

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO
Curso de Biomedicina

LETTICIA PORTO DE LIMA E SILVA

**MECANISMOS MORFOGENÉTICOS ASSOCIADOS
À OCORRÊNCIA DE ESPINHA BÍFIDA**

SÃO PAULO
2017

Leticia Porto de Lima e Silva

**MECANISMOS MORFOGENÉTICOS ASSOCIADOS
À OCORRÊNCIA DE ESPINHA BÍFIDA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pelo Prof. Dr. Renato Borges Tesser e coorientado pela Profa. Dra. Samara Urban de Oliva, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

SÃO PAULO

2017

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Inocente Radrizzani

Silva, Letticia Porto de Lima e

Mecanismos morfogenéticos associados à ocorrência de espinha bífida / Ana Carolina Silva Cruz. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2017.

73 p.

Orientação de Renato Borges Tesser

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2017.

1. Ácido fólico 2. Defeitos do tubo neural 3. Disrafismo espinal 4. Fetoscopia 5. Genes 6. Meningomielocoele I. Tesser, Renato Borges II. Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 573.21

Leticia Porto de Lima e Silva

**MECANISMOS MORFOGENÉTICOS ASSOCIADOS
À OCORRÊNCIA DE ESPINHA BÍFIDA**

São Paulo, 21 de outubro de 2017

Professor orientador: Prof. Dr. Renato Borges Tesser

Professor examinador: Profa. Dr. Ilka Schincariol Vercellino

SILVA, L. P. L.. **Mecanismos morfogênicos associados à ocorrência de espinha bífida**. 2017. 75 f. TCC (Graduação) - Curso de Biomedicina, Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2017.

A formação da medula espinal e das vértebras é um processo que envolve mecanismos celulares e moleculares altamente complexos. Falhas neste processo são comuns e resultam em anomalias congênitas, que acarretam alta morbidade e mortalidade, como é o caso da espinha bífida. O objetivo desta revisão bibliográfica é abordar alguns dos mecanismos morfogênicos relacionados à ocorrência de espinha bífida. A ocorrência da espinha bífida está relacionada a falha na fusão dos arcos vertebrais, geralmente na região lombar, em graus variáveis e que envolvem a espinha bífida oculta e a espinha bífida cística. Por sua vez, a espinha bífida cística inclui a meningocele, onde ocorre a protrusão somente das meninges, e mielomeningocele, em que há protrusão de elementos da medula espinal e/ou nervos e de meninges. Apesar da possível correção cirúrgica nos casos de mielomeningocele, a lesão neurológica acarretada é permanente. Vários genes candidatos envolvidos na gênese da espinha bífida estão sendo estudados, dentre os quais se destacam metabolismo do folato (gene MTHFR), à indução da proliferação e diferenciação de células na notocorda (gene SHH), à formação e diferenciação de somitos (fatores de crescimento PDGF e PDGFR) e a família de genes PAX, que são expressos durante a embriogênese e são de extrema importância no desenvolvimento do tubo neural, bem como a formação normal da medula espinal e das vértebras. Diversos fatores ambientais também parecem estar envolvidos na etiologia da espinha bífida, sendo a deficiência de ácido fólico o fator mais importante. Desta forma, a suplementação alimentar com ácido fólico, tanto no período periconcepcional, como no gestacional, mostrou-se efetivo na prevenção da espinha bífida, reduzindo aproximadamente de 50 a 75% dos casos. No entanto, os mecanismos pelo qual o ácido fólico promove esse efeito benéfico na gravidez ainda não estão bem estabelecidos. Evidências bioquímicas, genéticas e epidemiológicas levaram ao desenvolvimento de hipóteses correlacionando o ácido fólico à estimulação da metilação do DNA. Casos específicos de espinhas bífidas podem ser devidamente reparados pela cirurgia intrauterina, em fetos diagnosticados com mielomeningocele a partir da ultrassonografia convencional, minimizando as sequelas e melhorando o prognóstico frente a esta anomalia. Como muitos desses mecanismos são ainda desconhecidos é de grande relevância a continuidade das pesquisas para um maior entendimento dos mecanismos morfogênicos associados à espinha bífida assim como o aperfeiçoamento dos tratamentos para a redução das sequelas nos pacientes acometidos por esta malformação.

Palavras chave: 1. Ácido fólico 2. Defeitos do tubo neural 3. Disrafismo espinal 4. Fetoscopia 5. Genes 6. Meningomielocele.

SILVA, L. P. L.. **Morphogenetic mechanisms associated with the occurrence of spina bifida**. 2017. 75 f. TCC (Undergraduate) - Biomedicine Course, Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2017.

The formation of the spinal cord and vertebrae is a process involving highly complex cellular and molecular mechanisms. Failures of this process are common and result in congenital anomalies, which lead to high morbidity and mortality, as the spina bifida. The objective of this review is to approach some of the morphogenetic mechanisms related the occurrence of spina bifida. The occurrence of spina bifida development is related to failure of fusion the vertebral arches, usually in the lumbar region, to varying degrees and involving the occult spina bifida and cystic spina bifida. In turn, the cystic spina bifida includes the meningocele, where the protrusion occurs only of the meninges, and myelomeningocele, in which there are protrusion of elements from the spinal cord and / or nerves and meninges. Despite the possible surgical correction in cases of myelomeningocele, the neurological injury involved is permanent. Several candidate genes involved in spina bifida genesis are being studied, such as those folate metabolism (MTHFR gene), the induction of cell proliferation and differentiation in notochord (SHH gene), the formation and differentiation of somites (PDGF and PDGFR) and the family of PAX genes, which are expressed during embryogenesis and that are of extreme importance in the neural tube development, as well as normal formation of the spinal cord and vertebrae. Several environmental factors also appear to be involved in the etiology of spina bifida, with folic acid deficiency being the most important factor. Thus, supplementation with folic acid, both in the periconceptional and gestational periods, was effective in preventing spina bifida, reducing approximately 50 to 75% of the cases. However, the mechanisms by which folic acid promotes beneficial effect in pregnancy are not yet well established. Biochemical, genetic and epidemiological evidences led to the hypotheses correlating folic acid with the stimulation of DNA methylation. Specific cases of spina bifida can be adequately repaired by intrauterine surgery in fetuses diagnosed with myelomeningocele from conventional ultrasonography, minimizing the sequelae and improving the prognosis of this anomaly. As many of these mechanisms are still unknown, the conducting research is of great relevance for a better understanding of the morphogenetic mechanisms associated with spina bifida as well as the improvement of treatments for the reduction of sequelae in the patients affected by this malformation.

Key words: 1. Folic acid 2. Neural tube defects 3. Spinal dysraphism 4. Fetoscopy 5. Genes 6. Meningomyelocele.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	6
2 OBJETIVOS	8
2.1 OBJETIVO GERAL	8
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
3 MATERIAL E MÉTODOS	9
4 DESENVOLVIMENTO	10
4.1 Espinha Bífida	10
4.2 Formação do tubo neural: neurulação primária e secundária	12
4.3 Diferenciação da medula espinal	21
4.4 Somitogênese	28
4.5 Interação entre tubo neural e mesoderma paraxial	32
4.6 Metabolismo do folato	34
4.7 Mecanismos fisiopatológicos da espinha bífida	39
4.8.1 Gene MTHFR (Metilenotetrahidrofolato Redutase)	43
4.8.2 Via de sinalização SHH	45
4.8.3 PDGF, PDGFR α e sinalização PI3K	48
4.8.4 Família de genes PAX	51
4.9 Fatores ambientais relacionados à ocorrência de espinha bífida	54
4.10 Prevenção da espinha bífida por meio da suplementação com ácido fólico	56
4.11 Procedimento cirúrgico in útero para correção da espinha bífida	58
5 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

Os defeitos do tubo neural (DTN) incluem malformações que ocorrem na fase inicial do desenvolvimento fetal, entre a terceira e a quinta semana de gestação, envolvendo estruturas embrionárias que darão origem ao encéfalo, a medula espinal, os ossos da abóbada craniana e as vértebras. Dentre estas anomalias, a anencefalia e a espinha bífida respondem por cerca de 90% de todos os casos de defeitos do tubo neural (SANTOS; PEREIRA, 2009).

A prevalência destes defeitos congênitos varia devido a fatores geográficos, socioeconômicos, sazonais e raciais, sugerindo complexa interação de múltiplos fatores ambientais e de fatores genéticos (AGUIAR et al., 2003). No Brasil, estima-se uma taxa de ocorrência em torno de 1,6/1.000 nascidos vivos (NASSER et al., 2005).

A ocorrência da espinha bífida está relacionada a falha na fusão dos arcos vertebrais, geralmente na região lombar, em graus variáveis e que envolvem a espinha bífida oculta e a espinha bífida cística. Por sua vez, a espinha bífida cística inclui a meningocele, onde ocorre a protrusão somente das meninges, e mielomeningocele, em que há protrusão de elementos da medula espinal e/ou nervos e de meninges (AGUIAR, et al. 2003; BAILEY, et al., 2003; FREY; HAUSER, 2003; CUNHA, 2005).

Apesar da possível correção cirúrgica nos casos de mielomeningocele, a lesão neurológica acarretada é permanente, podendo resultar no comprometimento dos movimentos voluntários e involuntários. Além do comprometimento físico, a maior parte dos indivíduos afetados também apresenta dificuldade de aprendizado. Os DTN são determinantes importantes de morbimortalidade perinatal. Crianças com meningocele e mielomeningocele têm uma taxa de sobrevivência maior, geralmente devida a extensivos tratamentos médicos e cuidados cirúrgicos. O seu risco de morte depende da gravidade da lesão e de outros fatores, como disponibilidade de recursos médicos e cirúrgicos. Já a espinha bífida oculta pode evoluir de forma assintomática, durante toda a vida (BOTTO et al., 1999).

Vários genes candidatos envolvidos na gênese da espinha bífida estão sendo estudados, dentre os quais se destacam aqueles associados ao metabolismo do ácido fólico, como por exemplo o gene que codifica a enzima 5,10 metileno-tetra-hidrofolato-redutase (gene MTHFR), a qual está envolvida na remetilação de homocisteína em metionina. Diversos pesquisadores relatam aumento na frequência do polimorfismo C677T do gene MTHFR, tanto em homozigose como em heterozigose, em pacientes com espinha bífida, bem como em suas mães (AGUIAR et al., 2003).

Diversos fatores ambientais também parecem estar envolvidos na etiologia da espinha bífida, sendo a deficiência de ácido fólico o fator mais importante identificado. O exato mecanismo com que a deficiência do ácido fólico está envolvida na embriogênese desta malformação é pouco conhecido. No entanto, a suplementação periconcepcional e durante o primeiro trimestre de gravidez com ácido fólico tem reduzido em cerca de 50 a 70% os riscos de ocorrência e de recorrência da espinha bífida (AGUIAR et al., 2003). Outros fatores de risco para a espinha bífida incluem a presença de diabetes mellitus materno, o uso de ácido valpróico para tratamento de epilepsia durante a gestação, a obesidade materna, a deficiência de zinco e a hipertermia (NORTHRUP; VOLCIK, 2000).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi abordar os mecanismos morfogenéticos relacionados à espinha bífida em comparação com o desenvolvimento embrionário normal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever o desenvolvimento embriológico normal da medula espinal e das vértebras;
- Compreender os complexos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na formação da medula espinal e das vértebras;
- Caracterizar e descrever os eventos morfogenéticos relacionados a gênese da espinha bífida;
- Relacionar a suplementação com ácido fólico e a prevenção na ocorrência de espinha bífida;
- Apresentar procedimentos cirúrgicos in útero para a correção de espinha bífida.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada uma revisão bibliográfica por meio de pesquisa em artigos científicos publicados em revistas indexadas e nas bases de dados eletrônicas: PubMed, Scielo e MedLine. Em todas as bases foram realizadas pesquisas simples, sem restrições quanto ao tipo de estudo, ano de publicação, idioma, campo de busca, espécie e gênero estudados. Como estratégia de busca foram utilizados os descritores: spina bifida (espinha bífida); genetics/genes (genética/genes); folic acid (ácido fólico); fetal surgery (cirurgia fetal); myelomeningocele (Mielomeningocele); neural tube defects (defeitos do tubo neural); risk factors (fatores de risco); meningocele; gene SHH; genes PAX; PI3K signaling pathway (via de sinalização PI3K); receptor PDGFRa; PDGF; gene MTHFR.

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 Espinha Bífida

A espinha bífida consiste em uma malformação congênita ocasionada por um fechamento inadequado da extremidade inferior do tubo neural, fazendo com que os arcos vertebrais não se desenvolvam corretamente. Representa cerca de 75% das malformações relacionadas ao tubo neural e pode afetar todo o seu comprimento ou se limitar a uma determinada área. Os tipos mais comuns de espinha bífida são a mielomeningocele e a meningocele, com incidência de 0,5 a 0,8 por 1000 nascimentos, as quais estão associadas com uma protrusão cística contendo somente as meninges (meningocele) ou incluir estruturas da medula espinal (mielomeningocele). Estas formas císticas de espinha bífida podem resultar em graves sequelas neurológicas, apresentando mortalidade neonatal aproximada de 33% e a ocorrência de sequelas é em cerca de 65% nos sobreviventes (AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIAN AND GYNECOLOGIST, 1986; AGUIAR et al., 2003).

Outra variante da espinha bífida, que é recoberta por pele, é a espinha bífida oculta. Sua incidência é de 0,1 a 0,14 por 1000 nascimentos e estima-se que 5 a 10% da população possa ser portadora assintomática de algum grau desta anomalia congênita. (Figura 1) (AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIAN AND GYNECOLOGIST, 1986; AGUIAR et al., 2003).

Na meningocele, a medula e as raízes nervosas cobertas pela dura-máter não são malformadas, possibilitando um desenvolvimento normal do feto e da criança. Entretanto, na mielomeningocele, as raízes que partem da medula espinal sofrem alterações por estarem expostas e geralmente estão entre L5 e S1, podendo estar associada à hidrocefalia. Nestes casos, a intervenção cirúrgica necessita ser rápida e consiste na realocação da medula espinal e de suas raízes nervosas para o interior do canal vertebral, sutura do saco dural e fornecimento de um revestimento cutâneo adequado (PIERRE-KAHN, 1990).

Figura 1: Representação dos tipos de espinha bífida.

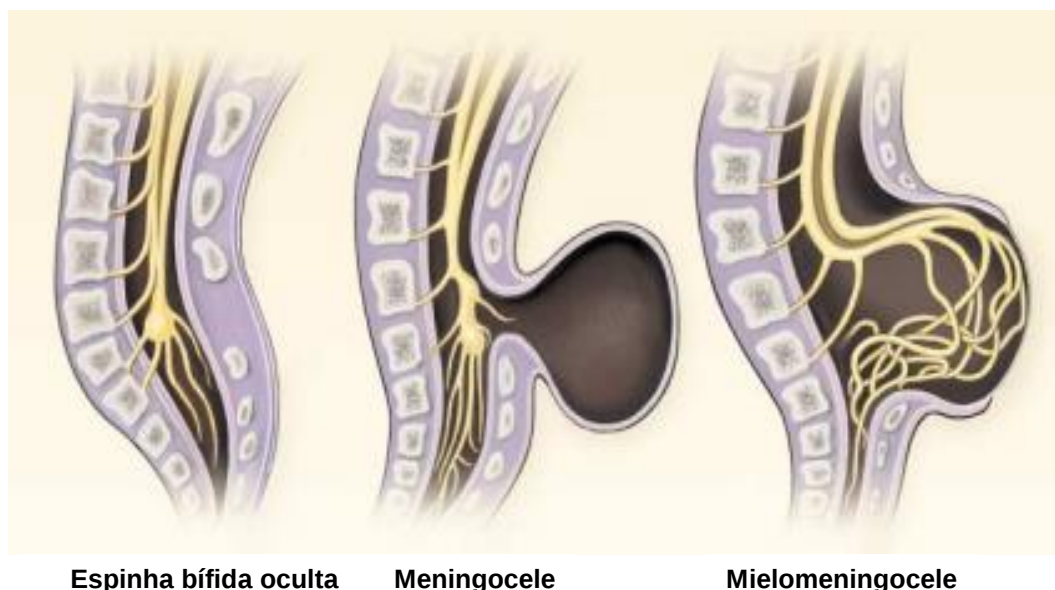


Figura ilustrativa dos tipos de espinha bífida. A espinha bífida oculta é recoberta por pele e normalmente assintomática. A meningocele e a mielomeningocele são as formas mais graves apresentadas, podendo estar associadas a exposição de componentes da medula espinhal.

Fonte: (Adaptado de BOTTO, 1999).

Nos pacientes com mielomeningocele, a maioria das alterações clínicas envolvem dificuldade ou incapacidade para adquirir ou manter-se em postura ortostática, caminhar e exercer controle voluntário do intestino e da bexiga urinária (SÁ et al., 2010).

Estes pacientes usualmente apresentam comprometimento sensorial e motor nas extremidades inferiores, impedindo que o indivíduo ande. Muitas vezes, a sobrecarga ou o excesso de utilização das extremidades superiores e tronco para compensar a perda dos movimentos e os desequilíbrios musculares nos membros inferiores, provoca o surgimento de distúrbios músculo-esqueléticos (SÁ et al., 2010).

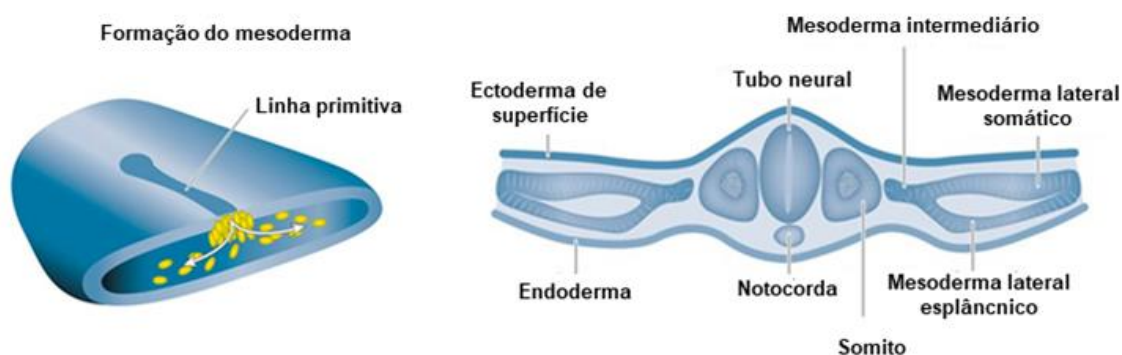
4.2 Formação do tubo neural: neurulação primária e secundária

Durante a terceira semana do desenvolvimento embrionário, em humanos, ocorre a formação do disco embrionário trilaminar a partir das células epiblasticas do disco embrionário bilaminar. Neste período são originados a linha primitiva, os três folhetos germinativos (ectoderma, mesoderma e endoderma) e a notocorda (Figura 2) (KAPLAN; SPIVAK; BENDO, 2004).

Inicialmente as células do mesoderma formam um fino folheto de tecido frouxamente entrelaçado de cada lado da linha média. Por volta do 17º dia, as células próximas da linha média se proliferam e formam uma placa de tecido espessada denominada mesoderma paraxial (Figura 2) (THIERY et al., 2009).

Mais lateralmente a camada mesodérmica permanece fina e é denominada mesoderma lateral. Com o aparecimento e a coalescência das cavidades intracelulares no mesoderma lateral, este tecido é dividido em duas camadas: uma camada contínua ao mesoderma que reveste o âmnio, chamada de camada mesodérmica somática e uma camada contínua ao mesoderma que recobre o saco vitelino, denominada como camada mesodérmica esplâncnica. Já a união entre o mesoderma paraxial ao mesoderma lateral é denominada de mesoderma intermediário (Figura 2) (THIERY et al., 2009).

Figura 2: Formação dos três folhetos embrionários.



As células epiblasticas convergem pela linha primitiva, originando o endoderma e o mesoderma intraembrionário. Os precursores mesodérmicos migram por todo o disco embrionário, ocupando posições diferentes ao longo do eixo médio-lateral, e diferenciam-se em mesoderma paraxial, mesoderma intermediário e mesoderma lateral.

Em sequência, ocorre a delaminação do mesoderma lateral, diferenciando-se em mesodermas laterais somático e esplâncnico (Azul - células epiteliais / Amarelo - células mesenquimais após a transição epitelial para mesenquimal).

Fonte: (Adaptado de NIETO, 2013).

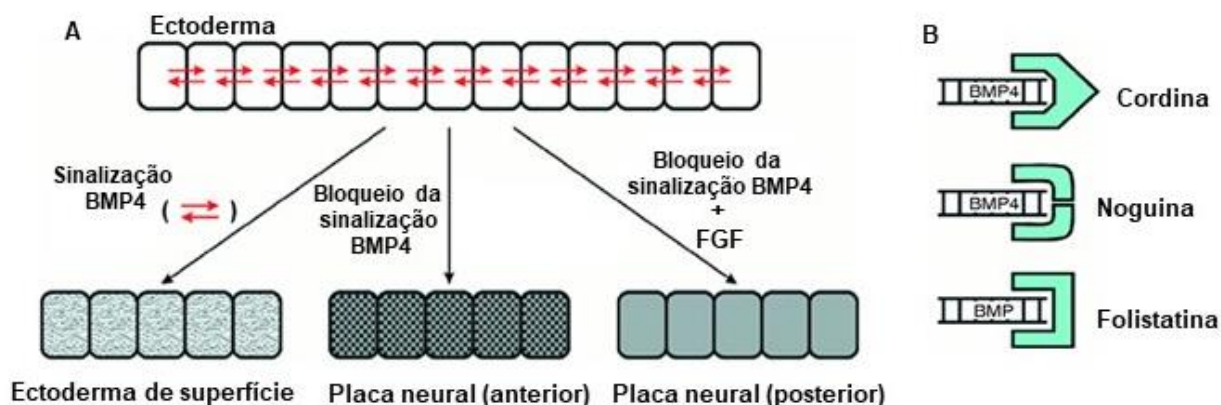
Ainda, na terceira semana do desenvolvimento, inicia-se o processo de neurulação que resultará na formação do encéfalo e da medula espinal. Este evento ocorre em duas etapas: a neurulação primária, durante a 3ª e 4ª semanas, seguida da neurulação secundária, entre a 5ª e 6ª semana do desenvolvimento (KIBAR; CAPRA; GROS, 2007; NAKATSU; SHIOTA, 2000).

Desta forma, a neurulação primária envolve a diferenciação do ectoderma subjacente à notocorda em neuroectoderma, formando a placa neural que, em sequência, origina o tubo neural (NAKATSU; SHIOTA, 2000; KAPLAN; SPIVAK; BENDO, 2004).

Estudos indicaram que os membros da família TGF β (Fator de transformação de crescimento beta) incluindo o TGF β e a activina, podem ser responsáveis pelo sinal que reprime a indução neural. Porém, outras evidências mostram que o principal sinal repressor provém da proteína morfogenética óssea 4 (BMP4), que é amplamente expressa no ectoderma, mas ausente nas células da placa neural durante a indução neural (TANABE; JESSEL, 1996).

A formação da placa neural ocorre devido à inativação da BMP-4, expressa nas células ectodérmicas, e que induz estas células a diferenciarem-se em epiderme. A supressão da BMP-4 é ocasionada pela ação antagonista das proteínas cordina, noguina e folistatina, as quais induzem o ectoderma a se diferenciar em neuroectoderma (Figura 3) (KIBAR; CAPRA; GROS, 2007).

Figura 3: Mecanismos associados à indução neural.

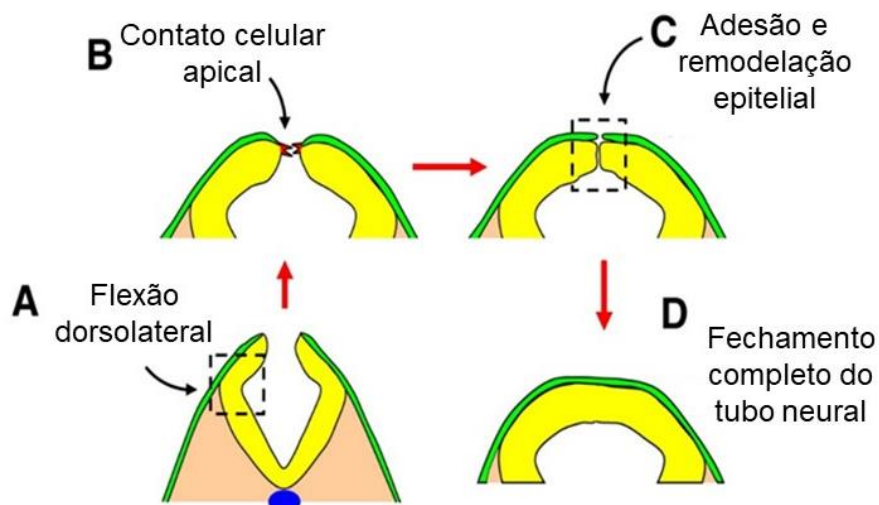


(A) Na fase de gastrulação, as células ectodérmicas expressam o gene BMP4 (setas vermelhas), o que promove a sua diferenciação em células epidérmicas. O bloqueio da sinalização do BMP4 por meio da ação dos genes cordina, noguina e folistatina, expressos principalmente na linha primitiva e na notocorda, induz a diferenciação do ectoderma em tecido neural, formando a porção anterior da placa neural. A exposição adicional do ectoderma à sinalização do fator de crescimento de fibroblasto (FGF), em condições de inibição do BMP4, determina a diferenciação e formação da porção posterior da placa neural (B) A cordina e a noguina se ligam ao BMP4, enquanto que a folistatina pode interagir com a proteína BMP7 e, possivelmente, com outras BMPs.

Fonte: (Adaptado de TANABE; JESSELL, 1996).

A placa neural se estreita e alonga-se continuamente ao longo do eixo ântero-posterior. Simultaneamente, as bordas laterais da placa neural elevam-se para formar as pregas neurais e o sulco neural. Em sequência, as pregas neurais se fundem na linha média do disco embrionário, formando o tubo neural (Figura 4) (COPP; GREENE, 2010).

Figura 4. Formação do tubo neural em mamíferos.

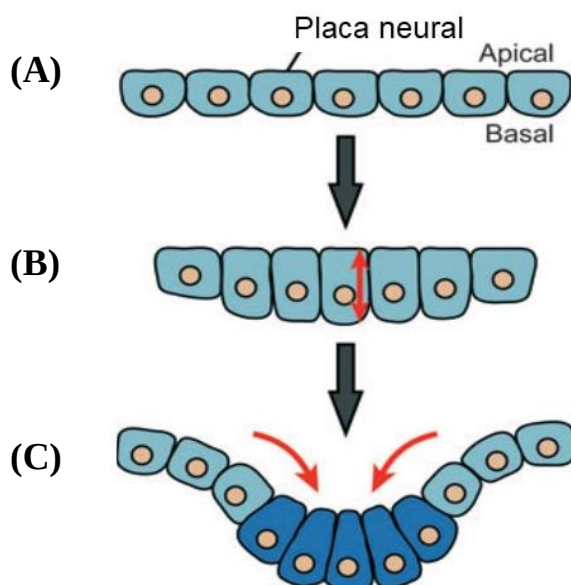


(A) O dobramento da placa neural (indicada em amarelo) ocorre no plano sagital mediano, sobrejacente a notocorda (indicada em azul). A superfície basal da placa neural deixa de ter contato com o mesoderma paraxial (indicado em marrom) e começa a entrar em contato com o ectoderma de superfície (indicado em verde); (B) À medida que as pregas neurais se aproximam, protrusões celulares denominadas “lamelípodios” (indicados em vermelhas) se estendem e entram em contato; (C) Uma vez estabelecida a adesão, ocorre o remodelamento epitelial (indicado pela caixa pontilhada), gerando um neuroepitélio contínuo (D) Fechamento completo do tubo neural.

Fonte: (Adaptado de COPP; GREENE, 2010).

O processo de remodelação da placa neural, que ocorre por meio de estreitamento no eixo médio-lateral e de alongamento no eixo rostro-caudal, envolve diversas modificações na adesão e no citoesqueleto celular (Figura 5). As alterações morfológicas necessárias para a formação do tubo dependem da ocorrência de uma constrição apical e um alongamento celular, os quais são precisamente controlados a nível molecular (SUZUKI et al., 2012).

Figura 5: Mudanças na forma celular contribuintes para o fechamento do tubo neural.



(A) Antes da neurulação, o neuroepitélio é formado por células cubóides. (B) As células neuroepiteliais primeiramente alongam-se ao longo do eixo apico-basal para se tornarem colunares. (C) Após o início do alongamento, ocorre a constrição das porções apicais das células, que tomam forma piramidal. Essa constrição apical é responsável pela geração de uma força física para a ocorrência do dobramento da placa neural, formando o tubo neural.

Fonte: (Adaptado de SUZUKI et al., 2012).

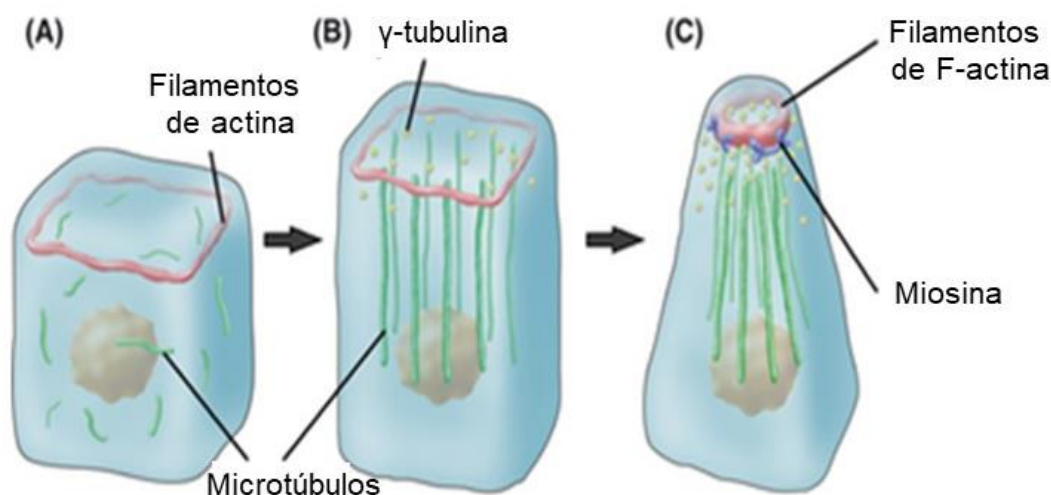
O filamento de actina (F-actina), formada pela actina monomérica (G-actina) consiste em um dos componentes principais do citoesqueleto. Na parte apical das células neuroepiteliais, existem bandas circulares de filamentos de actina (Figura 6 A) que, durante o fechamento do tubo neural, tornam-se mais espessos concomitantemente à ocorrência de retração apical das células (Figura 6 C). (SUZUKI et al., 2012).

As células neuroepiteliais também apresentam a proteína contrátil miosina II, do tipo não muscular, que se liga aos filamentos de actina. Estruturalmente, a miosina II apresenta duas cadeias pesadas, duas cadeias leves essenciais e duas cadeias leves reguladoras. As atividades motoras da miosina II são reguladas pela fosforilação da cadeia leve de miosina reguladora (MLC), por meio da quinase associada a enzima Rho (ROCK). Esta fosforilação aumenta a atividade da MLC, que move a miosina II

ao longo dos filamentos de actina que, por sua vez, gera uma força contrátil entre os filamentos de actina. Na placa neural, a miosina II encontra-se no ápice das células, sobreposta à actina. Estudos indicam que a actina e a força contrátil gerada pela miosina II não muscular são os principais responsáveis pela constrição apical (SUZUKI et al., 2012).

Outro elemento do citoesqueleto relacionado às modificações morfológicas das células da placa neural é o microtúbulo que, neste caso, origina-se a partir de um centrossomo e, portanto, apresenta γ -tubulina em sua estrutura. A acumulação de γ -tubulina está correlacionada com o rearranjo dos microtúbulos, os quais irão se dispor paralelamente ao eixo apico-basal das células, promovendo o alongamento destas. (Figura 6 B) (SUZUKI et al., 2012).

Figura 6: Mecanismos reguladores envolvidos na alteração da forma das células da placa neural.

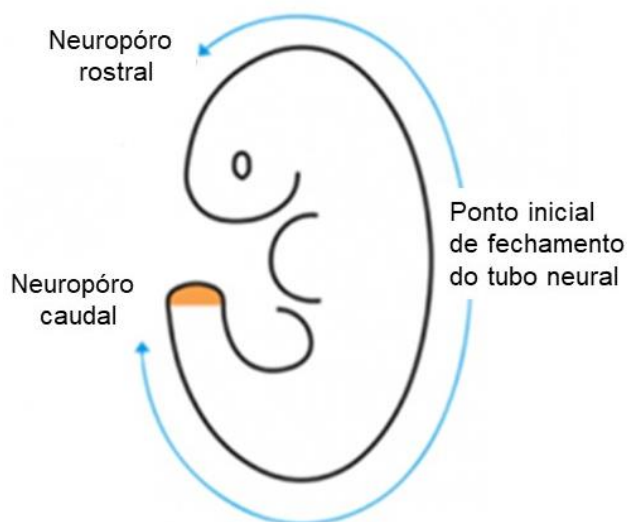


(A) Na célula neuroepitelial cuboide, um acúmulo de filamentos de actina (em vermelho) formam-se na porção apical da célula, enquanto que os microtúbulos (indicados em verde) estão dispostos difusos no citoplasma. (B) Durante o alongamento celular, os microtúbulos constituídos por subunidades de γ -tubulina (em amarelo) estão dispostos paralelamente ao eixo apico-basal. (C) Durante a constrição apical, os filamentos de actina tornam-se espessados. A miosina II não muscular (em azul) desliza ativamente sobre os filamentos de actina apicais, gerando uma força contrátil que determina a constrição dos ápices das células da placa neural.

Fonte: (Adaptado de SUZUKI et al., 2012).

Após o dobramento da placa neural, as pregas neurais se fundem para que ocorra o fechamento do tubo neural. O embrião humano apresenta apenas um ponto inicial de fusão, sendo que o fechamento do tubo neural ocorre em sentido bidirecional a partir da região cervical do embrião (Figura 7) (DETRAIT et al., 2005).

Figura 7: Local de fechamento do tubo neural em humanos.

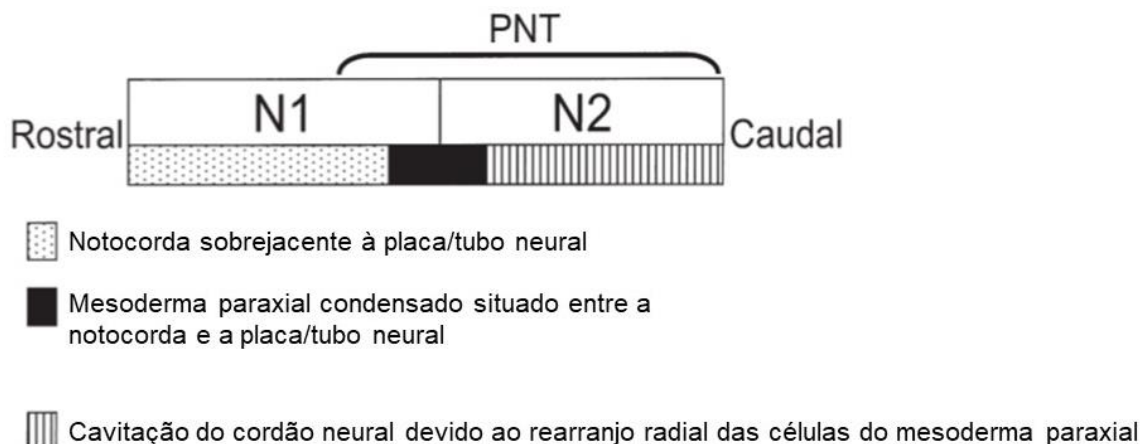


Para que ocorra o correto fechamento do tubo neural, as pregas neurais se fundem a partir da porção média e continuam este processo em sentido bidirecional, em direção aos neuropóros rostral e caudal.

Fonte: (Adaptado de GREENE; COPP, 2009).

Subsequente à neurulação primária, na extremidade caudal, ao nível do somito 31, que corresponde à segunda vértebra sacral (S2) no embrião humano, uma massa de células mesenquimais aparentemente indiferenciadas sofre cavitação, formando o tubo neural secundário (Figura 8) (YANG et al., 2014; KIBAR; CAPRA; GROS, 2007). A picnose nuclear nestas células mesenquimais caudais, observada no embrião humano, sugere a ocorrência do processo de apoptose na formação da neurocele em vez de remodelação por migração celular (Figura 9) (YANG et al., 2014).

Figura 8: Modelo proposto para a diferenciação da porção posterior do tubo neural em embriões humanos.

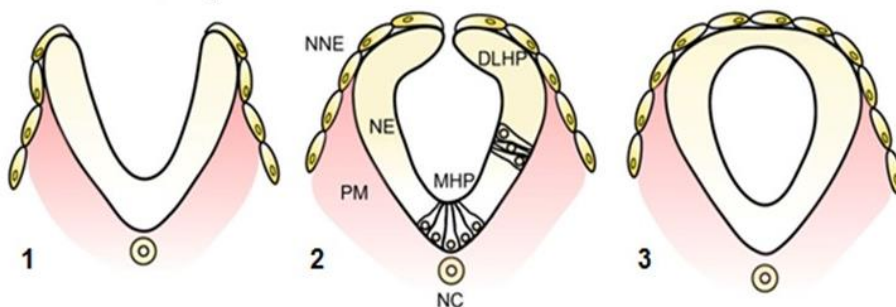


A porção posterior do tubo neural (PNT) pode ser dividida em três partes: região cranial ou rostral (N1), em que a notocorda está em contato com o tubo neural primário; região juncional, onde as células mesenquimais localizam-se entre a notocorda e o tubo neural. Ocorre a formação de uma única cavidade devido ao rearranjo das células mesenquimais; e região caudal (N2), onde a cavitação ocorre no cordão neural.

Fonte: (Adaptado de SAITSU; YAMADA, 2004).

Figura 9: Neurulação primária e secundária.

A Neurulação primária



B Neurulação secundária



(A) Representação esquemática da neurulação primária, envolvendo a elevação das pregas neurais (1), seguida da flexão da placa neural (2) e fusão das pregas neurais (3).

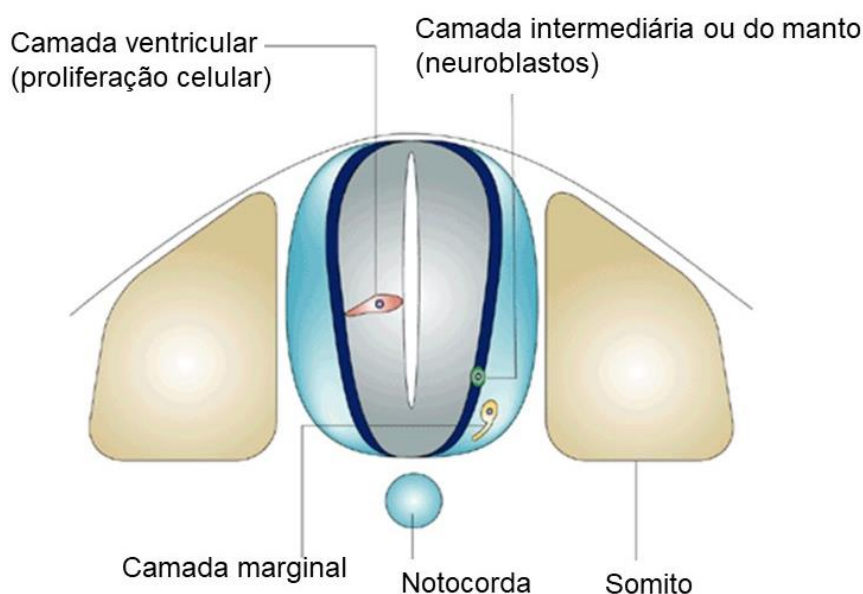
DLHP: ponto de dobramento dorsolateral; MHP: ponto médio do dobramento da placa neural; NC: notocorda; NE: neuroepitélio; NNE: ectoderma não-neural; PM: mesoderma paraxial. (B) Esquema da neurulação secundária. As células da porção caudal do embrião se condensam (1) na linha média para formar o cordão neural, que sofre epitelização (2), gerando o tubo neural secundário e a notocorda (3).

Fonte: (Adaptado de NIKOLOPOULOU et al., 2017).

4.3 Diferenciação da medula espinal

A parede do tubo neural é composta por um neuroepitélio pseudoestratificado colunar em que os núcleos das células neuroepiteliais se movimentam entre a porção apical e basal, dependendo da fase do ciclo celular. É composta por 3 camadas: a camada endimária ou ventricular, que circunda o canal central e onde situam-se as células neuroepiteliais, a camada intermediária ou do manto e a camada marginal. As células neuroepiteliais dividem-se e diferenciam-se em neuroblasto, os quais migram para a camada do manto e, subsequente, para a camada marginal (Figura 10).

Figura 10: Esquema das camadas (zonas) da parede do tubo neural.



Esquema de corte transversal do tubo neural, mostrando as camadas formadas pelo processo de diferenciação das células neuroepiteliais. Os precursores neurais proliferativos (representados em vermelho) estão presentes na camada ventricular, enquanto que as primeiras células pós-mitóticas (representadas em verde) estão posicionadas na camada intermediária e os neurônios (representados em amarelo) estão localizados na camada marginal.

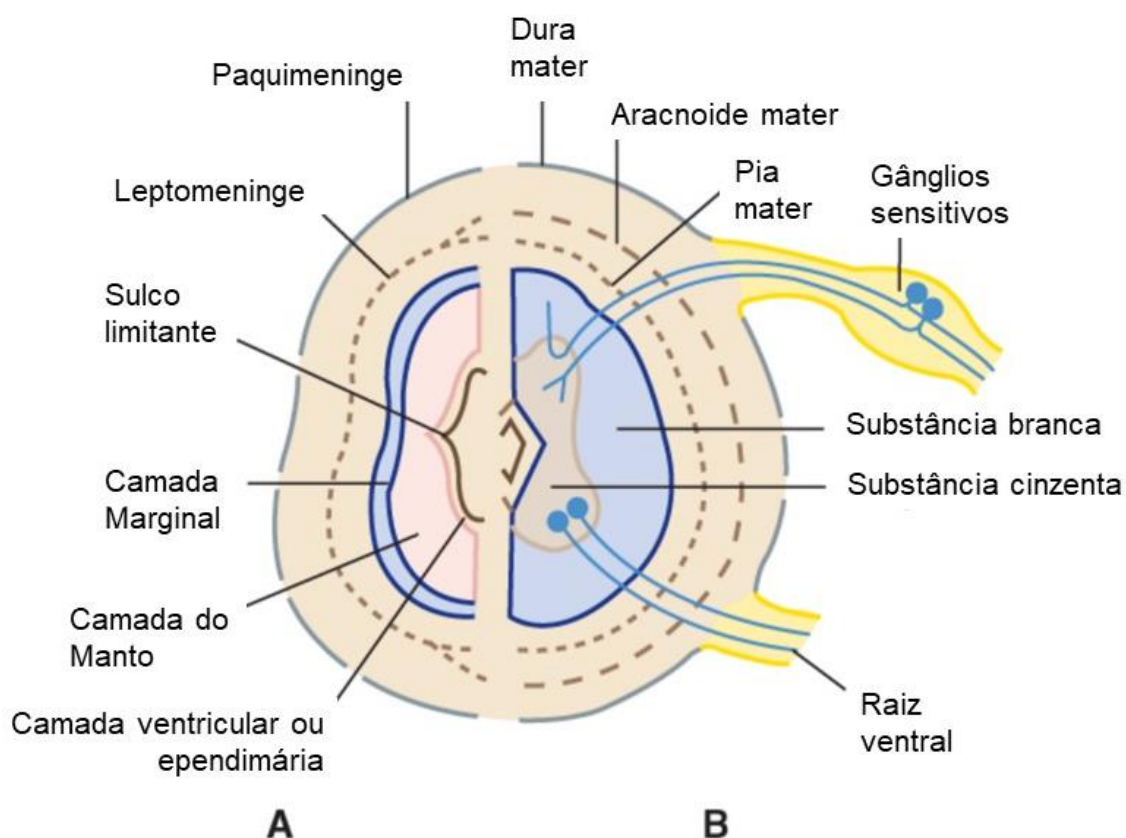
Fonte: (Adaptado de CORRAL; STOREY, 2001).

A camada intermediária ou do manto, onde localizam-se os corpos celulares dos neuroblastos formará, posteriormente, a substância cinzenta da medula espinal,

enquanto a camada marginal, contendo os axônios dos neuroblasto, originará a substância branca da medula espinal (SAKER et al., 2016) por exemplo, antes da divisão, os núcleos são deslocados para a superfície ventricular para que ocorra a mitose (PARIDAEN; HUTTNER, 2014).

Ainda, a zona do manto se diferencia em placa alar, dorsal, que contém principalmente neurônios sensoriais, e placa basal, ventral, que é composta principalmente de neurônios motores. Estas duas regiões são separadas pelo sulco limitante (sulcus limitans). Por sua vez, a placa alar originará a coluna cinzenta dorsal e a placa basal, a coluna cinzenta ventral (Figura 11) (KANDEL et al., 2013).

Figura 11: Fases de diferenciação da medula espinal.



Seção transversal da medula espinal mostrando duas fases no desenvolvimento. A: Fase inicial. B: Fase diferenciada. A camada ependimária é ocupada pelas células neuroepiteliais que, posteriormente, se diferenciarão em neuroblastos. Os neuroblastos migram para a camada do manto e para a camada marginal. Desta forma, a camada do manto formará, a substância cinzenta da medula espinal, enquanto a camada marginal, originará a substância branca da medula espinal. As células da crista neural adjacentes formarão as leptomeninges aracnoide mater e pia mater, enquanto

que a dura mater origina-se do mesênquima paraxial adjacente. São formadas também a raiz dorsal dos nervos espinais, onde encontram-se os gânglios sensitivos, e a raiz ventral, contendo os axônios dos nervos motores, que apresentam corpos neuronais localizados na substância cinzenta.

Fonte: (Adaptado de KANDEL et al., 2013).

A partir da diferenciação das células neuroepiteliais da zona ventricular, ou epêndima, serão formados os neurônios, os astrócitos e os oligodendrócitos da medula espinal. A expressão dos membros do fator de transcrição bHLH (basic helix-loop-helix), bem como a expressão transitória de FGF10 são necessárias para a diferenciação das células neuroepiteliais em células gliais radiais. À medida que a transformação ocorre é iniciada a expressão de marcadores astrogliais como GLAST (transportador de glutamato de alta afinidade glial) e BLBP (proteína de ligação aos lipídeos do cérebro) (PARIDAEN; HUTTNER, 2014).

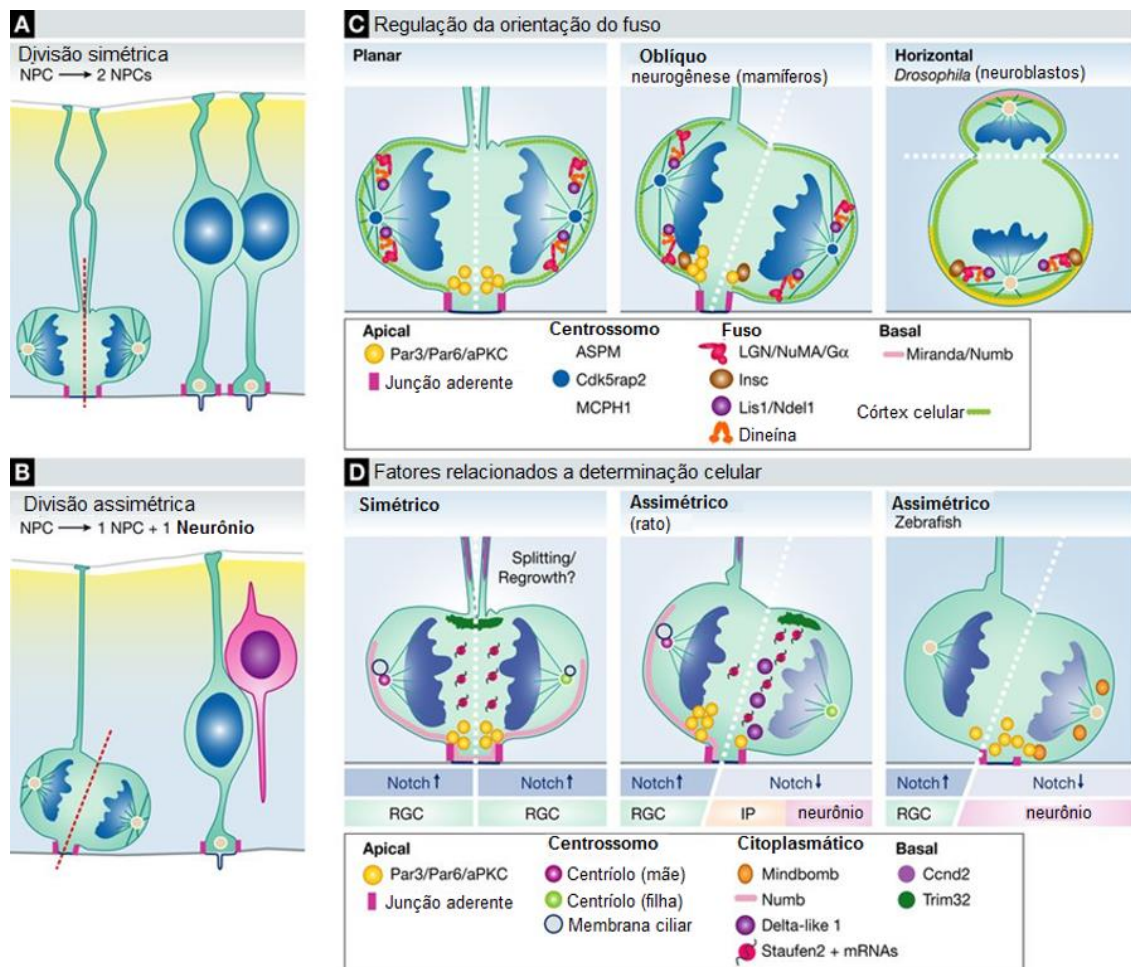
Desta forma, as células neuroepiteliais da camada ventricular diferenciam-se primeiramente em neuroblastos. Quando a formação dos neuroblastos cessa, as células neuroepiteliais diferenciam-se em glioblastos e estes, em astroblastos, que originarão os astrócitos, ou em oligodendroblastos, que formarão os oligodendrócitos. As células neuroepiteliais remanescentes da camada ventricular originarão as células ependimárias que revestem o canal central da medula espinal (SAKER et al., 2016).

A transição de uma célula neuroepitelial para um neuroblasto pós-mitótico é um processo altamente regulado e envolve uma cascata de fatores de transcrição desencadeada por genes pró-neurais. Os eventos da transição celular são facilmente visualizados no tubo neural, à medida que as distintas camadas celulares são formadas (CORRAL; STOREY, 2001).

No início da neurogênese, as células gliais radiais passam de divisões simétricas para assimétricas, dando origem a uma célula filha glial radial e a uma célula diferenciadora. Esta última, constitui um neurônio, ou em certas áreas do cérebro, como o neocórtex, um progenitor intermediário é formado como um dos principais tipos de progenitores basais. Os progenitores intermediários se dividem principalmente de forma simétrica para produzir dois neurônios (PARIDAEN; HUTTNER, 2014).

Após o início da neurogênese, as células gliais radiais dividem-se, principalmente, de forma assimétrica. No cérebro em desenvolvimento de vertebrados, as primeiras divisões de células gliais radiais apresentam planos de clivagem perpendiculares à superfície ventricular. A orientação do fuso das divisões de células gliais radiais simétricas é fortemente regulada por mecanismos envolvendo os centrosomos, posicionamento de microtúbulos astrais e interação de proteínas presentes no córtex celular (Figura 12) (PARIDAEN; HUTTNER, 2014).

Figura 12: Tipos de divisões das células neuroepiteliais e suas orientações.



A divisão simétrica produz duas células neuroepiteliais (A), enquanto que a divisão assimétrica produz uma célula neuroepitelial e uma célula diferenciada (neuroblasto) (B). A orientação do eixo das divisões simétricas e assimétricas é regulada por complexos estruturais e complexos de orientação do fuso, podendo ser divisões verticais e oblíquas (esquerda e média) e horizontais (C). Fatores relacionados com a determinação celular podem ser distribuídos igualmente entre as células neuroepiteliais indiferenciadas, originadas por divisão simétrica (representada a esquerda) ou

desigualmente entre as células originadas durante a divisão assimétrica (representação em ratos - figura do meio média e em zebrafish - á direita) (D).

Fonte: (Adaptado de PARIDAEN; HUTTNER, 2014).

A formação dos neurônios é controlada por mecanismos genéticos expressos ao longo dos eixos ântero-posterior e dorso-ventral do sistema nervoso central. No eixo dorso-ventral, são secretados, inicialmente, os genes sonic hedgehog (Shh) e da proteína morfogenética óssea (BMP), estabelecendo diversos gradientes. Esses genes, posteriormente, podem reprimir ou ativar a expressão de outros genes, fazendo com que o padrão de expressão seja capaz de originar diferentes tipos de neurônios (ZANNINO; SAGERSTRÖM, 2015).

Dependendo da localização, as células progenitoras iniciam a expressão de diferentes genes, formando assim “domínios progenitores” (dP) específicos. O desenvolvimento da medula espinal é, portanto, dividido em 11 domínios distintos de progenitores neurais, com cinco domínios ventrais (v3, MN, v2-0 de ventral para dorsal) e seis domínios dorsais (dP1-6 de dorsal para ventral) (Fig. 12 A) (ZANNINO; SAGERSTRÖM, 2015; DREAU et al., 2012).

Especificamente, Shh é um fator secretado pela notocorda e estimula a expressão deste mesmo gene pela placa do assoalho da medula espinal (WILSON; MADEN, 2005).

Os diferentes gradientes de Shh determinam a subdivisão das células neurais em domínios progenitores distintos no eixo dorso-ventral pela ativação da expressão de genes, como Nkx6.1, Nkx6.2, Nkx2.2 e Olig2, e a inibição de expressão dos genes Pax3, Pax6, Pax7, Dbx1, Dbx2 e Irx3 (Figura 12 B) (ZANNINO; SAGERSTRÖM, 2015).

Semelhante à expressão do Shh, as proteínas BMPs (BMP4, BMP5 e BMP7), expressas no ectoderma de superfície adjacente, estimulam e regulam a diferenciação neuronal, modificando as suas concentrações ao longo de eixo dorso-ventral (Figura 13) (ZANNINO; SAGERSTRÖM, 2015).

Outros fatores além de Shh e BMP também estão envolvidos na especificação dos domínios neuronais. Por exemplo, os inibidores da expressão do gene BMP, expressos ventralmente pela notocorda (cordina, noguina e folistatina) são

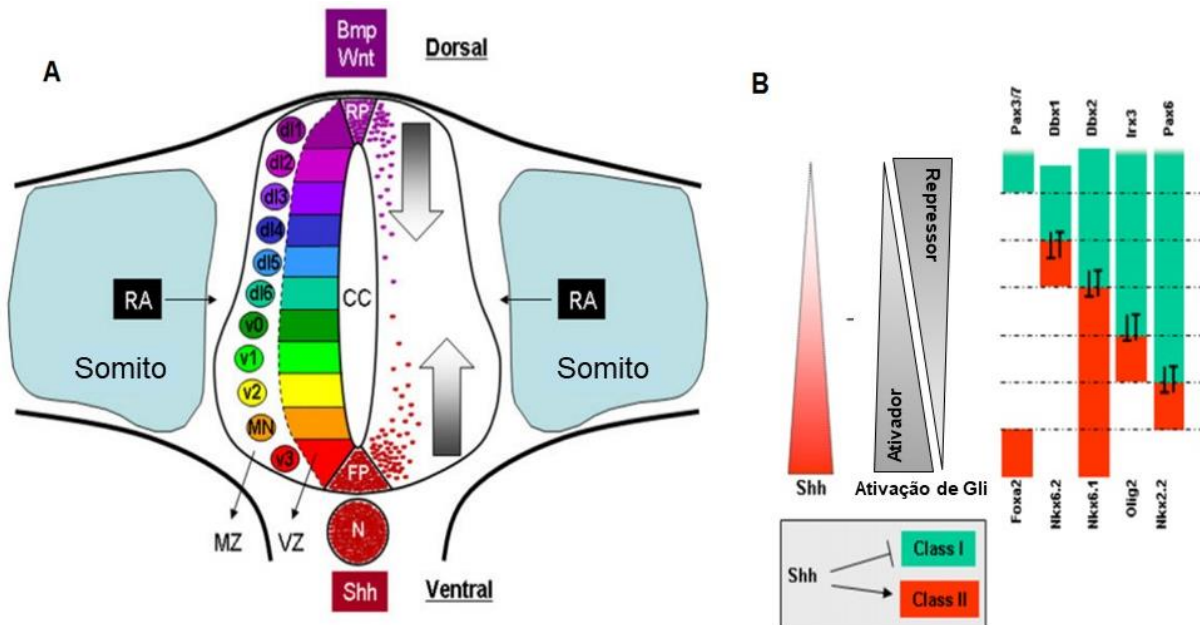
necessários a formação de domínios progenitores neurais ventrais. A sinalização FGF também está envolvida na especificação dos domínios progenitores, reprimindo a expressão de genes como Pax6, Irx3, Dbx1 e Dbx2 (CORRAL et al., 2002).

Em contraste, Wnt1, Wnt3a e o ácido retinóico são expressos na placa do teto e são necessárias para a formação dos domínios progenitores dorsais (Figura 13) (WILSON; MADEN, 2005; ZANNINO; SAGERSTRÖM, 2015).

A sinalização de Shh é dependente das proteínas transmembranares: Patched (Ptc), o receptor Shh, e Smoothened (Smo), que inicia a sinalização intracelular. A ligação de Shh ao receptor Ptc faz com que Smo consiga transmitir um sinal intracelular que resulta na regulação da atividade dos membros da família Gli, os quais podem ativar ou reprimir genes alvo. Três proteínas Gli foram identificadas nos vertebrados: Gli1, que possui apenas a função ativadora da transcrição, Gli2 e Gli3 que exibem propriedades transcricionais tanto ativadoras quanto repressoras (ULLOA, 2010; LE DREU; MARTÍ, 2012).

Todas as três proteínas Gli são expressas na medula espinal e também se mostraram importantes na especificação das células progenitoras. Gli1 é expresso em um gradiente ventro-dorsal enquanto que Gli3 mostra um padrão oposto a expressão de Gli1, sendo assim, dorso-ventral. A proteína Gli2 é expressa em todo o eixo dorso-ventral da medula espinal (Figura 14) (ULLOA, 2010).

Figura 13: Esquema da formação dos domínios de progenitores neurais a partir da sinalização das proteínas Shh, BMP e Wnt.



A) O lúmen do canal central (CC) é envolvido pela zona ventricular (VZ), onde são encontradas as células progenitoras proliferativas. Essas células se diferenciam em neuroblastos pós-mióticos, os quais são distribuídos lateralmente na zona do manto (MZ). Diferentes subtipos de progenitores neurais são distribuídos em uma ordem específica ao longo do eixo dorso-ventral. Este padrão é estabelecido pela ação de Shh, expresso pela notocorda (N) e pela placa do assoalho (FP), e das proteínas Wnts e BMPs, produzidas pela placa do teto (RP). Outras moléculas de sinalização extracelular estão envolvidas na diferenciação padrão dorso-ventral neuronal como, por exemplo, o ácido retinoico (RA) que é secretado pelos somitos. (B) As expressões de duas classes de genes são desencadeadas a partir da sinalização dorso-ventral de Shh: Classe I, que engloba os genes que são reprimidos por Shh (Pax 3/7, Ddx1, Ddx2, Irx3 e Pax6) e Classe II, envolvendo os genes ativados por Shh (Foxa2, Nkx6.2, Nkx6.1, Olig2 e Nkx2.2). As proteínas Gli também podem ser ativadas ou reprimidas por Shh, de forma que, os genes Glis ativados por Shh são expressos no sentido dorso-ventral, enquanto que os que são reprimidos, são expressos no sentido oposto.

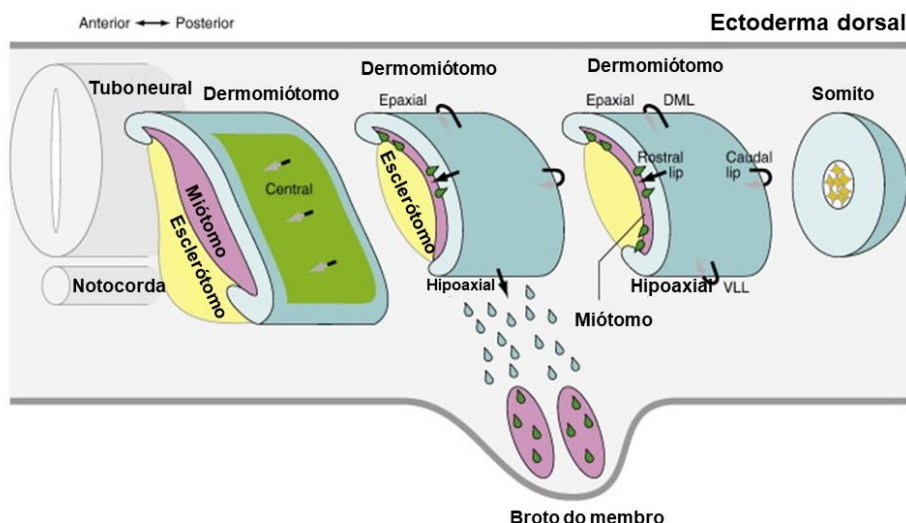
Fonte: (Adaptado de ULLOA, 2010).

4.4 Somitogênese

Bilateralmente à notocorda, o mesoderma se diferencia em três áreas principais: paraxial, intermediário e laterais (somático e esplâncnico). Até o final da quinta semana, são formados de 42 a 44 pares de somitos a partir do mesoderma paraxial. O desenvolvimento dos somitos ocorre de forma crânio-caudal e estão envolvidos na formação do esqueleto axial (ossos da cabeça, vértebras, estruturas ósseas do tórax) e apendicular, além da musculatura lisa e estriada esquelética e da derme. O número de somitos pode ser usado para estimar a idade embrionária (KAPLAN; SPIVAK; BENDO, 2004; GREENE; COPP, 2009).

Cada somito diferencia-se, inicialmente, em duas porções: esclerótomo e dermomiótomo. As células do esclerótomo são responsáveis pela formação de parte do esqueleto axial, incluindo as vértebras, enquanto o dermomiótomo originarão células musculares e derme (Figura 14) (KAPLAN; SPIVAK; BENDO, 2004; GREENE; COPP, 2009).

Figura 14: Diferenciação dos somitos.



Os somitos diferenciam-se em dermomiótomo e em esclerótomo. As células progenitoras do músculo se separam do dermomiótomo para formar o miótomo primitivo subjacente.

Fonte: (Adaptado de ENDO, 2015).

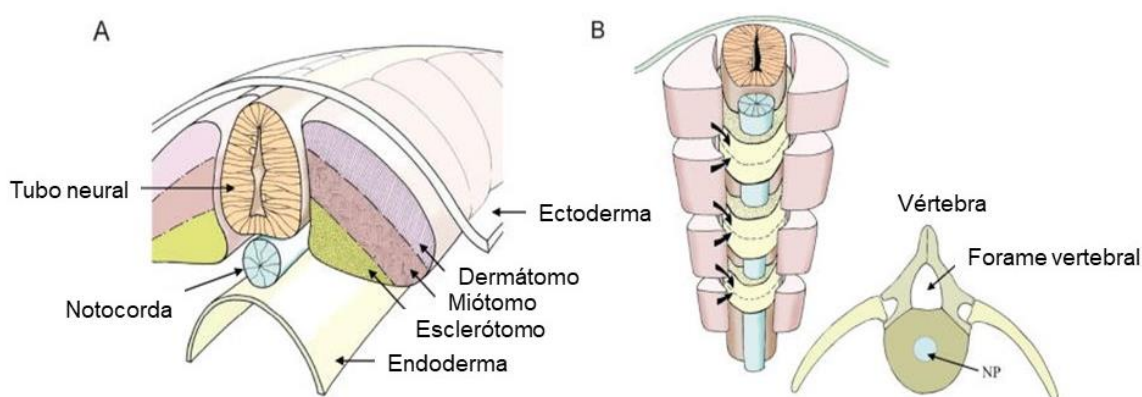
Durante a quarta semana, as células do esclerótomo começam a migrar em direção e ao redor da notocorda e do tubo neural. A migração destes tipos celulares

depende de mecanismos moleculares específicos e da interação com estruturas adjacentes. Os esclerótomos ao redor da notocorda e do tubo neural serão separados em uma parte cranial, onde as células estão dispostas dispersamente, e em uma porção caudal, mais densa, para formar o mesênquima (KAPLAN; SPIVAK; BENDO, 2004; MAROTO; BONE; DALE, 2012).

Esse processo é influenciado pelo gene *sonic hedgehog* (Shh), expresso na notocorda, para induzir a expressão de Pax1 e Pax9 nas células do esclerótomo (YUSUF; BRAND-SABERI, 2006; MAROTO; BONE; DALE, 2012).

O espaço formado entre as porções cranial e caudal será preenchido pelas células da região caudal dos esclerótomos, as quais migram cranialmente e originam o anel fibroso do disco intervertebral. O núcleo pulpos, por sua vez, se desenvolverá a partir das células notocordais (Figura 15) (KAPLAN; SPIVAK; BENDO, 2004).

Figura 15: Início da formação das vértebras a partir dos somitos.



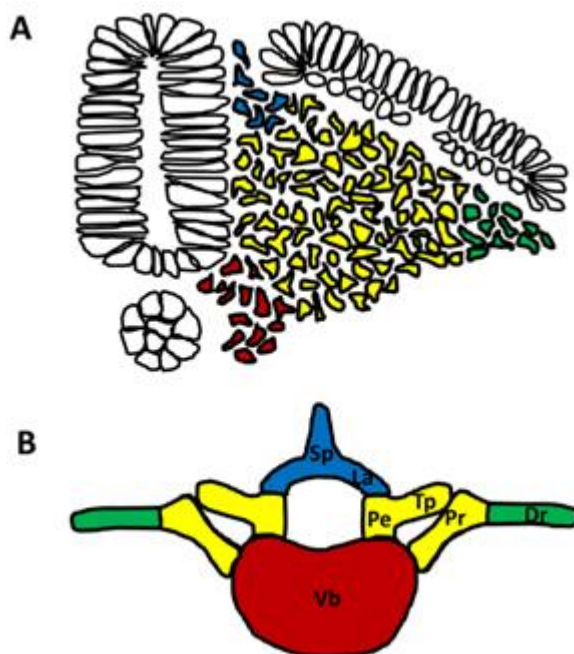
(A) Durante a metamerização, o mesoderma paraxial forma pares de somitos ao longo do eixo central do corpo do embrião, bilateralmente ao tubo neural (laranja) e à notocorda (azul). Cada somito é composto pelo dermatômo (indicado em roxo), miótomo (indicado por marrom claro) e esclerótomo (indicado em amarelo escuro). O ectoderma de superfície encontra-se dorsal e o endoderma, ventral aos somitos. **(B)** As células do esclerótomo migram dos somitos adjacentes, circundando cada vértebra em formação. Células do dermatômo (próximo do ectoderma de superfície) formarão a derme, enquanto as células do miótomo, originarão parte do tecido muscular estriado esquelético. A inserção B mostra a arquitetura das vértebras, destacando o canal espinhal, os processos espinais e o núcleo pulposo (em azul).

Fonte: (Adaptado de RISBUD; SHAPIRO, 2011).

Devido aos gradientes de diferentes moléculas sinalizadoras, alguns subdomínios são formados no esclerótomo. Desta forma, a parte central está localizada perto do miótomo, a parte ventral será formada por células que expressam Pax1, a partir da região ventro-medial do esclerótomo, enquanto as células que não expressam Pax1 migram em direção dorso-medial e formam o subdomínio dorsal do esclerótomo, cujas células expressam Msx1 e Msx2. As células deste subdomínio, sob o controle de BMP4 expresso pelas células do tubo neural, formarão a parte dorsal do arco vertebral e o processo espinhoso (CHRIST et al., 2007).

O esclerótomo central formará parte do pedículo do arco vertebral, a costela proximal e as articulações costovertebrais. O esclerótomo ventral originará o corpo vertebral. O esclerótomo dorsal forma a parte dorsal do arco vertebral e o processo espinhoso. O esclerótomo lateral dará origem a parte distal das costelas e tendões, enquanto as células do esclerótomo medial serão responsáveis por formar as meninges da medula espinal e seus respectivos vasos sanguíneos (Figura 16) (CHRIST et al., 2007).

Figura 16: Diferenciação do esclerótomo e derivados vertebrais.



(A) Esquema do estágio inicial de diferenciação do esclerótomo. Esclerótomo central (em amarelo), esclerótomo ventral (em vermelho), esclerótomo dorsal (em azul), esclerótomo lateral (em verde). (B) Esquema demonstrando os derivados vertebrais dos esclerótomos. O esclerótomo ventral (em vermelho) forma o corpo vertebral, enquanto o esclerótomo central (em amarelo) origina os pedículos do arco vertebral, o

processo transversal, e parte proximal das costelas, incluindo as articulações costovertebrais; o esclerótomo lateral (verde) forma a parte distal das costelas e o esclerótomo dorsal (em azul), a parte dorsal e o processo espinhoso do arco vertebral. Dr: Costela distal; La: Lâmina do arco vertebral; Pe: Pedículo do arco vertebral; Pr: Costela proximal; Sp: Processo espinhoso, Tp: Processo transversal; Vb: Corpo vertebral.

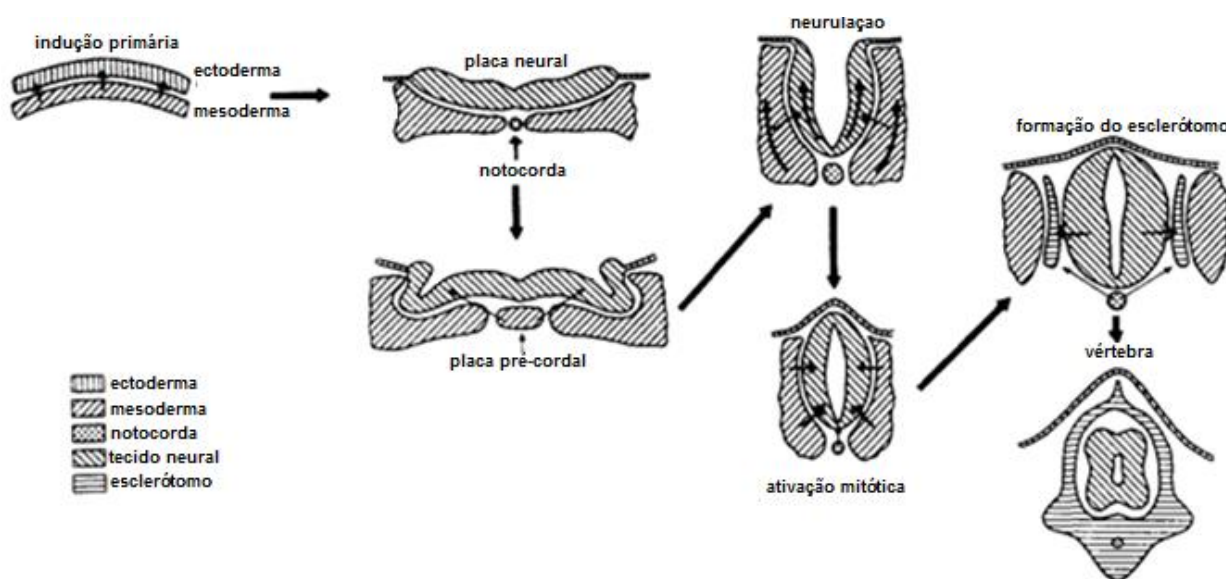
Fonte: (Adaptado de SCAAL, 2016).

4.5 Interação entre tubo neural e mesoderma paraxial

O mesoderma paraxial adjacente é de grande importância para o processo de neurulação devido a expressão de fatores que regulam a atividade mitótica das células do tubo neural e, dessa forma, dão origem a estruturas que, posteriormente, originarão o encéfalo e a medula espinal (KALLEN, 1968).

Além disso, por meio de interações indutivas, a placa neural está envolvida na determinação da especificação e diferenciação do mesoderma paraxial que originará as vértebras. Como por exemplo, o diâmetro do canal espinal é diretamente determinado pelo tamanho do tubo neural e a formação das vértebras é devida a influências indutoras do tubo neural e da notocorda (Figura 17) (KALLEN, 1968; MARIANI et al., 2001).

Figura 17: Interação entre o mesoderma e o tubo neural.



A interação indutiva entre as células da placa neural e do mesoderma paraxial está relacionada à formação do tubo neural e a diferenciação dos esclerôtomos, os quais originarão as vértebras.

Fonte: (Adaptado de KALLEN, 1968).

Desta forma, fatores secretados pelo mesoderma paraxial adjacente, dentre eles as proteínas Wnt, participam da determinação do eixo rostro-caudal da placa neural. Devido aos altos níveis de proteínas Wnt na região caudal da placa, as células

progenitoras neurais adquirem potencial para originarem a medula espinal (KANDEL et al., 2013). Ainda, a proliferação e o rearranjo das células mesenquimais parecem ser importantes para o processo de fechamento do tubo neural, controlando o mecanismo de elevação das pregas neurais. O mesênquima também está envolvido nos mecanismos de migração das células da crista neural, regulando a diferenciação neuronal periférica (YAMAGUCHI; MIURA, 2013; NODEN; TRAINOR, 2005; ZOHN; SARKAR, 2012; CORRAL et al., 2002).

Durante os estágios posteriores de desenvolvimento, o mesoderma cefálico derivado do paraxial contribui para formação de diversas estruturas como os músculos liso e esquelético e alguns elementos cartilagosos e ósseos do crânio. As células da crista neural contribuem para a formação dos nervos cranianos, vasos sanguíneos e muitos dos elementos ósseos da cabeça e da face (CORRAL et al., 2002; ZOHN; SARKAR, 2012).

4.6 Metabolismo do folato

O folato, termo genérico para os compostos que têm atividade vitamínica similar ao do ácido pteroilglutâmico, é a forma da vitamina B₉ naturalmente encontrada nos alimentos. A suplementação vitamínica com o ácido fólico, ou vitamina B₉, constitui uma das principais estratégias empregadas para a prevenção de malformações fetais graves, principalmente dos defeitos de fechamento do tubo neural, devido a sua abrangência, biodisponibilidade e baixo custo (ALABURDA; SHUNDO, 2007). No Brasil, a fortificação tornou-se obrigatória a partir de junho de 2004 com a publicação da RDC n. 344, que determinou que as farinhas de trigo e de milho deveriam conter 150µg de ácido fólico para cada 100g de farinha (BRASIL, 2002).

Este composto parece estar envolvido no crescimento, diferenciação, desenvolvimento, reparação e disposição do sistema nervoso. Essas funções são provavelmente mediadas pela síntese de nucleotídeos, integridade e transcrição do DNA e por mecanismos epigenéticos, incluindo a expressão gênica relacionados à metilação do DNA (KRISHNASWAMY; NAIR, 2001; REYNOLDS, 2006).

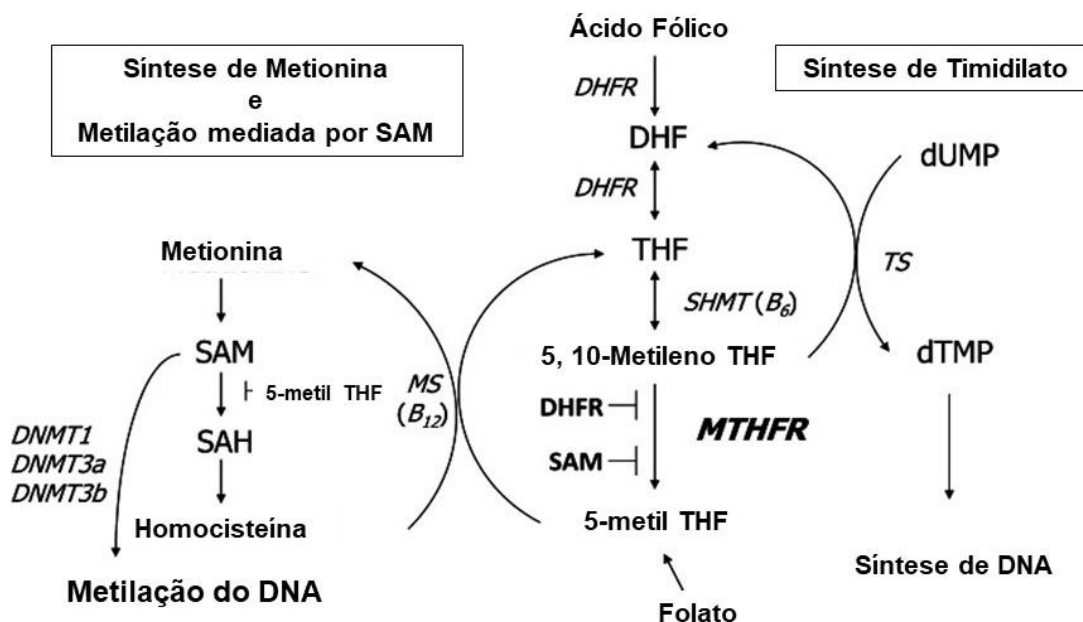
Em condições alimentares normais, o folato absorvido é metabolizado, no intestino e/ou no fígado, em 5-metiltetra-hidrofolato (5-metil THF), que consiste no composto primário de folato absorvido por tecidos não-hepáticos. O 5-metil THF deve ser convertido em tetrahidrofolato (THF), pela ação da enzima da metionina sintase (MS) (CRIDER et al., 2012). Ainda, no caso da administração do ácido fólico, a forma sintética de folato, este é primeiramente reduzido a di-hidrofolato (DHF), pela ação da di-hidrofolato-redutase (DHFR), e subsequentemente convertido a THF. A coenzima de THF, formada a partir de ácido fólico ou do folato, é convertida em 5,10-metileno THF pela enzima serina hidroximetiltransferase (SHMT), a qual é dependente da vitamina B₆, e em sequência, convertida de forma irreversível a 5-metil THF, pela enzima metilenotetra-hidrofolato redutase (MTHFR) (Figura 18) (CRIDER et al., 2012).

Esta reação é fundamental para manter a remetilação de homocisteína em metionina, por meio da reação mediada pela MS dependente de vitamina B₁₂. A metionina é o substrato para a S-adenosilmetionina (SAM), um cofator e doador do grupo metil para inúmeras reações de metilação, incluindo a metilação de DNA, RNA,

neurotransmissores e outras moléculas como fosfolipídios, proteínas e histonas. Uma série de reações dependentes de SAM têm funções reguladoras, podendo afetar a estabilidade do genoma e a transcrição de genes, bem como a localização da proteína e a degradação de pequenas moléculas (Figura 18) (CRIDER et al., 2012).

O cofator SAM transfere para as enzimas DNA Metiltransferases (DNMT), responsáveis pela metilação do DNA, um grupo metil (Figura 18). Existem 3 tipos de DNMTs: DNMT1, DNMT3a e DNMT3b. O DNMT1 é a mais abundante nas células, acredita-se que atua como a metiltransferase de manutenção primária para metilação do DNA hemimetilado (apenas uma cadeia é metilada), após a replicação do DNA, e mantém os padrões de metilação do DNA em gerações de células subsequentes. Em contraste, DNMT3a e DNMT3b metilam diferentes sequências desmetiladas de DNA do genoma, atuando principalmente durante o desenvolvimento embrionário para estabelecer os padrões de metilação do DNA (CRIDER et al., 2012).

Figura 18: Metabolismo do folato associado a síntese e metilação de DNA.



Esquema demonstrando a reação de síntese e metilação do DNA a partir do folato/ácido fólico. O folato é transformado em 5-metiltetra-hidrofolato (5-metil THF), o qual é convertido em tetrahydrofolato (THF), por meio da enzima metionina sintase (MS). Por sua vez, o ácido fólico é primeiramente reduzido a di-hidrofolato (DHF) pela ação da enzima di-hidrofolato-redutase (DHFR) e, posteriormente, convertido a THF. Subsequentemente, a coenzima de THF é convertida em 5,10-metileno THF pela enzima serina hidroximetiltransferase (SHMT) e, então, reduzida de forma irreversível a 5-metil THF por meio da enzima metilenotetra-hidrofolato redutase (MTHFR). Esta reação é

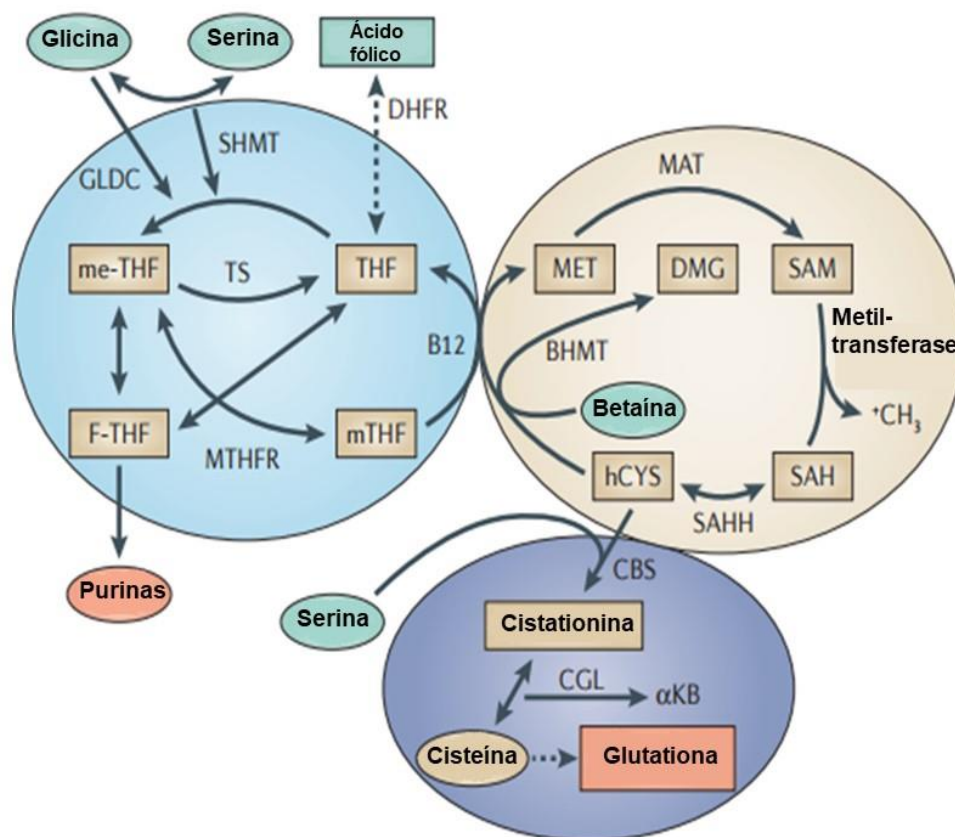
importante para a remetilação de homocisteína em metionina por meio da MS. A metionina é o substrato para o cofator SAM, o qual está envolvido nas reações de metilação de DNA pela ação das enzimas DNA metiltransferases (DNMT1, DNMT3a e DNMT3b). Para a ocorrência da síntese do DNA, a timidilato sintetase (TS) transfere um grupo metilo do 5,10-metileno THF para dUMP (monofosfato de desoxiuridina), convertendo-o em dTMP (timidilato), que será inserido no DNA.

Fonte: (Adaptado de CRIDER et al., 2012).

O ciclo de metionina inicia-se com a homocisteína que recebe um carbono do ciclo do folato através de mTHF para gerar metionina (MET). A metionina, por meio da enzima metionina adeniltransferase (MAT), é convertida em SAM, que é desmetilada para formar S-adenosil-homocisteína (SAH). A SAH é convertida novamente em homocisteína pela enzima S-adenosil homocisteína hidrolase (SAHH) (Figura 19) (LOCASALE, 2013; BLOM; SMULDERS, 2011).

Outra via metabólica relacionada ao folato consiste na transulfuração. Nesta via, que está associada ao ciclo da metionina por meio da homocisteína intermédia, a serina é convertida em cistationina, pela ação da cistationina sintase (CBS). A cistationina é, então, clivada pela enzima cistationina-liase (CGL) para gerar α -cetobutirato (α KB) e cisteína, sendo que esta pode ser desviada para produção de glutatona e para o metabolismo de outros compostos (Figura 19) (LOCASALE, 2013; BLOM; SMULDERS, 2011).

Figura 19: Metabolismo do folato e da metionina



O esquema mostra a interligação do metabolismo do folato (inserido no círculo azul claro) e da metionina (indicado no círculo marrom). As setas bidirecionais indicam as etapas reversíveis; setas tracejadas indicam as várias etapas bioquímicas. O ácido fólico é reduzido a tetrahydrofolato (THF), que é convertido em 5,10-metilenotetrahydrofolato (me-THF), por meio da enzima serina hidroximetil transferase (SHMT). Me-THF é, então, reduzido a 5-metiltetrahydrofolato (mTHF) pela enzima metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR) ou é convertido em 10-formiltetrahydrofolato (F-THF). A homocisteína recebe um carbono, gerado pelo ciclo do folato, através do mTHF, gerando metionina (MET). A metionina é convertida em S-adenosilmetionina (SAM) pela ação da enzima metionina adeniltransferase (MAT), que sofre desmetilação e forma S-adenosil-homocisteína (SAH). A SAH é convertida novamente em homocisteína pela enzima S-adenosil homocisteína hidrolase (SAHH). A via de transsulfuração (indicada pelo círculo azul escuro) está ligada ao ciclo da metionina e consiste na conversão de serina em cistationina pela ação da enzima cistationina sintase (CBS). A cistationina é, então, clivada pela enzima cistationina-liase (CGL), gerando α -cetobutirato (α KB) e cisteína, a qual está relacionada com a produção de glutatona.

Fonte: (Adaptado de LOCASALE, 2013).

Particularmente no SNC, a falha ou bloqueio do suprimento de folato resulta em diminuição da síntese de purina, timidina, nucleotídeos e DNA, bem como na interrupção da transcrição do DNA, metilação, expressão gênica e outros mecanismos epigenéticos relacionados ao crescimento, diferenciação e reparação de tecidos no geral (REYNOLDS, 2006).

Conforme citado anteriormente, a deficiência de folato está associado a um risco aumentado de defeitos do tubo neural. Os mecanismos pelos quais os baixos níveis de folato contribuem para esses transtornos permanecem desconhecidos. A disponibilidade inadequada de folato durante a divisão celular pode resultar na produção comprometida de dTMP, de modo que dUMP pode ser substituído na sequência de DNA. Este evento pode desencadear tentativas de reparação do defeito e aumenta a frequência de quebras cromossômicas desestabilizando o DNA (CRIDER et al., 2012).

A deficiência de folato pode também ter efeitos deletérios nas células, permitindo a acumulação de homocisteína, uma substância potencialmente tóxica, produzida pela desmetilação de metionina. O excesso de homocisteína é derivada a partir de tecidos extra-hepáticos, os quais que não apresentam a via de transulfuração completa, causando a homocisteinúria (ZETTERBERG, 2004).

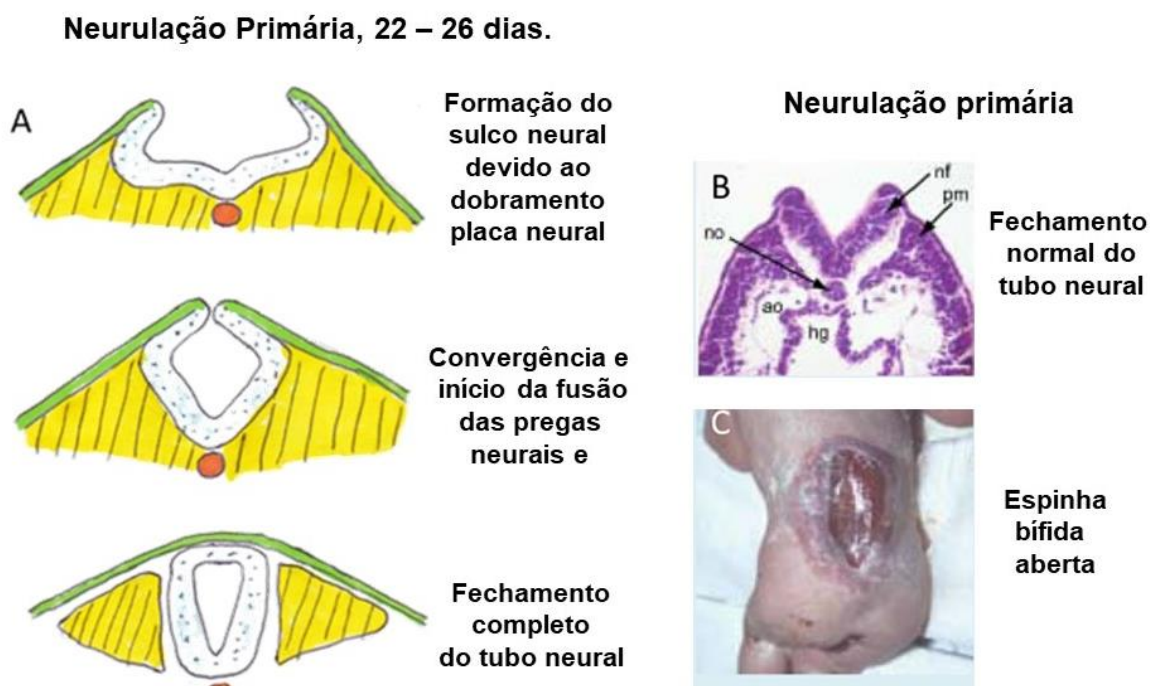
O sistema nervoso pode ser particularmente sensível ao acúmulo de homocisteína extracelular, a qual promove a excitotoxicidade por meio da estimulação dos receptores NMDA e danos ao DNA neuronal, desencadeando a apoptose neuronal (REYNOLDS, 2006; ZETTERBERG, 2004).

4.7 Mecanismos fisiopatológicos da espinha bífida

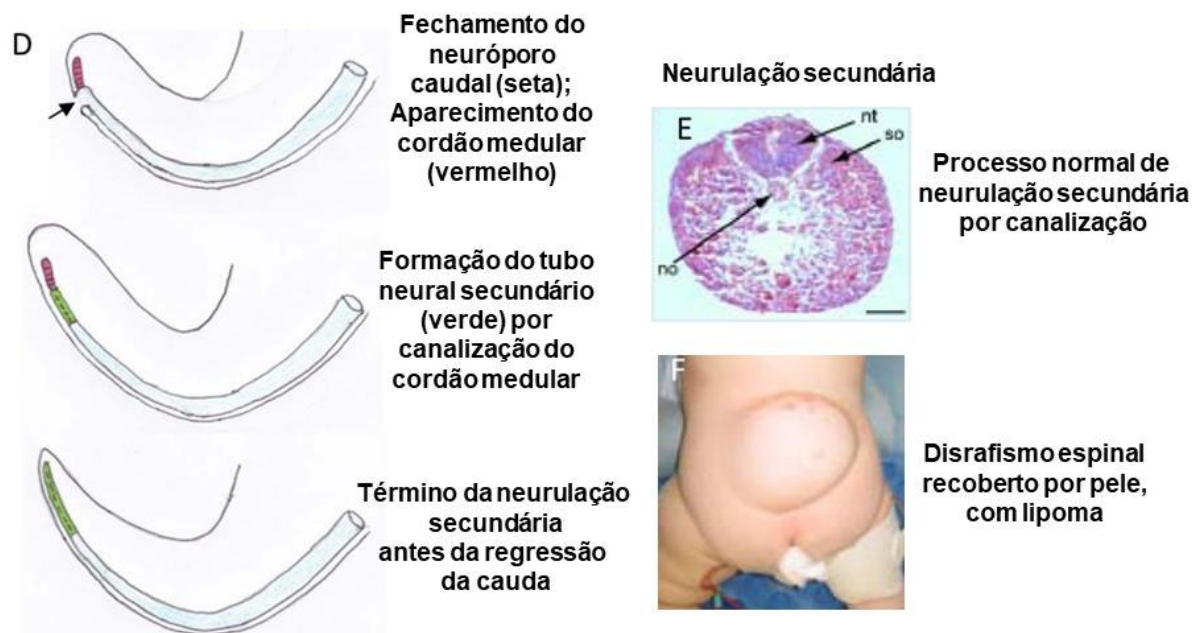
A espinha bífida cística é caracterizada pela exposição das meninges, raízes nervosas e medula espinal por meio de aberturas nos arcos vertebrais devido ao fechamento inadequado do tubo neural durante a neurulação primária. Em contrapartida, falhas da neurulação secundária acarretam formas menos comuns de DTNs, onde o tubo neural em desenvolvimento não se separa de outros tecidos (GREENE; COPP, 2009; KIBAR; CAPRA; GROS, 2007).

Consequentemente, as alterações nos processos de neurulação estão envolvidas na inadequada diferenciação do ectoderma de superfície do ectoderma neural, além de afetar a migração do mesênquima para a posição dorsal do tubo neural, permanecendo na posição lateral, resultando em falhas na formação das vértebras, dos ligamentos e dos músculos e da pele desta região (Figura 20) (ROSSI et al., 2004).

Figura 20: Neurulação e a origem da espinha bífida oculta e cística.



Neurulação secundária, 20 – 40 dias



(A) Esquemas de seções transversais do tubo neural, mostrando o processo de neurulação primária, que envolve dobramento da placa neural, convergência das pregas neurais e fechamento do tubo neural. (B) Fotomicrografia apresentando o processo normal de fechamento do tubo neural durante a neurulação primária em embrião humano. (C) A falha do processo da neurulação primária, na quarta semana do desenvolvimento embrionário acarreta a mielomeningocele. (D) Esquemas de seções sagitais do tubo neural mostrando o processo de neurulação secundária, que envolve a condensação da eminência caudal, seguida pela formação do lúmen (canalização), conclusão da neurulação secundária e regressão da cauda. Este processo finaliza-se na sexta semana do desenvolvimento. (E) Fotomicrografia apresentando o processo normal de neurulação secundária em embrião humano. (F) A falha do processo da neurulação secundária determina a não separação dos tecidos não-neuronais, levando à ocorrência do disrafismo espinal fechado. No, notocorda; Np, placa neural; So, somito.

Fonte: (Adaptado de COPP et al., 2015).

4.8 Fatores genéticos e genes candidatos envolvidos na ocorrência da espinha bífida

Diversas evidências sugerem o envolvimento de fatores genéticos na ocorrência dos DTNs. Desta forma, o risco de recorrência estimado em irmãos é 2-5%, sendo 50 vezes maior que o observado na população em geral. Além disso, a recorrência em casos de história familiar indica que estes fatores genéticos relacionados com os DTNs são transmitidos, preferencialmente, pela mãe (MARCO et al., 2011).

Estudos com animais demonstraram que existem até 100 genes mutantes que afetam a neurulação e quase todos eles apresentam homólogos em humanos (PADMANABHAN, 2006). Muitos destes genes estão envolvidos no metabolismo do folato, como é o exemplo do gene que codifica a enzima MTHFR, que catalisa a conversão de 5,10-metilenotetrahidrofolato (5,10-MTHF) em 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF) e proporciona a doação de um grupo metil para a remetilação da homocisteína (LI; WAHLQVIST; LI, 2016).

Além do gene MTHFR, outros genes envolvidos no metabolismo de folato e que estão relacionados com a ocorrência de DTNs estão listados na Tabela (LI; WAHLQVIST; LI, 2016).

Tabela 1 – Genes associados ao metabolismo do folato e aos defeitos do tubo neural.

Gene	SNP
<i>Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR)</i>	C677T; A1298C
<i>Metilenotetrahidrofolato desidrogenase (MTHFD1)</i>	G1958A
<i>Cistationina beta sintase (CBS)</i>	844ins68bp; 31bpVTNR
<i>Metionina sintase (MS)</i>	A2756G
<i>Metionina sintase redutase (MTRR)</i>	A66G
<i>Serina hidroximetil transferase (SHMT)</i>	C1420T; Δ TCTT1721-1724
<i>Betaína-homocisteína metiltransferase (BHMT)</i>	G742A
<i>Dihidrofolato redutase (DHFR)</i>	Δ 19 bp
<i>Timidilato sintase (TYS)</i>	28-bp repeat in 5'UTR
<i>Receptor de folato beta (FRβ)</i>	rs651646 (A/T)
<i>Transportador de folato 1 (RCF1)</i>	A80G
<i>Gene da transcobalamina (TC)</i>	C776G; A701G

Fonte: (Adaptado de MARCO et al., 2011).

Além disso, outros genes não relacionados ao metabolismo do folato demonstraram envolvimento na ocorrência de espinha bífida, como é o caso do gene que codifica o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o gene SHH, e os genes da família PAX, que são expressos durante a embriogênese e que são de extrema importância na formação do tubo neural e, posteriormente, da medula espinal.

4.8.1 Gene MTHFR (Metilenotetrahidrofolato Redutase)

Nesta enzima ocorre a substituição de uma Alanina por Valina (transição C>T no nucleotídeo 677). Uma deficiência na enzima MTHFR acarreta aumento da concentração plasmática de homocisteína, conhecida como hiper-homocisteinemia, que além de favorecer a instalação de placas de ateroma nas artérias elásticas e musculares, também pode acometer vasos de todos os calibres com trombozes tanto arteriais quanto venosas. No ciclo de metilação, o grupo metil do 5-MeTHF é transferido para homocisteína para produzir metionina. A metionina é convertida à S-adenosilmetionina, que consiste na principal doadora de grupos metil. A perda de um grupo metil da S-adenosilmetionina gera S-adenosilhomocisteína, sendo esta um forte inibidor das metiltransferases e, assim, deve ser removida por meio de sua conversão à homocisteína e adenosina (BLOM et al., 2006; ZETTERBERG, 2004).

Polimorfismos no domínio catalítico do gene MTHFR, por meio da substituição de uma alanina por valina, no nucleotídeo 677 (677 C>T), determina a formação de uma enzima termolábil, com sua atividade in vitro reduzida em 70% em homozigotos e 35%, em heterozigotos. A homozigose para o alelo 677T acarreta em aumento plasmático dos níveis de homocisteína, principalmente em indivíduos que apresentam concentrações baixas de folato. Além disso, a concentração elevada de homocisteína inibe a síntese de desoxitimidilato (dTMP) por meio da redução da atividade do cofator 5-MeTHF, que converte dUMP para dTMP, alterando o processo de síntese do DNA (BLOM et al., 2006; ZETTERBERG, 2004).

Um segundo polimorfismo do gene da MTHFR é uma transição 1298 A>C, que resulta da troca do glutamato em alanina. O alelo 1298C também determina diminuição na atividade da enzima MTHFR, embora não na mesma intensidade que o alelo 677T (BLOM et al., 2006).

Ensaio in vitro revelaram que indivíduos heterozigotos para os alelos 677T e 1298C, que produzem um genótipo 677CT/1298AC, apresentam redução de 40 a 50% na atividade da enzima MTHFR, possuindo um perfil bioquímico semelhante ao observado entre os homozigotos 677T e, portanto, aumento dos níveis de homocisteína e diminuição dos níveis de ácido fólico plasmáticos. Por outro lado,

resultados de estudos recentes indicaram que o polimorfismo 1298A>C não contribui significativamente para a hiper-homocisteinemia (ZETTERBERG, 2004).

A metilação reduzida associada a homocisteína elevada e ocorrência de DTNs levou à análise de variantes em outros genes que poderiam influenciar o ciclo de metilação (MTR, MTRR, BHMT e BHMT2) ou da transulfuração (CBS) de homocisteína. Polimorfismos no gene CBS, que codifica uma enzima que converte a homocisteína em cistationina, demonstrou ser capaz de elevar os níveis de homocisteína. No entanto, não foram encontradas evidências confirmando a associação do polimorfismo isolado do gene CBS com os DTNs (GREENE; STANIER; COPP, 2009; BOYLES; HAMMOCK; SPEER, 2005).

4.8.2 Via de sinalização SHH

A via sinalização do Hedgehog (Hh) foi caracterizada inicialmente em *Drosophila* sendo, posteriormente, demonstrado que a maioria dos componentes da via Hh e os mecanismos de transdução de sinal, são similares em vertebrados (LEE; ZHAO; INGHAM, 2016).

A atividade da via sinalizadora do gene Sonic Hedgehog (SHH), o principal membro da família Hh, é essencial durante os eventos que ocorrem durante a embriogênese, incluindo a estabilização do eixo direito-esquerdo, o padrão dorsoventral do tubo neural, o desenvolvimento craniofacial, o desenvolvimento do cérebro, da hipófise, dos membros, além de induzir a proliferação de células mesenquimais e a diferenciação da ectoderme. Inicialmente, o gene SHH é expresso na notocorda e nas células da placa neural, sendo responsável pela regulação dos centros organizadores do prosencéfalo e do rombencéfalo (MING; ROESSLER; MUENKE, 1998; MCMAHON; INGHAM; TABIN, 2003; BRISCOE; THÉRON, 2013). O gene SHH também está envolvido na especificação dos tipos celulares no tubo neural (conforme descrito no item 4.3)

Esta via de sinalização é iniciada por meio de um processo autocatalítico, produzindo um domínio N-terminal (Shh-N), que possui atividade sinalizadora, e um domínio C-terminal, que não colabora com a sinalização (VILLAVICENCIO; WALTERHOUSE; IANNACCONE, 2000). Durante a clivagem, uma molécula de colesterol é adicionada ao grupo carboxila do domínio N-terminal, a qual está envolvida no transporte, secreção e a interação do ligante com o seu receptor (MING; ROESSLER; MUENKE, 1998; VILLAVICENCIO; WALTERHOUSE; IANNACCONE, 2000; WALTERHOUSE; YOON; IANNACCONE, 1999).

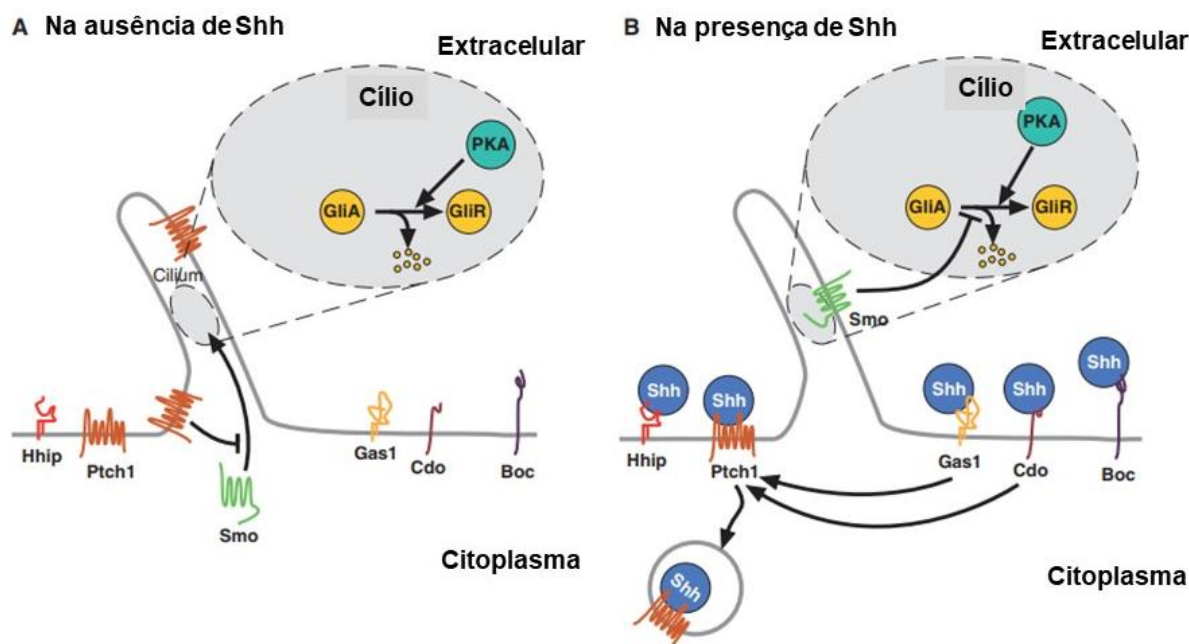
Em sequência, a proteína SHH clivada sofre uma reação de palmitação, tornando-as altamente hidrofóbicas (RYAN; CHIANG, 2013; BRISCOE; THÉRON, 2013; GOROJANKINA, 2016).

Desta forma, a proteína SHH interage com um complexo receptor composto de duas proteínas transmembranas, patched (PTCH 1 e 2) e smoothened (SMO). PTCH constitui a subunidade de ligação, enquanto que SMO é responsável pela transdução

do sinal mediada por proteínas da família Gli de fatores de transcrição. A ligação de Shh ao receptor PTCH, as interações PTCH-SMO são alteradas de forma que o SMO deixa de ser reprimido, o que leva à ativação de um ou mais membros da família de fatores de transcrição GLI1, GLI2, GLI3, que são translocados para o núcleo, onde irão controlar a transcrição de genes alvo. Na ausência da sinalização por SHH, a família de receptores PTCH inibem o transdutor de sinal SMO (Figura 23) (MING; ROESSLER; MUENKE, 1998; VILLAVICENCIO; WALTERHOUSE; IANNACCONE, 2000; WALTERHOUSE; YOON; IANNACCONE, 1999).

Três fatores de transcrição Gli (Gli1, 2 e 3) são expressos no tubo neural, sendo que Gli1 e Gli2 são fatores ativadores e Gli3 é repressor da transcrição do gene-alvo (MING; ROESSLER; MUENKE, 1998; WALTERHOUSE; YOON; IANNACCONE, 1999; DESSAUD; MCMAHON; BRISCOE, 2008; CHEN; JIANG, 2013).

Figura 21: Esquema da sinalização de Shh em vertebrados na ausência e presença de Shh.



(A) Na ausência de Shh, o receptor Patched 1 (Ptch1) reprime a atividade da proteína Smo. Outras moléculas envolvidas na sinalização Shh são expressas na superfície celular, incluindo Hhip1, que bloqueia a ativação da via de sinalização, e Cdo, Boc e Gas1, que atuam na ativação da via. (B) Quando a proteína Shh se liga ao receptor Ptch1, Smo deixa de ser inibida, iniciando a sinalização Shh. Além de Smo, outras proteínas são importantes para a transdução do sinal, por exemplo, a proteína quinase A (PKA), cujo envolvimento ainda não é bem esclarecido. A sinalização de Smo

promove a ativação ou bloqueio dos fatores de transcrição Gli. Três fatores de transcrição Gli (Gli1, 2 e 3) são expressos no tubo neural, sendo a expressão de Gli3 inibida quando exposta a altos níveis de Shh. Na ausência de Shh, Gli3 sofre um processo proteolítico e gera um repressor de transcrição (GliR). Da mesma forma, na ausência de sinalização Shh, Gli2 também sofre proteólise mas, diferentemente de Gli3, ele é quase que completamente degradado (representado nos círculos amarelos). Finalmente, a expressão de Gli1 é dependente da ativação de Gli2/3 (GliA). Gli1 é transportado para fora do núcleo na ausência de sinalização ativa.

Fonte: (Adaptado de DESSAUD; MCMAHON; BRISCOE, 2008).

Entretanto, a via de sinalização Shh em vertebrados é dependente da presença de um cílio primário (PC). A presença de vários componentes da via Shh nesta organela evidencia a sua importância. Foi demonstrado que, na ausência de ligante, o receptor Ptch se acumula no PC, mas, na presença de Shh, o receptor se desloca lateralmente, e bloqueia a inibição da proteína Smo (MILENKOVIC et al., 2015). Parece que o PC também está envolvido nos processos de repressão dos fatores Gli, por meio da produção de cAMP e a ativação concomitante de PKA (LEE; ZHAO; INGHAM, 2016).

4.8.3 PDGF, PDGFR α e sinalização PI3K

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), identificado há mais de três décadas, apresenta ação sobre o controle da proliferação em fibroblastos, células de músculo liso e células da glia, além de estar relacionado com o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (SORIANO, 1997; ANDRAE; GALLINI; BETSHOLTZ, 2008).

Em mamíferos, um total de nove genes diferentes codificam quatro cadeias PDGF diferentes (PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C e PDGF-D) (ANDRAE; GALLINI; BETSHOLTZ, 2008). O PDGF-B é principalmente expresso em células endoteliais vasculares, megacariócitos e neurônios, enquanto que PDGF-A e PDGF-C são expressos em células epiteliais, músculo e células neurais progenitoras. A expressão de PDGF-D ainda não está bem caracterizada, mas aparentemente ocorre em fibroblastos (SORIANO, 1997; ANDRAE; GALLINI; BETSHOLTZ, 2008).

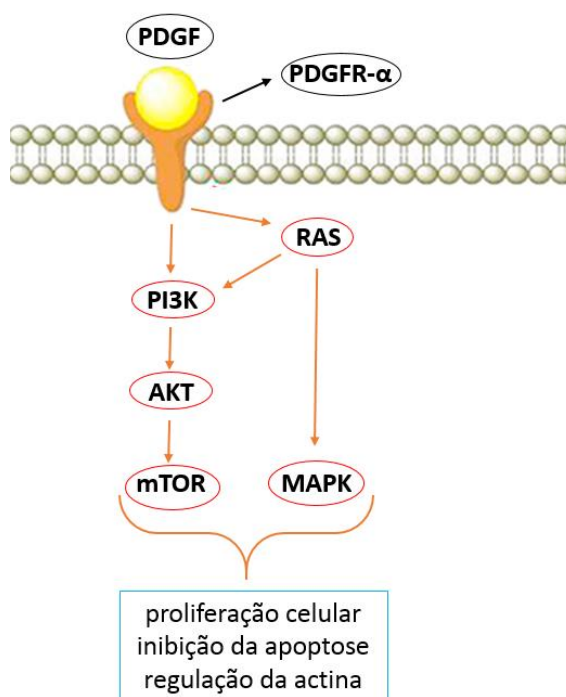
Os PDGFs atuam por meio de dois receptores (PDGFR- α e PDGFR- β) com estruturas comuns, incluindo cinco domínios de imunoglobulina extracelulares e um domínio de tirosina quinase (TK) intracelular (ANDRAE; GALLINI; BETSHOLTZ, 2008). O PDGFR- α é amplamente expresso em células mesenquimais e está envolvido na formação dos somitos e na diferenciação do esclerótomo e do dermatomo. Alterações na ativação desses receptores afetam o desenvolvimento vertebral e da musculatura dorsal, podendo causar espinha bífida (SORIANO, 1997; ANDRAE; GALLINI; BETSHOLTZ, 2008; PICKETT; OLSEN; TALLQUIST, 2008).

O PDGFR- α está associado com as vias de sinalização fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e Ras-MAPK (Proteína quinase ativada por mitógenos) as quais estão envolvidas em alguns processos do desenvolvimento embrionário (ANDRAE; GALLINI; BETSHOLTZ, 2008). Em estudos experimentais, embriões contendo deleção do gene que codifica o PDGFR- α apresentaram desenvolvimento anormal dos somitos correlacionado a malformações das costelas e das vértebras. Também foi demonstrado que os embriões que apresentam falhas da via de sinalização PI3K desenvolvem anormalidades esqueléticas, principalmente na formação do arco

vertebral, resultando em espinha bífida (ANDRAE; GALLINI; BETSHOLTZ, 2008; PICKETT; OLSEN; TALLQUIST, 2008).

O PI3K pertence a uma família de enzimas de fosfoinosítídeos e sua sinalização inclui as vias de serina/treonina quinase tais como Akt/PKB (proteína serina/treonina quinase b), alguns membros da família PKC e pequenas GTPases da família Rho (Figura 22). A ativação da via de sinalização PI3K, por meio do PDGFR- α , promove a reorganização da actina citoplasmática, movimentos celulares dirigidos, estimulação do crescimento celular e inibição da apoptose (Figura 22) (PICKETT; OLSEN; TALLQUIST, 2008).

Figura 22: Esquema das vias de sinalização relacionadas ao PDGFR- α .



A ligação do PDGF ao seu receptor PDGFR- α resulta na ativação das vias de sinalização RAS/MAPK e PI3K (PI3K-AKT-mTOR), envolvidas na proliferação celular, inibição da apoptose, regulação da actina, entre outros processos celulares (PICKETT; OLSEN; TALLQUIST, 2008).

A sinalização de PI3K por PDGFR- α é essencial para a migração celular do mesênquima dorsal derivado dos somitos e, a interrupção desta sinalização, pode conduzir à espinha bífida (SORIANO, 1997; BETSHOLTZ, 2003).

O papel exato de PDGF-A e de PDGF-C no desenvolvimento dos somitos não é conhecido, mas evidências sugerem que estas moléculas participam na

interação recíproca entre o miótomo e o esclerótomo, além da diferenciação dos condrócitos nas células esclerotômicas (SORIANO, 1997; BETSHOLTZ, 2003).

4.8.4 Família de genes PAX

Os genes Pax (Paired box) codificam uma família de fatores de transcrição que controlam processos complexos de diferenciação em diferentes linhagens celulares (BLAKE; ZIMAN, 2014). Estudos experimentais e análises genéticas em humanos revelaram que esta família de genes possui importante papel no desenvolvimento de vários órgãos e tecidos, incluindo as vértebras (PAX1), o sistema nervoso central (PAX2, PAX5, PAX8, PAX6, PAX3 e PAX7), as células de Schwann (PAX3 e PAX7) e a musculatura estriada esquelética (PAX3 and PAX7). Eles exibem padrões de expressão dinâmicos durante a organogênese, como demonstrados pelos fenótipos resultantes das mutações nestes genes, como por exemplo, a mutação de Pax1, o qual é expresso no esclerótomo, acarreta anormalidades esqueléticas, enquanto que mutações no gene Pax3 leva a anomalias em estruturas derivadas dos miótomos, tubo neural e crista neural (MANSOURI; HALLONET; GRUSS, 1996).

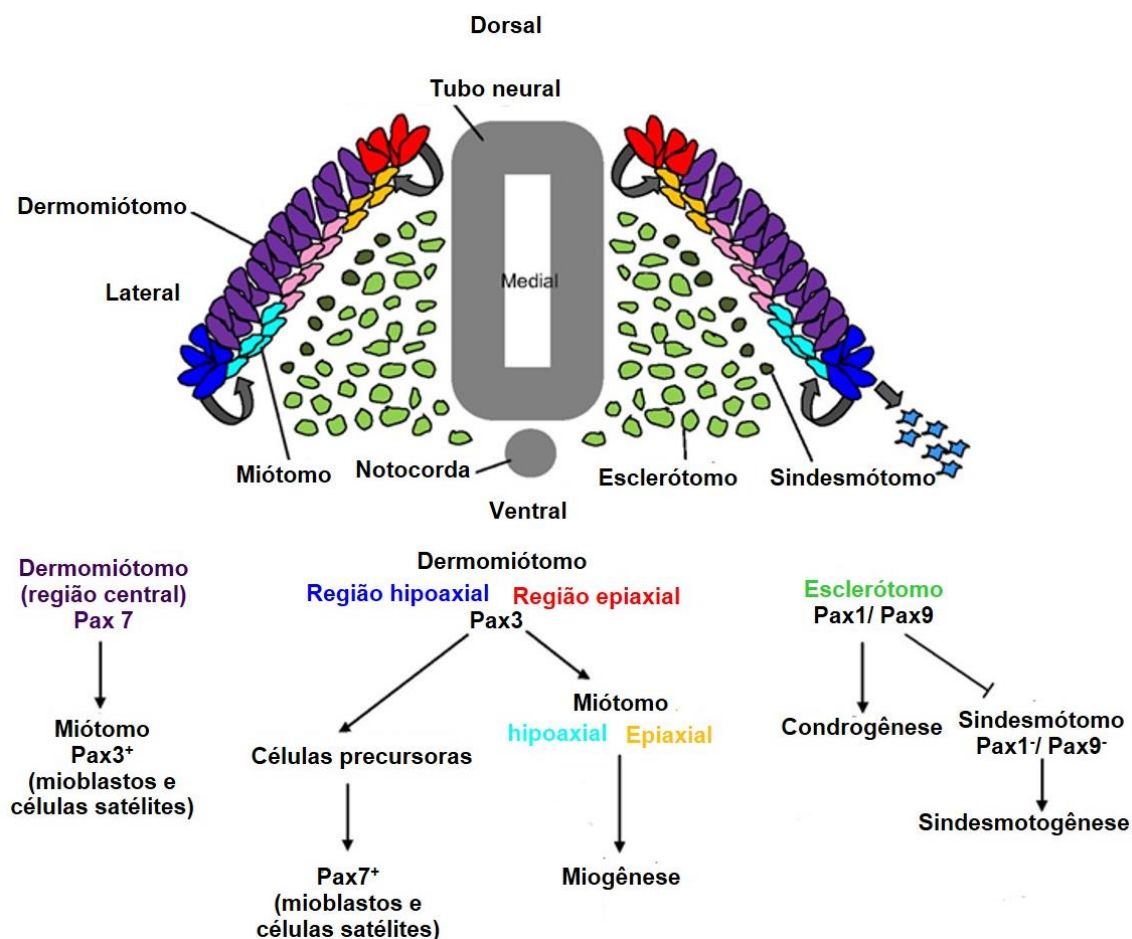
Além disso, os genes Pax são expressos na parte rostral do cérebro: Pax6 no telencéfalo, Pax3 e Pax7 no mesencéfalo, e Pax2, Pax5 e Pax8 no limite mesencéfalo/mielencéfalo. Na medula espinal, os genes Pax exibem padrões de expressão restritos ao longo do eixo dorso-ventral (MANSOURI; HALLONET; GRUSS, 1996).

O Pax1 e o Pax9 são os únicos genes da família Pax que não são expressos no sistema nervoso central. A expressão de Pax1 é primeiramente detectada na parte ventral dos somitos (esclerótomo) e, subsequentemente, na coluna vertebral em desenvolvimento, o que sugere sua importância na especificação do esclerótomo (WEHR; GRUSS, 1996). A expressão de Pax9 no esclerótomo é semelhante ao do Pax1, com exceção de que as células mais próximas da notocorda expressam, preferencialmente, níveis elevados de Pax1 e baixos de Pax9, enquanto que o contrário ocorre em células localizadas mais lateralmente, na região do esclerótomo (Figura 23) (DAHL; KOSEKI; BALLING, 1997).

Para essas células, as diferenças nos níveis de proteínas Pax1 e Pax9 a qual são submetidas podem ser críticas, de modo que a perda da expressão de um destes genes pode ser compensada parcialmente pela presença do outro (DAHL; KOSEKI;

BALLING, 1997). Nestes casos, os corpos vertebrais e os discos intervertebrais são especificamente afetados (Figura 23) (DAHL; KOSEKI; BALLING, 1997).

Figura 23: Genes Pax envolvidos na condrogênese e na diferenciação das linhagens de células progenitoras da musculatura estriada esquelética dos tendões.



Nas células da porção ventromedial dos somitos que se diferenciam em esclerótomo (representadas em verde), os genes Pax1 e Pax9 são expressos de forma Shh-dependentes. Na região dorsolateral do esclerótomo, no sindesmótomo (verde escuro), as expressões dos genes Pax 1 e Pax9 são inibidas, ocasionando a diferenciação das sindesmosses. Em contrapartida, o dermomiótomo se alonga dorsomedial e ventrolateralmente, diferenciando-se. A expressão do gene Pax3, então, torna-se restrita ao miótomo, em sua porção epiaxial (representado em vermelho) e hipoaxial (em azul escuro). Com a formação dos miócitos secundários, as duas regiões do miótomo sofrem delaminação e migração, originando os miótomos epiaxial (em laranja) e hipoaxial (azul claro). O gene Pax7 é principalmente expresso nas células da porção média do dermomiótomo (representado em rosa); estas células Pax3⁺Pax7⁺

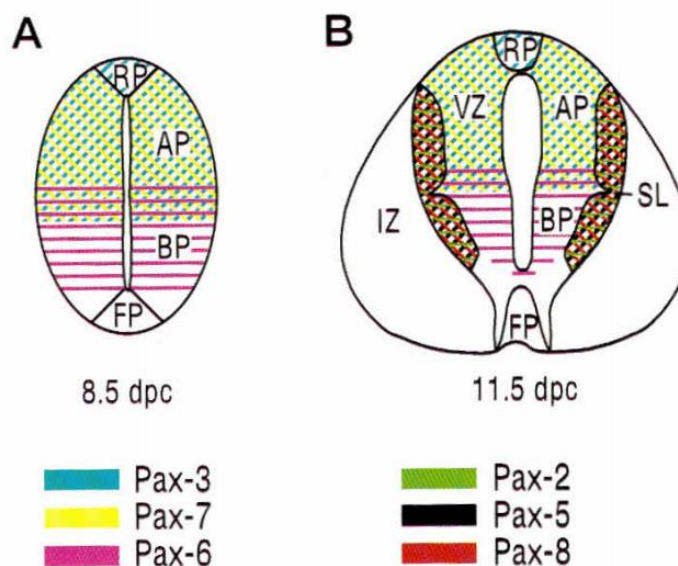
também se delaminam e originam progenitores necessários para o crescimento e desenvolvimento da musculatura estriada esquelética.

Fonte: (Adaptado de BLAKE; ZIMAN, 2014).

Pax6, Pax3 e Pax7 são os primeiros genes Pax a serem expressos no tubo neural em diferenciação. O Pax6 está presente na placa basal e intermediária, enquanto que o Pax3 e o Pax7 são expressos na placa alar. O domínio de expressão de Pax6 é parcialmente sobreposto com Pax3 e Pax7 (Figura 24 A). Este padrão de expressão específico sugere que esses fatores de transcrição podem desempenhar um papel importante durante o estabelecimento da polaridade dorso-ventral na medula espinal (WEHR; GRUSS, 1996; GRUSS; WALTHER, 1992).

Um segundo grupo de genes Pax (Pax2, Pax5 e Pax8) é expresso nas células pós-mitóticas da zona intermediária na medula espinal e no rombencéfalo (Figura 24 B) (WEHR; GRUSS, 1996).

Figura 24: Representação esquemática da expressão dos genes Pax no desenvolvimento da medula espinal.



Esquema de secções transversais do tubo neural em diferenciação mostrando a expressão de genes da família Pax ao longo do eixo dorso-ventral. (A) Em embrião de camundongo aos 8,5 d.p.c. (B) Em embrião de camundongo aos 11,5 d.p.c. AP: placa alar, BP: placa basal, d.p.c: dia pós coito, IZ: Zona intermédia, FP: placa do assoalho, SL: Sulcus limitans, RP: placa do teto, VZ: zona ventricular.

Fonte: (Adaptado de WEHR; GRUSS, 1996).

4.9 Fatores ambientais relacionados à ocorrência de espinha bífida

Uma vez que os DTNs são de origem multifatorial, é de grande interesse a compreensão das interações gene-ambiente, principalmente com relação a alguns teratógenos que, reconhecidamente, podem aumentar o risco dos DTNs. Essas interações podem contribuir com as variações sazonais ou geográficas atribuídas à incidência destas anomalias (DETRAIT, 2005; COPP; GREENE, 2010).

Desta forma, a deficiência de folato, o aumento da ingestão ácido retinóico, a ingestão de álcool e o tratamento terapêutico com anticonvulsivantes, como a carbamazepina e ácido valpróico, durante a gravidez, além do diabetes melitus, obesidade materna, deficiência de zinco e hipertermia estão relacionados ao aumento do risco de ocorrência de espinha bífida (Tabela 2) (NORTHRUP; VOLCIK, 2000; MARCO et al., 2011).

Tabela 2: Fatores não genéticos associados a defeitos do tubo neural.

Categoria	Agente teratogênico	Provável mecanismo
Antagonistas do folato	Carbamazepina Fumonisin Trimetoprim	Inibição da absorção do folato
Glicemia não controlada	Hiperglicemia materna ou obesidade	Aumento da morte celular
Inibidores da enzima histona desacetilase	Ácido valpróico	Interrupção da sinalização intracelular
Deficiência de micronutrientes	Folato	Desregulação do metabolismo do folato
	Inositol	
	Vitamina B12 Zinco	Desregulação da fosforilação da Proteína Quinase C
Alteração térmica	Hipertermia materna	Desconhecido

Fonte: (Adaptado de MARCO et al., 2011).

O ácido valpróico, em doses acima de 1000 mg/dia, está associado a 1 - 2% dos casos de DTNs, causando também malformações urogenitais, craniofaciais e cardíacas. Foi demonstrado o ácido valpróico é um antagonista do ácido fólico, levando

a regulação negativa do gene do receptor de folato (FOLR1). A carbamazepina também está associada a um risco de 1% na ocorrência da espinha bífida (SALIH; MURSHID; SEIDAHMED, 2014; MARCO et al., 2011).

Estudos mostraram que o ácido valpróico provoca hipometilação do DNA, sugerindo que o mesmo afeta a síntese de metionina por meio da atividade da metionina sintase, interrompendo e comprometendo o ciclo de metilação do DNA. Mais recentemente, mostrou-se que as histonas desacetilases são alvos diretos do ácido valpróico, onde o processo de desacetilação de resíduos de lisina nas caudas das histonas induzem a repressão transcricional por meio da condensação da cromatina. Os fármacos que modulam o estado de acetilação das histonas, como os inibidores de histonas desacetilases, podem inibir o crescimento celular e induzir sua diferenciação, o que pode alterar o padrão normal de desenvolvimento embrionário (HILL et al., 2010).

A monoterapia com carbamazepina, um antagonista do folato, apresentou-se significativa na ocorrência da espinha bífida em comparação com a ausência do uso de fármacos antiepiléticos, mas o risco foi significativamente menor quando comparada com a exposição ao ácido valpróico (HILL et al., 2010; MATLOW; KOREN, 2012).

Também tem sido demonstrado, em roedores, que a hipertermia materna pode ser um potente teratógeno causador de DTNs. Além disso, relatos clínicos sobre casos de DTNs, após episódios de febre materna ou após a participação de atividades onde ocorre aumento de temperatura corporal materna no início da gravidez, tem confirmado a associação entre hipertermia e risco aumentado da ocorrência de DTNs (SALIH; MURSHID; SEIDAHMED, 2014; DETRAIT, 2005).

Além disso, a exposição materna a pesticidas, por meio do consumo durante a gravidez de milho contaminado por fumonisina, foi associada ao desenvolvimento anormal do tubo neural, em populações que têm o milho como alimento básico (SALIH; MURSHID; SEIDAHMED, 2014).

4.10 Prevenção da espinha bífida por meio da suplementação com ácido fólico

O ácido fólico é composto de três unidades – um anel de pterina, ácido p-aminobenzóico, e ácido glutâmico. A quantidade diária necessária está normalmente presente em um grande número de alimentos. O folato é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B (Vit. B9), e pode ser encontrada principalmente em vegetais de folhas verdes (o termo folato deriva da palavra latina *folium*, que significa folha), na forma de poliglutamato, com 2 a 7 resíduos de ácido glutâmico (PITKIN, 2007).

A forma oxidada e sintética do folato, denominada ácido fólico, pode ser encontrada em alimentos fortificados e suplementos alimentares contendo um único glutamato e é mais biodisponível que o folato natural dos alimentos. Uma vez transportado para dentro das células, o ácido fólico é reduzido a tetrahidrofolato, forma biologicamente ativa no corpo (BEAUDIN; STOVER, 2007).

O ácido fólico/folato é fundamental no processo da multiplicação celular, sendo, portanto, imprescindível durante a gravidez. O folato interfere no aumento dos eritócitos, no alargamento do útero e no crescimento da placenta e do feto. Atua como coenzima no metabolismo de aminoácidos (glicina), síntese de purinas e pirimidinas, síntese de ácido nucléico DNA e RNA e é vital para a divisão celular e síntese proteica. Consequentemente, sua deficiência pode acarretar alterações na síntese de DNA e alterações cromossômicas (SANTOS; PEREIRA, 2007).

Em 1992, o Centers for Diseases Control and Prevention (CDC) recomendou a ingestão de 0,4 mg/dia de ácido fólico para as mulheres que planejassem engravidar e com história familiar negativa de DTN, mas para mulheres com alto risco a recomendação era de 4mg/dia. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou, em 2005, um regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada de proteína, vitaminas e minerais e que, no caso do ácido fólico, sugere-se 0,4mg/dia para mulheres não gestantes em idade fértil e 0,6mg/dia para gestantes (OLIVEIRA; REGGIOLLI; RIBEIRO, 2014).

As principais fontes de ácido fólico são os vegetais de coloração verde escuro, frutas cítricas, cereais, vísceras, feijão, abacate, abóbora, batata, carne de vaca, carne de porco, cenoura, couve, fígado, laranja, leite, maçã, milho, ovo, queijo e alimentos

enriquecidos (sob forma sintética). Há também a suplementação sob forma de comprimidos, muitas vezes distribuídos gratuitamente em ambulatórios públicos para gestantes carentes (OLIVEIRA; REGGIOLLI; RIBEIRO, 2014; SANTOS; PEREIRA, 2007).

Recomenda-se que o alimento seja ingerido cru ou parcialmente cozido por conta da instabilidade do ácido fólico a altas temperaturas. Alimentos contendo ácido fólico devem ser preparados com cuidado devido a sua fragilidade, podendo diminuir a sua quantidade em até 70% ou 100%, principalmente se o alimento sofrer um excesso de cozimento. (OLIVEIRA; REGGIOLLI; RIBEIRO, 2014).

A suplementação com ácido fólico demonstra resultado positivo na prevenção de malformações, tendo redução de 45% a 80% da ocorrência de DTN tanto em populações de alto risco como nas de baixo risco, desde que o mesmo comece a ser administrado com pelo menos 30 dias antes da possível concepção, na dosagem correta (0,4 mg/dia), e para populações de risco a dose recomendada (4 mg/dia) deve ser iniciada 90 dias antes da concepção e mantida pela embriogênese (até 12ª semana) (OLIVEIRA; REGGIOLLI; RIBEIRO, 2014).

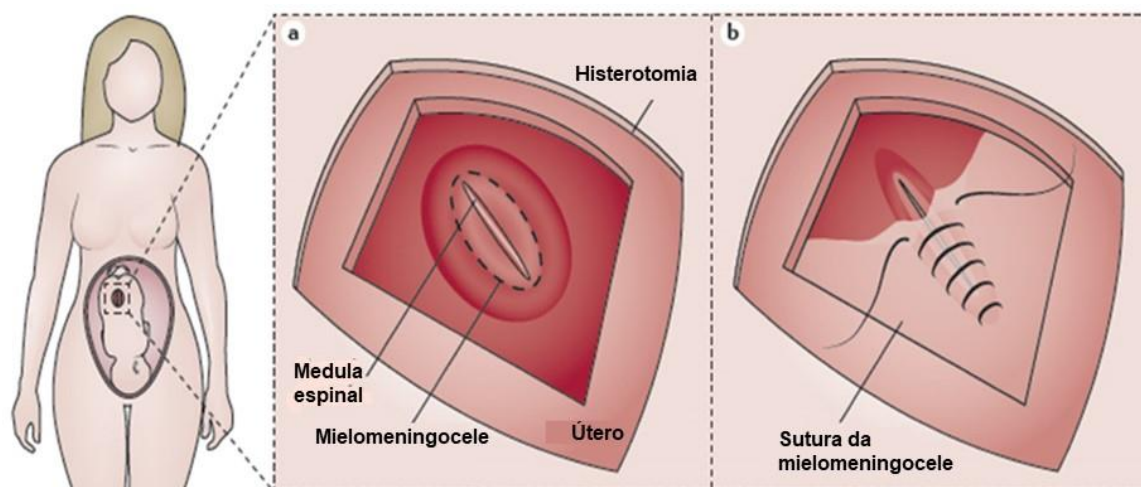
Até o momento o mecanismo pelo qual o ácido fólico previne os defeitos do tubo neural não é bem conhecido. Alguns estudos sugerem que este micronutriente corrige uma deficiência nutricional já instalada, enquanto que outros indicam que a função seria de compensar as deficiências que alguns indivíduos têm em processar o ácido fólico (SANTOS; PEREIRA, 2007).

4.11 Procedimento cirúrgico in útero para correção da espinha bífida

O tratamento cirúrgico, intrauterino, para a correção de espinha bífida (principalmente a mielomeningocele e meningocele) em fetos, diagnosticada rotineiramente antes da 20ª semana de gestação, mostrou ser uma opção terapêutica importante, proporcionando melhora no prognóstico neurológico na evolução dos recém-nascidos afetados, determinando maior preservação medular e melhores resultados clínicos, quando comparada a correção pós-natal. Além disso, os pacientes acometidos pela mielomeningocele apresentam diferentes graus de comprometimento motor em membros inferiores, restrição no desenvolvimento intelectual, disfunções nos controles de esfíncteres e alterações ortopédicas, causados em parte, devido à exposição do tecido nervoso à agressões mecânicas (movimentação fetal e traumas diretos contra a parede uterina) e químicas (líquido amniótico) intrauterinas, justificando a correção intrauterina do defeito (MEULI et al., 1997; HEFFEZ et al., 1990; HIROSE; FARMER, 2009; SALIH; MURSHID; SEIDAHMED, 2014). Entretanto, durante a intervenção cirúrgica podem ocorrer complicações maternas e fetais, tais como oligoâmnio, separação corioamniótica, descolamento de placenta e rotura prematura pré-termo de membranas (ADZICK et al., 2011).

A técnica neurocirúrgica clássica, que somente transpôs a técnica de correção pós-natal para utilização pré-natal, consiste no fechamento do defeito em planos distintos. Inicialmente, o tecido nervoso e o saco dural são descolados da pele adjacente; em sequência, a dura-máter é fechada, seguindo-se da sutura da fáscia, com reaproximação da musculatura e, finalmente, a sutura da pele, na linha média do defeito (Figura 25) (KOHL et al., 2009; COPP et al., 2015).

Figura 25: Esquema do procedimento cirúrgico in utero para correção de mielomeningocele.



Ao atingir 22 semanas de gestação, o feto pode ser submetido a cirurgia intrauterina para a reparação da mielomeningocele. Inicialmente é realizada uma histerotomia materna, onde a lesão fetal é exposta (esquema a), seguido pelo fechamento do defeito, usando a pele do feto ou um enxerto (esquema b).

Fonte: (Adaptado de COPP et al., 2015).

Perspectivas para o tratamento minimamente invasivo para a correção da mielomeningocele vêm sendo desenvolvidas em modelos animais e podem trazer subsídios para diminuir o trauma cirúrgico da cirurgia fetal (KOHL et al., 2009; BEVILACQUA; PEDREIRA, 2015).

Crianças com meningocele necessitam de acompanhamento médico e, as vezes, cuidados cirúrgicos pós natal dependendo da extensão da protusão cística. Sendo assim, neste caso, o procedimento *in útero* não é necessário, uma vez que os elementos da medula não estão expostos ao ambiente intrauterino (TUZUN; IZCI; POLAT, 2005; BOTTO et al., 1999).

Já a espinha bífida oculta pode evoluir de forma assintomática, durante toda a vida, e não necessita de tratamento cirúrgico, apenas acompanhamento médico, em caso desta ser sintomática (TUZUN; IZCI; POLAT, 2005; BOTTO et al., 1999).

5 CONCLUSÃO

A formação da medula espinal e das vértebras é um processo que envolve mecanismos celulares e moleculares altamente complexos. Alterações nestes processos podem acarretar a espinha bífida. Considerando-se que esta anomalia possui herança multifatorial, as interações entre fatores genéticos e ambientais são essenciais para o desenvolvimento normal dessas estruturas.

Conhecer os mecanismos morfogenéticos associados à espinha bífida é de extrema importância. Ainda que alguns deles sejam desconhecidos, vários fatores mostraram envolvimento na embriogênese da medula espinal e das vértebras, dentre eles os genes relacionados ao metabolismo do folato (gene MTHFR), à indução da proliferação e diferenciação de células na notocorda (gene SHH), à formação e diferenciação de somitos (fatores de crescimento PDGF e PDGFR) e a outros mecanismos presentes na formação dessas estruturas, que envolvem a família de genes PAX.

Assim como os mecanismos genéticos, os fatores ambientais podem também influenciar na formação e diferenciação de certas estruturas. A correlação mielomeningocele com a deficiência de ácido fólico já está bem estabelecida, e é imprescindível a regulação desse nutriente, por suplementação, durante a gravidez.

As formas mais brandas de espinha bífida (espinha bífida oculta e meningocele) exigem tratamentos menos complexos e a probabilidade de sequela são bem menores. Por outro lado, a mielomeningocele necessita de um tratamento mais agressivo e invasivo, como é o caso da cirurgia in útero, que pode ser feita quando a gestação atingir a 22^a semana, determinando maior preservação medular e melhores prognóstico, quando comparada a correção da anomalia após o nascimento.

Sendo assim, as constantes pesquisas para desvendar os mecanismos morfogenéticos associados a espinha bífida necessitam de continuidade para um maior entendimento desta malformação, assim como o aperfeiçoamento de tratamentos visando reduzir as sequelas nos pacientes acometidos pela mielomeningocele.

REFERÊNCIAS

ADZICK, N. S.. Fetal surgery for spina bifida: Past, present, future. **Seminars In Pediatric Surgery**, [s.l.], v. 22, n. 1, p.10-17, fev. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23395140>>. Acesso em: 02 jan. 2017.

ADZICK, N. S. et al.. A Randomized Trial of Prenatal versus Postnatal Repair of Myelomeningocele. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 364, n. 11, p.993-1004, 17 mar. 2011. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS). Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1014379#t=article>>. Acesso em: 31 ago. 2017.

AGUIAR, M. J.B. et al.. Defeitos de fechamento do tubo neural e fatores associados em recém-nascidos vivos e natimortos. **Jornal de Pediatria**, Porto Alegre, v. 79, n. 2, p. 129-134, abr. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572003000200007> . Acesso em: 20 set. 2016.

ALABURDA, J.; SHUNDO, L.. Ácido fólico e fortificação de alimentos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, [s.l.], v.66, n.2, p. 95-102, 2007. Disponível em <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552007000200002&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 31 ago. 2017.

AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS: Prenatal detection of neural tube defects. **Technical bulletin**, nº 99, Dec 1986.

ANDRAE, J.; GALLINI, R.; BETSHOLTZ, C.. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. **Genes & Development**, [s.l.], v. 22, n. 10, p.1276-1312, 15 maio 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18483217>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

BAILEY L.B. et al.. Folic acid supplements and fortification affect the risk for neural tube defects, vascular disease and cancer: evolving science. **Journal of Nutrition**,

v.133, n.6, p.1961S-1968S, jun. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12771346>>. Acesso em: 20 set. 2016.

BEAUDIN, A. E.; STOVER, P. J.. Folate-mediated one-carbon metabolism and neural tube defects: balancing genome synthesis and gene expression. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today**, Hoboken, v. 81, n. 3, p. 183-203, set. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17963270>>. Acesso em: 16 mar. 2017.

BETSHOLTZ, C.. Biology of platelet-derived growth factors in development. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today**, v. 69, n. 4, p.272-285, dez. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14745969>>. Acesso em: 15 jul. 2017.

BEVILACQUA, N.S.; PEDREIRA, D. A. L.. Fetoscopy for meningocele repair: past, present and future. **Einstein**, São Paulo, v. 13, n. 2, p.283-289, jun. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-45082015000200021>. Acesso em: 05 jan. 2017.

BLOM, H. J. et al.. Neural tube defects and folate: case far from closed. **Nature Reviews. Neuroscience**, [s.l], v.7, n.9, p.724–731, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16924261>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

BLOM, H.J.; SMULDERS, Y.. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v.34, n.1, p.5-81, 2011. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20814827>>. Acesso em 16 mar. 2017.

BOTTO L.D. et al.. Neural tube defects. **New England Journal of Medicine**, v.341, n.20, p.1509-1519, nov. 1999. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199911113412006>>. Acesso em: 20 set. 2016.

BOYLES, A.L.; HAMMOCK, P.; SPEER, M.C.. Candidate gene analysis in human neural tube defects. **American Journal Of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**, [s.l.], v. 135, n. 1, p.9-23, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15816061>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

BRASIL. Resolução nº 344, de 13 de dezembro de 2002. Aprova o regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico, constante no anexo desta resolução. **Diário Oficial da Republica federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 de dezembro de 2002.

BRISCOE, J.; THÉRON, P. P.. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s.l.], v. 14, n. 7, p.418-431, 30 maio 2013. Springer Nature. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrm/journal/v14/n7/full/nrm3598.html?foxtrotcallback=true>>. Acesso em: 31 ago. 2017.

CARPENTER, E. M.. Hox Genes and Spinal Cord Development. **Developmental Neuroscience**, California, v. 24, n. 1, p.24-34, jan. 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12145408>>. Acesso em: 16 mar. 2017.

CHEN, Y.; JIANG, J.. Decoding the phosphorylation code in Hedgehog signal transduction. **Cell Research**, [s.l.], v. 23, n. 2, p.186-200, 22 jan. 2013. Springer Nature. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23337587>>. Acesso em: 31 ago. 2017.

CHRIST, B.; HUANG, R.; SCAAL, M.. Amniote somite derivatives. **Developmental Dynamics**, v. 236, n. 9, p.2382-2396, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17557304>>. Acesso em: 15 jul. 2017.

CRIDER, K.S. et al.. Folate and DNA Methylation: A Review of Molecular Mechanisms and the Evidence for Folate's Role. **Advances in Nutrition**, [s.l.], v.3, n.1, p.21-38, jan. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22332098>>. Acesso em: 15 jul. 2017.

COPP, A.J. et al.. Spina bifida. **Nature Reviews Disease Primers**, [s.l.], p.1-45, 30 abr. 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27189655>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

COPP, A.J.; GREENE, N.D.. Defining a Particular Pathway of Neural Tube Closure. **Developmental Cell**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.1-2, jan. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20152170>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

COPP, A.J; GREENE, N.D.. Genetics and development of neural tube defects. **The Journal Of Pathology**, [s.l.], p.1-28, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19918803>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

CORRAL, R.D.; BREITKREUZ, D.N.; STOREY, K.G.. Onset of neuronal differentiation is regulated by paraxial mesoderm and requires attenuation of FGF signalling. **Development**, [s.l.], v. 7, n. 129, p.1681-1691, mar. 2002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11923204>>. Acesso em: 15 jul. 2017.

CORRAL, R.D.; STOREY, K.G.. Markers in vertebrate neurogenesis. **Nature Reviews Neuroscience**, [s.l.], v. 2, n. 11, p.835-839, nov. 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11715060>>. Acesso em: 15 jul. 2015.

CUNHA, C. J. et al.. Fatores genéticos e ambientais associados a espinha bífida. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 5, p. 268-274, mai 2005. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-720320050005000007>. Acesso em: 20 set. 2016.

DAHL, E.; KOSEKI, H.; BALLING, R.. Pax genes and organogenesis. **Bioessays**, Reino Unido, v. 19, n. 9, p.755-765, set. 1997. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9297966>>. Acesso em: 15 jul. 2017.

DESSAUD, E.; MCMAHON, A. P.; BRISCOE, J.. Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional

network. **Development**, v. 135, n. 15, p.2489-2503, 25 jun. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18621990>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

DETRAIT, E.R. et al.. Human Neural Tube Defects: Developmental Biology, Epidemiology, and Genetics. **Neurotoxicology and teratology**, [s.l.], v.27, n.3, p. 515-524, mai/jun, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15939212>>. Acesso em: 25 out. 2016.

DRÉAU, G. L.; MARTÍ, E.. Dorsal-ventral patterning of the neural tube: A tale of three signals. **Developmental Neurobiology**, [s.l.], v. 72, n. 12, p.1471-1481, 20 jul. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22821665>>. Acesso em: 15 jul. 2017.

ENDO, T.. Molecular mechanisms of skeletal muscle development, regeneration, and osteogenic conversion. **Bone**, [s.l.], v. 80, p.2-13, nov. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26453493>>. Acesso em: 15 jul. 2017.

FREY L.; HAUSER W.A.. Epidemiology of neural tube defects. **Epilepsia**, [s.l.], v. 44, suppl.3, p. 4-13, jun. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12790881>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

GOROJANKINA, T.. Hedgehog signaling pathway: a novel model and molecular mechanisms of signal transduction. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [s.l.], v. 73, n. 7, p.1317-1332, 13 jan. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26762301>>. Acesso em: 31 ago. 2017.

GREENE, N.D.; COPP, A.J.. Development of the vertebrate central nervous system: formation of the neural tube. **Prenatal Diagnosis**, [s.l.], v. 29, n. 4, p.303-311, abr. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19206138>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

GREENE, N. D.; STANIER, P.; COPP, A. J.. Genetics of human neural tube defects. **Human Molecular Genetics**, [s.l.], v. 18, n. 2, p.113-129, 6 out. 2009.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2758708/>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

GRUSS, P.; WALTHER, C.. Pax in development. **Cell**, Gottingen, v. 69, n. 5, p.719-722, maio 1992. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1591773>>. Acesso em: 16 mar. 2017.

HEFFEZ, D.S. et al.. The paralysis associated with myelomeningocele: clinical and experimental data implicating a preventable spinal cord injury. **Neurosurgery**, [s.l.], v. 6, n. 26, p.987-992, jun. 1990. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2362676>>. Acesso em: 31 ago. 2017.

HILL, D. S. et al.. Efeitos Teratogênicos de Drogas Antiepiléticas. **Avaliação especializada de neuroterapeutics**, [s.l.], v.10, n.6, p.943-959, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2970517/>>. Acesso em: 5 out. 2017.

HIROSE, S.; FARMER, D. L.. Fetal Surgery for Myelomeningocele. **Clinics In Perinatology**, [s.l.], v. 36, n. 2, p.431-438, jun. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19559329>>. Acesso em: 15 jul. 2017.

IMBARD, A.; BENOIST, J.F.; BLOM, H.. Neural Tube Defects, Folic Acid and Methylation. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [s.l.], v. 10, n. 9, p.4352-4389, 17 set. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24048206>>. Acesso em: 25 out. 2016.

KÄLLÉN, B.. Early Embryogenesis of the Central Nervous System with Special Reference to Closure Defects. **Developmental Medicine & Child Neurology**, [s.l.], v. 10, p.44-53, out. 1968. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8749.1968.tb04846.x/abstract>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

KANDEL, Eric R.. **Principles of Neural Science**. 5. ed. [s.l.]: Mc Graw Hill, 2012.

KAPLAN, K.M.; SPIVAK, J.M.; BENDO, J.A.. Embryology of the spine and associated congenital abnormalities. **The Spine Journal**, [s.l.], v. 5, n. 5, p.564-576, set. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16153587>>. Acesso em: 13 fev. 2017.

KRISHNASWAMY, K.; NAIR, K. M.. Importance of folate in human nutrition. **British Journal Of Nutrition**, [s.l.], v. 85, n. 2, p.115-124, maio 2001. Cambridge University Press (CUP). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1079/bjn2000303>>. Acesso em: 08 jan. 2017.

KIBAR, Z.; CAPRA, V.; GROS, P.. Toward understanding the genetic basis of neural tube defects. **Clinical Genetics**, [s.l.], v. 71, n. 4, p.295-310, 25 abr. 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17470131>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

KOHL, T. et al.. Percutaneous fetoscopic patch closure of human spina bifida aperta: advances in fetal surgical techniques may obviate the need for early postnatal neurosurgical intervention. **Surgical Endoscopy**, [s.l.], v. 23, n. 4, p.890-895, 26 set. 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18818968>>. Acesso em: 31 ago. 2017.

LEE, R. T. H.; ZHAO, Z.; INGHAM, P. W.. Hedgehog signalling. **Development**, [s.l.], v. 143, n. 3, p.367-372, 1 fev. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26839340>>. Acesso em: 13 fev. 2017.

LI, K.; WAHLQVIST, M.; LI, D.. Nutrition, One-Carbon Metabolism and Neural Tube Defects: A Review. **Nutrients**, [s.l.], v. 8, n. 11, p.1-13, 23 nov. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27886045>>. Acesso em: 16 mar. 2017.

LOCASALE, J. W.. Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 13, n. 8, p.572-583, 4 jul. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23822983>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

MANSOURI, A.; HALLONET, M.; GRUSS, P.. Pax genes and their roles in cell differentiation and development. **Current Opinion In Cell Biology**, Gottingen, v. 8, n. 6, p.851-857, dez. 1996. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8939674>>. Acesso em: 15 jul. 2017.

MARCO, P. et al.. Human neural tube defects: Genetic causes and prevention. **Biofactors**, [s.l.], v. 37, n. 4, p.261-268, 14 jun. 2011.. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21674647>>. Acesso em: 25 out. 2016.

MAROTO, M.; BONE, R.A.; DALE, J.K.. Somitogenesis. **Development**, [s.l.], v.139, n.14, p.2453-2456, jul. 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22736241>>. Acesso em: 13 fev. 2017.

MATLOW, J.; KOREN, G.. Is carbamazepine safe to take during pregnancy? **Canadian Family Physician**, [s.l.], v.58, n.2, p.163-164, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3279268/>>. Acesso em: 10 out. 2017.

McMAHON, A.P.; INGHAM, P.W.; TABIN, C.J.. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. **Current Topics in Developmental Biology**, [s.l.], v.53, p.1–114, 2003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12509125>>. Acesso em: 31 ago. 2017.

MEULI, M. et al.. The spinal cord lesion in human fetuses with myelomeningocele: implications for fetal surgery. **Journal of Pediatric Surgery**, [s.l.], v.32, n.3, p.448-52, 1997. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9094015>>. Acesso em: 31 ago. 2017.

MILENKOVIC, L. et al.. Single-molecule imaging of Hedgehog pathway protein Smoothened in primary cilia reveals binding events regulated by Patched1. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 112, n. 27, p.8320-8325, 22 jun. 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26100903>>. Acesso em: 31 ago. 2017.

MING, J.; ROESSLER, E.; MUENKE, M.. Human developmental disorders and the Sonic hedgehog pathway. **Molecular Medicine Today**, [s.l.], v. 4, n. 8, p.343-349, ago. 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9755453>>. Acesso em: 13 fev. 2017.

NAKATSU, T.; SHIOTA, K.. Neurulation in the human embryo revisited. **Congenital Anomalies**, Kyoto, v. 40, n. 2, p.93-98, jun. 2000. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1741-4520.2000.tb00912.x/abstract>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

NASSER, C. et al.. Semana da conscientização sobre a importância do ácido fólico. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, Porto Alegre, v. 11, n. 4, p. 199-203, dec. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1676-26492005000400009&script=sci_abstract&lng=pt>. Acesso em: 25 out. 2016.

NIETO, M. A.. Epithelial Plasticity: A Common Theme in Embryonic and Cancer Cells. **Science**, [s.l.], v. 342, n. 6159, p.1234850, 7 nov. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24202173>>. Acesso em: 15 jul. 2017.

NIKOLOPOULOU, E. et al. Neural tube closure: cellular, molecular and biomechanical mechanisms. **Development**, [s.l.], v. 144, n. 4, p.552-566, 14 fev. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28196803>> . Acesso em: 16 mar. 2017.

NODEN, D. M.; TRAINOR, P. A.. Relations and interactions between cranial mesoderm and neural crest populations. **Journal Of Anatomy**, [s.l.], v. 207, n. 5, p.575-601, 2 nov. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16313393>>. Acesso em: 17 jun. 2017.

NORTHROP, H., VOLCIK, K.A.. Spina bifida and other neural tube defects. **Current Problems in Pediatrics**, [s.l.], v. 30, n. 10, p. 313-32, nov/dec, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11147289>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

OBICAN, S.G. et al.. Folic acid in early pregnancy: a public health success story. **Faseb Journal**, Bethesda, v. 24, n. 11, p. 4167-4174, Nov 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20631328>>. Acesso em: 13 fev. 2017.

OLIVEIRA, A. C.; REGGIOLLI, M. R.; RIBEIRO, K. R.. A importância do ácido fólico na redução dos defeitos do tubo neural durante a gestação. **Interciência & Sociedade**, São Paulo, v. 3, n. 2, p.9-16, 2014. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2007000100003>. Acesso em: 25 out. 2016.

ORR-URTREGER, A. et al.. Developmental expression of the alpha receptor for platelet-derived growth factor, which is deleted in the embryonic lethal Patch mutation. **Development**, Rehovot, v.115, n.1, p. 289-303. maio 1992. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1322271>>. Acesso em: 17 jun. 2017.

PADMANABHAN, R.. Etiology, pathogenesis and prevention of neural tube defects. **Congenital Anomalies**, [s.l.], v. 46, n. 2, p.55-67, jun. 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16732763>>. Acesso em: 13 fev. 2017.

PARIDAEN J.T.; HUTTNER W.B.. Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. **EMBO Reports**, [s.l.], v. 15, n.4, p.351-364, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24639559>>. Acesso em: 15 jul. 2017.

PAYNE, J.; SHIBASAKI, F.; MERCOLA, M.. Spina bifida occulta in homozygous Patch mouse embryos. **Developmental Dynamics**, Boston, v. 209, n. 1, p.105-116, maio 1997. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9142500>>. Acesso em: 17 jun. 2017.

PERRY, V.L. et al.. Operative nuances of myelomeningocele closure. **Neurosurgery**, Pittsburgh, v. 51, n. 3, p.719-724, set. 2002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12188950>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

PICKETT, E.A.; OLSEN, G.S.; TALLQUIST, M.D.. Disruption of PDGFR α -initiated PI3K activation and migration of somite derivatives leads to spina bifida. **Development**, England, v.135, n.3, p.589-598, 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2928559/>>. Acesso em: 15 jul. 2017.

PIERRE-KHAN, A.. Spina bífida aberta: aspects cliniques, prognostic et prise em charge. **Medicine Foetale et Échographie em Gynécologie**, [s.l], n.2, p. 23-26, 1990. Disponível em: < <http://www.beep.ird.fr/collect/uouaga/index/assoc/M13063.dir/M13063.pdf>>. Acesso em: 05 jan.2017.

PITKIN, R.M.. Folate and neural tube defects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.85, n.1, p. 285-288, Jan, 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17209211>>. Acesso em: 17 jun. 2017.

QUINN, T.M.; ADZICK, N.S.. Fetal surgery. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, [s.l], v.24, n.1, p.143-157, 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9086523>>. Acesso em: 25 out.2016.

REYNOLDS, E.. Vitamin B12, folic acid, and the nervous system. **The Lancet Neurology**, [s.l.], v. 5, n. 11, p.949-960, nov. 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17052662>>. Acesso em: 13 fev. 2017.

RISBUD, M.V.; SHAPIRO, I.M.. Notochordal cells in the adult intervertebral disc: new perspective on an old question. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, [s.l], v.21, n.1, p.29-41, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21967331>>. Acesso em: 08 ago. 2017.

ROSSI, A. et al.. Imaging in spine and spinal cord malformations. **European Journal Of Radiology**, Genova, v. 50, n. 2, p.177-200, maio 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15081131>>. Acesso em: 08 ago. 2017.

ROTHENBERG, S.P. et al. Autoantibodies against Folate Receptors in Women with a Pregnancy Complicated by a Neural-Tube Defect. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 350, n. 2, p.134-142, 8 jan. 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14711912>>. Acesso em: 16 mar. 2017.

SÁ, M. R. C. et al.. Perfil de crianças com Mielomeningocele em hospital de referência - Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Neurologia**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 46, p.7-11, dez. 2010. Disponível em: < <http://files.bvs.br/upload/S/0101-8469/2010/v46n4/a1773.pdf>>. Acesso em: 25 out. 2016.

SBRAGIA, L.. Tratamento das malformações fetais intraútero. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 1, p. 47-54, Jan. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010072032010000100008&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 03 set. 2017.

SCAAL, M.. Early development of the vertebral column. **Seminars In Cell & Developmental Biology**, [s.l.], v. 49, p.83-91, jan. 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26564689>>. Acesso em: 21 jul. 2017.

SAITSU, H. et al. Development of the posterior neural tube in human embryos. **Anatomy And Embryology**, [s.l.], v.209, n.2, p.107-117, 14 out. 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15597189>>. Acesso em: 16 mar. 2017.

SAKER, E. et al.. The Human Central Canal of the Spinal Cord: A Comprehensive Review of its Anatomy, Embryology, Molecular Development, Variants, and Pathology. **Cureus**, [s.l.], v.12, n.8, p.1-13, dec. 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5234862/>>. Acesso em: 23 jun. 2017.

SALIH, M. A.; MURSHID, W. R.; SEIDAHMED, M. Z.. Epidemiology, prenatal management, and prevention of neural tube defects. **Saudi Medical Journal**, [s.l.], v.35, n.1, p.15–28, 2014. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4362104/>>. Acesso em: 21 jul. 2017.

SANTOS, L. M. P.; PEREIRA, M. Z.. Efeito da fortificação com ácido fólico na redução dos defeitos do tubo neural. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 1, p. 17-24, jan. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2007000100003>. Acesso em: 05 jan. 2017.

SORIANO, P.. The PDGF α receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites. **Basic Sciences**. Seattle, v.124, n.14, p. 2691-2700, 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9226440>>. Acesso em: 13 fev. 2017.

SUZUKI, M.; MORITA, H.; UENO, N.. Molecular mechanisms of cell shape changes that contribute to vertebrate neural tube closure. **Development, Growth & Differentiation**, Nishigonaka, v. 54, n. 3, p.266-276, abr. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22524600>>. Acesso em: 17 mai. 2017.

TANABE, Y.; JESSELL, T. M.. Diversity and Pattern in the Developing Spinal Cord. **Science**, New York, v.274, n.5290, p. 1115-1123. nov. 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8895454>> . Acesso em: 05 ago. 2017.

THIERY, J. P. et al. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. **Cell**, [s.l.], v. 139, n. 5, p.871-890, nov. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19945376>>. Acesso em: 16 mar. 2017.

TUZUN, Y.; IZCI, Y.; POLAT, K. Y.. Anterior Sacral Meningocele: Excision by the Abdominal Approach. **Pediatric Neurosurgery**, [s.l.], v. 41, n. 5, p.244-247, 29 set. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16195676>>. Acesso em: 05 out. 2017.

ULLOA, F.; MARTÍ, E.. Wnt won the war: Antagonistic role of Wnt over Shh controls dorso-ventral patterning of the vertebrate neural tube. **Developmental Dynamics**,

[s.l.], v. 1, n. 239, p.69-76, jan. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19681160>>. Acesso em: 05 ago. 2017.

VILLAVICENCIO, E. H.; WALTERHOUSE, D. O.; IANNACCONE, P. M.. The Sonic Hedgehog–Patched–Gli Pathway in Human Development and Disease. **The American Journal Of Human Genetics**, [s.l.], v. 67, n. 5, p.1047-1054, nov. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1288546/>>. Acesso em: 05 ago. 2017.

WALTERHOUSE, D. O.; YOON, J. W.; IANNACCONE, P. M.. Developmental Pathways: Sonic Hedgehog-Patched-GLI. **Research Review**, Chicago, v. 107, n. 3, p.167-171, mar. 1999. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10064544>>. Acesso em: 22 jul. 2017.

WEHR, R.; GRUSS, P.. Pax and vertebrate development. **The International Journal of Developmental Biology**, Gottingen, v. 1, n. 40, p.369-377, fev. 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8735950>>. Acesso em: 30 abr. 2017.

WILSON, L.; MADEN, M.. The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. **Developmental Biology**, [s.l.], v. 282, n. 1, p.1-13, jun. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15936325>>. Acesso em: 17 jul, 2017.

YAMAGUCHI, Y.; MIURA, M.. How to form and close the brain: insight into the mechanism of cranial neural tube closure in mammals. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [s.l.], v. 70, n. 17, p.3171-3186, 15 dez. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3742426/>>. Acesso em: 15 mai. 2017.

YANG, H.J. et al.. Secondary neurulation of human embryos: morphological changes and the expression of neuronal antigens. **Child's Nervous System**, [s.l.], v.30, n.1, p.73-82, jan. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23760472>>. Acesso em: 23 abr. 2017.

ZANNINO, D. A.; SAGERSTRÖM, C. G.. An emerging role for prdm family genes in dorsoventral patterning of the vertebrate nervous system. **Neural Development**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.1-12, 24 out. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26499851>>. Acesso em: 15 jan. 2017.

ZETTERBERG, Henrik. Methylenetetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. **Reproductive Biology And Endocrinology**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.1-8, 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14969589>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

ZOHN, I.E.; SARKAR, A.A.. Does the cranial mesenchyme contribute to neural fold elevation during neurulation? **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, [s.l.], v. 94, n. 10, p.841-848, 3 set. 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3473154/>>. Acesso em: 10 mar. 2017.