e o rostro-caudal. Também duas regiões especializadas se formam no TN: a placa do teto, na parte mais dorsal do tubo, e a placa do assoalho, localizada ventralmente (Lent, 2002). A regionalização também ocorre como resultado de mudanças na forma do tubo. Na região cefálica, a parede é espessa e uma série de curvaturas e dobramentos definem as vesículas encefálicas, enquanto caudalmente, o TN constitui uma estrutura cilíndrica que originará a medula espinhal.

Devido à regionalização do TN, são formadas subdivisões rostro-caudais e cada uma delas dá origem a diferentes partes do SNC (Schoenwolf, 1999). Três dilatações constituem as vesículas encefálicas primárias: o prosencéfalo, o mesencéfalo e o rombencéfalo. Estas formam a flexura cervical, na junção do rombencéfalo com a medula espinhal, e a flexura cefálica, na região mesencefálica. O prosencéfalo divide-se posteriormente nas duas vesículas telencefálicas, que constituem os hemisférios cerebrais primitivos, e no diencéfalo, caracterizado pelo desenvolvimento das vesículas ópticas. O mesencéfalo não se divide, e sua cavidade é posteriormente denominada aqueduto cerebral. O rombencéfalo se divide em metencéfalo, que dá origem à ponte e ao cerebelo, e em mielencéfalo, que dá origem ao bulbo (Sadler, 1997) (figura 2).

O crescimento diferencial é um processo essencial à mudança na forma do tubo e formação das flexuras. Contudo, existem outros fatores determinantes, como a orientação dos fusos mitóticos, a mudança na forma das células, que pode envolver funções de microfilamentos e microtúbulos, e o rearranjo localizado das posições celulares (Goodrum e Jacobson, 1981).

Inicialmente, o tubo neural é constituído por células neuroepiteliais, que formam um epitélio pseudo-estratificado organizando a parede do tubo. Estas células se dividem rapidamente, constituindo a camada neuroepitelial ou neuroepitélio, que através do processo de neurogênese, dá origem às células presentes no SNC (Sadler, 1997).

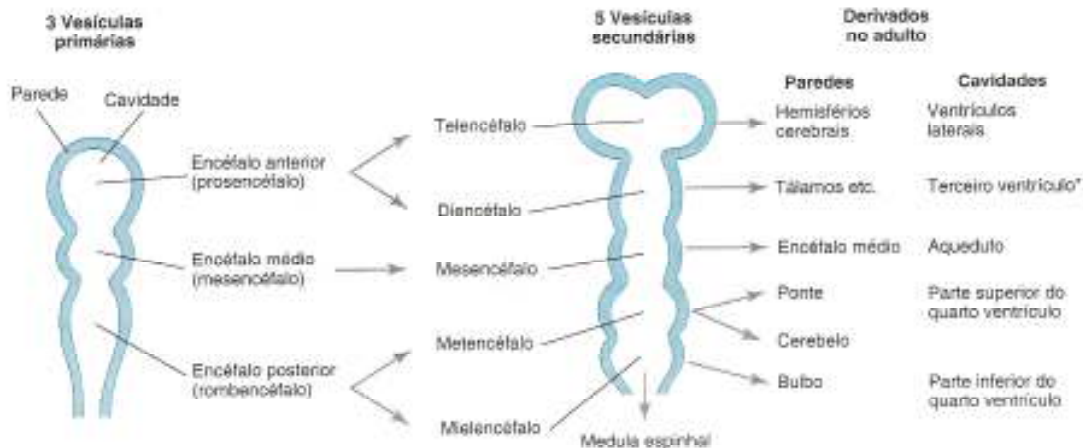


Figura 2: Representação esquemática das vesículas encefálicas primárias e secundárias (modificado de Moore e Persaud, 2004).

Nas vesículas telencefálicas, após cessarem as mitoses no neuroepitélio, muitas células migram e se diferenciam (Gilbert, 2000), e as que permanecem, constituem a camada ventricular. As células que se originam precocemente migram distâncias menores e as que surgem mais tarde migram até regiões mais superficiais – camada do manto. A diferenciação dessas células depende da posição que as mesmas passam a ocupar fora do neuroepitélio (Hatten, 1999).

Como as primeiras células migram para fora da camada ventricular, surge, entre esta e a camada do manto, constituída por células pós-mitóticas, a região denominada intermediária ou subventricular (Hatten, 1999). Após, se identifica uma segunda camada, a pré-placa cortical. Em seguida, surge uma nova camada de neurônios inserida entre a pré-placa e a camada do manto: a placa cortical, esta última se subdivide sucessivamente, constituindo o neocórtex e dando origem às camadas do córtex cerebral maduro (Götz *et al.*, 2002) (figura 3A).

Na medula espinhal, o processo inicial de organização de camadas é semelhante, com a presença das camadas ventricular e do manto. As células da camada do manto se diferenciam em neurônios e células da glia (Sadler, 1997), fazem conexões entre si e emitem seus prolongamentos, originando a camada marginal (Moore e Persaud, 2004) (figura 3B).

As interações célula-célula são fundamentais no processo de migração celular (Nadarajah e Parnavelas, 2002). Na camada ventricular do encéfalo e da

medula espinhal, as células pós-mitóticas migram ao longo das fibras da glia radial a fim de estabelecer as camadas corticais (Hatten, 1999). Este é o modelo clássico de migração neural, embora exista também a migração tangencial. Este tipo de migração caracteriza-se pelo movimento de neurônios paralelamente à superfície encefálica, e sua importância no desenvolvimento do córtex já foi demonstrada por traçadores retrovirais, em cortes e em culturas de regiões encefálicas. As células que seguem essa rota de migração, em mamíferos, geralmente originam interneurônios e oligodendrócitos (Wong *et al.*, 2002).

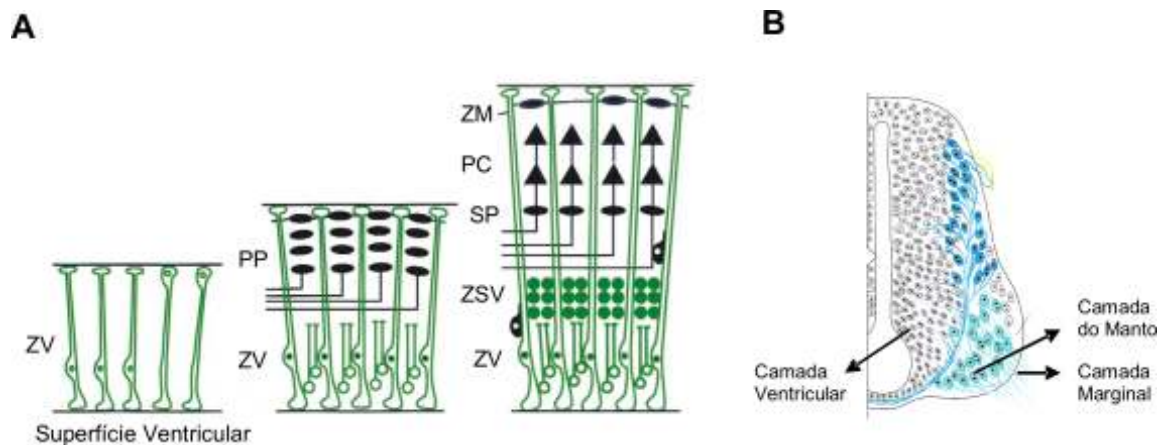


Figura 3: (A) Esquema mostrando a organização do córtex encefálico durante o processo de desenvolvimento. (ZV) zona ventricular; (PP) pré-placa cortical; (ZSV) zona subventricular; (SP) sub-placa cortical; (PC) placa cortical; (ZM) zona do manto (modificado de Götz *et al.*, 2002). (B) Esquema da medula espinhal de embrião de galinha em E4 (modificado de Wolpert *et al.*, 1998).

A glia radial constitui um tipo celular especializado que participa da diferenciação do SNC em vertebrados (Hatten, 1999; Götz *et al.*, 2002). As células da glia radial expandem seus processos radialmente ao longo de toda a parede das vesículas encefálicas e da medula espinhal (Bentivoglio e Mazzarello, 1999). Estas células pertencem à linhagem astrogliar, e enquanto persistem em grande parte dos vertebrados (peixes, anfíbios, répteis e aves), em mamíferos, originam os astrócitos na maioria das regiões do SNC adulto (Margotta e Morelli, 1997).

Estas células foram visualizadas inicialmente pelo método de Golgi, mas suas propriedades astrogliais só foram descritas por meio da imuno-histoquímica, que revelou a expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) nos processos

radiais das células presentes no córtex cerebral em desenvolvimento de primatas (Bentivoglio e Mazzarello, 1999).

1.2 Os Filamentos Intermediários – Vimentina e GFAP

A manutenção e a regulação dinâmica da forma das células, e a organização de compartimentos citoplasmáticos são funções de proteínas intracelulares constituintes do citoesqueleto (Pollard & Earnshaw, 2006). Este é composto por três classes de proteínas com propriedades físicas e funções distintas: filamentos intermediários (10-12 nm de diâmetro), microtúbulos (cerca de 25 nm de diâmetro) e os filamentos de actina (cerca de 7-9 nm de diâmetro) (Arias e Stewart, 2002).

Os filamentos intermediários são polímeros flexíveis, mas resistentes, que dão suporte mecânico às células, especialmente para evitar estiramento excessivo nos tecidos de organismos mais complexos. São compostos quimicamente estáveis, resistindo à solubilização por extremos de temperatura e também a altas concentrações de detergentes (Pollard e Earnshaw, 2006).

Há vários tipos de filamentos intermediários e cada um é especializado para exercer variadas funções em diferentes tipos celulares. Os primeiros relatos encontrados na literatura descreviam 5 tipos de filamentos intermediários nos vertebrados, distribuídos nos seguintes tecidos: citoqueratinas (tecido epitelial), vimentina (tecido mesenquimal), desmina (tecido muscular), proteína glial fibrilar ácida (astrócitos) e neurofilamentos (neurônios) (Machado e Figueiredo, 1996). Estudos recentes revelaram que os vertebrados dispõem de mais de 50 genes codificando 6 subclasses de proteínas de filamento intermediário, onde mais de uma classe pode ser encontrada na mesma célula e o mesmo filamento pode conter mais de um tipo de subunidade protéica. As similaridades de seqüência para cada classe são maiores entre as espécies do que entre diferentes classes. Isto é um indicativo de que as demandas funcionais de cada classe surgiram no início da evolução e conferiram forte pressão seletiva sobre os genes para cada proteína (Pollard e Earnshaw, 2006).

No tecido nervoso, as células expressam uma sucessão de isoformas de filamentos intermediários à medida que amadurecem e se diferenciam (Pollard e Earnshaw, 2006). A vimentina é considerada o maior componente do citoesqueleto em astrócitos imaturos e as fibras da glia radial imuno-reativas à vimentina contribuem para a migração dos neuroblastos na camada do manto encefálica e também estão envolvidas no desenvolvimento da medula espinhal em mamíferos (Oudega e Marani, 1991).

Em estágios iniciais do desenvolvimento do SNC de vertebrados, a glia radial e astrócitos imaturos expressam vimentina como filamento intermediário. Esta proteína, com peso molecular entre 50-54 kDa, é também característica de células mesenquimais, constituindo o maior componente das células com esta origem, como os fibroblastos e células endoteliais. Os anticorpos anti-vimentina apresentam reação cruzada com células de mamíferos, aves e anfíbios, indicando que esta proteína foi bem conservada durante a evolução. O alto grau de insolubilidade da vimentina sugere a sua função estrutural no citoplasma (Machado e Figueiredo, 1996). A expressão de vimentina cessa na maioria dos astrócitos e é substituída por GFAP nas células maduras em mamíferos (Galou *et al* 1996; Cole e Lee 1997).

Os filamentos de GFAP foram isolados primeiramente a partir de placas de esclerose múltipla (Machado e Figueiredo, 1996). Seu peso molecular está entre 47–53 kDa e ela parece ser restrita aos astrócitos no SNC de vertebrados, portanto, é bastante utilizada como marcador exclusivo destas células (Pixley e Vellis, 1984), estando presente em astrócitos normais e neoplásicos (Machado e Figueiredo, 1996).

A GFAP foi encontrada em muitos vertebrados, incluindo mamíferos, aves e peixes (Machado e Figueiredo, 1996). Além de fazer parte da constituição do citoesqueleto maduro em astrócitos, a GFAP também contribui com a migração dos neuroblastos, embora de maneira limitada e em período mais tardio do desenvolvimento. Os processos radiais positivos à GFAP estão envolvidos também no crescimento pós-natal das fibras nervosas (Oudega e Marani, 1991). Os filamentos de GFAP foram também identificados em células de Schwann,

células da pineal e em células da neuro-hipófise (Machado e Figueiredo, 1996). Além disso, a GFAP também pode ser expressa por células endimárias durante algumas fases do desenvolvimento (Roessmann, 1980) e também em processos inflamatórios (Machado e Figueiredo, 1996).

Em embriões de galinha doméstica, segundo estudo realizado por Tapscott *et al.* (1981), os astrócitos maduros não são revelados, através de imunohistoquímica para GFAP, até E12, enquanto as fibras da glia radial podem ser visualizadas através do método de Golgi já em E4 (estágios 23–25HH). A imunopositividade à GFAP é bastante expressiva, entre E11 e E19, na substância branca da medula espinhal. Entretanto, em estudo mais recente, Cole e Lee (1997) encontraram, nesta mesma espécie, já em E7, leve marcação para GFAP em astrócitos nas substâncias branca e cinzenta, e também nas células da camada endimária da medula espinhal.

1.3 A Morte Celular e o Desenvolvimento do Sistema Nervoso

O controle do número de células é um mecanismo morfogenético importante no desenvolvimento normal do SNC e responsável por determinar os diferentes níveis de citoarquitetura deste sistema, de modo que o crescimento e a maturação do SNC é resultado do equilíbrio entre dois processos fundamentais, a proliferação e a morte celular (Simonati *et al.*, 1997). Desta forma, a morte celular elimina o excesso de células e permite a formação de estruturas especializadas como núcleos, gânglios e camadas corticais (Anlar *et al.*, 2003).

O processo de morte celular no sistema nervoso em desenvolvimento tem sido bastante documentado em aves e mamíferos. Ele ocorre tanto nos neurônios quanto nas células gliais, em várias regiões do SNC e SNP e envolve todos os tipos celulares – motores, sensoriais, autonômicos, entéricos, receptores sensoriais e interneurônios, células de Schwann, astrócitos e oligodendrócitos (Buss *et al.*, 2006). Está presente tanto nos estágios mais iniciais, envolvendo progenitores ou células indiferenciadas, quanto durante a sinaptogênese, quando os neurônios se diferenciam e atingem seus alvos (Oppenheim, 1991).

A morte celular que ocorre durante o desenvolvimento é um tipo de morte celular programada por apoptose (Buss *et al.*, 2006). Esta é uma forma de morte celular que não é homeostática e nem acidental, mas sim uma morte celular ativa, geneticamente programada, regulada por genes pró e anti-apoptóticos, que se perturbados, podem resultar numa variedade de doenças e patologias (Yuan e Yankner, 2000; Kaufmann e Hengartner, 2001).

A apoptose é um processo rápido, que possui características morfológicas próprias, como a condensação da cromatina, fragmentação do DNA, núcleo picnótico e eventualmente, a formação de corpos apoptóticos que são fagocitados (Ferrer *et al.*, 1990), não ocorrendo reação celular do tecido adjacente, sendo, portanto, diferente do processo de morte celular por necrose.

Especula-se que a apoptose nas camadas germinativas tenha a função básica de regular o número de progenitores neurogliais (Kuan *et al.*, 2000). Entretanto, existem evidências de que ela regule também o destino e fenótipo dos neurônios em vertebrados (Yeo e Gautier, 2003). Além disso, ela pode ser necessária para excluir células com genoma instável, com aneuploidia por exemplo (Rehen *et al.*, 2001).

A apoptose é também importante ao desenvolvimento do sistema nervoso porque os neurônios são produzidos em excesso, e, então, competem por contatos celulares até o estabelecimento de seus alvos, levando ao ajuste de seu número, a fim de prover as conexões neurais efetivamente necessárias (Pettman e Henderson, 1998).

1.4 O Modelo Biológico Experimental

Embriões de ave são bastante utilizados como modelo experimental para estudo de desenvolvimento devido à similaridade entre estes e embriões de mamíferos, principalmente na sua complexidade morfológica inicial (Sanes, 1992; Wolpert *et al.*, 1998). Além disso, permitem a incubação artificial e o acompanhamento do desenvolvimento embrionário diário, porque, diferentemente dos mamíferos, os embriões de ave se desenvolvem fora do útero, o que provém um fácil acesso desde a postura até a eclosão. Outras vantagens da utilização de

aves como modelo experimental, em especial galinhas, é que os ovos podem ser obtidos facilmente em grande número e também toleram bem a manipulação experimental (Gilbert e Raunio, 1997). Por todas essas razões, embriões de galinha doméstica tem servido à embriologia e a biologia do desenvolvimento desde a época de Aristóteles, servindo como um modelo usual de estudo do desenvolvimento, tanto descritivo quanto experimental (Schoenwolf, 1999).

Uma série de eventos ocorre durante a embriogênese, antes da postura do ovo pela galinha. O ovo é envolto por membranas acelulares (vitelínicas) e após a fertilização, é coberto por albúmen e membranas calcificadas (casca). Ainda no oviduto, o zigoto sofre clivagem formando o blastoderma e é então estabelecido o eixo rostro-caudal. No momento da postura, o embrião de galinha encontra-se na gastrulação, tendo o hipoblasto já formado. Após a postura, para o desenvolvimento ter continuidade, é necessário incubar os ovos a temperatura de 38°C (Schoenwolf, 1999).

Os estudos de embriologia realizados com *Gallus domesticus* adotam o trabalho de Hamburguer e Hamilton (1951) como modelo descritivo que estabelece os estágios de desenvolvimento (HH) do embrião desde a fertilização até a eclosão. Baseado neste estudo, até o estágio 14HH (50-53 horas), o número de pares de somitos é utilizado para definir a idade do embrião, após este estágio, os critérios incluem o desenvolvimento das membranas extra-embriônicas, a presença de flexuras e áreas de rotação corporal, o tamanho e forma dos brotos dos membros e o desenvolvimento dos arcos faríngeos (Sanes, 1992).

Com 53 horas de incubação, as flexuras cefálica, cervical, dorsal e caudal já estão formadas, e, após 96 horas (23-25HH), o embrião apresenta as 5 vesículas encefálicas bem definidas, todos os pares de somitos já estão presentes, as vesículas ópticas apresentam pigmentação e os membros anteriores e posteriores exibem igual tamanho (Hamburguer e Hamilton, 1951) (figura 4).

1.5 Defeitos do Tubo Neural – Conceito e Incidência

Durante o desenvolvimento embrionário, os sistemas orgânicos estão sujeitos a ação de fatores exógenos e endógenos que podem interferir na

expressão do padrão estrutural e funcional do organismo. A interferência de fatores exógenos – agentes tóxicos ou mesmo deficiências nutricionais – pode levar ao surgimento de malformações congênitas (Moore e Persaud, 2004).

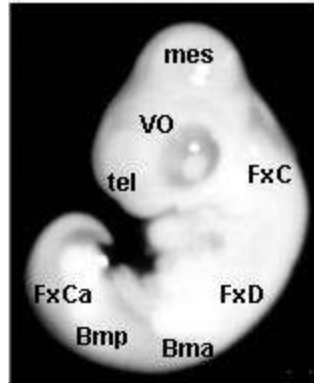


Figura 4: Embrião de *Gallus domesticus* com 96 horas de desenvolvimento (23-25HH). (*mes*) mesencéfalo; (*Bma*) broto do membro anterior; (*Bmp*) broto do membro posterior; (*FxC*) flexura cervical; (*FxCa*) flexura caudal; (*FxD*) flexura dorsal; (*tel*) telencéfalo; (*VO*) vesícula óptica.

Os defeitos do tubo neural (DTN) constituem alterações no processo da neurulação e/ou defeitos no invólucro esquelético do TN. Alterações na sutura média, neural e/ou esquelética, podem afetar a região do encéfalo, medula espinhal ou ambas. A falha em qualquer etapa do processo de neurulação, desde a indução neural primária até o fechamento do TN, pode resultar em DTN (Björklund e Gordon, 2006). Estes defeitos são mais freqüentes em embriões do que em neonatos, isso porque a maioria dos embriões afetados – 90% – são espontaneamente eliminados (Sadler, 1997; O’Rahilly e Müller, 2005).

A *anencefalia* é o tipo mais grave de DTN e consiste na ausência parcial do encéfalo e da abóbada craniana, que ocorre devido a defeitos no fechamento do *neuróporo rostral*. Geralmente as partes ausentes são o prosencéfalo, mesencéfalo e a parte craniana do rombencéfalo (O’Rahilly e Müller, 2005). Em neonatos vivos, sempre estão presentes um tronco encefálico rudimentar e tecido nervoso funcional (Sadler, 1997), por esse motivo, *meroanencefalia* é um nome mais adequado para esta anomalia (Moore e Persaud, 2000). Esta malformação é incompatível com a vida e em humanos, ocorre em 1 a cada 1.000 nascimentos (Moore e Persaud, 2004). Quando o DTN afeta a medula espinhal e os tecidos

sobrejacentes – meninges, arcos vertebrais, músculos e tecido epitelial – é denominado de *espinha bífida* (Moore e Persaud, 2000).

As malformações do SNC constituem cerca de 10% de todas as malformações congênitas e os DTN figuram entre as mais freqüentemente relacionadas à mortalidade infantil e ao comprometimento funcional. A incidência de DTN varia de 1:1.000 a 5:1.000 nascidos vivos, e sua reincidência é de aproximadamente 3% (O’Rahilly e Müller, 2005). Enquanto a *anencefalia* é uma malformação incompatível com a vida, os neonatos com *espinha bífida* sobrevivem, entretanto, os graus de acometimento são variados, e não raro a criança é portadora de sérios comprometimentos físicos (Bruin *et al.*, 2003).

Dados do ECLAMC/SC (Estudo Colaborativo Latino–Americano de Malformações Congênitas em Santa Catarina), referentes aos neonatos com malformações congênitas nascidos nas Maternidades Carmela Dutra e do Hospital Universitário (HU-UFSC), ambas localizadas na grande Florianópolis, durante o período de 1999 a 2004, a taxa de neonatos portadores de *anencefalia* foi de 3,7 e de *espinha bífida* foi de 13,6 para cada 10.000 nascimentos. No mesmo período, a taxa brasileira de ocorrência de *espinha bífida* foi de 8,62, o que reflete uma incidência expressiva desse DTN no estado de Santa Catarina (Souza, 2006).

1.6 Ácido Fólico, Homocisteína e Malformações Congênitas

Os DTN possuem uma etiologia multifatorial em que há a combinação de fatores tanto genéticos quanto ambientais, como a nutrição, por exemplo. Sabe-se que a ingestão de ácido fólico antes e durante o início da gestação previne a ocorrência desses defeitos em 50 a 70% dos casos. Evidência suportada por estudos epidemiológicos realizados nos últimos 20 anos (Molloy, 2005), que demonstraram que as taxas de crianças que apresentam DTN vêm diminuindo nos países desenvolvidos, não existindo dúvidas de que fatores nutricionais e ambientais desempenham um papel importante na etiologia destes defeitos.

Estudos epidemiológicos evidenciaram a eficácia do ácido fólico na prevenção desses defeitos congênitos. Daly *et al.* (1997) demonstraram que uma dose diária de 200 µg de ácido fólico é capaz de reduzir a ocorrência dos DTN em

cerca de 39 a 41%. Segundo Finnel *et al.* (2004), a suplementação periconcepcional com ácido fólico reduz em 70% a ocorrência de DTN, além de ter ação protetora aos defeitos craniofaciais e cardíacos.

A partir da década de 90, políticas públicas têm tomado medidas para adequar a ingestão de ácido fólico à população, principalmente entre as mulheres em idade fértil (Cornel e Erickson, 1997; Oakley e Johnston, 2004). A fortificação de alimentos com ácido fólico teve início nos EUA em 1998, desde então, a prevalência de DTN caiu para 5 a cada 10.000 nascimentos (Olney e Mulinare, 2002). Entretanto, no Brasil, somente a partir de junho de 2004, o Ministério da Saúde determinou que todas as farinhas de trigo e milho fabricadas no país ou importadas fossem enriquecidas com ferro e ácido fólico, segundo resolução nº 344 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

A oferta e o metabolismo adequado do ácido fólico são necessários ao desenvolvimento embrionário normal, bem como à maturação do sistema nervoso (Ramaekers e Blau, 2004), tendo em vista que o mesmo desempenha papel importante na regulação de processos como neurogênese e morte celular programada (Mattsom e Shea, 2003).

O ácido fólico obtido na alimentação encontra-se na forma inativa, pois apenas suas formas reduzidas funcionam como co-fatores ativos no metabolismo celular (Ramaekers e Blau, 2004). Entretanto, ele é convertido em derivados metabolicamente ativos, como o *5,10-metileno-tetrahydrofolato* (Björklund e Gordon, 2006). A função desses folatos é a síntese de purinas e timina, metilação do DNA, conversão da homocisteína à metionina e a formação de grupos doadores de metil como a *S-adenosil-metionina (SAM)* (Ramaekers e Blau, 2004). O folato (*5,10-metileno-tetrahydrofolato*) provém o grupo metil para a conversão da metionina à SAM, utilizada na síntese de aminoácidos, proteínas, RNA, DNA e lipídios. Quando há baixos níveis de folato, diminuem também os níveis de SAM, levando a uma redução na metilação da citosina do DNA (Mattsom e Shea, 2003).

A geração de novas células na embriogênese é um processo bastante rápido, portanto, embriões são sensíveis a níveis reduzidos de folato. O ectoderma e o neuroepitélio podem ser os mais sensíveis de todos os tecidos embrionários,

idéia suportada pela observação de que a placa neural expressa altos níveis de RNA mensageiro para receptores de folato, quando comparada a outros tecidos embrionários, como, por exemplo, o coração (Rosenquist e Finnel, 2001).

A deficiência de ácido fólico tem como consequência direta o aumento dos níveis plasmáticos de homocisteína (Calle *et al.*, 2003). A homocisteína é um aminoácido sulfurado derivado da des-metilação e re-metilação da metionina, e é metabolizado através de reações de re-metilação e trans-sulfuração (Limpach *et al.*, 2000). A reação de re-metilação, catalisada pela enzima *metionina sintetase*, que requer a presença de ácido fólico, converte a homocisteína à metionina (Brauer e Tierney, 2004; Mattson e Shea, 2003). Pela ação da *cistationa β-sintetase*, uma enzima dependente de vitamina B₆, a homocisteína é convertida ao aminoácido cisteína, numa reação de trans-sulfuração (Calle *et al.*, 2003) (figura 5). Estas duas reações permitem que o organismo mantenha os níveis normais de homocisteína, que em humanos, estão em torno de 5 – 15 μM no plasma sanguíneo (Ueland *et al.*, 1993), e entre 0,5 e 10 μM no líquido e tecido nervoso (Welch e Loscalzo, 1998). As desordens nutricionais que levam ao aumento de homocisteína podem ser deficiência de vitaminas B₁₂ e B₆ e de ácido fólico (Brauer e Tierney, 2004).

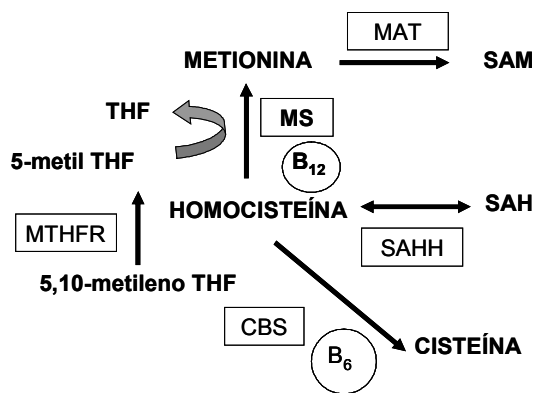


Figura 5: Ciclo de re-metilação e trans-sulfuração da homocisteína. (MAT) metionina adenosil-transferase; (SAM) s-adenosil-metionina; (MS) metionina-sintetase; (THF) tetraidrofolato; (MTHFR) metileno-tetraidrofolato redutase; (SAH) s-adenosil-homocisteína; (SAHH) s-adenosil-homocisteína-hidrolase; (CBS) cistationa β-sintetase.

A homocisteína é um metabólito normal, porém, em indivíduos com deficiência de ácido fólico ou com alterações na atividade enzimática da *5,10-metileno-tetraidrofolato redutase*, *metionina sintetase* ou *cistationa β-sintetase*

ela se acumula intracelularmente (Limpach *et al.*, 2000). Segundo Mattsom e Shea (2003), níveis elevados de homocisteína podem induzir a quebra do DNA, estresse oxidativo e apoptose no sistema nervoso. E o aumento dos níveis séricos da homocisteína está relacionado a condições neurodegenerativas como acidente vascular cerebral (AVC), doença de Alzheimer e Parkinson, e também com doenças psiquiátricas (Mattsom e Shea, 2003).

Tanto a deficiência de ácido fólico, quanto o aumento da homocisteína promovem danos ao DNA neuronal por impedir seu reparo. Entretanto, essa morte neural promovida pela deficiência de doadores de metil pode ser atenuada através da suplementação com purina e timina (Krumann *et al.*, 2002). Os efeitos adversos provocados pela deficiência do ácido fólico ou aumento dos níveis intracelulares de homocisteína atingem as células do sistema nervoso em mitose, incluindo células da glia e progenitores neurais (Choi e Mason, 2000), o que pode ser bastante relevante em se tratando de um sistema em desenvolvimento.

Rosenquist *et al.* (1999) demonstraram, durante o desenvolvimento de embriões de ave, que a homocisteína atua como inibidor dos receptores NMDA. Desta forma, ela pode interferir em funções importantes durante o desenvolvimento, tendo em vista que estes receptores regulam processos como a migração e adesão celulares, o influxo intracelular de cálcio e a morte celular programada (Lipton *et al.*, 1997).

Estudos evidenciam o papel da alteração do metabolismo homocisteína/metionina na etiologia de malformações cardíacas (Rosenquist *et al.*, 1996; Limpach *et al.*, 2000, Boot *et al.*, 2004), defeitos do tubo neural (Afman *et al.*, 2005; Limpach *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2003) e doenças cardiovasculares (Meleady *et al.*, 2003). Níveis elevados de homocisteína no sangue da mãe aumentam os riscos de malformações ao nascimento, principalmente os DTN. Em casos de hiperhomocisteinemia materna, a suplementação com ácido fólico diminui a incidência desses defeitos. Entretanto, os mecanismos responsáveis pelo efeito protetor do ácido fólico são desconhecidos, bem como os mecanismos celulares pelos quais o nível elevado de homocisteína aumenta o risco de ocorrência de

DTN e de que forma essa relação é causal ou secundária ao metabolismo anormal do folato (Brauer e Tierney, 2004).

Fatores genéticos também podem estar envolvidos na gênese de malformações congênitas. Foram descobertas alterações em genes que codificam enzimas envolvidas nas cadeias de reação do folato, enzimas que participam da re-metilação da homocisteína (Hansen *et al.*, 2001). As malformações em que há fortes indícios de que tanto fatores genéticos quanto nutricionais possam interagir para determinar a expressão do fenótipo incluem os DTN, malformações cardíacas e craniofaciais (Finnel *et al.*, 2004).

O papel do aumento dos níveis de homocisteína na etiologia dos DTN tem sido estudado em muitos modelos animais (Afman *et al.*, 2005). A homocisteína demonstrou ser teratogênica em embriões de ave induzindo defeitos congênitos do tubo neural (Rosenquist *et al.*, 1996, Epeldegui *et al.*, 2002), coração (Rosenquist *et al.* 1996), membros (Limpach *et al.*, 2000) e olhos (Maestro de las Casas *et al.*, 2003). A administração de doses que variavam de 0,5-7,5 μmol de D,L-homocisteína (D,L-HC) provocou poucos defeitos, já a dose de 20 μmol foi letal. Defeitos grosseiros do TN foram observados em embriões tratados com 5-15 μmol de D,L- HC (Rosenquist, *et al.*, 1996).

Portanto, o objetivo do nosso estudo foi analisar o padrão morfológico externo e a organização do telencéfalo e da medula espinhal de embriões de *Gallus domesticus* tratados com homocisteína e/ou ácido fólico, durante o período inicial de desenvolvimento (96 hr).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a interferência da homocisteína e do ácido fólico no processo de desenvolvimento embrionário inicial (96 horas) de *Gallus domesticus*, com ênfase no processo de neurulação, no padrão morfológico externo e na estrutura organizacional do telencéfalo e medula espinhal.

2.2 Objetivos Específicos

- Reconhecer e descrever as alterações no padrão morfológico externo nos grupos tratados;
- Aferir a massa corporal dos embriões controle e tratados;
- Avaliar o efeito isolado da homocisteína e do ácido fólico sobre a estrutura organizacional do telencéfalo e medula espinhal dos embriões de ave;
- Caracterizar o efeito do ácido fólico sobre a estrutura organizacional do telencéfalo e medula espinhal dos embriões de ave tratados com homocisteína.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos utilizados nesta pesquisa foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFSC, sob os números 00006/CEUA e 23080.032216/2005-18/UFSC. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal, do Departamento de Biologia, Embriologia e Genética, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.1 O Modelo Biológico Experimental

Ovos fertilizados da espécie *Gallus domesticus* foram doados pela Empresa Macedo-Koerich S/A - São José/SC e transportados ao Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal/BEG/CCB em bandejas apropriadas, confeccionadas com papel reciclável, que possuíam acomodações individuais, o que dificultava a movimentação dos ovos durante o trajeto. Estes foram limpos, numerados e tiveram a massa aferida em balança de precisão (0,01g). A amostra consistiu de ovos homogêneos, de forma ovalada e coloração bege, e média de massa de 65,64g ($\pm 5,36$).

3.2 Condições de Incubação

Os ovos doados pela empresa são fertilizados e os embriões estão na fase de blástula (figura 6), sendo a estrutura embrionária reconhecida como blastoderma. Isso porque desde a fecundação até o momento da postura, o embrião de galinha já inicia seu desenvolvimento. Após a postura, se a temperatura não estiver próxima dos 38°C, o desenvolvimento é interrompido (Magaldi, 1974, Romboli *et al.*, 1984). Portanto, os ovos eram estocados a um intervalo de temperatura entre 10 e 15°C, por um período médio de 96 horas, sendo o período máximo recomendado de 168 horas (7 dias) (Magaldi, 1974, Romboli *et al.*, 1984).

Para retomar o processo de desenvolvimento dos embriões, e então dar início aos experimentos, os ovos eram primeiramente dispostos em posição horizontal, em incubadora apropriada e a uma temperatura constante de 37,5°C a 38°C e umidade de 65% (Dias e Müller, 1998). Iniciada a incubação, estabeleceu-se um período de cerca de 2 horas, para que os embriões retomassem o desenvolvimento, sendo determinados a partir daí, os estágios de desenvolvimento embrionário (HH) de acordo com o descrito por (Hamburguer e Hamilton, 1951) para a espécie *Gallus domesticus*.

3.3 Procedimentos Realizados com os Ovos

Após 32 horas de incubação (estágio 8HH) os ovos foram retirados da incubadora e a câmara de ar percutida com um estilete de extremidade rombóide, a fim de se efetuar um orifício para permitir a saída de ar. Procedeu-se então, com uma seringa de insulina de agulha ultra-fina (12 mm), a retirada de cerca de 50 a 200µl de albúmem, o que viabilizava o rebaixamento do embrião. Esses procedimentos facilitavam a realização de uma segunda abertura, efetuada na face superior mediana do ovo, onde a casca era expandida com o auxílio de um alfinete e pinças, gerando uma abertura de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro, que permitia a visualização e o manuseio do embrião (figura 6).

Excetuando-se os grupos controle, os demais embriões foram tratados com homocisteína e/ou ácido fólico. O veículo para as duas substâncias foi salina e a quantidade de solução injetada foi de 25 µl por embrião. O local da injeção foi a região do vitelo próxima à área opaca – futura área vasculosa do embrião. Na figura 7, vê-se o desenho de um ovo de um embrião de ave com 26-29 horas de desenvolvimento (estágio 8 HH), correspondente à idade de manuseio. Os embriões eram manipulados nesta idade, devido ao fato do processo de neurulação ainda não ter se completado neste estágio, permanecendo ambos os neuróporos, anterior e posterior, abertos.

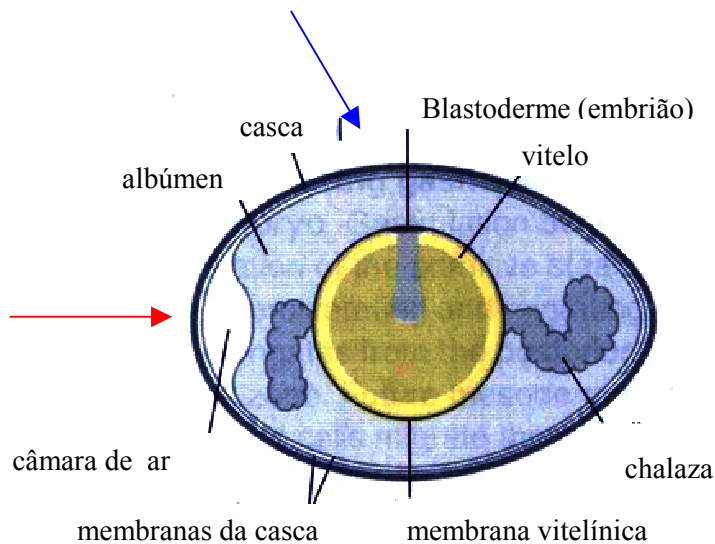


Figura 6: Esquema didático de ovo de *Gallus domesticus* no momento da postura. A seta vermelha (→) indica o local onde será efetuada a abertura que permite o rebaixamento do embrião. A seta azul (→) indica o local onde será efetuada a abertura, que permite o manuseio e a visualização do embrião (Modificado de Wolpert *et al.*, 1998).

Para atingir aos objetivos propostos, foram constituídos 5 grupos experimentais, cada qual com $n=10$, totalizando 50 embriões. Foram utilizados dois grupos como controle – Grupo Controle 1 (GC1): ovos intactos; e Grupo Controle 2 (GC2): 25 μ l de solução salina. O uso de dois controles justifica-se pelo fato de que a manipulação do embrião, principalmente neste estágio tão inicial (26-29 horas), pode por si só interferir no processo de desenvolvimento, por isso foi utilizado um Grupo Controle Fechado (GC1), neste, não houve nenhuma manipulação até a retirada do embrião do ovo, realizada após 96 horas de incubação (23-25HH). O Grupo Controle Salina (GC2), foi constituído a fim de verificar se houve interferência do veículo administrado em conjunto com os demais tipos de agentes utilizados, como segue:

- Grupo 3 (G3) : 10 μ mol de D,L-Homocisteína em 25 μ l de solução salina (400mM);
- Grupo 4 (G4) : 10 μ mol D,L-Homocisteína e 0,5 μ g de ácido fólico em 25 μ l de solução salina;
- Grupo 5 (G5) : 0,5 μ g de ácido fólico em 25 μ l de solução salina.

Concluída a manipulação, a abertura localizada na face superior mediana do ovo era fechada com filme PVC transparente atóxico e o ovo recolocado na estufa. Diariamente, o desenvolvimento dos embriões foi acompanhado, sendo observadas, *in ovo*, as seguintes características gerais (Dias, 1996; Schatz, 2003):

- 1) Aspecto da vesícula vitelínica e área vascular;
- 2) Padrão normal de desenvolvimento do embrião:
 - Desenvolvimento das vesículas cerebrais e vesículas ópticas,
 - Organização do eixo corporal
 - Diferenciação das estruturas faciais,
 - Fechamento adequado da região torácica e abdominal.



Figura 7: Embrião de *Gallus domesticus* com 26-29 horas de desenvolvimento (estágio 8-9HH). A seta preta (→) indica o neuróporo anterior aberto, a seta vermelha (→) aponta à formação dos somitos e a seta azul (→) a região caudal do embrião (modificado de Hamburger e Hamilton, 1951).

3.4 Análise dos Embriões: Morfologia e Morfometria

Após 96 horas de incubação (23-25HH), os embriões tiveram seu desenvolvimento interrompido sendo retirados da estufa e colocados a temperatura de 4°C por 15 minutos. Com o uso de uma colher de café e tesoura cirúrgica, o embrião foi separado do saco vitelínico e colocado em placa de Petri contendo solução salina, onde através da agitação suave foram retirados os remanescentes das membranas extra-embriônicas. Após, os embriões foram fixados em formaldeído a 10% por até 24 horas e conservados em solução de etanol 70%, onde permaneceram por 5 dias até que tivessem sua massa corporal aferida em balança de precisão (0,0001g) e fossem posteriormente analisados ao estereomicroscópio (20X), a fim de se determinar o estágio de desenvolvimento embrionário conforme Hamburger e Hamilton (1951) e de se detectar a presença de alterações visíveis no padrão morfológico externo.

A fim de realizar uma análise mais detalhada do padrão morfológico dos embriões e verificar se o ácido fólico e a homocisteína interferiram no crescimento das estruturas embrionárias, foram estabelecidas algumas mensurações feitas com auxílio de graticula milimetrada acoplada ao estereomicroscópio (14, 20 e 30X), sendo obtidas as seguintes medidas de comprimento (figura 8):

- *altura cefálica (1)*: distância medida do ápice (topo do mesencéfalo) até a altura do IV arco faríngeo, passando pela vesícula óptica (14X);
- *distância cefálica ântero-posterior (2)*: medida desde a extremidade anterior do telencéfalo à extremidade posterior do mielencéfalo passando pela vesícula óptica (14X);
- *diagonal cefálica (3)*: medida desde a extremidade anterior do telencéfalo ao ápice (topo do mesencéfalo) (20X);
- *distância ântero-posterior na base do mesencéfalo (4)*: medida horizontal ântero-posterior na base do mesencéfalo (30X);
- *altura do mesencéfalo (5)*: medida perpendicular à 4 (30X);
- *diâmetro da vesícula óptica (6)*: medida horizontal no centro da vesícula óptica (30X);
- *comprimento do ápice ao vértice (7)*: distância do ápice ao vértice do embrião, passando pelo centro da vesícula óptica até a região dorsal do embrião na altura do brotamento do membro anterior (14X);
- *comprimento do vértice à cauda (8)*: distância medida a partir do vértice até à extremidade caudal do embrião passando pelo brotamento do membro posterior (14X);
- *distância entre os brotos dos membros (9)*: medida horizontal entre o brotamento de cada membro (anterior e posterior) (14X);
- *distância ântero-posterior na altura do coração (10)*: medida horizontal medida desde a região ventral à dorsal do embrião na altura do coração (14X);

- *comprimento total (11)*: corresponde ao somatório das medidas 7 e 8.

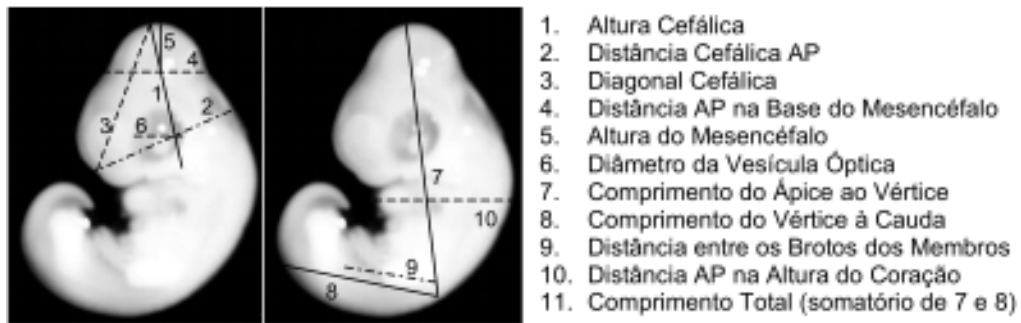


Figura 8: Ilustração e denominação das medidas estabelecidas e determinadas nos embriões com auxílio de graticula milimetrada acoplada ao estereomicroscópio (14,20 e 30X).

3.5 Procedimentos e Análise Microscópica

As regiões cefálica e truncal dos embriões previamente fixadas foram preparadas para microscopia de luz e fluorescência, de acordo com as seguintes etapas:

- Desidratação: realizada em série etanólica crescente (70 até 100%);
- Diafanização: as peças foram colocadas em álcool/xilol e transferidas para xilol, até a peça tornar-se translúcida;
- Inclusão: três banhos de parafina a 57°C por 45 minutos cada, sendo que após o último banho, as peças foram orientadas em blocos e deixadas à temperatura ambiente;
- Confeção dos Cortes: os cortes, frontais para a região cefálica e transversais para a região truncal, foram confeccionados em micrótomo rotativo (espessura de 8µm) e colocados sobre lâminas histológicas.
- Desparafinização: as lâminas foram desparafinizadas em xilol, seguido de álcool / xilol e hidratação em série alcoólica decrescente, de álcool absoluto até álcool 70% e em água destilada.

a) Coloração Hematoxilina-Eosina (HE) - Após desparafinização, as lâminas foram coradas com Hematoxilina de Harris, lavadas em água corrente e imersas

em eosina aquosa (1%). Posteriormente seguiu-se a desidratação e montagem das lâminas com bálsamo do Canadá (Beçak e Paulet, 1976).

Técnica utilizada como controle histológico, para realização de morfometria das camadas celulares das regiões do telencéfalo e medula espinhal e de quantificação das células da notocorda e do mesoderma apical da medula espinhal dos embriões.

b) Método de Hoescht (33258) – Após desparafinização, as lâminas foram banhadas em solução de tampão Mc Ivaine (0,4M de fosfato de sódio e 0,1M de ácido cítrico, pH 5,5) por 5 minutos. Em seguida, foram coradas durante 10 minutos em Hoechst 33258 (Sigma) diluído em tampão Mc Ivaine na concentração de 0,5 µg/ml. Após esse procedimento, as lâminas foram lavadas em água destilada (3 banhos de 5 minutos cada), montadas com tampão Mc Ivaine, vedadas com esmalte e armazenadas a 4°C.

Técnica utilizada para visualizar os núcleos celulares e principalmente identificar células apoptóticas (Verma e Babu, 1995).

c) Técnicas Imuno-Histoquímicas – Alguns cortes histológicos foram destinados a reações imuno-histoquímicas para localização dos filamentos intermediários vimentina e GFAP (proteína ácida fibrilar da glia) nas regiões cefálica e truncal dos embriões. Para tal, foram utilizados independentemente dois tipos de anticorpos primários, anti-vimentina e anti-GFAP, como segue abaixo:

- Bloqueio da atividade das peroxidases endógenas: 1 banho de peróxido de hidrogênio (0,3%) em metanol por 15 minutos; em seguida as lâminas foram lavadas por 15 minutos em tampão fosfato (PBS - 0,1M, pH de 7,4) + Triton X-100% (0,3%). Após, as lâminas foram lavadas duas vezes por 10 minutos em tampão PBS.

- Bloqueio de sítios inespecíficos: as lâminas foram incubadas com soro fetal bovino 5% por 1 hora. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS por 10 minutos em agitação.

- Incubação com anticorpo primário: o conjunto de lâminas foi subdividido para incubação independente com os anticorpos anti-vimentina V9 (1:50) e anti-GFAP (1:50) em PBS por 12 horas a 4°C. Após a incubação, as secções foram lavadas com PBS em agitação 3 vezes por 10 minutos.

- Incubação com anticorpo secundário: as secções incubadas com anti-GFAP foram incubadas com anti-coelho conjugado à peroxidase (1:100), e as secções incubadas com anti-vimentina V9 foram incubadas com anti-camundongo conjugado à peroxidase (1:100). Ambos em PBS por 1 hora e trinta minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram lavados 3 vezes em PBS por 10 minutos em agitação.

- Revelação: as secções foram tratadas com solução de 3-3'-Diaminobenzidine (DAB) por tempo suficiente até que os cortes apresentassem tonalidade marrom; em seguida, a reação foi bloqueada com água destilada.

O controle negativo consistiu na realização dos procedimentos acima descritos, suprimindo-se a incubação com o anticorpo primário.

3.6 Análise dos Resultados

3.6.1 Morfologia e Morfometria dos Embriões

A partir da observação dos embriões com auxílio do estereomicroscópio (20X) e detectada a presença de alterações do padrão morfológico, estas foram organizadas em categorias. Foram obtidas as médias das freqüências de ocorrência de cada categoria para cada grupo experimental.

Após a mensuração de massa corporal, determinação do estágio de desenvolvimento (HH) e da realização das mensurações corporais e da região cefálica dos embriões, com auxílio de gráticula milimetrada acoplada ao estereomicroscópio (14, 20 e 30X), foram obtidas e registradas as médias (\bar{x}) e desvio padrão (sd) destas variáveis para todos os grupos.

Para as medidas da região cefálica, todos os grupos possuíam n=10, com exceção do Grupo Homocisteína (G3), que possuía n=09. Para as medidas

corporais, os Grupos Controle Fechado (GC1) e Controle Salina (GC2) apresentaram n=10 para todas as mensurações. Para a medida 7, os grupos G3 e G5 apresentaram n=09; para as medidas 8 e 11, os grupos G3, G4 e G5 apresentaram n=09; para as medidas 9 e 10, o Grupo G5 apresentou n=09. Em todas as situações em que os grupos apresentaram n inferior a 10 foi devido à impossibilidade de mensuração por motivo de haver alterações no padrão morfológico externo dos embriões.

3.6.2 Morfometria do Telencéfalo e Medula Espinhal

Com auxílio de ocular micrométrica acoplada ao microscópio de luz (400X), foi realizada morfometria do telencéfalo e da medula espinhal dos embriões. Foram mensuradas a espessura das camadas ventricular e do manto, e após, foram calculadas as razões camada do manto/camada ventricular.

Para as medidas das camadas celulares do telencéfalo, foram utilizados 6 cortes para cada grupo e foi mensurada a espessura das camadas nas regiões dorsal e lateral (n=06 para cada camada em cada região).

Para a região da medula espinhal, foram utilizados também 6 cortes, sendo mensuradas a espessura das camadas celulares na região basal (direita e esquerda) da medula espinhal (n=12 para cada camada) (figura 9).

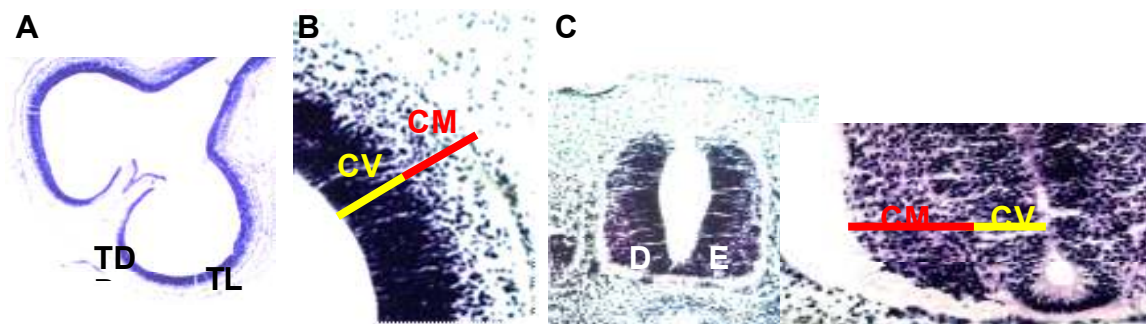


Figura 9: Visualização das mensurações das camadas celulares realizadas nos cortes histológicos do telencéfalo (8µm) (A – 40X e B - 400X) e da medula espinhal (8µm) (C – 200X e D - 400X). (TD) telencéfalo dorsal, (TL) telencéfalo lateral, (CV) camada ventricular, (CM) camada do manto, (D) direita, (E) esquerda.

3.6.3 Quantificação das Células da Notocorda e Mesoderma

A gráticula de Weibel acoplada ao microscópio de luz (400X) foi utilizada para delimitar a área de contagem direta, realizada com auxílio de contador manual, das células do mesoderma localizado imediatamente acima da região apical da medula espinhal (n=6 cortes histológicos por grupo). O mesmo procedimento foi adotado para realizar a contagem das células do interior da notocorda (n=06 cortes histológicos por grupo) (figura 10).

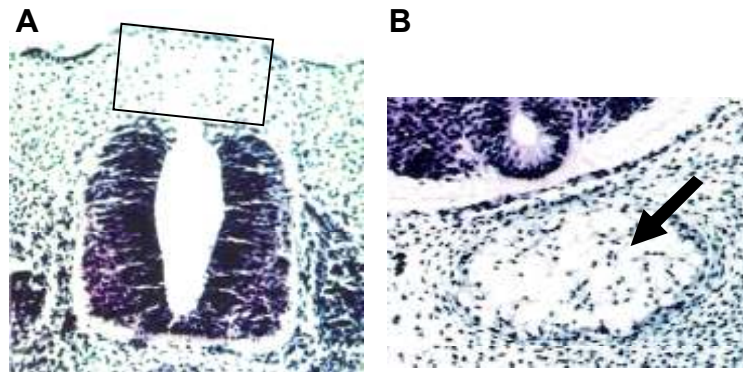


Figura 10: Cortes histológicos da medula espinhal (8µm) (A - 200X e B - 100X). **(A)** Delimitação da região onde foi realizada a contagem de células do mesoderma apical. **(B)** Visualização da notocorda, a seta preta (→) indica as células que foram contadas diretamente em aumento de 400X.

3.6.4 Tratamento Estatístico

Os dados referentes ao padrão morfológico e morfométrico dos embriões, medidas de espessura das camadas do telencéfalo e da medula, bem como os resultados obtidos a partir da contagem das células da notocorda e do mesoderma apical da medula espinhal, foram analisados no programa estatístico Statistica[®] versão 6.0 para Windows. Para verificar a existência de diferenças significativas entre os grupos, foi utilizado o teste de análise de variância de uma via (*One-Way ANOVA*), $p \leq 0,05$, seguido de *teste post hoc de Duncan*, quando $n=10$ para todos os grupos, e *teste de Tukey* quando $n=09$ para alguns grupos.

4 RESULTADOS

Este capítulo contém o conjunto de dados obtidos através da análise estereomicroscópica e morfométrica do padrão morfológico externo, e também da análise microscópica do sistema nervoso central – telencéfalo e medula espinhal – , notocorda e mesoderma adjacente ao telencéfalo e à medula espinhal dos embriões dos diferentes grupos experimentais. São apresentados, acerca da morfologia dos embriões, variáveis de massa corporal (g), estágio de desenvolvimento (HH), características do padrão morfológico externo, bem como medidas morfométricas cefálicas e corporais previamente estabelecidas na metodologia.

Quanto à análise microscópica dos tecidos embrionários, são apresentadas diferentes técnicas histológicas realizadas no SNC destes embriões, como a coloração com Hematoxilina-eosina, que permitiu a descrição geral dos tecidos e posterior morfometria das camadas celulares do telencéfalo e medula espinhal em desenvolvimento, bem como a quantificação das células da notocorda e do mesoderma apical à medula espinhal; a técnica de Hoescht (33258), que possibilitou a detecção de células apoptóticas nos tecidos neural e mesodérmico; e as técnicas imuno-histoquímicas, que permitiram identificar a presença dos filamentos intermediários vimentina e GFAP nas estruturas embrionárias analisadas, e verificar a existência de diferenças na intensidade e localização destes entre os grupos, evidenciando a presença de alterações no padrão de diferenciação celular dos tecidos em questão.

4.1 Análise dos Embriões: Padrão Morfológico Externo e Morfometria

Os embriões de *Gallus domesticus* tratados com homocisteína e/ou ácido fólico exibiram várias alterações na morfologia externa, em contrapartida, nos grupos Controle Fechado (GC1) e Controle Salina (GC2), todos os embriões exibiram padrão morfológico externo considerado normal para o desenvolvimento da espécie (tabela 1). As alterações encontradas nos grupos tratados consistiram em

modificações nas flexuras e curvaturas corporais, hipoplasia do mesencéfalo, assimetria de vesículas ópticas e extrusão visceral (figura 11).

A porcentagem de embriões que apresentaram padrão morfológico normal foi de 20%, 30% e 70% nos grupos tratados com Homocisteína (G3), Homocisteína e Ácido Fólico (G4) e Ácido Fólico (G5), respectivamente, sendo a diferença significativa entre os grupos Controle (GC1 e GC2) e os grupos G3 e G4 ($p < 0,001$). Houve também diferença significativa quanto à porcentagem de embriões que exibiram padrão morfológico normal do Grupo Ácido Fólico (G5) em comparação com os grupos Homocisteína (G3) ($p < 0,01$) e Homocisteína e Ácido Fólico (G4) ($p < 0,05$) (tabela 1).

Tabela 1: Padrão morfológico externo normal e alterado exibido pelos embriões dos diferentes grupos experimentais.

PADRÃO MORFOLÓGICO EXTERNO	Grupos Experimentais					
	GC1 (N=10)	GC2 (N=10)	G3 (N=10)	G4 (N=10)	G5 (N=10)	
Normal	100% ^a	100% ^a	20% ^b	30% ^b	70% ^a	
Alterado						
– Assimetria de Vesículas Ópticas	0%	0%	0%	10%	0%	
– Extrusão Visceral	0%	0%	10%	10%	0%	
– Hipoplasia do Mesencéfalo	0%	0%	0%	10%	10%	
– Modificações nas Flexuras e Curvaturas Corporais	Flexura Cervical	0%	0%	10%	20%	20%
	Flexura Dorsal	0% ^a	0% ^a	50% ^b	50% ^b	10% ^a
	Torção Tóraco-lombar	0%	0%	20%	0%	10%

Dentre as alterações morfológicas observadas, a mais freqüente foi a modificação no padrão da flexura dorsal, totalizando 50% dos embriões no grupo G3 e também em G4, sendo a diferença significativa em relação aos grupos GC1 e GC2 ($p < 0,01$). Os embriões do Grupo Ácido Fólico (G5) também exibiram essa alteração na flexura dorsal, porém com freqüência significativamente inferior aos outros dois grupos (G3 e G4) ($p < 0,05$) (tabela 1).

Os embriões tratados com homocisteína e/ou ácido fólico também exibiram, entre outras anormalidades, modificação no padrão da flexura cervical – 10% (G3) e 20% (G4 e G5) – e torção do eixo corporal na região tóraco-lombar – 20% (G3) e 10% (G5). Porém, para estas alterações, bem como para as demais, as diferenças entre os grupos não foram significativas.

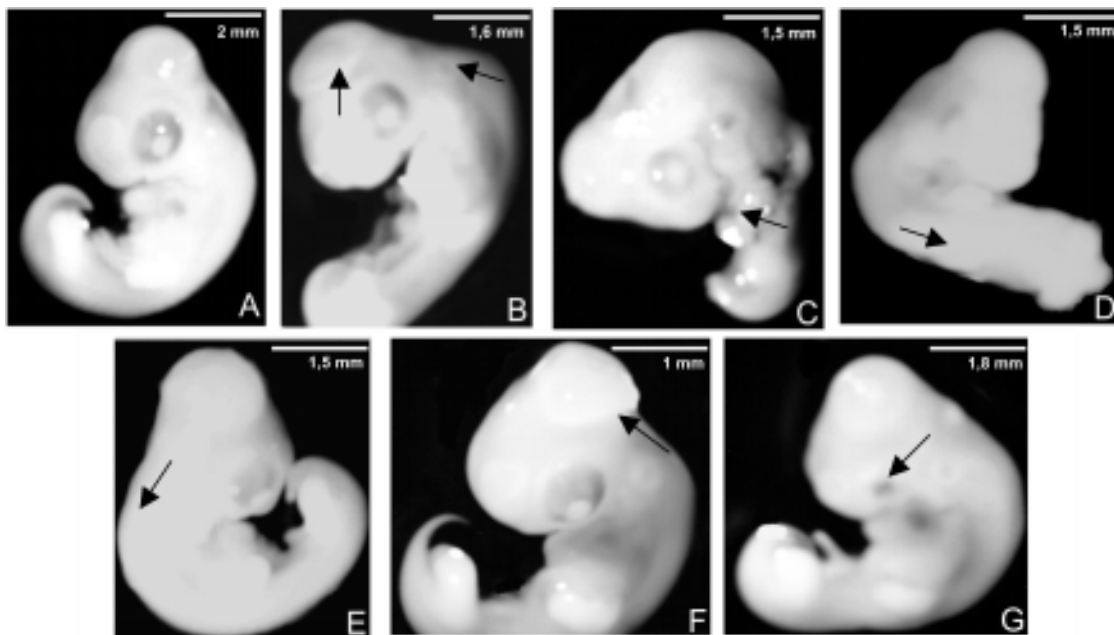


Figura 11: (A) Embrião do Grupo Controle Fechado (GC1) apresentando padrão morfológico externo normal (14X). (B) Embrião do Grupo Ácido Fólico (G5) apresentando hipoplasia do mesencéfalo e modificação no padrão da flexura cervical (20X). (C) Embrião do Grupo Homocisteína (G3) apresentando extrusão visceral e modificação no padrão da flexura dorsal (10X). (D) Embrião do Grupo Homocisteína (G3) apresentando torção tóraco-lombar (7X). (E) Embrião do Grupo Homocisteína (G3) apresentando modificação no padrão da flexura cervical (7X). (F) Embrião do Grupo Homocisteína e Ácido Fólico (G4) apresentando hipoplasia do mesencéfalo e modificação no padrão da flexura cervical (20X). (G) Embrião do Grupo Homocisteína e Ácido Fólico (G4) apresentando assimetria de vesículas ópticas (10X) (hipoplasia da vesícula óptica no antímero esquerdo).

Quanto à variável de massa corporal (g) dos embriões, os valores médios não revelaram diferença significativa entre os grupos. Já com relação ao estágio de desenvolvimento (HH), os valores médios, de modo geral, também foram

semelhantes entre os grupos, com exceção do Grupo Controle Fechado (GC1), que exibiu média significativamente superior aos demais (tabela 2).

Com relação à análise morfométrica dos embriões, quanto às medidas da região cefálica, os grupos Controle Fechado (GC1) e Controle Salina (GC2), exibiram valores médios superiores aos demais grupos que receberam tratamento, com exceção do Grupo Ácido Fólico (G5), que em alguns casos exibiu média superior ou bastante similar a dos grupos controle (figura 2). A média da medida da *altura cefálica* (1) foi superior nos grupos Controle Fechado (GC1), Controle Salina (GC2) e Ácido Fólico (G5): 3,85mm (\pm 0,32); 3,55mm (\pm 0,3) e 3,64mm (\pm 0,52), respectivamente. Entre os outros dois grupos as médias foram semelhantes – 3,43mm (\pm 0,62) e 3,4mm (\pm 0,58) – G3 e G4, respectivamente. Com relação à média da *distância cefálica AP* (2), esta foi inferior no Grupo Homocisteína (G3), em relação aos demais – 3,57mm (\pm 0,51) – sendo a diferença significativa entre este grupo e o Grupo Controle Fechado (GC1), que obteve o maior valor médio – 4,31mm (\pm 0,5). A média da medida da *diagonal cefálica* (3) foi superior no Grupo Controle Fechado (GC1) – 4,32 mm (\pm 0,32) – em relação aos demais, que obtiveram médias semelhantes, tendo, entretanto, o Grupo Ácido Fólico (G5), apresentado a maior média entre os demais – 3,87mm (\pm 0,52) (figura 12).

Tabela 2: Valores de média (\bar{x}) e desvio padrão (sd) da massa corporal (g) e do estágio de desenvolvimento (HH) dos embriões. Número de embriões com alteração (s) do padrão morfológico e frequência absoluta das alterações exibidas pelos embriões dos diferentes grupos experimentais (n=10 por grupo).

Grupos Experimentais (n=50)	Massa Corporal (g)	Estágio de Desenvolvimento (HH)	Alterações no Padrão Morfológico	
			Nº de embriões	Frequência
Controle Fechado (GC1)	0,056 (\pm 0,031)	24,8 (\pm 0,42) *	0	0
Controle Salina (GC2)	0,046 (\pm 0,024)	24,1 (\pm 0,32)	0	0
Homocisteína (G3)	0,054 (\pm 0,025)	24,1 (\pm 0,88)	8	9
Homocisteína e Ácido Fólico (G4)	0,044 (\pm 0,024)	24,1 (\pm 0,74)	7	10
Ácido Fólico (G5)	0,056 (\pm 0,041)	24,2 (\pm 0,63)	3	5

Duncan test * p < 0,05

Embora os valores médios das medidas mesencefálicas tenham demonstrado bastante linearidade entre os grupos, a média da medida da *distância AP na base do mesencéfalo* (3) foi inferior no Grupo Homocisteína (G3) – 2,69mm (\pm 0,42). Já a média da *altura do mesencéfalo* (4), neste mesmo grupo, foi superior aos demais – 1,45mm (\pm 0,29) (figura 12). Para o *diâmetro da vesícula óptica* (5) os grupos demonstraram também linearidade entre as médias, embora o Grupo Controle Fechado (GC1) tenha apresentado novamente valor médio superior em relação aos demais – 1,3mm (\pm 0,2) (figura 12).

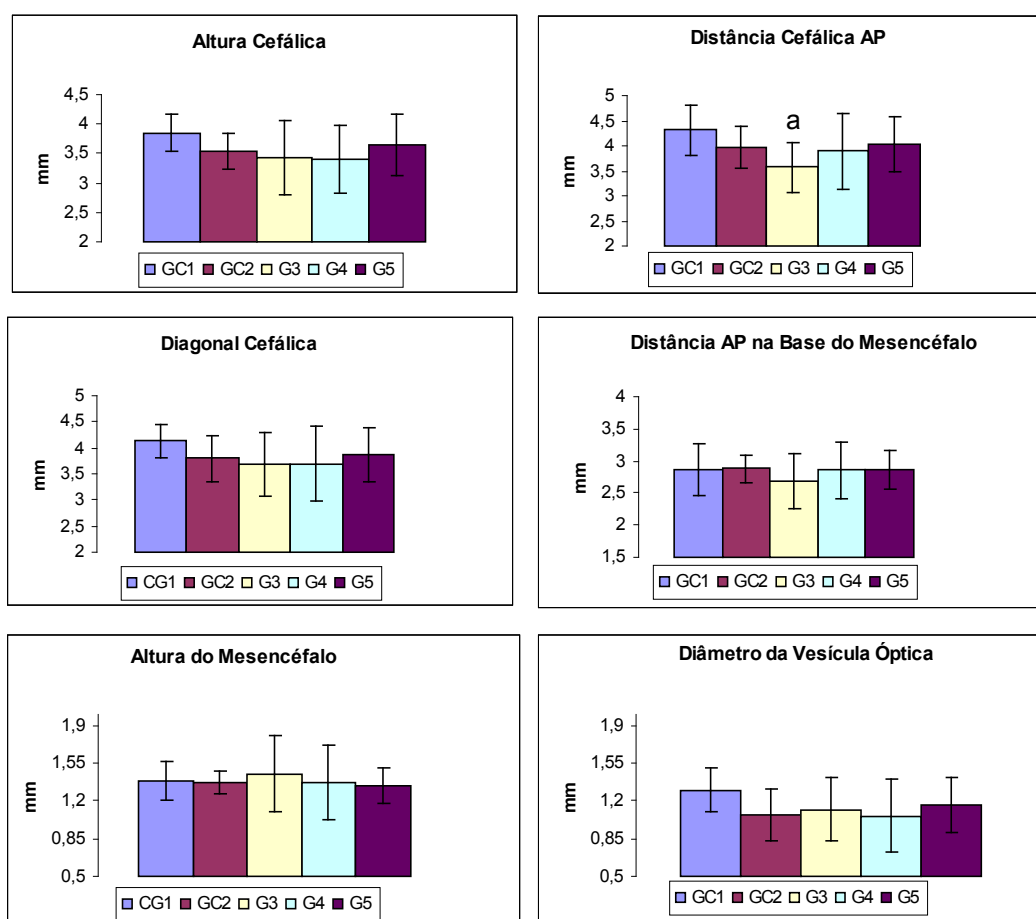


Figura 12: Média (\bar{x}) e desvio padrão (sd) das medidas da região cefálica dos embriões dos diferentes grupos experimentais (Tukey test^a p < 0,01).

Com relação à morfometria corporal dos embriões, pode-se dizer que as médias obedeceram a um padrão linear. A média da medida do *comprimento do ápice ao vértice* (7) foi superior no Grupo Controle Fechado (GC1) em comparação aos demais – 6,92mm (\pm 0,84). O Grupo Homocisteína e Ácido Fólico

(G4) apresentou o menor valor médio – 6,38mm (\pm 1,03). Quanto à medida do *comprimento do vértice à cauda* (8), o Grupo Controle Salina (GC2) apresentou a maior média – 4,0mm (\pm 0,43) – seguido do Grupo Ácido Fólico (G5) – 3,97mm (\pm 0,82) – Grupo Controle Fechado (GC1) – 3,83mm (\pm 0,45) – Grupo Homocisteína e Ácido Fólico (G4) – 3,77 mm (\pm 0,53) – e do Grupo Homocisteína (G3), que o obteve a menor média – 3,44mm (\pm 0,54) (figura 13).

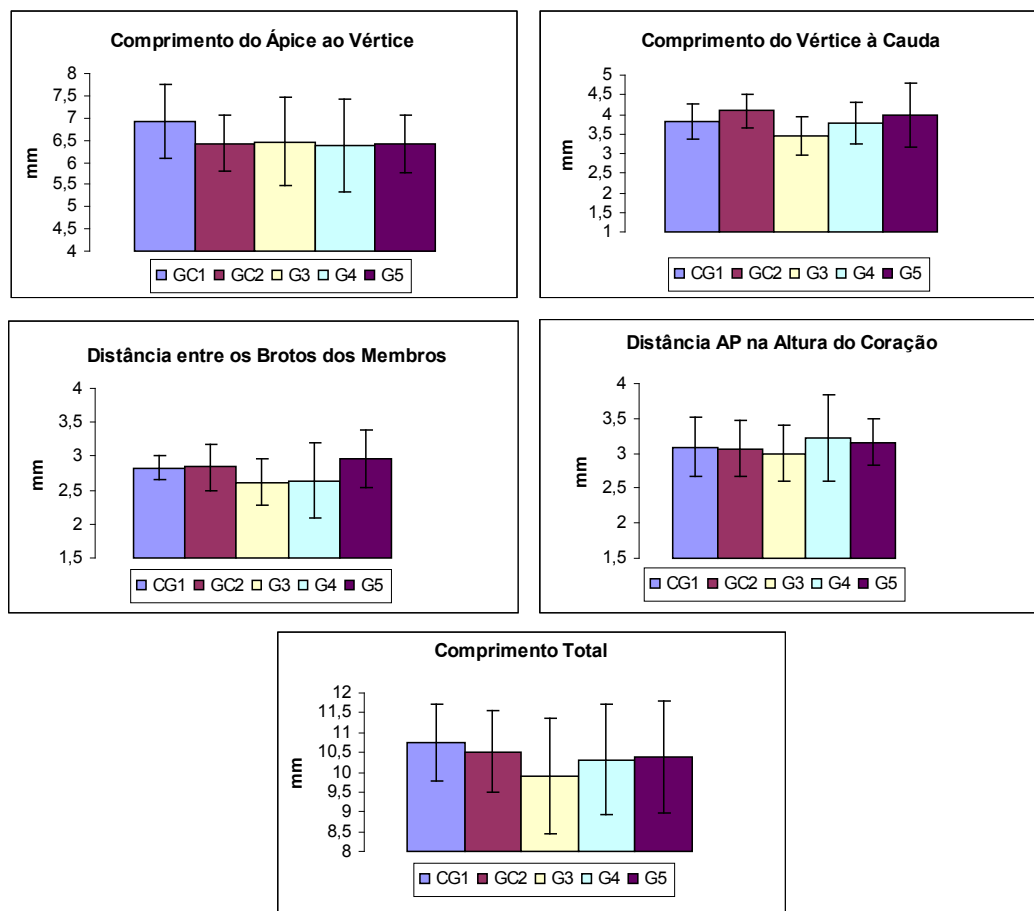


Figura 13: Média (\bar{x}) e desvio padrão (sd) das medidas corporais dos embriões dos diferentes grupos experimentais (*Tukey test* $p > 0,05$).

A média da medida da *distância entre os brotos dos membros* (9) foi superior no Grupo Ácido Fólico (G5) – 2,96mm (\pm 0,42) – seguido dos grupos Controle Salina (GC2) e Controle Fechado (GC1), que apresentaram médias semelhantes – 2,84mm (\pm 0,34) e 2,83mm (\pm 0,17), respectivamente. Novamente o menor valor médio foi apresentado pelo Grupo Homocisteína (G3) – 2,62mm (\pm 0,34) (figura 13).

Embora os valores médios da *distância AP na altura do coração (10)* tenham demonstrado bastante linearidade, novamente o Grupo Homocisteína (G3) registrou o menor valor médio – 3,00mm ($\pm 0,41$) – seguido dos grupos Controle Salina (GC2) e Controle Fechado (GC1), que apresentaram novamente valores médios bastante próximos – 3,07mm ($\pm 0,4$) e 3,09mm ($\pm 0,42$), respectivamente. Para esta medida, os maiores valores foram registrados pelos grupos G4 e G5 – 3,50 21mm ($\pm 0,62$) e 3,16mm ($\pm 0,34$), respectivamente (figura 13).

A medida do *comprimento total (11)*, que corresponde ao somatório das medidas do *comprimento do ápice ao vértice (7)* e do *comprimento do vértice à cauda (8)*, foi inferior no Grupo Homocisteína (G3) – 9,06mm ($\pm 1,47$) – seguido dos grupos G4, G5, GC2 e GC1, respectivamente. Para as medidas corporais, nenhuma das diferenças nos valores médios entre os grupos foi significativa (figura 13).

4.2 Estudo do Telencéfalo

4.2.1 Microscopia e Morfometria

Através da observação das lâminas histológicas, da região cefálica dos embriões, verificou-se a existência de diferenças na organização tecidual do telencéfalo dos embriões dos diferentes grupos experimentais. Em todos os grupos experimentais, a espessura média das camadas ventricular e do manto era sempre maior na região lateral do que na região dorsal do telencéfalo, que possuía menor densidade celular.

No Grupo Controle Fechado (GC1) e Controle Salina (GC2) a zona de migração dos neuroblastos e glioblastos, correspondente à camada do manto, era mais espessa e melhor organizada em comparação aos demais grupos, tanto na região dorsal quanto lateral do telencéfalo (figura 14). Ao microscópio de luz (1000X), nem sempre era nítida a distinção entre as camadas celulares nos cortes histológicos do telencéfalo dos embriões dos grupos Homocisteína (G3) e Homocisteína e Ácido Fólico (G4).

A partir da análise morfométrica realizada nestas camadas, esses dados se confirmaram, e na maioria das vezes, os grupos Controle Fechado (GC1) e Controle Salina (GC2) apresentaram espessura média, de ambas as camadas celulares telencefálicas, significativamente superiores aos demais grupos, independente do tratamento.

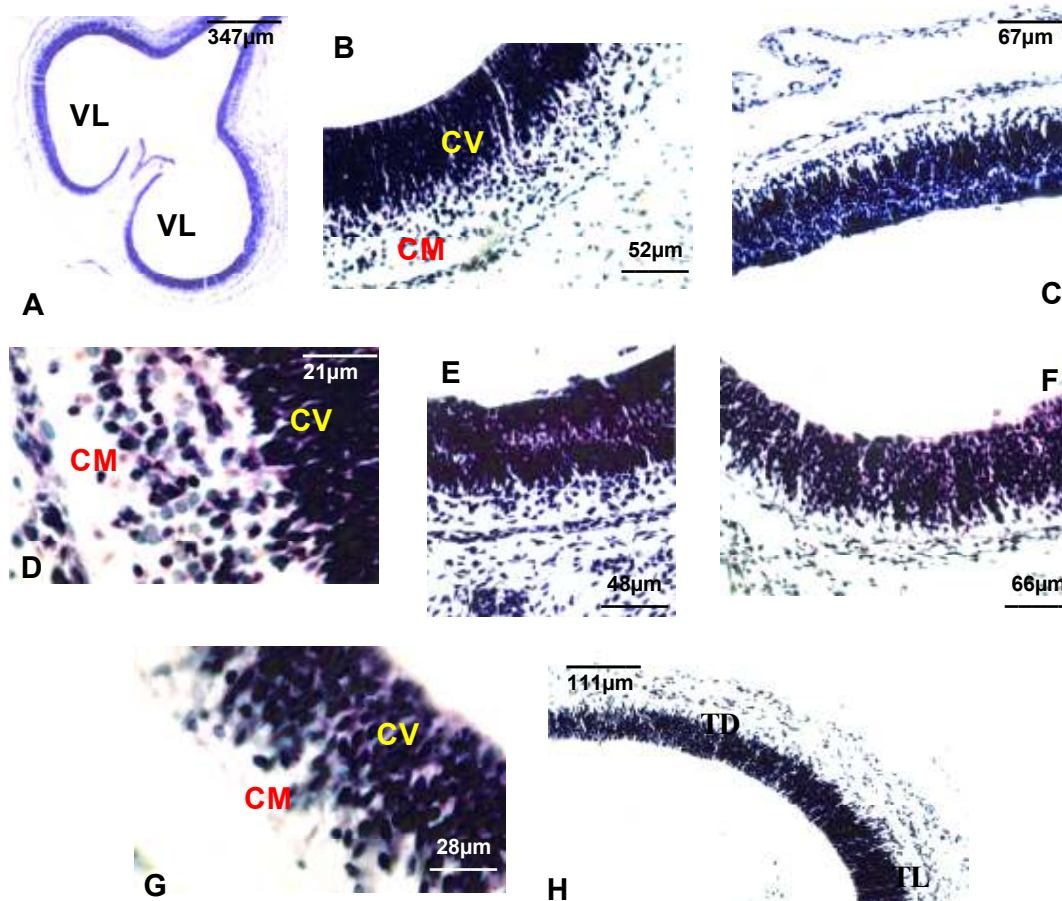


Figura 14: Cortes frontais do telencefalo (8µm) dos embriões dos diferentes grupos experimentais corados com Hematoxilina-eosina (HE). **(A)** Vista geral do telencefalo de embrião do Grupo Controle Fechado (GC1) (40X), mostrando as duas vesículas telencefálicas e os ventrículos laterais. **(B)** Detalhe da região lateral do telencefalo de embrião do Grupo Controle Salina (GC2) (400X). **(C)** Detalhe da região dorsal do telencefalo de embrião do GC1 (200X). **(D)** Detalhe da região lateral do telencefalo de embrião do GC2 (1000X). **(E)** Detalhe da região lateral do telencefalo de embrião do Grupo Homocisteína (G3) (400X). **(F)** Detalhe da região lateral do telencefalo de embrião do Grupo Homocisteína e Ácido Fólico (G4) (200X). **(G)** Detalhe da mesma região visualizada em F (1000X). **(H)** Detalhe da região dorso-lateral do telencefalo de embrião do Grupo Ácido Fólico (G5) (200X). **(VL)** ventrículo lateral; **(CV)** camada ventricular; **(CM)** camada do manto; **(TD)** telencefalo dorsal; **(TL)** telencefalo lateral.

A espessura média da camada ventricular mensurada na região dorsal do telencefalo foi significativamente superior no Grupo Controle Fechado (GC1) em comparação aos demais grupos tratados com homocisteína e/ou ácido fólico – 56,64µm (± 8,24) – seguido do Grupo Ácido Fólico (G5) e Homocisteína e Ácido

Fólico (G4) - $36,61\mu\text{m}$ ($\pm 3,94$) e $36,08\mu\text{m}$ ($\pm 5,88$), respectivamente ($p < 0,0001$). O Grupo Controle Salina (GC2) também obteve média superior aos demais grupos tratados, sendo significativamente superior a média do Grupo Homocisteína (G3), que apresentou a menor média de espessura da camada ventricular nesta região do telencéfalo – $23,39\mu\text{m}$ ($\pm 2,52$) ($p < 0,0001$) (figura 15 e 16).

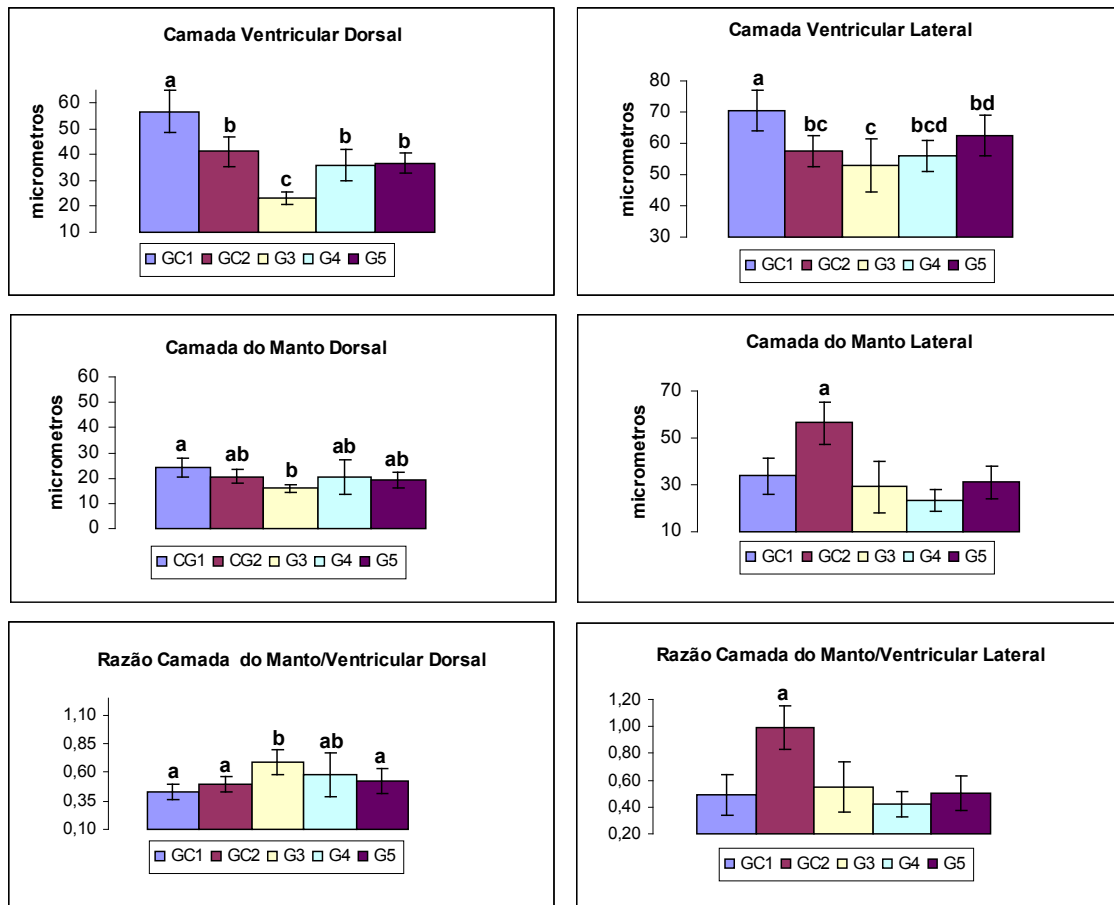


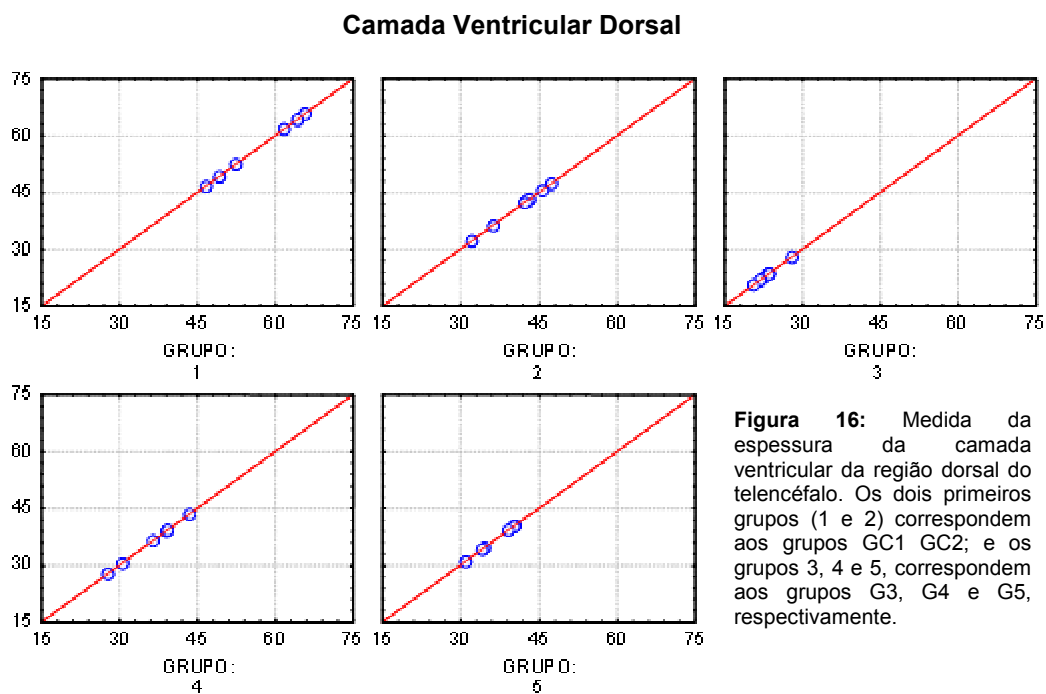
Figura 15: Média (\bar{x}) e desvio padrão (sd) das medidas da espessura das camadas ventricular e do manto e das razões camada do manto/camada ventricular, das regiões dorsal e lateral do telencéfalo, dos cortes histológicos dos embriões dos diferentes grupos experimentais ($n=06$ para todas as mensurações).

Para a medida da espessura da camada ventricular na região lateral do telencéfalo, o Grupo Controle Fechado (GC1) apresentou média significativamente superior em relação aos demais grupos que receberam tratamento com homocisteína e/ou ácido fólico – $70,45\mu\text{m}$ ($\pm 6,5$) ($p < 0,05$) – seguido pelo Grupo Ácido Fólico (G5), Controle Salina (GC2), Homocisteína e Ácido Fólico (G4) e Homocisteína (G3), que apresentou o menor valor médio para a camada

ventricular também nesta região do telencéfalo – $53,04\mu\text{m}$ ($\pm 8,43$) ($p < 0,0005$). A média desta medida no Grupo Ácido Fólico (G5) – $62,44\mu\text{m}$ ($\pm 6,52$) –, embora inferior a do grupo GC1, também foi significativamente superior em relação à média do Grupo Homocisteína (G3) ($p < 0,05$) (figura 15).

Com relação ao valor médio da espessura da camada do manto na região dorsal do telencéfalo, o Grupo Controle Fechado (GC1) obteve também maior média em comparação aos demais grupos – $24,06\mu\text{m}$ ($\pm 3,50$) – seguido dos grupos Controle Salina (GC2), Homocisteína e Ácido Fólico (G4) e Ácido Fólico (G5), respectivamente. O Grupo Homocisteína (G3) novamente apresentou o menor valor médio – $16,01\mu\text{m}$ ($\pm 1,57$), sendo significativa a diferença entre este último e o GC1 ($p < 0,005$).

Já para a mesma camada, porém agora mensurada na região lateral do telencéfalo, o Grupo Controle Salina (GC2) apresentou média significativamente maior aos demais grupos – $56,64\mu\text{m}$ ($\pm 9,01$) ($p < 0,0005$) – seguido dos grupos Controle Fechado (GC1), Ácido Fólico (G5), Homocisteína (G3) e Homocisteína e Ácido Fólico (G4), respectivamente (figura 15).



Quanto aos valores das razões camada do manto/camada ventricular nas duas regiões telencefálicas – dorsal e lateral – os grupos exibiram um perfil diferente. A maior razão média da região dorsal do telencéfalo, calculada a partir das medidas de espessura das camadas celulares aí localizadas, foi obtida pelo Grupo Homocisteína (G3) – 0,69 (\pm 0,11) – sendo a diferença significativa entre este grupo e os grupos Controle Fechado (GC1), Controle Salina (GC2) e Ácido Fólico (G5) ($p < 0,05$). Para esta razão, o menor valor médio foi apresentado pelo grupo GC1 – 0,43 (\pm 0,07). Já para os valores médios das razões calculadas a partir das morfometria realizada na região lateral do telencéfalo, o Grupo Controle Salina (GC2) obteve média significativamente superior aos demais grupos – 0,99 (\pm 0,16) ($p < 0,0005$) – que apresentaram valores médios lineares para estas razões, embora a menor média, para esta razão, tenha sido obtida pelo Grupo Homocisteína e Ácido Fólico (G4) 0,42 (\pm 0,09) (figura 15).

4.2.2 Imuno-localização da Vimentina e GFAP

A partir da análise imuno-histoquímica do telencéfalo, foi possível observar, em todos os grupos experimentais, ausência de marcação para vimentina, tanto nas regiões das camadas ventricular e do manto, quanto no mesoderma adjacente à vesícula encefálica (figura 17 e tabela 3).

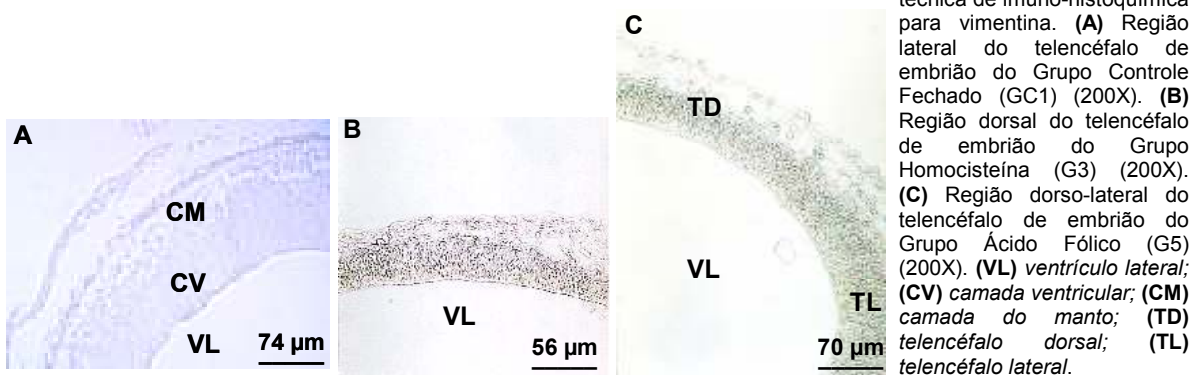


Figura 17: Cortes frontais do telencéfalo (8 μ m) de embriões de diferentes grupos experimentais submetidos à técnica de imuno-histoquímica para vimentina. **(A)** Região lateral do telencéfalo de embrião do Grupo Controle Fechado (GC1) (200X). **(B)** Região dorsal do telencéfalo de embrião do Grupo Homocisteína (G3) (200X). **(C)** Região dorso-lateral do telencéfalo de embrião do Grupo Ácido Fólico (G5) (200X). **(VL)** ventrículo lateral; **(CV)** camada ventricular; **(CM)** camada do manto; **(TD)** telencéfalo dorsal; **(TL)** telencéfalo lateral.

Em contrapartida, os cortes submetidos à técnica de imuno-histoquímica para GFAP revelaram marcação positiva nas regiões das camadas ventricular e/ou do manto, e também no mesoderma adjacente ao telencéfalo, embora houvesse diferenças na localização das marcações entre os grupos (figura 18 e tabela 3). O Grupo Controle Salina (GC2) revelou forte marcação positiva para GFAP nas regiões das camadas ventricular e do manto e também no mesoderma adjacente à camada ventricular em todo o telencéfalo. O Grupo Controle Fechado (GC1) também revelou marcação positiva para a região da camada ventricular no telencéfalo dorsal e lateral. O Grupo Homocisteína (G3) revelou marcação negativa para GFAP em todo o telencéfalo, com exceção apenas de algumas células isoladas localizadas na camada ventricular da região dorsal do telencéfalo. Também o Grupo Homocisteína e Ácido Fólico (G4) revelou marcação negativa para GFAP em todas as regiões do telencéfalo. O Grupo Ácido Fólico (G5) revelou marcação positiva na camada ventricular nas regiões dorsal e lateral do telencéfalo (figura 18 e tabela 3).

Tabela 3: Quantificação da marcação imuno-histoquímica para GFAP no telencéfalo dos embriões dos diferentes grupos experimentais. (TD) *telencéfalo dorsal*; (TL) *telencéfalo lateral*; (-) *ausência de marcação*; (+) *marcação leve*; (++) *marcação moderada*; (+++) *marcação intensa*.

<i>Telencéfalo</i>	GC1		GC2		G3		G4		G5	
	TD	TL	TD	TL	TD	TL	TD	TL	TD	TL
Camada do Manto	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-
Camada Ventricular	++	++	+++	+++	+	-	-	-	++	++
Mesoderma Adjacente	+	+	+++	+++	-	-	-	-	-	-

4.3 Estudo da Medula Espinhal, Notocorda e Mesoderma Adjacente

4.3.1 Microscopia, Morfometria e Quantificação Celular

Através da observação das lâminas histológicas da região truncal dos embriões, verificou-se a existência de diferenças na organização celular das camadas da medula espinhal e do mesoderma apical adjacente à medula espinhal nos diferentes grupos experimentais (figura 19). O Grupo Controle Fechado (GC1) e o Grupo Controle Salina (GC2) exibiram padrão adequado de fechamento do tubo neural (TN) e mesoderma apical na maioria dos cortes. Já o Grupo

Homocisteína (G3) exibiu, em todos os cortes, falha na fusão do TN e também do mesoderma adjacente ao ápice da medula espinhal.

A partir da análise dos cortes do Grupo Homocisteína e Ácido Fólico (G4), foi possível observar também a existência de falha no fechamento do TN na região apical da medula espinhal, mas não do mesoderma adjacente, onde identificamos apenas a existência de uma densidade celular menor em comparação com os Grupos Controle (GC1 e GC2) (figura 22). Já o Grupo Ácido Fólico (G5) exibiu organização tecidual semelhante aos grupos controle, embora em alguns cortes não houvesse fusão total do mesoderma apical. Nos cortes histológicos de todos os grupos, fez-se facilmente a distinção entre as zonas ventricular e do manto na medula espinhal, e em alguns cortes dos grupos controle, foi possível observar também o início da formação da camada marginal (figura 19).

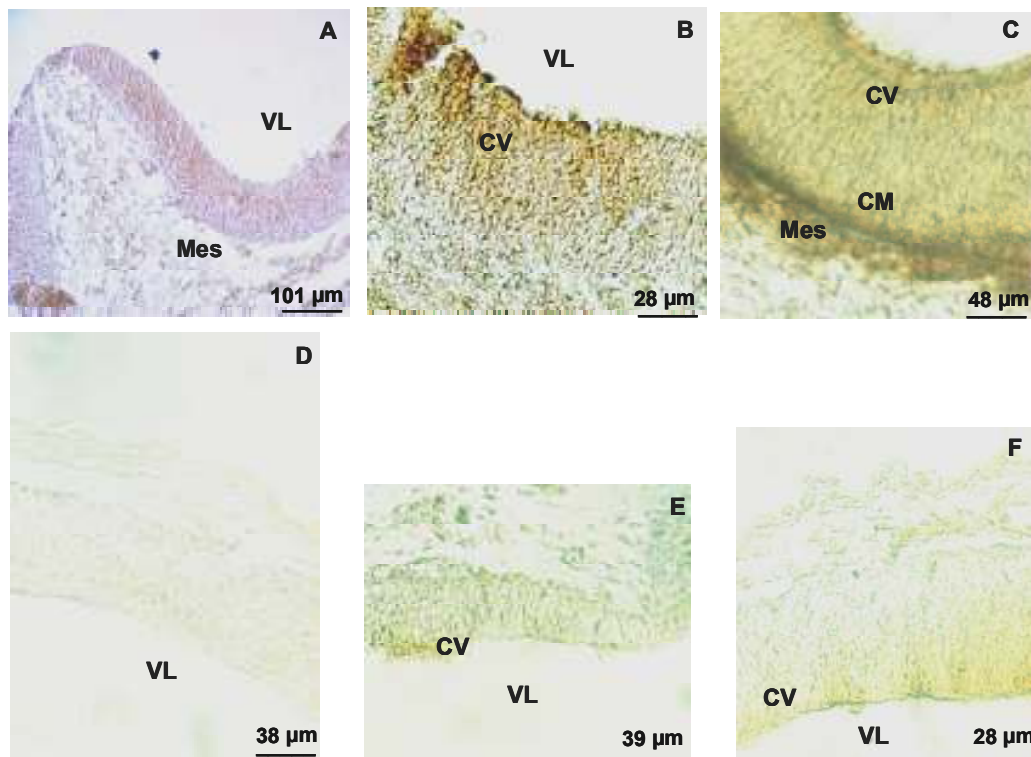


Figura 18: Cortes frontais do telencéfalo (8µm) de embriões de diferentes grupos experimentais submetidos à técnica de imuno-histoquímica com GFAP. **(A)** Vista da região dorsal do telencéfalo de embrião do Grupo Controle Fechado (GC1) (200X). **(B)** Detalhe da região lateral do telencéfalo de embrião do GC1 (400X). **(C)** Detalhe da região do telencéfalo lateral de embrião do Grupo Controle Salina (GC2) (400X). **(D)** Vista da região dorsal do telencéfalo de embrião do Grupo Homocisteína e Ácido Fólico (G4) (400X). **(E)** Vista da região dorsal do telencéfalo de embrião do Grupo Homocisteína (G3) (400X). **(F)** Vista da região dorsal do telencéfalo de embrião do Grupo Ácido Fólico(G5) (400X). **(VL)** *ventrículo lateral*; **(CV)** *camada ventricular*; **(CM)** *camada do manto*.

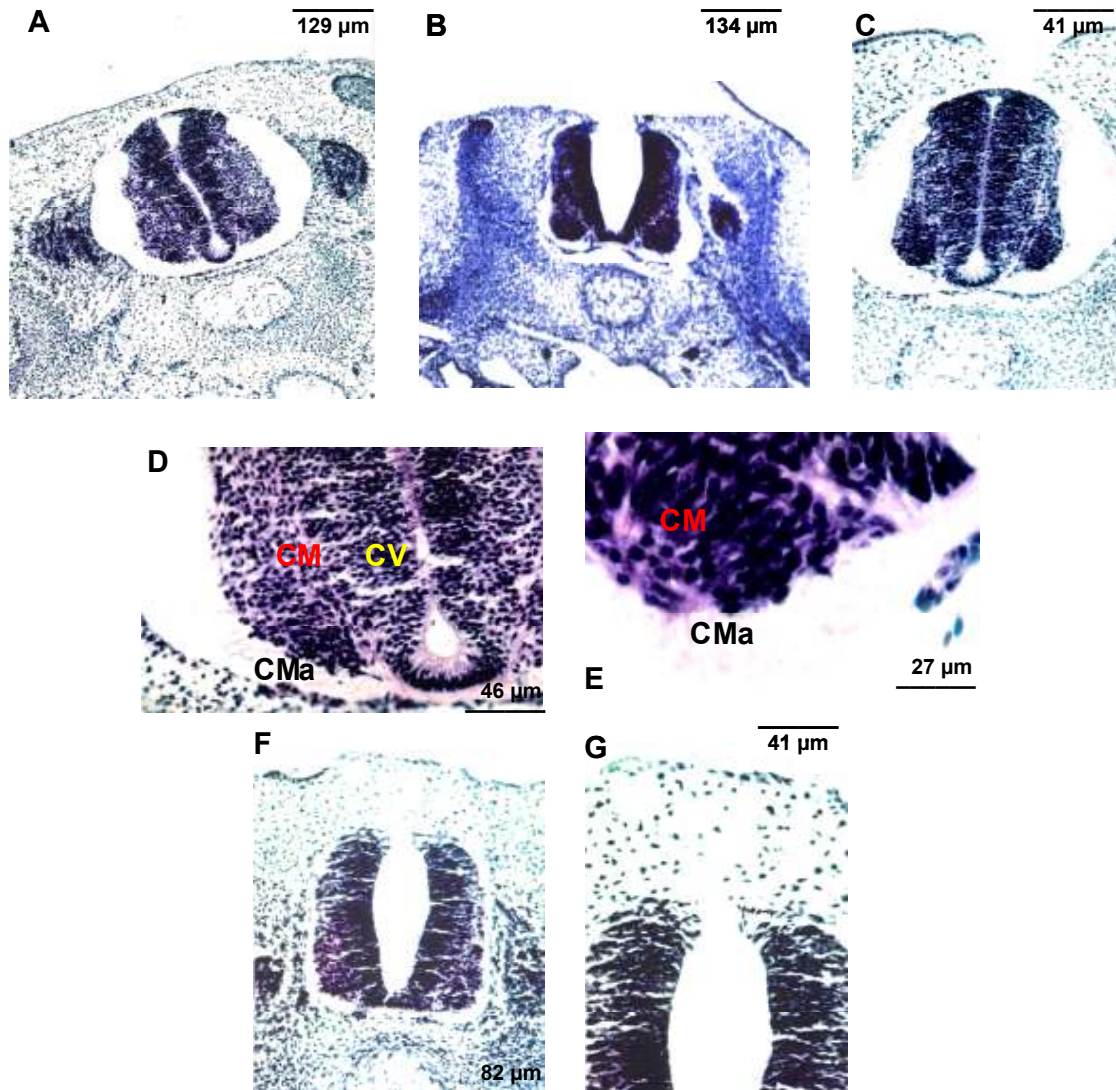


Figura 19: Cortes transversais da região troncual (8μm) dos embriões dos diferentes grupos experimentais corados com Hematoxilina-eosina (HE). **(A)** Vista geral da medula espinhal de embrião do Grupo Controle Fechado (GC1) (100X). **(B)** Vista geral da medula espinhal de embrião do Grupo Homocisteína (G3) (100X). **(C)** Detalhe da medula espinhal de embrião do Grupo Ácido Fólico (G5) (200X). **(D)** Detalhe da região basal da medula espinhal de embrião do GC1 (400X). **(E)** Detalhe da mesma região da medula espinhal em embrião do Grupo Controle Salina (GC2) (1000X). **(F)** Detalhe da medula espinhal de embrião do Grupo Homocisteína e Ácido Fólico (G4) (200X). **(G)** Detalhe de F (400X). **(CV)** camada ventricular; **(CM)** camada do manto; **(CMa)** camada marginal.

As diferenças observadas na organização celular das camadas medulares foram confirmadas através da mensuração destas, realizada na região basal da medula espinhal. Com relação à espessura da camada ventricular, o Grupo Controle Fechado (GC1) apresentou os maiores valores médios – 32,95μm (± 3,79) – essa diferença foi significativa em relação aos grupos G3 e G4 ($p < 0,05$), e o menor valor médio para esta camada celular foi apresentado pelo Grupo

Homocisteína (G3) – 28,13 μm (\pm 4,27) (figura 20 e 21). A média de espessura da camada do manto na medula espinhal, também foi significativamente superior no Grupo Controle Fechado (GC1) – 83,03 μm (\pm 4,32) ($p < 0,0005$) – e o menor valor, de 45,21 μm (\pm 3,77), foi exibido desta vez pelo Grupo Homocisteína e Ácido Fólico (G4). Os grupos Controle Salina (GC2) e Ácido Fólico (G5) também obtiveram médias significativamente superiores ao grupo G4 ($p < 0,0005$ e $p < 0,005$, respectivamente) (figura 20).

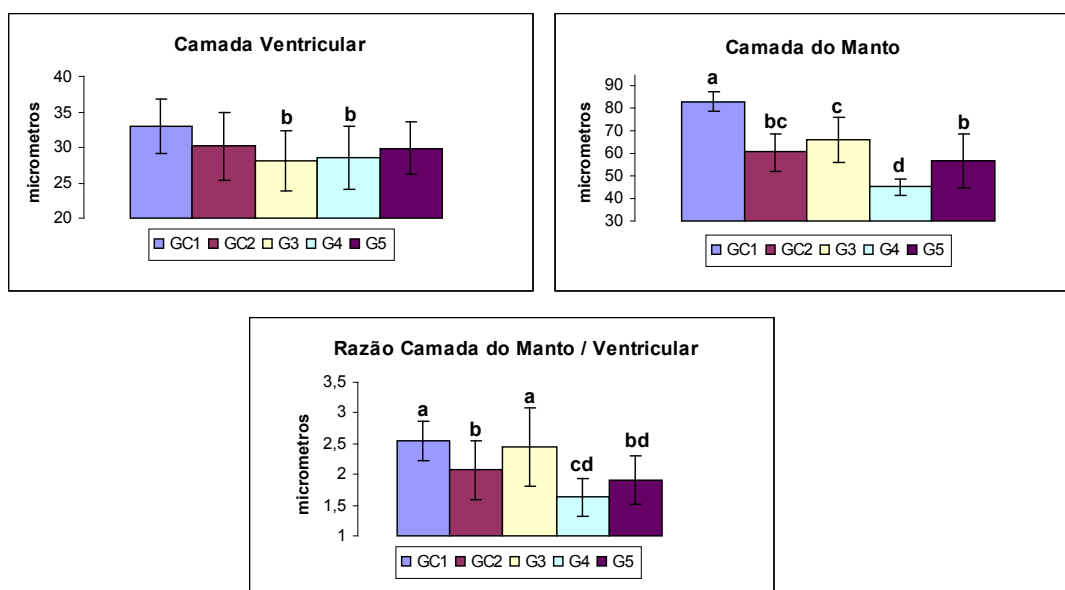


Figura 20: Média (\bar{x}) e desvio padrão (sd) das medidas da espessura das camadas ventricular e do manto e da razão camada do manto/camada ventricular da região basal da medula espinhal dos cortes histológicos dos embriões dos diferentes grupos experimentais ($n=12$ para todas as mensurações).

Quanto aos valores das razões camada do manto/camada ventricular, a maior média, calculada a partir dos valores das camadas celulares mensuradas na região basal da medula espinhal, foi obtida novamente pelo Grupo Controle Fechado (GC1) – 2,55 (\pm 0,32) – sendo a diferença significativa entre este grupo e os grupos GC2 ($p < 0,05$), G4 ($p < 0,0001$) e G5 ($p < 0,005$), mas não em comparação ao grupo Homocisteína (G3), que obteve, para esta razão, a segunda maior média – 2,44 (\pm 0,64) –, seguido do Grupo Controle Salina (GC2), cuja média foi também significativamente superior a do Grupo Homocisteína e Ácido Fólico (G4) – 2,07 (\pm 0,48) ($p < 0,05$) (figura 20).

Camada Ventricular

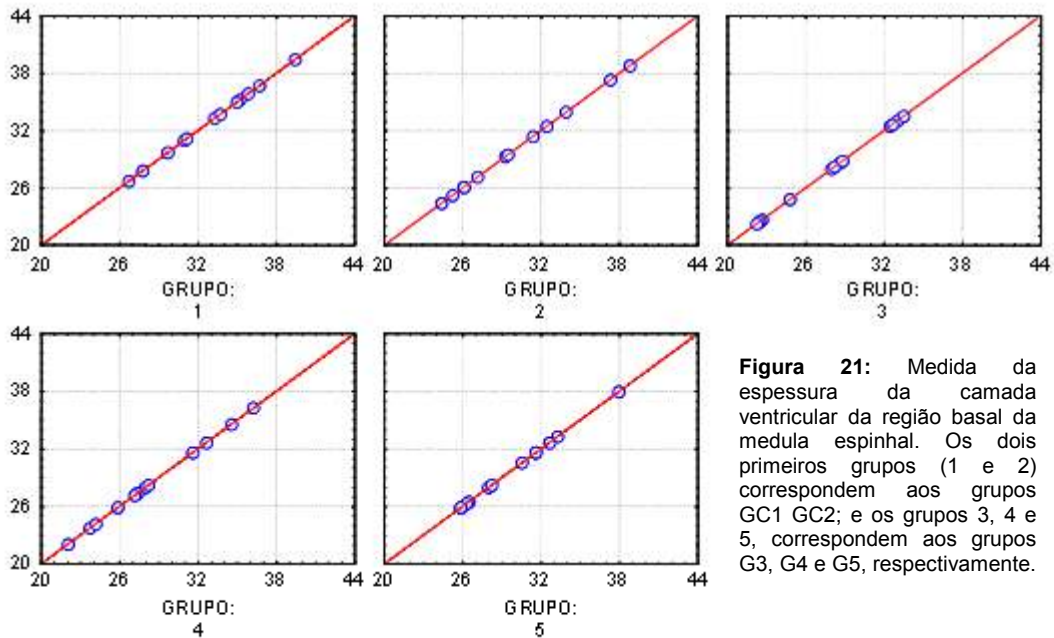


Figura 21: Medida da espessura da camada ventricular da região basal da medula espinhal. Os dois primeiros grupos (1 e 2) correspondem aos grupos GC1 GC2; e os grupos 3, 4 e 5, correspondem aos grupos G3, G4 e G5, respectivamente.

Analisando a notocorda dos embriões, por meio da contagem direta das células localizadas no interior desta estrutura, pode-se constatar que não houve diferenças significativas no número absoluto de células entre os grupos. Embora os Grupos Controle Fechado (GC1), Homocisteína (G3) e Ácido Fólico (G5) tenham apresentado os maiores valores médios, enquanto os Grupos Controle Salina (GC2) e o Grupo Homocisteína e Ácido Fólico (G4) obtiveram as menores médias para esta variável (figura 22).

Analisando o mesoderma apical à medula espinhal, verificou-se, após realização de contagem direta das células, a existência de diferenças significativas no número absoluto destas células entre os grupos. A média de células do mesoderma presentes nesta região foi significativamente superior nos grupos Controle Fechado (GC1) e Controle Salina (GC2) – 175,67 ($\pm 14,98$) e 166,83 ($\pm 25,04$), respectivamente ($p < 0,05$). O menor valor médio foi exibido pelo Grupo Homocisteína (G3) – 115,17 ($\pm 20,23$) ($p < 0,005$) (figura 22).

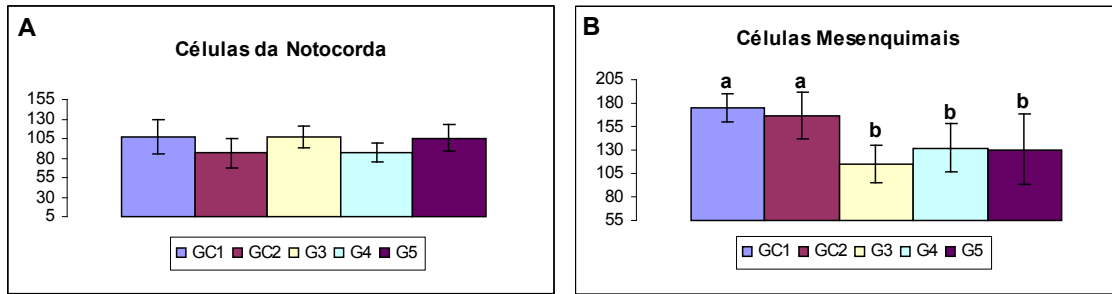


Figura 22: (A) Média (\bar{x}) e desvio padrão (sd) do número absoluto de células presentes no interior da notocorda dos embriões dos diferentes grupos experimentais. (B) Média (\bar{x}) e desvio padrão (sd) do número absoluto de células presentes na região do mesoderma apical da medula espinhal dos embriões dos diferentes grupos experimentais.

4.3.2 Imuno-localização da Vimentina e GFAP

A análise dos cortes submetidos à técnica de imuno-histoquímica para vimentina revelou marcação positiva, em regiões bem definidas, somente no Grupo Controle Fechado (GC1). Este mostrou marcação positiva em algumas células das camadas ventricular e do manto da medula espinhal e em células localizadas no interior da notocorda. Nos demais grupos experimentais não houve marcação imuno-histoquímica para vimentina (figura 23 e tabela 4).

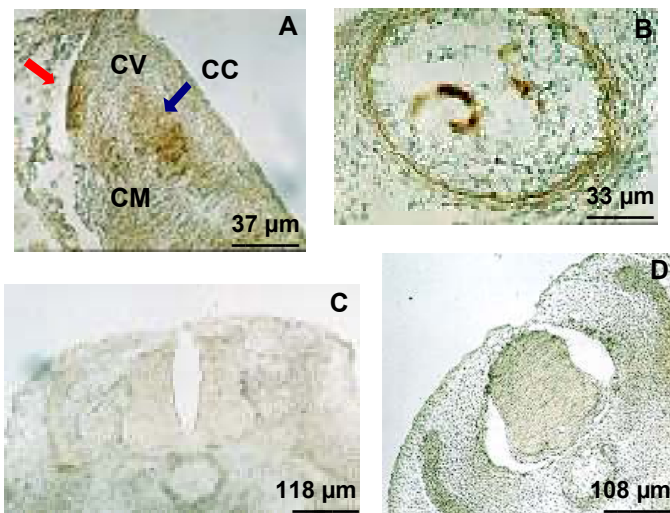
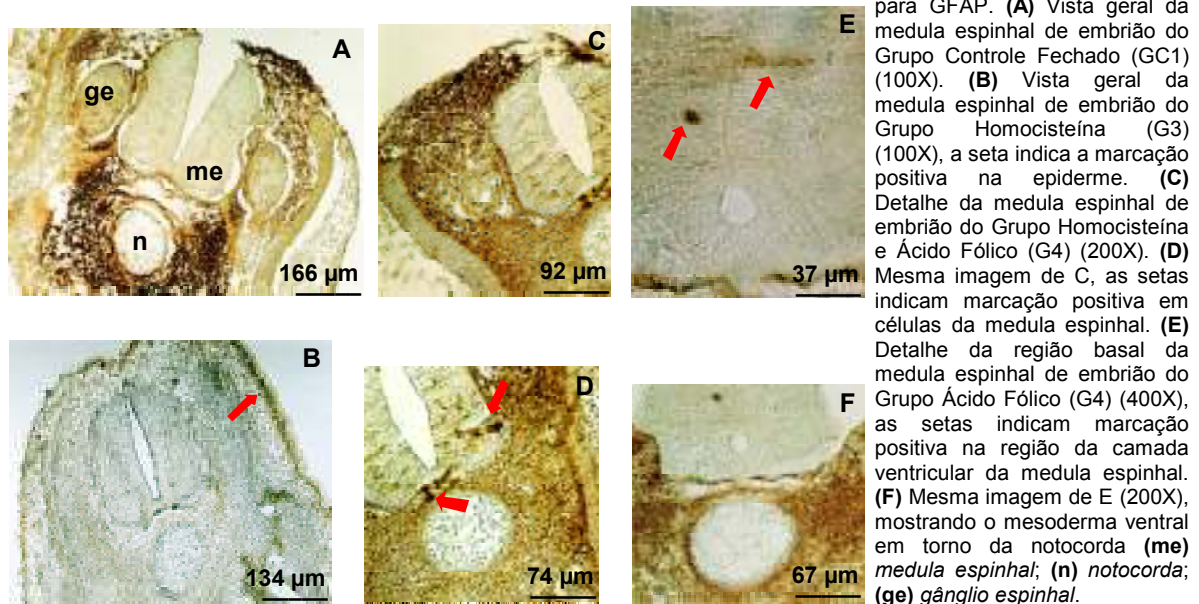


Figura 23: Cortes transversais da região truncal (8 μ m) de embriões de diferentes grupos experimentais submetidos à técnica de imuno-histoquímica para vimentina. (A) Detalhe da medula espinhal de embrião do Grupo Controle Fechado (GC1) (400X). A seta vermelha indica marcação positiva na região apical da camada do manto e a seta azul indica a marcação positiva na região de transição entre as camadas ventricular e do manto. (B) Detalhe da notocorda de embrião do GC1 (400X). (C) Vista geral da medula espinhal de embrião do Grupo Homocisteína (G3) (100X). (D) Vista geral da medula espinhal de embrião do Grupo Ácido Fólico (G5) (100X). (CC) canal central; (CV) camada ventricular; (CM) camada do manto; (n) notocorda.

Já os cortes submetidos à técnica de imuno-histoquímica para GFAP, revelaram extensa marcação positiva em todos os grupos experimentais, em diferentes regiões, com exceção do Grupo Homocisteína (G3), em que a marcação foi positiva somente na região do mesoderma apical e ectoderma

superficial (epiderme). No Grupo Controle Fechado (GC1) observou-se marcação positiva na região do mesoderma apical, gânglios espinhais e no mesoderma ventral adjacente à notocorda. O Grupo Homocisteína e Ácido Fólico (G4) foi reativo ao GFAP em algumas células das camadas ventricular e do manto da medula espinhal. O Grupo Ácido Fólico (G5) revelou marcação positiva em algumas células da camada ventricular da medula espinhal e no mesoderma adjacente à notocorda (figura 24 e tabela 4).



4.4 Detecção de Apoptose no Telencéfalo, Medula Espinhal e Mesoderma

Através da observação dos cortes da região cefálica dos embriões, que foram submetidos à técnica de Hoescht 33258, foi possível observar que no Grupo Controle Salina, tanto na camada do manto, quanto na região do mesoderma adjacente à região dorsal do telencéfalo, não foi evidenciada a presença de células apoptóticas. O contrário foi observado no Grupo Homocisteína e Ácido Fólico (G4), onde tanto na região do mesoderma, quanto na camada do manto, foi possível identificar a presença de células apoptóticas em estágio de condensação da cromatina. Em contrapartida, neste mesmo grupo, foi possível observar

também intensa atividade proliferativa na região ventricular do telencéfalo dorsal (figura 25).

Tabela 4: Quantificação da marcação imuno-histoquímica para vimentina e GFAP na medula espinhal e estruturas próximas dos embriões dos diferentes grupos experimentais. (-) ausência de marcação; (+) marcação leve; (++) marcação moderada; (+++) marcação intensa.

Medula Espinhal e Adjacências	Imuno-marcação	GC1	GC2	G3	G4	G5
Camada do Manto	Vimentina	+	-	-	-	-
Camada Ventricular		+	-	-	-	-
Ectoderma Superficial		-	-	-	-	-
Gânglio Espinhal		-	-	-	-	-
Mesoderma Apical		-	-	-	-	-
Mesoderma Ventral		-	-	-	-	-
Notocorda		++	-	-	-	-
Camada do Manto	GFAP	-	+	-	+	-
Camada Ventricular		-	+	-	+	+
Ectoderma Superficial		+	+	+	+	-
Gânglio Espinhal		++	+	-	++	-
Mesoderma Apical		+++	++	+	+++	-
Mesoderma Ventral		+++	-	-	++	++
Notocorda		-	-	-	-	-

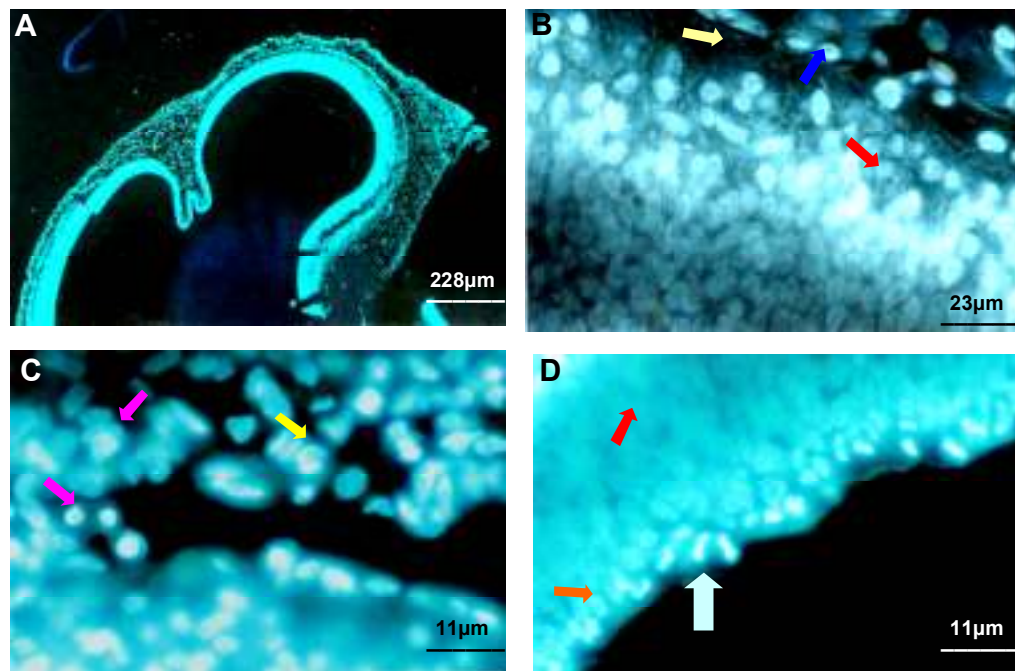


Figura 25: Cortes frontais do telencéfalo (8µm) dos embriões de diferentes grupos experimentais submetidos à técnica de Hoescht 33258. (A) Vista geral do telencéfalo de embrião do Grupo Controle Salina (GC2) (100X). (B) Detalhe da camada do manto do telencéfalo dorsal (seta vermelha), de algumas células do mesoderma adjacente (seta azul) e do limite entre a camada do manto e o mesoderma (seta amarela) de embrião do Grupo Controle Fechado (GC1) (1000X). (C) Detalhe do limite entre a região do mesoderma adjacente à camada do manto do telencéfalo dorsal de embrião do Grupo Homocisteína e Ácido Fólico (G4) (1000X), as setas indicam células apoptóticas em estágio de cromatina condensada na camada do manto (setas cor-de-rosa) e de degradação da cromatina (seta amarela). (D) Detalhe das camadas ventricular (seta laranja) e migratória (seta vermelha) do telencéfalo dorsal de embrião do mesmo Grupo G4 (1000X), a seta azul indica células em divisão celular.

Através da observação dos cortes histológicos da região trunca dos embriões, que foram submetidos à técnica de Hoescht 33258, não foi possível observar a presença de células apoptóticas no Grupo Controle Fechado (GC1), tanto na região da das camadas ventricular e do manto, quanto no mesoderma adjacente ao ápice da medula espinhal. Em contrapartida, no Grupo Homocisteína e Ácido Fólico (G4), na região da camada do manto, foi possível evidenciar a presença de células apoptóticas em diferentes estágios: degradação da cromatina e corpos apoptóticos. No Grupo Controle Salina (GC2) foram encontradas células apoptóticas na região do mesoderma apical da medula espinhal (figura 26).

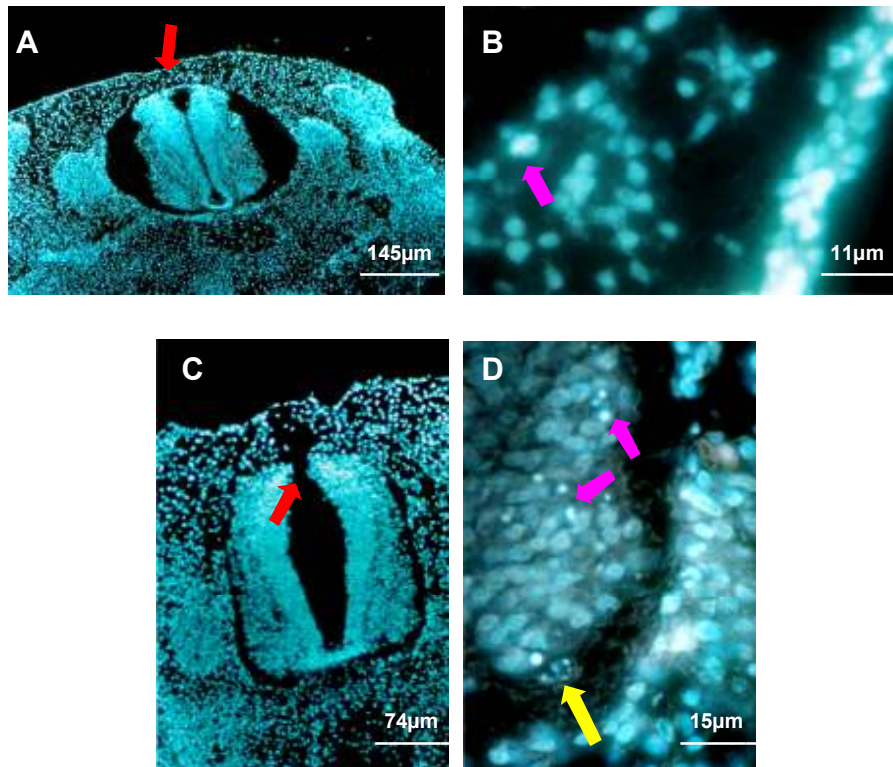


Figura 26: Cortes transversais da medula espinhal (8µm) dos embriões de diferentes grupos experimentais submetidos à técnica de Hoescht 33258. **(A)** Vista geral da medula espinhal de embrião do Grupo Controle Fechado (GC1) (100X), a seta vermelha indica o correto fechamento do TN e do mesoderma apical adjacente. **(B)** Detalhe da região do mesoderma apical da medula espinhal de embrião do Grupo Controle Salina (GC2) (1000X), a seta cor-de-rosa indica célula apoptótica em estágio de cromatina condensada. **(C)** Detalhe da medula espinhal de embrião do Grupo Homocisteína e Ácido Fólico (G4) (200X), a seta vermelha indica o não fechamento do TN. **(D)** Detalhe da região basal da medula espinhal do corte anterior (1000X), as setas indicam células em diferentes estágios de apoptose na camada do manto, corpos apoptóticos (setas cor-de-rosa) e degradação da cromatina (seta amarela).

5 DISCUSSÃO

Nosso objetivo com este trabalho foi avaliar a interferência da homocisteína e do ácido fólico, isoladamente e em conjunto, no processo de desenvolvimento embrionário inicial, com ênfase na neurulação, no padrão morfológico externo e na estrutura organizacional do telencéfalo e medula espinhal; para tanto, utilizamos como modelo animal embriões de *Gallus domesticus*. Estes são utilizados há mais de 100 anos por embriologistas e constituem um excelente modelo para o estudo de desenvolvimento, tanto descritivo quanto experimental, de vertebrados superiores – aves e mamíferos –, animais cujo desenvolvimento apresenta graus de complexidade crescentes que levam a um aumento de volume exponencial (Schoenwolf, 1999).

Ao analisar nossos resultados, encontramos, nos embriões submetidos aos tratamentos com homocisteína e/ou ácido fólico, tanto alterações do padrão morfológico externo, como modificações nas flexuras corporais e hipoplasia mesencefálica, quanto alterações nos processos de proliferação, migração e diferenciação celulares, verificadas através da análise morfométrica e imunohistoquímica do telencéfalo e medula espinhal. Observamos diferenças significativas na espessura média das camadas ventricular e do manto destas estruturas do SNC, e também modificações na localização de elementos do citoesqueleto – filamentos intermediários vimentina e GFAP –, demonstrando que os agentes utilizados interferiram no desenvolvimento do SNC – telencéfalo e medula espinhal embrionária – e também em estruturas adjacentes, como o mesoderma apical e cranial e notocorda.

Com relação ao padrão morfológico externo, foi possível constatar que o tratamento com homocisteína e/ou ácido fólico, interferiu no processo de morfogênese inicial dos embriões de *Gallus domesticus* (96 horas), por ser capaz de modificar, de diferentes maneiras e proporções, as características externas dos embriões. Inclusive, algumas das alterações encontradas estão relacionadas à ocorrência de defeitos do tubo neural (DTNs), como por exemplo, as modificações no padrão das flexuras do eixo corporal, exibidas por alguns embriões.

Jacobson e Tam (1982) *apud* Brook *et al.* (1991) demonstraram, que em embriões de camundongo, há uma considerável redução da flexura cefálica no momento do fechamento do TN na região do mesencéfalo, devido à existência de uma pausa temporária no dobramento axial, que é responsável pela formação desta flexura. Straaten *et al.* (1993) observaram também uma relação direta entre a falha no fechamento do neuróporo posterior e o ângulo de curvatura presente na região caudal de embriões de galinha analisados em culturas, sugerindo que a curvatura do eixo corporal pode ser um mecanismo que regula a neurulação nestes animais.

Partindo do princípio que a neurulação envolve tanto forças intrínsecas – geradas por comportamentos celulares como mudanças na forma, posição e número de células, controle da formação da placa neural e das pregas neurais – quanto extrínsecas ao neuroepitélio – geradas pela ectoderme superficial, mesoderme e endoderme e sua associação com a matriz extracelular (Schoenwolf e Smith, 1990; Lawson *et al.*, 2001), um possível mecanismo, que pode ser considerado durante a regulação deste processo, é o papel da curvatura do eixo corporal (Straaten, *et al.*, 1993).

Uma das hipóteses levantadas para acentuar a curvatura do eixo corporal e, assim, impedir o fechamento do neuróporo posterior, seria a aplicação de um estresse mecânico sobre o neuroepitélio, ou seja, o dobramento na direção ventral faria oposição à elevação e conseqüente fusão das pregas neurais (Brook *et al.*, 1991). Essa relação causa-efeito pôde ser observada em nosso estudo, tendo em vista que a modificação no padrão da flexura dorsal dos embriões apresentou-se com freqüência expressiva (50%), tanto nos embriões do Grupo Homocisteína (G3), quanto nos embriões do Grupo Homocisteína e Ácido Fólico (G4). E após análise histológica da medula espinhal, estes embriões exibiram, em 100% dos cortes, abertura da medula espinhal na região apical – Grupo G4 – acompanhada de falha na fusão do mesoderma adjacente – Grupo G3 – revelando que houve erro no processo de neurulação na região da medula espinhal. Desta forma, se o desenvolvimento não tivesse sido interrompido após 96 horas de incubação (23-25

HH), mas prosseguisse até a eclosão (21 dias), os pintos provavelmente apresentariam DTNs ao nascimento.

Estudos realizados por Epeldegui *et al.* (2002), encontraram, em 46% dos embriões tratados com uma dose de 20 μ mol de L-homocisteína, a ocorrência de DTNs. Rosenquist *et al.* (1996) observaram também, após tratamento com homocisteína, em doses de 10 e 15 μ mol (100 de L-homocisteína e 200mM de D,L-homocisteína), em embriões de galinha doméstica com até 48 horas de desenvolvimento, a taxa de ocorrência de DTN de 27%. Neste estudo, os autores observaram, que na maioria dos casos em que havia fechamento anormal do TN, a medula espinhal e o encéfalo apresentavam maior número de células, porém, estas se organizam de maneira irregular. Além desses defeitos, a duplicação da notocorda também era comum nos embriões tratados com homocisteína.

O Grupo Homocisteína (G3) apresentou, em 20% dos embriões, a modificação no padrão de curvatura do eixo corporal denominada de torção tóraco-lombar. Esta alteração foi relatada também por Rosenquist *et al.* (1999). Neste estudo, 6,4% dos embriões tratados com L-homocisteína (5 μ mol ou 100mM) exibiram torção corporal severa nesta região, acompanhada ou não de DTN. No Grupo Homocisteína e Ácido Fólico (G4), 10% dos embriões apresentaram assimetria de vesículas ópticas, modificação do padrão morfológico registrada também por Maestro de las Casas *et al.* (2003), em que a dose de 20 μ mol de L-homocisteína demonstrou ser teratogênica ao desenvolvimento das estruturas ópticas, levando ao surgimento de malformações como microftalmia e defeitos na formação do cristalino. Rosenquist *et al.* (1999) também encontraram, em embriões tratados com homocisteína, alterações denominadas em seus resultados de defeitos orofaciais, entre estas, encontrava-se desde a ausência até hipoplasia de vesícula óptica.

Embriões do Grupo G4 (10%) e G5 (10%) apresentaram hipoplasia do mesencéfalo, que pode ter como causa diferenças regionais na atividade proliferativa do tubo neural, notocorda, mesoderme e endoderme, tendo em vista que estas podem gerar mudanças no padrão externo do embrião, bem como na morfologia do encéfalo (Takamatsu e Fujita, 1987). Miller *et al.* (2003) também

encontraram, em seus embriões de *Gallus gallus* tratados com D,L-homocisteína (0,5 a 20 μ mol ou 500 a 750mM), uma redução da massa encefálica.

Embora os embriões tratados com ácido fólico tenham apresentado algumas alterações no padrão morfológico, o que não era esperado, já que extensa literatura relata seus efeitos benéficos no processo de desenvolvimento, a frequência dessas alterações foi menor, se comparada aos grupos Homocisteína (G3) e Homocisteína e Ácido Fólico (G4). Tanto que, a porcentagem de embriões que exibiram padrão morfológico normal no Grupo Ácido Fólico (G5) foi bastante similar a dos grupos Controle – 70% – enquanto nos grupos G3 e G4 foi significativamente inferior – 20 e 30%, respectivamente. Há de se considerar, em modelos de desenvolvimento, que embriões são organismos extremamente delicados e complexos, e podem, portanto, ser perturbados durante o curso do desenvolvimento de maneiras inespecíficas, o que por vezes pode comprometer e dificultar a interpretação dos resultados experimentais (Schoenwolf, 2001). Desta forma, apenas a manipulação e injeção de uma substância, embora se espere que esta seja benéfica aos embriões, pode interferir no seu desenvolvimento. O mesmo se aplica para justificar a diferença não significativa das médias de massa corporal entre os grupos, e a diferença significativa, com relação ao estágio de desenvolvimento (HH), somente do Grupo Controle Fechado (GC1) em relação aos demais grupos, tendo em vista que o GC1 não sofreu interferência no seu processo de desenvolvimento até a análise de sua morfologia após 96 horas de incubação.

Entretanto, após análise mais detalhada dos embriões, através da morfometria das regiões cefálica e corporal como um todo, foi possível verificar diferenças no padrão de crescimento das estruturas embrionárias entre os grupos, embora nem sempre estas fossem significativas. Quanto às medidas da região cefálica, por exemplo, os grupos Controle Fechado (GC1) e Controle Salina (GC2) sempre exibiram, com exceção da medida da altura do mesencéfalo, valores médios superiores em relação aos demais grupos que receberam tratamento, com exceção do Grupo Ácido Fólico (G5), que na maioria dos casos exibiu média bastante similar a dos grupos Controle (GC1 e GC2). Este resultado era esperado,

tendo em vista que não localizamos na literatura estudos relatando os efeitos nocivos desta substância ao padrão de crescimento e desenvolvimento de estruturas embrionárias. Pelo contrário, existem estudos epidemiológicos (Daly *et al.*, 1997; Bruin *et al.*, 2003) e experimentais (Rosenquist *et al.*, 1996; Rosenquist *et al.*, 1999; Hansen *et al.*, 2001) que embora recentes, demonstram que o ácido fólico é indispensável ao desenvolvimento embrionário normal, principalmente em estágios iniciais, tendo em vista sua interferência no processo de neurulação (Rosenquist e Finnel, 2001; Calle *et al.*, 2003; Finnel *et al.*, 2004; Molloy, 2005; Björklund e Gordon, 2006).

Em contrapartida, o Grupo Homocisteína (G3) exibiu os menores valores médios em quase todas as medidas cefálicas, sendo a diferença significativa, entre este e o grupo GC1, para a medida da distância cefálica ântero-posterior. O que concorda com os resultados de Greene *et al.* (2003), que demonstraram, que nas doses de 0,5mM ou acima, a exposição de embriões de camundongo em cultura à homocisteína, causa um aumento, dose-dependente, no retardo do crescimento e na letalidade, além de causar anormalidades nos embriões.

Analisando os valores médios apresentados acerca das medidas corporais, foi possível constatar também que a homocisteína foi a substância testada que mais interferiu no padrão de crescimento dos embriões, tendo em vista que os valores médios das medidas de comprimento do vértice à cauda e comprimento total se apresentaram inferiores neste grupo em relação aos demais, embora a diferença não tenha sido significativa.

A análise morfométrica do telencéfalo dos embriões possibilitou identificar a existência de diferenças significativas entre os grupos com relação à organização das camadas celulares desta vesícula encefálica. Os grupos tratados com Homocisteína (G3) e com Homocisteína e Ácido Fólico (G4) exibiram quase sempre os menores valores médios de espessura de ambas as camadas celulares – ventricular e do manto –, tanto na região dorsal quanto lateral do telencéfalo. E após comparar os valores médios do Grupo Homocisteína (G3) com os valores médios dos grupos Controle (GC1 e GC2) e também do Grupo Ácido Fólico (G5), essa diferenças foram, de maneira geral, significativas. Isto demonstra, que a

maior interferência nos processos tanto de proliferação – camada ventricular – quanto de migração e diferenciação celulares – camada do manto – foram provocadas pela homocisteína (Grupo G3). O que era esperado, tendo em vista o fato de que estudos já demonstraram que o efeito da homocisteína sobre a proliferação celular implica que ela exibe características freqüentemente associadas com fatores de crescimento e citocinas. Além disso, sabe-se que a homocisteína funciona como inibidor do receptor NMDA (Rosenquist *et al.*, 1999; Rosenquist e Finnell, 2001), que é o principal regulador da migração neuronal, adesão celular, influxo de Ca^{++} na célula e apoptose; além de atuar como fator de crescimento durante o desenvolvimento neuronal (Medina *et al.*, 2001). Desta forma, níveis elevados de homocisteína tem potencial para alterar os padrões normais de diferenciação e proliferação celulares durante o desenvolvimento (Brauer e Tierney, 2004).

Pelos dados apresentados, percebe-se que a homocisteína alterou de forma significativa dois passos essenciais ao desenvolvimento do telencéfalo, que são a geração e diferenciação das células neurais, que tem início com o surgimento dos neuroblastos e glioblastos em zonas proliferativas adjacentes aos ventrículos, e depois prossegue com a migração dessas células para uma localização mais superficial, quando aí originam as células pós-mitóticas e após diferenciam-se em neurônios ou células gliais (Blaschke *et al.*, 1996).

Este fato pôde ser observado também através da análise das médias das razões camada do manto/ventricular na região dorsal do telencéfalo, visto que a diferença entre o Grupo Homocisteína (G3) e os Grupos Controle (GC1 e GC2) e Ácido Fólico (G5) foi significativa. O Grupo Homocisteína (G3) obteve a razão média mais próxima de um (0,69), isso mostra que a espessura média da camada ventricular era bastante próxima à espessura média da camada do manto. Somando-se ao fato da espessura média da camada do manto também ter sido significativamente inferior neste grupo, conclui-se que houve, especificamente nesta região, menor diferenciação dos neuroblastos no telencéfalo dos embriões tratados com homocisteína, tendo em vista que, com o curso do desenvolvimento, a fração das células que migram a partir da camada ventricular para se diferenciar

aumenta, levando à conseqüente diminuição da população de células progenitoras seguida da cessação da neurogênese (Hanashima *et al.*, 2002).

Observando os mesmos padrões morfométricos, porém analisados na medula espinhal dos embriões, as médias de espessura da camada ventricular foram significativamente superiores no Grupo Controle Fechado (GC1) em comparação com os grupos Homocisteína (G3) e Homocisteína e Ácido Fólico (G4), o que denota novamente a interferência da homocisteína no processo de proliferação celular também nesta região do SNC em desenvolvimento. Já quanto aos processos de migração e diferenciação celular, os resultados foram pouco elucidativos, porque embora a diferença da média de espessura da camada do manto na ME tenha sido significativa entre o Grupo Controle Fechado (GC1) e o Grupo Homocisteína (G3), este último apresentou um valor bastante próximo à média do Grupo Controle Salina (GC2) e superior aos demais, o que interferiu nos valores das razões, obtendo o Grupo Homocisteína (G3) valor bastante próximo ao Grupo Controle Fechado (GC1) e superior aos demais grupos.

Através da análise quantitativa dos cortes da medula espinhal, observamos diferença significativa no número absoluto de células presentes na região do mesoderma apical dos Grupos Controle (GC1 e GC2) em relação aos demais, apresentando novamente o Grupo Homocisteína (G3) a menor média entre eles. Estes dados constituem um resultado bastante interessante, considerando que todos os cortes do Grupo G3 exibiram DTN, com falha na fusão do tecido neural (ME) e da região do mesoderma apical, e levando em conta que estudos recentes demonstraram que a fusão da epiderme e das pregas neurais requer um equilíbrio entre proliferação, sobrevivência celular e apoptose e que perturbações nesse sistema podem levar a falhas nesse processo (Brauer e Tierney, 2004). Há estudos que relacionam a ocorrência de anencefalia – o mais grave DTN – à redução na densidade celular na região do mesoderma cranial, demonstrando que ele potencialmente contribui para o desenvolvimento deste defeito, por ter um papel importante na facilitação da neurulação, contribuindo para a elevação das pregas neurais (Dunlevy *et al.*, 2006; Coop, 2005). Morris e Solursh (1978) *apud* Coop (2005) relataram esta influência em embriões de mamíferos, demonstrando

que a elevação das pregas neurais tem uma fase inicial que consiste na expressiva expansão do mesoderma cranial, com proliferação celular e um considerável aumento no espaço extracelular.

A análise da notocorda, através da contagem direta das células presentes no interior desta estrutura, não revelou diferenças significativas, o que nos faz concluir que as substâncias utilizadas neste trabalho não interferem na formação e/ou regressão da notocorda, e portanto, provavelmente os DTNs causados pela homocisteína não interferem na sinalização feita por esta estrutura durante a neurulação. A notocorda é muito importante durante o processo de desenvolvimento de embriões de cordados, uma vez que as células que a compõem têm origem a partir do nó e/ou linha primitiva durante a gastrulação, o que a torna responsável, em parte, pela padronização do TN e dos somitos através de duas ações: supressão da atividade de fatores de crescimento necessários à dorsalização, e secreção de sinais ventralizantes como o sonic hedgehog (Schoenwolf, 1999).

Por meio da análise imuno-histoquímica do telencéfalo dos embriões, foi demonstrada marcação negativa para o filamento intermediário vimentina em todos os grupos experimentais, tanto na região das camadas celulares, quanto no mesoderma adjacente ao telencéfalo dorsal e lateral. Resultado este que não era esperado, tendo em vista que a presença de fibras radiais positivas à vimentina no telencéfalo de embriões de galinha doméstica foi descrita por Striedter e Beydler (1997) e devido ao fato já estabelecido de que o desenvolvimento do sistema glial em vertebrados é determinado por dois eventos: a substituição de vimentina por GFAP, e a transformação da glia radial em astrócitos (Kálman *et al.*, 1998). Sendo assim, esperava-se que houvesse marcação positiva, para este elemento do citoesqueleto, ao menos nos grupos controle, neste estágio inicial do desenvolvimento (23-25HH). Além disso, sabe-se que as células da glia radial, que orientam a migração dos neuroblastos na camada do manto, expressam vimentina e GFAP (Oudega & Marani, 1991) e já foram reveladas, através do método de Golgi, em embriões de galinha, no 4º dia embrionário (estágio 23–25HH) (Tapscott *et al.*, 1981).

Entretanto, podemos afirmar que este resultado não decorreu de falhas nos procedimentos imuno-histoquímicos, porque realizamos a técnica utilizando duas concentrações diferentes dos anticorpos primário e secundário, e adotamos um controle positivo (cortes de encéfalo de pinto de 7 dias). Neste, houve marcação positiva para vimentina no cerebelo (foto em anexo), o que era esperado, tendo em vista que as células da glia de Bergmann coexpressam vimentina e GFAP (Lazarides, 1982 *apud* Noack *et al.*, 2003). Todavia, enquanto para mamíferos (Bentivoglio e Mazzarello, 1999) está bem documentado que o desaparecimento da glia radial ocorre concomitantemente ao surgimento de astrócitos reativos à GFAP, em aves, principalmente em galinha doméstica, já foi demonstrado que esta interação é menos evidente. A natureza de algumas fibras positivas à GFAP e negativas à vimentina sugere que estas representam processos astrocíticos formados a partir de um mecanismo secundário ao da glia radial (Kálman *et al.*, 1998), o que poderia explicar a ausência de marcação positiva à vimentina no telencéfalo dos embriões em nossos grupos experimentais. Além disso, apesar da intensa investigação já realizada, as funções da vimentina não foram ainda claramente definidas; e já se sabe, que a perda desta abundante proteína é compatível com a vida e não causa alterações evidentes no fenótipo do organismo – camundongo – nem mesmo em culturas celulares (Eckes *et al.*, 1998).

Ao contrário da técnica de imuno-histoquímica para vimentina, quando utilizamos, nos cortes do telencéfalo, o anticorpo para o filamento intermediário GFAP, observamos marcação positiva em diferentes regiões, embora não estivesse presente no telencéfalo de todos os grupos experimentais. O Grupo Controle Salina (GC2) foi o que apresentou marcação mais intensa, tanto nas camadas celulares quanto no mesoderma adjacente à vesícula encefálica. Com base em nossos resultados, e considerando a conexão existente entre citoesqueleto e diferenciação no tecido neural (Björklund e Gordon, 2006) e a contribuição do GFAP na migração dos neuroblastos, embora de forma limitada e mais tardia (Oudega e Marani, 1991), pode-se dizer que os grupos Homocisteína (G3) e Homocisteína e Ácido Fólico (G4) foram os que sofreram maior interferência no processo de diferenciação e maturação celular no telencéfalo, por

apresentar, respectivamente, leve marcação apenas na região da camada ventricular do telencéfalo dorsal e marcação negativa em toda a vesícula encefálica. Por outro lado, o Grupo Ácido Fólico (G5) apresentou marcação semelhante ao Grupo Controle Fechado (GC1), não revelando GFAP na camada do manto e mesoderma adjacente à vesícula encefálica. Em primatas, incluindo o homem, o GFAP foi encontrado, durante o período pré-natal, nas fibras da glia radial (Kálman e Ajtai, 2001).

Partindo para análise da região da medula espinhal e estruturas adjacentes, é difícil tirar conclusões sobre a interferência da homocisteína e/ou ácido fólico, quanto à localização do filamento intermediário vimentina, tendo em vista que houve marcação positiva somente no Grupo Controle Fechado (GC1), em ambas as camadas celulares da ME e também em células localizadas no interior da notocorda. Entretanto, a presença de vimentina na medula espinhal, em embriões de galinha, nos estágios iniciais do desenvolvimento (8–12HH) já está documentada na literatura (Page *et al.*, 1989), bem como em torno da notocorda, nos somitos e nervos espinhais, em estágio 25HH (Noack *et al.*, 2003). Considerando que, no nosso resultado, encontramos células da notocorda com marcação positiva à vimentina e que estas, e também as localizadas em torno desta estrutura, são de origem mesodérmica, a imuno-reatividade nesta região é pertinente (Machado e Figueiredo, 1996).

Já a marcação para GFAP foi bastante intensa e se estendeu por diversas regiões, embora com intensidade e localização diferentes entre os grupos experimentais. Houve marcação para GFAP em células das camadas ventricular e do manto da medula espinhal, o que se contrapõe aos dados de Tapscott *et al.* (1981), pois segundo este estudo, em embriões de galinha doméstica, a imuno-positividade para GFAP foi encontrada entre E11 e E9 na medula espinhal, e nossos embriões encontravam-se em E4 no momento da análise. Entretanto, Cole e Lee (1997) encontraram, nesta mesma espécie, em E7, leve marcação para GFAP em astrócitos nas substâncias branca e cinzenta, e também nas células da camada endimária da medula espinhal. Os grupos experimentais e controles apresentaram também marcação positiva à GFAP nos gânglios espinhais,

provavelmente devido à presença de astrócitos, porém, apresentaram também marcação positiva no ectoderma e mesoderma apical e ventral (adjacente à notocorda), onde não há a presença de astrócitos. Entretanto, a presença do filamento intermediário GFAP já foi descrita em células não-neurais, o que indica que possivelmente ele possua outras funções que ainda não foram descritas, além de participar do processo de diferenciação neural (Hansen, *et al.*, 1989 *apud* Oudega e Marani, 1991).

Em se tratando da questão da ocorrência de morte celular programada, através da aplicação da técnica de Hoescht 33258, foi possível observar somente a presença expressiva de apoptose, tanto no telencéfalo, quanto na medula espinhal e mesoderma adjacente aos mesmos, no Grupo Homocisteína e Ácido Fólico (G4). Provavelmente este efeito ocorreu devido à ação da homocisteína, tendo em vista evidências de que ela esteja envolvida no aumento de quebra do DNA ocasionado por falha na sua metilação, o que conseqüentemente leva à apoptose (Sachdev, 2005).

As análises de Kruman *et al.* (2002) demonstraram que a deficiência de folato e o acúmulo de homocisteína intracelular promovem danos ao DNA neuronal por impedir seu reparo, devido à deficiência de doadores de metil nestas situações. Sabe-se que o sistema nervoso é altamente sensível a esses efeitos, porque a homocisteína é rapidamente captada pelos neurônios por um transportador específico presente na membrana, o que leva rapidamente a altos níveis intracelulares (Grieve *et al.*, 1992). Em nosso estudo, observamos, na camada do manto do telencéfalo dorsal e da medula espinhal de embriões do Grupo Homocisteína e Ácido Fólico (G4), várias células em diferentes estágios de apoptose.

A partir de nossos resultados, evidenciamos a presença de alterações, tanto morfológicas, quanto histológicas e imuno-histoquímicas nos embriões tratados com homocisteína e ácido fólico (Grupo G4). Ou seja, o ácido fólico não pôde reverter, ao menos de forma significativa, o efeito teratogênico da homocisteína. Entretanto, sabe-se que embriões e fetos humanos possuem menos habilidade e eficiência na trans-sulfuração e re-metilação quando

comparados a adultos (Björklund e Gordon, 2006) e em ratos, o tecido neural embrionário tem uma demanda elevada de S-adenosil-metionina (SAM) durante o período crítico de fechamento do TN. É aceitável, portanto, que os embriões, no estágio de desenvolvimento em que as substâncias foram administradas (8-9HH), não tivessem ainda eficiência metabólica suficiente, e, por esse motivo, o ácido fólico pode não ter sido capaz de reverter, de forma significativa, os efeitos nocivos da homocisteína ao desenvolvimento.

Dunlevy *et al.* (2006) encontraram DTNs em embriões de camundongo em cultura, após tratamento com metionina, o que também não era esperado, tendo em vista que a falta de doadores de metil é um dos mecanismos especulados como causa da ocorrência de DTNs (Matson e Shea, 2003; Brauer e Tierney, 2004; Kruman *et al.*, 2002). Para elucidar a questão, eles quantificaram os níveis de SAM e s-adenosil-homocisteína (SAH) em suas culturas de embriões de camundongo (E8,5), e verificaram que houve aumento dos níveis de SAM, provavelmente devido à oferta de metionina, mas também de SAH; e concluíram que a elevação nos níveis de SAH ocorreu devido a um “feedback negativo”, que suprimiu a conversão da homocisteína à metionina, devido à grande oferta desta última. Desta forma, o conseqüente aumento nos níveis de homocisteína levou ao aumento nos níveis de SAH, uma vez que o equilíbrio da reação neste caso favorece à sua formação. E, como para todos os efeitos, sabe-se que a redução na razão SAM/SAH inibe as reações de trans-metilação (Matson e Shea, 2003; Brauer e Tierney, 2004), isto explicaria a ocorrência dos DTNs em seus embriões.

O estudo de Dunlevy *et al.* (2006) demonstrou que o excesso de metionina foi capaz de suprimir o ciclo de metilação, sugerindo que a mesma pode ser contra-indicada como agente protetor, e que, portanto, a regulação do processo é muito tênue, o que pode explicar também a interferência da homocisteína em conjunto com o ácido fólico no processo de desenvolvimento dos nossos embriões, bem como as alterações encontradas nos embriões tratados com ácido fólico.

6 CONCLUSÕES

O tratamento com homocisteína (Grupo G3) foi o que interferiu de maneira mais significativa, tanto no padrão morfológico externo dos embriões, quanto na estrutura organizacional do telencéfalo e medula espinhal embrionária. Tendo em vista que o mesmo exibiu, quase sempre, comportamento significativamente diferente ao dos grupos controle (GC1 e GC2).

O tratamento com ácido fólico (Grupo G5), de maneira geral, não foi capaz de interferir significativamente no padrão morfológico externo e na estrutura organizacional do telencéfalo e medula espinhal embrionária. Tendo em vista que este grupo exibiu, quase sempre, comportamento bastante similar ao dos grupos controle (GC1 e GC2).

Quando utilizamos a homocisteína e o ácido fólico em conjunto (Grupo G4), observamos interferência significativa destes agentes no processo de desenvolvimento dos embriões de *Gallus domesticus*, quando comparado aos grupos controle (GC1 e GC2) e ácido fólico (Grupo G5). Estas diferenças dizem respeito tanto ao padrão morfológico, quanto à estrutura organizacional do telencéfalo e medula espinhal embrionária.

O ácido fólico não foi capaz de reverter, ao menos de forma eficaz, a ação nociva da homocisteína (Grupo G4), tanto sobre o padrão morfológico quanto sobre a estrutura organizacional do telencéfalo e medula espinhal embrionária. Provavelmente, as modificações encontradas, tanto morfológicas, quanto organizacionais, ocorreram devido à imaturidade metabólica dos embriões neste estágio inicial do desenvolvimento (96 horas), desta forma, talvez estes não tenham sido capazes de utilizar o ácido fólico como agente protetor, não anulando, portanto, os efeitos adversos provocados pela homocisteína.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFMAN, L.A.; BLOM, H.J.; DRITTIJ, M.J.; BROUNS, M.R.; STRAATEN, H.W.M. (2005). **Inhibition of transmethylation disturbs neurulation in chick embryos.** Developmental Brain Research 158: 59-65.

ANLAR, B.; ATILLA, T.; CAKAR, N.;TOMBAKOGLU, M.;BULUN, A. (2003). **apoptosis in the developing human brain: a preliminary study of the frontal region.** Early Human Development 71:53-60.

ARIAS, A.M.; STEWART, A. **Molecular Principles of Animal Development.** New York: Oxford, 2002.

AYBAR, M.J.; MAYOR, R.R. (2002). **Early induction of neural crest cells: lessons learned from frog, fish and chick.** Current Opinion in Genetics & Development 12: 452–458.

BEÇAK, W. & PAULETE, J. **Técnicas de Citologia e Histologia.** Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976.

BENTIVOGLIO, M.; MAZZARELLO, P. (1999). **The history of radial glia.** Brain Res Bull 49(5): 305–315.

BLASCHKE, A.J.; STALEY,K.; CHUN, J. (1996). **Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex.** Development 122: 1165-1174.

BJÖRKLUND, N.K.; GORDON, R. (2006). **A hypothesis linking low folate intake to neural tube defects due to failure of post-translations methylations of the cytoskeleton.** Int. J. Dev. Biol. 50:135-141.

BOOT, M.J.; THEUNISSEN-STEEGERS, R.P.M.; POELMANN, R.E.; IPEREN, E.V.; GROOT, A.C.G. (2004). **Cardiac outflow tract malformations in chick embryos exposed to homocysteine.** Cardiovascular Research 64: 365-373.

BRAUER, P.R.; TIERNEY, B.J. (2004). **Consequences of Elevated Homocysteine During Embryonic Development and Possible Modes of Action.** Curr Pharm Des 10:2719-32.

BROOK, F.A.; SHUM, A.S.W.; STRAATEN, H.W.M van; COPP, A.J. (1991). **Curvature of the caudal region is responsible for failure of neural tube closure in the curly tail (ct) mouse embryo.** Development 113: 671-678.

BRUIN, K.M.P.; HEIJDEN, P.G.M.; BUITENDIJK, S.E.; OUDEN, A.L. (2003). **Periconceptional folic acid use and the prevalence of neural tube defects in the Netherlands.** Eur Jour of Obst & Gyn and Rep Bio 108: 33-39.

BUSS, R.R.; SUN, W.; OPPENHEIM, R.W. (2006). **Adaptative Roles of Programmed Cell Death During Nervous System Development**. *Annu Rev Neurosci* 29: 1-35.

CALLE, M.; USANDIZAGA, R.; SANCHA, M.; MAGDALENO, F.; HERRANZ, A.; CABRILLO, E. (2003). **Homocysteine, folic acid and B-group vitamins in obstetrics and gynaecology**. *Eur Jour Obst Gyn and rep Bio* 107:125-134.

CATALA, M. **Embriologia: Desenvolvimento Humano Inicial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

CHOI, S.W.; MASON, J.B. (2000). **Folate and carcinogenesis: an integrated scheme**. *J Nutr* 130: 129-132.

COLE, G.J.; LEE, J.-A. (1997). **Immunocytochemical localization of a novel radial glial intermediate filament protein**. *Developmental Brain Research* 101: 225-238.

CORNEL, M.C.; ERICKSON, J.D. (1997). **Comparison of national policies on periconceptional use of folic acid to prevent spina bifida and anencephaly (SBA)**. *Teratology* 55: 134-137.

COPP, A.J. (2005). **Neurulation in the cranial region-normal and abnormal**. *J. Anat.* 207: 623-635.

DALY, S.; MILLIS, J.L.; MOLLOY, A.M.; CONLEY, M.; LEE, Y.J.; KIRKE, P.N.; WEIR, D.G.; SCOTT, J.M. (1997). **Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects**. *Lancet* 350: 1666-1669.

DIAS, P.F. **Estudo da ação de fatores físicos e químicos sobre a morfogênese de embriões de *Gallus gallus domesticus*, com ênfase no desenvolvimento do sistema nervoso central**. 1996. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

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

DUNLEVY, L.P.E.; BURKEN, K.A.; CHITTY, L.S.; COOP, A.J.; GREENE, N.D.E.; (2006). **Excess methionine suppresses the methylation cycle and inhibits neural tube closure in mouse embryos**. *FEBS Letters* 580: 2803-2807.

ECKES, B.; DOGIC, D.; COLUCCI-GUYON E.; WANG, N; MANIOTIS, A.; INGBER, D.; MERCKLING A.; LANGA, F.; AUMAILLEY, M.; DELOUVÉE, A.; KOTELIANSKY, V.; BABINET, C.; KRIEG, T. (1998). **Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentindeficient fibroblasts**. *Journal of Cell Science* 111:1897 -1907.

EPELDEGUI, M.; PENA-MELIAN, A.; VARELA-MOREIRAS, G.; PEREZ-MIGUELSANZ, J. (2002). **Homocysteine Modifies Development of Neurulation and Dorsal Root Ganglia in Chick Embryos**. *Teratology* 65: 171-179.

FERRER, I.; BERNET, E.; SORIANO, E.; DELRIO, T.; FONSECA, M. (1990). **Naturally occurring cell death in the cerebral cortex of rat and removal of the dead cells by transitory phagocytes**. *Neuroscience* 1990; 39: 451–8

FINNEL, R.H.; SHAW, G.M.; LAMMER, E.J.; BRANDL, K.L.; CARMICHAEL, S.L.; ROSENQUIST, T.H. (2004). **Gene-nutrient interactions: importance of folates and retinoids during early embryogenesis**. *Tox Appl Pharm* 198: 75-85.

GALOU, M.; COLUCCI-GUYON, E.; ENSERGUEIX, D.; RIDET J.L.; RIBOTTA, M.G.; PRIVAT, A.; BABINET, C.; DUPOUEY, P. (1996). **Disrupted glial fibrillary acidic protein network in astrocytes from vimentin knockout mice**. *J.Cell Biol.* 133:853–863.

GILBERT, SF. **Developmental Biology**. 6 ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2000.

GILBERT, S.F.; RAUNIO, A.M. **Embryology: Constructing the Organism**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1997.

GOODRUM, G.R.; JACOBSON, A.G. (1981). **Cephalic Flexure Formation in the Chick Embryo**. *The Journal of Experimental Zoology* 216: 399-408.

GÖTZ, M.; HARTFUSS, E.; MALATESTA, P. (2002). **Radial glial cells as neuronal precursors: A new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice**. *Brain Research Bulletin* 57(6): 777–788.

GREENE, N.E.; DUNLEVY, L.E, COPP, A.J. (2003). **Homocysteine is embryotoxic but does not cause neural tube defects in mouse embryos**. *Anat. Embryol.* 206 185– 191.

GRIEVE, A.; BUTCHER, S.P.; GRIFFITHS, R. (1992). **Synaptosomal plasma membrane transport of excitatory sulphur amino acid transmitter candidates: kinetic characterization and analysis of carrier specificity**. *J Neurosci Res* 32: 60-68.

HAMBURGUER, V.; HAMILTON, H. (1951). **A Series of Normal Stages in the Development of the Chick Embryo**. *Journal of Morphology*, 88: 49-92.

HANASHIMA, C.; SHEN, L.; LI, S.C.; LAI, E. (2002). **Brain Factor-1 Controls the Proliferation and Differentiation of Neocortical Progenitor Cells through Independent Mechanisms**. *The journal of Neuroscience* 22 (15): 6526-6536.

HANSEN, D.K.; BARBEE, S.A.; GRAFTON, T.F.; GU, Y.; STRECK, R.D. (2001). **Antisense modulation of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase expression produces neural tube defects in mouse embryo.** *Reproductive Toxicology* 15:21-29.

HATTEN, M.E. (1999). **Central Nervous System: Neuronal Migration.** *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 511–39.

KÁLMAN, M.; AJTAI, B.M. (2001). **A comparison of intermediate filament markers for presumptive astroglia in the developing rat neocortex: immunostaining against nestin reveals more detail, than GFAP or vimentin.** *Int. J. Devl. Neurosc.* 19: 101-108.

KÁLMAN, M.; SZÉKELY, A.D.; CSILLAG, A. (1998). **Distribution of glial fibrillary acidic protein and vimentin-immunopositive elements in the developing chicken brain from hatch to adulthood.** *Anat Embryol* 198: 213-235.

KAUFMANN, S.H.; HENGARTNER, M.O. (2001). **Programmed cell death: alive and well in the new millennium.** *Trends Cell Biol.* 11:526–34.

KRUMAN, I.I.; KUMARAVEL, T.S.; LOHANI, A.; WARD, A.P.; CUTLER, R.G.; KRUMAN, Y.; HAUGHEY N.; LEE, J.; EVANS, M.; MATTSON, M.P. (2002). **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* 22 (5): 1752-62.

KUAN, C.Y.; ROTH, K.A.; FLAVELL, R.A.; RAKIC, P. (2000). **Mechanisms of programmed cell death in the developing brain.** *Trends Neurosci.* 23:291–97.

LAWSON, A.; ANDERSON, H.; SCHOENWOLF, G. (2001). **Cellular Mechanisms of Neural Fold Formation and Morphogenesis in the Chick Embryo.** *The Anatomical Record* 262: 153 – 168.

LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociência.** São Paulo: Atheneu, 2002.

LIMPACH, A.; DALTON, M.; MILES, GADSON, P. (2000). **Homocysteine Inhibits Retinoic Acid synthesis: A Mechanism for Homocysteine-Induced Congenital Defects.** *Exp Cell Res* 260: 166-74.

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

MACHADO, G.; FIGUEIREDO, F. (1996). **Revisão: Filamentos Intermediários.** *Medicina, Ribeirão Preto* 29: 104-113.

MAESTRO DE LAS CASAS, C.; EPELDEGUI, M.; TUDELA, C.; VARELA-MOREIRAS, G.; PEREZ-MIGUELSANZ, J. (2003). **High exogenous Homocysteine Modifies eye development in Early Chick Embryos**. Birth Defects Res (Part A) 67: 35-40.

MAGALDI, M.A. **Construcciones manejo y alimentación**. In: Produccion de Aves. Ed. Cathebra, Argentina. 259-278. 1974.

MARGOTTA, V.; MORELLI, A. (1997). **Contribution of radial glial cells to neurogenesis and plasticity of central nervous system in adult vertebrates**. Anim. Biol. 6:101–108.

MATTSON, MP.; SHEA, TB. (2003). **Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders**. Trends in Neurosciences 26:137-46.

MEDINA, M.A.; URDIALES, J.L.; SÁNCHEZ-AMORES, M.I. (2001). **Roles of Homocysteine in Cell Metabolism – Old e New Functions**. Eur. J. Bioch. 268: 3871-3882.

MELEADY, R.; UELAND, P.M.; BLOM, H.; WHITEHEAD, A.S.; REFSUN, H.; DALY, L.E.; VOLLSET, S.E.; DONOHUE, C.; GIESENDORF, B.; GRAHAM, I.M.; ULVIK, A.; ZHANG, Y.; MONSEN, A.L.B. (2003). **Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase, homocysteine, and cardiovascular disease risk: the European Concerted Action Project1–3**. Am J Clin Nutr 77:63–70.

MILLER, R.R.; LEANZA, C.M.; PHILLIPS, E.E.; BLACQUIRE, K.D. (2003). **Homocysteine-induced changes in brain membrane composition correlate with increased brain caspase-3 activities and reduced chick embryo viability**. CBP, 136B:521-32.

MOLLOY, A.M. (2005). **The role of folic acid in the prevention of neural tube defects**. Food Sci & Tech 16:241-45.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia Clínica**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

NADARAJAH, B.; PARNAVELAS, J.G. (2002). **Review: Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex**. Neuroscience 3: 423-432.

NOACK, C.; PROLS, F.; GAMEL, A.J.; RIST, W.; MAYER, M.P.; SABERI, B.B. (2003). **Revisiting vimentin expression in early chick development**. Anat Embryol 206:391–397.

OAKLEY, G.P.; JOHNSTON, R.B. (2004). **Balancing benefits and harms in public health prevention programmes mandated by governments.** *BMJ* 329:41-3.

OLNEY, R.S.; MULINARE, J. (2002). **Trends in neural tube defect prevalence, folic acid fortification and vitamin supplement use.** *Semin. Perinatol.* 26: 277-285.

OPPENHEIM, R.W. (1991). **Cell death during development of the nervous system.** *Annu Rev Neurosci* 14: 453– 501.

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

OUDEGA, M.; MARANI, E. (1991). **Expression of vimentin and glial fibrillary acidic protein in the developing rat spinal cord: an immunocytochemical study of the spinal cord glial system.** *J. Anat* 179: 97-114.

PIXLEY, S.K.; VELLIS, J. (1984). **Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin.** *Brain research* 317(2): 201-209.

PAGE, M. (1989). **Changing patterns of cytokeratins and vimentin in the early chick embryo.** *Development* 105:97–107.

PETTMANN, B.; HENDERSON, C.E. (1998). **Neuronal cell death.** *Neuron* 20:633–47.

POLLARD, T.D.; EARNSHAW, W.C. **Biologia Celular.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

RAMAERKS, V. T.H.; BLAU, N. (2004). **Cerebral Folate Deficiency.** *Developmental Medicine & Child Neurology* 46: 843–851.

REHEN, S.K.; MCCONNELL, M.J.; KAUSHAL, D.; KINGSBURY, M.A.; YANG, A.H.; CHUN, J. (2001). **Chromosomal variation in neurons of the developing and adult mammalian nervous system.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:13361–66.

ROESSMANN, U.; VELASCO, M.E.; SINDELY, S.D.; GAMBETTI, P. (1980). **Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in ependymal cells during development: an immunocytochemical study.** *Brain Research* 200: 13-22.

ROMBOLI, I., MORI, B., SALAMI, A. & FEDELI-AVANZI, C. (1984). **Storage Condition and Hatchability in Muscovy Duck Eggs.** *Proceedings and Abstracts. Finnish Branch of the World's Poultry Science Associated*, 218-219.

ROSENQUIST, TH.; RATASHACK SA.; SELHUB, J. (1996). **Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: effect of folic acid.** Proc Natl Acad Sci USA 93: 15227-32.

ROSENQUIST, T.H; SCHNEIDER, A.M; MONAGHAN, D.T. (1999). **N-methyl_D-aspartate receptor agonists modulate homocysteine-induced developmental abnormalities.** TheFASEB Journal 13: 1523-31.

ROSENQUIST, T.H.; FINNELL, R.H. (2001). **Genes, folate and homocysteine in embryonic development.** Proceedings of the Nutrition Society 60: 53-61.

SACHDEV, P.S. (2005). **Homocysteine and Brain Atrophy.** Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 29: 1152-1161.

SADLER, TW. **LANGMAN: Embriologia Médica.** 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1997.

SANES, J.R. **On the Republication of the Hamburger-Hamilton Stage Series.** Developmental Dynamics 1992, 195: 229-230.

SCHATZ, J. C. **Caracterização Morfológica de Embriões de *Gallus domesticus*, expostos ao acetato de chumbo, com ênfase na sua ação em nível tecidual e celular na medula.** 2003. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SCHOENWOLF, G.C.; SMITH, K.L. (1990). **Mechanisms of neurulation: traditional viewpoint and recent advances.** Development 109: 243-270.

SCHOENWOLF, G.C. (1999). **The Avian Embryo: A Model for descriptive and Experimental Embryology.** In: *Lineage and Fate Determination* (MOODY, S.A, eds.), Academic Press, London.

SCHOENWOLF, G.C. (2001). **Cutting, Pasting and Painting: Experimental Embryology and Neural Development.** Nature Reviews 2:763-771.

SMITH, J.L, SCHOENWOLF G.C. (1997). **Neurulation: coming to closure.** Trends Neurosci 20:510–517.

SIMONATI, A.; ROSSO, T.; RIZZUTO, N. (1997). **DNA fragmentation in normal development of the human central nervous system: a morphological study during corticogenesis.** Neuropathology and Applied Neurobiology 23: 203-211.

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

STRAATEN, H.W.M van; HEKKING, J.W.M.; CONSTEN, C.; COPP, A.J. (1993). **Intrinsic and Extrinsic factors in the mechanism of neurulation: effect of curvature of the body axis on closure of the posterior neuropore.** *Development* 117: 1163-1172.

STRIEDTER, G.F.; BEYDLER, S. (1997). **Distribution of radial glia in the developing telencephalon of chicks.** *J Comp Neurol* 387:399– 421.

TAKAMATSU, T.; FUJITA, S. (1987). **Growth of Notochord and Formation of Cranial and Mesencephalic Flexures in Chick Embryo.** *Develop. Growth and Differ.* 29 (5): 497-502.

TAPSCOTT, S.J; BENNETT, G.S.; TOYAMA, Y.; KLEINBART F.; HOLTZER, H. (1981). **Intermediate filament proteins in the developing chick spinal cord.** *Dev Biol* 86:40–54.

UELAND, P.M.; REFSUM, H.; STABLER S.P.; MALINOW, M.R.; ANDERSSON A.; ALLEN, R.H. (1993). **Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications.** *Clin Chem* 39: 1764-79.

VERMA, R.S.; BABU, A. **Human chromosomes: principles and techniques.** 2ed. New York: MacGraw-Hill, 1995.

WELCH, G.N.; LOSCALZO, J. (1998). **Homocysteine and atherothrombosis.** *N Engl J Med* 338: 1042-1058.

WILSON, L.; MADEN, M.T. (2005). **The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube.** *Developmental Biology* 282(1): 1-13.

WOLPERT, L. *et al.* **Principles of Development.** NY: Oxford University Press. 1998.

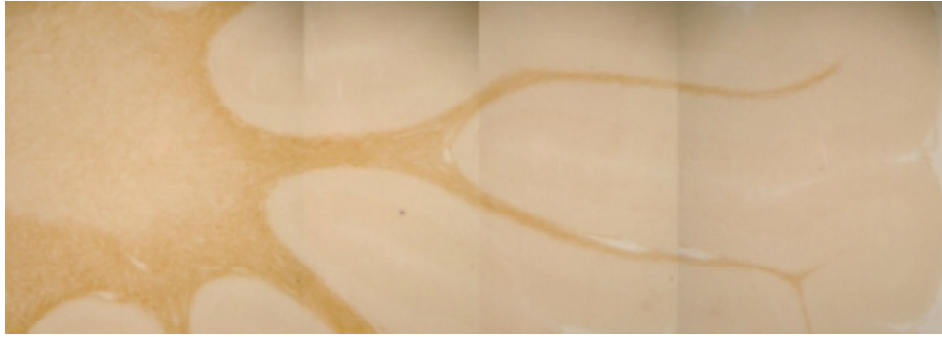
WONG, KIT; W.U, JANE Y.; RAO, Y.I. Neuronal Migration: Introductory Structures and Processes *Developmental Biology.* **In: *Encyclopedia of Life Sciences.*** Washington: Macmillan, 2002.

YEO,W.; GAUTIER, J. (2003). **A role for programmed cell death during early neurogenesis in *Xenopus*.** *Dev. Biol.* 260:31–45.

YUAN, J.; YANKNER, B.A. (2000). **Apoptosis in the nervous system.** *Nature* 407:802–9.

ZHU, H.; WICKER, N.J.; SHAW, G.M.; LAMMER, E.J.; HENDRICKS, K.; SUAREZ, L.; CANFIELD, M.; FINNEL, R.H. (2003). **Homocysteine remethylation enzyme polymorphisms and increased risks for neural tube defects.** *Mol Gen Met* 78:216-21.

ANEXO



Corte sagital de cerebello de pinto de 7 dias submetido à marcação imuno-histoquímica para vimentina (40X).