

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a YARA MARIA RAUH MÜLLER

**ESTUDO DA AÇÃO DE FATORES FÍSICOS E QUÍMICOS SOBRE A
MORFOGÊNESE DE EMBRIÕES DE *Gallus gallus domesticus*, COM
ÊNFASE NO DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

PAULO FERNANDO DIAS

FLORIANÓPOLIS, AGOSTO DE 1996

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO
ORIENTADORA: PROF^a. DR^a YARA MARIA RAUH MÜLLER

**ESTUDO DA AÇÃO DE FATORES FÍSICOS E QUÍMICOS SOBRE A
MORFOGÊNESE DE EMBRIÕES DE *Gallus gallus domesticus*, COM
ÊNFASE NO DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

PAULO FERNANDO DIAS

*Dissertação submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre
em Neurociências e Comportamento.*

FLORIANÓPOLIS, AGOSTO DE 1996

ESTUDO DA AÇÃO DE FATORES FÍSICOS E QUÍMICOS SOBRE A MORFOGÊNESE DE EMBRIÕES DE *Gallus gallus domesticus*, COM ÊNFASE NO DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

PAULO FERNANDO DIAS

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

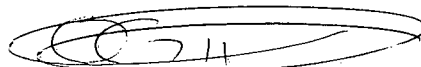
MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO

na área de Neurofisiologia e Comportamento Aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento.

Orientador

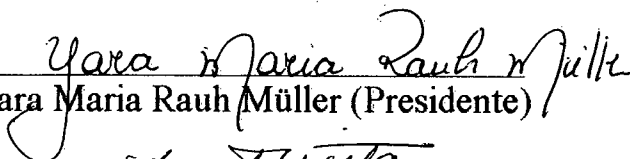

Yara Maria Rauh Müller

Coordenador do Curso



Odival Cezar Gasparotto

Banca Examinadora


Yara Maria Rauh Müller (Presidente)



Hiroko Nitta



José Carlos Fiad Padilha

A minha mãe,
à memória de meu pai
e a minha filha Virgínia.

À Gê, minha esposa, por sua constante
colaboração, paciência e dedicação.

“Realidade é esta coisa que está aí do lado de fora do nosso corpo. Fluindo sem parar, realidade é esta ilusão dos sentidos, é esta cachoeira de signos, realidade é esta incessante explosão de DNA que vai gerando vida, ... formas que tem de se reproduzir e que nós perseguimos atrás, tentando interpretar. A galáxia, o sentimento do amor, a fome, o cristal, o sangue e o medo, o esperma e o ovo, todos estão num fluir, sem rumo.”

(Arnaldo Jabor)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Professora Dra. Yara Maria Rauh Müller pelo apoio e incentivo dados a este estudo e por sua orientação e dedicação, no decorrer deste trabalho e do Curso.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento, pelos conhecimentos transmitidos e pelo companheirismo.

Em especial, ao Professor Pedro Barbeta por sua colaboração nos procedimentos estatísticos.

Aos Professores do Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias, pelo fornecimento do material para estudo.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Embriologia, pelo apoio recebido durante todas as etapas do trabalho.

Ao Sr. Nivaldo Manoel Vicente por sua prestimosa colaboração na Secretaria do Curso.

À CAPES, pelo apoio financeiro dado através do Curso.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO	1
1. OBJETIVOS	18
1.1. Objetivo Geral	18
1.2. Objetivos específicos	18
2. MATERIAL E MÉTODO	19
2.1. Material de estudo	19
2.2. Metodologia	20
2.2.1 Condições de incubação	20
2.2.2. Manuseio e análise do material de estudo	20
2.2.3. critérios utilizados na caracterização da morfogênese	26
2.2.4. Fotografias	28
2.2.5. Estudo descritivo dos resultados	29

3. RESULTADOS	30
3.1. Análise das unidades amostrais	32
3.1.1. Período de 24h	32
3.1.2. Período de 96h	33
3.2. Caracterização dos embriões	34
3.2.1. Discriminação dos embriões normais entre as modalidades de incubação	34
3.2.2. Discriminação dos embriões malformados entre as modalidades de incubação	34
3.2.3. Descrição das categorias de alterações da forma registradas nos embriões malformados	35
3.3. Análise dos níveis de morfogênese	42
4. DISCUSSÃO	58
5. CONCLUSÃO	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXO	94

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Eventos marcantes do desenvolvimento de *Gallus gallus domesticus*, em relação aos estádios descritos por Hamburger & Hamilton (1951), o respectivo tempo de incubação padrão, os períodos de cultura intercalados aos procedimentos e esquemas relativos à forma embrionária básica, nos períodos de 24h, 48h, 72h, e 96h de incubação. 23
- FIGURA 2 - Diagrama representando o nível aproximado em que foram aplicadas as perfurações e injeções (asterísticos sobre a linha pontilhada transversal a linha anterior do embrião). 25
- FIGURA 3 - Frequência dos embriões normais e malformados e número de indivíduos da amostra, entre as modalidades de incubação (i), (a), (R1), (R2) (A), (R), (T1) e (P), após o período de 96h. 33
- FIGURA 4 - Frequência absoluta do padrão de malformação "Sphinx-shaped" nas modalidades de incubação T1, R2, P, 12, II e I. 38
- FIGURA 5 - Frequência absoluta do padrão de malformação "Fish-shaped" em relação às modalidades de teste R, RI, II e P. 38
- FIGURA 6 - Frequência relativa dos níveis morfológicos de 1 a 5, em todas as categorias de forma embrionária, registradas nas diversas modalidades de incubação. 43
- FIGURA 7 - Intervalos para médias (95% de confiança) de nível morfológico para as modalidades de incubação: i, A, a, R, R1, R2, 1, II, 12, P, T1, T2. 46

- FIGURA 8 - Médias de nível morfológico máximo por embrião de *Gallus gallus domesticus*. 47
- FIGURA 9 - Frequência de embriões referidos por nível de morfogênese máximo modalidades: i, a, A, R, RI e R2 (a), e T1, P, I2, I, I1 e T2 (b). 48
- FIGURA 10 - Esquema interpretativo dos 5 níveis de morfogênese, quanto à integridade do sistema nervoso central e ao tempo relativo ao desenvolvimento embrionário, de acordo com os resultados obtidos no presente estudo. 49
- FIGURA 11 - Embrião normal de *Gallus gallus domesticus* (72h), estágio 12HH; controle i - (A) Alantóide; (F) Flexura cervical; (MS) Mesencéfalo e (V) Vesícula óptica. Aumento 42 X. 50
- FIGURA 12 - Embrião normal de *Gallus gallus domesticus* (84h), estágio 20HH, controle i - (M) Membros posteriores, (BC) Botão caudal. Aumento 32 X. 50
- FIGURA 13 - Embrião normal de *Gallus gallus domesticus* (96h), estágio 23HH, controle i - (M) Membros superiores, (C) Curvatura dorsal. Aumento 28 X. 51
- FIGURA 14 - Embrião de *Gallus gallus domesticus*, malformados; teste A-(R) Erro de rotação; (C) Ausência de botão caudal. Aumento 20 X. 51
- FIGURA 15 - Embrião de *Gallus gallus domesticus*, malformados; teste RI - (F) Erro de rotação; (C) Ausência de botão caudal. Aumento 42 X. 52
- FIGURA 16 - Embrião de *Gallus gallus domesticus*, malformado; teste 12 - (A) Assimetria da vesícula óptica e (R) Redução do botão caudal. Aumento 20 X. 52
- FIGURA 17 - Embrião de *Gallus gallus domesticus* malformado; teste 12 - (O) Anormalidade óptica. Aumento 20 X. 53
- FIGURA 18 - Embrião de *Gallus gallus domesticus*, malformado; teste T1 - (DA) Dismorfismo anterior e (DP) Dismorfismo posterior - ausência de membros posteriores. Aumento 28 X. 53
- FIGURA 19 - Embrião de *Gallus gallus domesticus*, malformado; teste P - (DA) Dismorfismo anterior; (DP) Dismorfismo posterior e (C) Anormalidade cardíaca. Aumento 70 X. 54

- FIGURA 20 - Embrião de *Gallus gallus domesticus*, malformado; teste P - Nanismo; (P) Protusão e (C) Anormalidade cardíaca. Aumento 70 X. 54
- FIGURA 21 - Embrião de *Gallus gallus domesticus*, malformado; teste I - Padrão "sphinx-shaped", região dorsal. (C) Projeção cefálica. Aumento 84 X. 55
- FIGURA 22 - Embrião de *Gallus gallus domesticus*, malformado; teste I - Padrão "sphinx-shaped". (C) Projeção cefálica. Aumento 140 X. 55
- FIGURA 23 - Embrião de *Gallus gallus domesticus*, malformado, teste R2- Padrão "sphinx-shaped". (I) Ilhotas sangüíneas. Aumento 84 X. 56
- FIGURA 24 - Embrião de *Gallus gallus domesticus*, malformado; teste P - Padrão "fish-shaped". (C) Ausência de cauda e (F) Erro de flexura. Aumento 28 X. 56
- FIGURA 25 - Embrião de *Gallus gallus domesticus*, malformado, teste R2- Teratoma. Aumento 84 X. 57
- FIGURA 26 - Embrião de *Gallus gallus domesticus*, malformado; teste RI - Duplicidade. Aumento 84 X. 57

LISTA DE TABELAS

TABELA I -	Modalidades de incubação, simbologias e respectivos procedimentos desenvolvidos no presente estudo, com ovos de <i>Gallus gallus domesticus</i> .	21
TABELA II -	Relação do número, percentagem de incubação, e das frequências absoluta e relativa de ovos e dos embriões fixados em cada modalidade de incubação.	31
TABELA III -	Relação da média de idade embrionária (h), média geral e respectivo estágio de desenvolvimento de <i>Gallus gallus domesticus</i> , registrado em cada modalidade de teste, no período de 24h de cultura.	32
TABELA IV -	Frequência de embriões normais (NOR) e das categorias de malformação, em relação a todas as modalidades de incubação (Mod), com os respectivos totais (Tot).	36
TABELA V -	Tamanho das amostras, médias \pm desvio padrão, medianas e modas do nível de morfogênese referente a todas as categorias de forma embrionária, observadas nas modalidades de incubação controle (i) e testes (A, a, R, R1, R2 I, I1, I2, P, T1 e T2).	43
TABELA VI -	Tamanho das amostras, médias \pm desvio padrão, medianas e modas referentes ao nível morfogenético máximo, definido pelas categorias de forma em cada embrião.	44

RESUMO

Objetivando investigar a ação de fatores físicos e químicos nos processos envolvidos na morfogênese do sistema nervoso central de *Gallus gallus domesticus*, através da manipulação do ectoderma e neuroectoderma e das estruturas deles derivadas, foram incubados ovos por 96h, 163 dos quais apresentaram desenvolvimento, sendo os embriões analisados e fixados. Com exceção de ovos mantidos intactos (i), os demais foram preliminarmente analisados ao final de 24h de incubação e manuseados com os testes de abertura da casca (A) e perfuração com agulha (a), ou injeção de um volume de 5 µl de uma das substâncias: Ringer 100% (R), a 25% (R1) e a 6,25% (R2); insulina 0,5U (I), 0,125U (I1) e 0,031U (I2); PBS 10mM (P) e tunicamicina 150µg/ml (T), 15µg/ml (T1) e 0,66µg/ml (T2), na área pelúcida adjacente às dobras neurais. Após o período complementar de 72h em estufa, os indivíduos foram analisados sob estereomicroscópio e registrados por modalidade de incubação quanto à forma embrionária, normal ou alterada, respectivamente 22,1% e 77,9%. Os embriões foram caracterizadas segundo categorias e classificadas de acordo com um protocolo, em 5 níveis de morfogênese: 1º - normal (13%), 2º - alterações de posição (21%), 3º - dismorfismo localizado por região ou campo morfogenético (32%), 4º - dismorfismo generalizado (30%) e 5º nível - anormalidade de centro organizacional ou de eixo corporal (4%), sendo os dados

organizados em sumário estatístico e submetidos à comparação de médias. A ANOVA ($p \leq 0,05$) e o método de comparações múltiplas evidenciaram que as médias das modalidades (i) e (a), referentes aos menores níveis morfogenéticos (1° e 2°), são significativamente diferentes das concernentes aos demais testes e que as modalidades (I), (II) e (T2), mostraram médias de nível morfogenético, superiores ao 4° nível. O 3° e 4° níveis de dismorfismos foram predominantes em frequência, sobre os demais, tendo sido alterado o padrão do desenvolvimento, provavelmente dentro das 24h subsequentes ao tratamento, indicando que neste período, os destinos das camadas celulares não se encontram absolutamente determinados. Caracterizaram-se 2 padrões de malformação, "fish e sphinx - shaped" e sendo o último, vinculado às 3 doses de insulina, o que confirma e estende dados da literatura, quanto à ação desta substância, a qual modificou o ritmo de desenvolvimento e alterou acentuada e regionalizadamente a forma do corpo e da área vascular dos embriões. Embora as demais categorias de malformação não se mostrem etiologicamente associadas a um fator específico, a metodologia evidenciou que os fatores físicos e químicos interagiram com os processos epigenéticos no período embrionário.

ABSTRACT

The action of physical and chemical factors in morphogenetic processes of the *Gallus gallus domesticus* central nervous system was investigated through ectoderm, neuroectoderm manipulation and their derived structures. The control eggs (i) were incubated intactly for 96h uninterruptedly. The others were analysed after 24h of incubation, tested with opening shell (test A) and perforated with needle (test a) or injected with a volume of 5l of one of the substances: Ringer, pH 7,2, 100% (test R); 25% (R1); 6,25% (R2); insulin 0,5 U (I); 0,125 U (I1) and 0,031U (I2), PBS 10mM (P) and tunicamycin 150 µg/ml (T); 15µg/ml (T1) and 0,66 µg/ml (T2) in the pellucida area adjacent to neural folds. The embryos analysed through stereomicroscopy (20 x) and characterized according to the normal morphology (36/163) or altered (127/163) were classified according to the morphogenetic levels: 1st - normal (13%); 2nd - alteration of position (21%); 3rd - dimorphism located according morphogenetic field or region (32%); 4th - generalized dimorphism (30%) and 5th - abnormality of the organizational center or corporal axis (4%). The "ANOVA" ($p \leq 0,05$) and the multiple range method, evidence the differences among the (i) and (a) levels average and the other tests. The (I) (I1) and (T2) tests, showed averages related to the fourth morphogenetic level. The levels 3 and 4, the most frequent, indicate

susceptibility to those factors, immediately after the treatments, and that even after 24h of incubation the destination of the layers are not definitely determined in the blastoderm.

Two malformation patterns were identified, "fish" and "sphinx - shaped". The last one is linked to the insuline action, that retarded the embryo growth it and altered the embryonic shape.

INTRODUÇÃO

A origem e o desenvolvimento dos organismos há muito suscitaram a curiosidade do espírito humano, possivelmente refletindo o interesse acerca da sua própria existência. Embora estudos com embriões remontem à Grécia antiga, os períodos iniciais do desenvolvimento, pelo fato de se processarem no interior do ovo, somente se tornaram melhor conhecidos no último século, mediante o emprego de metodologias adequadas (Patten, 1951 e Balinsky, 1981).

Segundo Jacobson (1993), a formação de um plano do corpo nos vertebrados é bastante precoce, estabelecendo-se a partir do ovócito, progressivamente, durante a segmentação do ovo e completando-se basicamente na gástrula. São definidas 3 etapas, com o surgimento da polaridade no ovo e na blástula inicial - momento em que os determinantes presentes no citoplasma devem ser mobilizados pelas células na sua orientação espacial; a expressão de funções celulares nas diferentes regiões do organismo e interações celulares resultando em diferenças regionais mais complexas. Ao final destes processos seqüenciais, são expressados programas primordiais de desenvolvimento, em grupos de células dos diferentes campos morfogenéticos, territórios definidos por um conjunto particular de fatores do ambiente (Raff, 1977; Balinsky, 1981; Eyal-Giladi, 1991; Eyal-Giladi et al., 1992 e Harold, 1995).

Os processos de gastrulação e neurulação incluem múltiplos deslocamentos de células que modelam o embrião em desenvolvimento e são conseqüentemente denominados movimentos morfogenéticos. Estes movimentos, envolvendo convergência e divergência de camadas celulares, são características comuns da organização de gástrulas e nêurulas, em uma grande variedade de organismos (Jacobson, 1993 e Gilbert, 1994).

Para o desenvolvimento de trabalhos relacionados à embriologia, é importante considerar-se grupos que apresentam padrões característicos concernentes à morfogênese e à organogênese. Mudanças no comportamento das células, como modificações de forma, dimensões, posição e número, têm sido especialmente estudadas durante a gastrulação de ouriço-do-mar e anfíbios, e mais recentemente na neurulação de anfíbios e aves (Browder et al., 1991 e Jacobson, 1993).

Entre os vertebrados, os processos de segmentação e de gastrulação mostram-se diversificados, porém na fase de pós-gástrula, as formas entre os grupos apresentam-se bastante similares, caracterizando assim, o início do período embrionário. Nesta etapa do desenvolvimento, através dos processos morfo-organogenéticos, são estabelecidos os primórdios da forma e da organização interna do corpo, comuns ao grupo e específicos a nível de diversidade das espécies (Shostak, 1991 e Duboule, 1994).

A despeito das informações existentes sobre a importância da remodelação celular durante os processos de gastrulação e neurulação, muito permanece para ser compreendido sobre eventos que ocorrem no início do desenvolvimento, sendo pouco conhecidos os mecanismos através dos quais as células iniciam movimentos em determinadas regiões e no tempo adequado e como a direção da diferenciação celular é estabelecida na embriogênese (Schoenwolf & Yuan, 1994).

Nas aves, o eixo ântero-posterior está orientado no blastoderma, durante a clivagem do ovo em sua passagem através do oviduto. Em *Gallus gallus domesticus*, o

processo de segmentação já está concluído no momento da ovopostura, a partir do qual, a dinâmica do desenvolvimento tem curso em temperatura de incubação adequada, efetivando-se os processos de gastrulação e neurulação. Uma vez formados, os três folhetos embrionários diferenciam-se progressivamente e até o final do quarto dia de incubação, se estabelecem os primórdios das principais estruturas do organismo. Neste período, são marcantes os aspectos da diferenciação do ectoderma neural e conseqüentemente a importância que o sistema nervoso assume no estabelecimento da forma do corpo do embrião, o qual destacando-se do vitelo subjacente, torna-se mais evidente (Eyal-Giladi, 1991 e Eyal-Giladi et al., 1992).

Os mecanismos relacionados à padronização da forma, no embrião inicial dos vertebrados, são muito complexos. Na ontogênese de aves, a partir do estágio de gastrula tardia e de nêurula inicial, as células do epiblasto estão geralmente concentradas em regiões relacionadas com destinos presuntivos, revogavelmente distintos entre si, em arranjo característico dos mapas de territórios (Bortier & Vakaet, 1992; Schoenwolf, 1994 e Schoenwolf & Yuan, 1995).

No desenvolvimento normal, células precursoras da notocorda, originam-se do nó de Hensen, porção anterior da linha primitiva, e estendem-se ventralmente, numa disposição longitudinal à linha média do blastoderma (Yuan et al., 1995).

Em aves, o arranjo dinâmico das células do epiblasto, desempenha uma importante função no processo de neurulação, sendo possível definir quatro populações distintas de células ectodérmicas prospectivas. A primeira consiste de células que se distribuem ao longo da linha média, rostral e longitudinalmente ao nó de Hensen. Ainda medialmente e no sentido desta estrutura, a segunda população vai suplementando as células prospectivas anteriores. A terceira população é representada pelas células que se dispõem em pares nas margens do epiblasto, flanqueando o nó de Hensen e distribuindo-se nas regiões posteriores, paralelamente à linha média. Finalmente, a quarta população é

representada por células também localizadas em áreas laterais, mas nos limites do epiblasto, numa interface entre as áreas pelúcida e opaca do blastoderma, organizando o ectoderma epitelial do corpo do embrião, bem como o extra-embriônico (Schoenwolf & Yuan, 1995).

A neurulação consiste em um complexo processo multifatorial, dirigido por comportamentos celulares diferentes, os quais ocorrem em virtude de fatores intrínsecos no neuroectoderma e a aspectos extrínsecos, também relacionados aos tecidos adjacentes a essa camada celular (Schoenwolf, 1994 e Chen & Behringer, 1995).

A organização do neuroeixo é dependente de interações célula - célula e de movimentos celulares, que concomitantemente à mudança de local, produzem novas combinações de células, de diferentes origens, seguidas de interações indutivas que levam à determinação da placa neural, com sua especificação médio - lateral, dorso - ventral e ântero - posterior. A formação dessa estrutura, induzida pela interação com o mesoderma subjacente, ou mesmo com o endoderma, acarreta mudanças na forma de seus constituintes celulares, resultando no aparecimento dos primeiros sinais de reconhecimento específico das células neurais (Le Douarin et al., 1994 e Schoenwolf, 1994).

Com o estabelecimento da placa neural, direcionado pelos três tipos principais de comportamento celular - mudanças na forma, posição e no número das células, desencadeia-se um processo morfogenético, no qual o epitélio colunar pseudoestratificado espessa-se apical - basalmente, estreita-se transversalmente e estende-se longitudinalmente. Após, inicia-se o dobramento da placa neural, evento provido por células que adquirem a forma típica de garrafas, levando à formação da goteira e das dobras neurais (Schoenwolf, 1994 e Seller, 1995b).

No processo de dobramento as interações indutivas com a notocorda - através do firme contato com o assoalho da placa são forças relacionadas aos movimentos no ectoderma superficial, também mediadas por ancoragem - na zona de transição com o neuroectoderma, bem como de prováveis mudanças na matriz extracelular do mesoderma para-axial. Devido à interação desses fatores, as dobras neurais são elevadas, sustentadas e trazidas uma de encontro à outra, na linha média dorsal. O fechamento do tubo neural, no embrião de *Gallus gallus domesticus*, do mesmo modo que nos embriões de ratos, ocorre longitudinalmente, por fuscionamento a partir de múltiplos sítios, sendo este processo, mediado pela ação de glicoconjugados da superfície celular apical das dobras neurais (Schoenwolf, 1994; Moury & Schoenwolf, 1995; Seller, 1995b e Van Straaten et al., 1995).

O desenvolvimento do tubo neural é coordenado pela expressão de genes de identidade posicional, como os tipos contendo homeoboxes. A primeira fase da neurulação resulta na formação das vesículas cerebrais e corda espinhal, nas suas porções cervical, torácica e lombosacral anterior. A segunda fase, leva à formação dos níveis mais caudais da corda espinhal, a qual inicia-se com o fechamento do neuróporo posterior e envolve a formação e a subsequente canalização de um agregado de células neuroepiteliais, a corda medular, associada ao botão caudal (Schoenwolf, 1994; Catala et al., 1995; Darnell & Schoenwolf, 1995 e Chen et al., 1996).

Concomitantemente, no decorrer do desenvolvimento do sistema nervoso central, os movimentos de flexuras e de rotação longitudinal do tubo neural, bem como o desenvolvimento e curvatura do botão caudal, acompanham o crescimento do embrião, que adquire complexidade na forma e modifica a posição em relação aos demais constituintes do ovo. Esses processos são acompanhados do aparecimento dos somitos, dos membros e, da morfogênese do coração, evidenciada na região ventral do organismo, juntamente com a formação inicial do epitélio torácico. A cavidade pericárdica, no

primeiro momento, comunica-se com o celoma extra-embriônico, através de uma ampla abertura, limitada pela borda livre do corpo, denominada dobra pericárdica. Devido aos seus dobramentos, até aproximadamente o terceiro dia de incubação, o tubo cardíaco inteiro projeta-se através dessa abertura para o interior do celoma extra-embriônico. Durante a fase final de dobramentos cardíacos, a dobra peritoneal, derivada da região do arco branquial, movimenta-se ventralmente, no sentido do portal do intestino anterior, fechando a abertura entre o celoma pericárdico e o celoma extra-embriônico. Deste modo, o coração fica incorporado à cavidade pericárdica e a porção ventral da parede torácica se fecha (Patten, 1951; Bellairs, 1971; Wischnitzer, 1980; Balinsky, 1981; Goodrum & Jacobson, 1981; Vakaet, 1984; Takamatsu & Fujita, 1987; Serbedzija et al., 1989; Shostak, 1991e Männer et al., 1995b).

A organização seqüencial dos somitos resulta da metamerização dos cordões bilaterais de mesoderma para-axial, longitudinalmente dispostos de cada lado da notocorda e do tubo neural. Embora estas estruturas sejam transitórias, constituem importantes componentes na organização do padrão segmentar dos embriões e na determinação de processos formativos e de diferenciação dos seus derivados (Hamburger & Hamilton, 1951; Houillon, 1972; Balinsky, 1981; Shostak, 1991 e Gilbert, 1994). A periodicidade no surgimento dos somitos, monitorável também externamente, possibilitam com as demais estruturas, a caracterização de estádios, através de um conjunto de características particulares, descrito por Hamburger & Hamilton (1951).

Para o estudo do organismo em desenvolvimento, torna-se oportuno detalhar alguns aspectos da embriogênese de *Gallus gallus domesticus*, com ênfase no tempo de desenvolvimento do sistema nervoso. Os primeiros indícios de sua organização referem-se à formação da placa neural, uma área de blastoderma espessado mais evidente na região anterior, nos embriões de 18 horas de incubação (estádio 4 HH). Esta placa bifurca-se na

região do nó de Hensen, porção anterior da linha primitiva e continua, de cada lado da mesma (Huettner, 1949; Hamburger & Hamilton, 1951 e Patten, 1951).

Às 21 horas do desenvolvimento (estádio 5 HH), a placa neural começa a dobrar-se definindo medianamente a goteira neural. Uma elevação de blastoderma similar a uma prega, situada no centro da área pelúcida em forma de pêra, marca a extremidade anterior do organismo e se estende posteriormente, na direção do eixo céfalo - caudal, tomando o aspecto de cristas paralelas, que evidenciam os primórdios do sistema nervoso central de *Gallus gallus domesticus* (Hamburger & Hamilton, 1951 e Patten, 1951).

Às 27 horas (estádio 8 HH), as dobras neurais iniciam o fusionamento, sendo que, com 33 horas (estádio 9 HH), o tubo neural encontra-se formado. Nenhum somito é observado até a 19ª hora de incubação, porém a partir da 20ª hora, com a formação de um par de somitos a cada hora, estas estruturas permitem durante um determinado tempo, definir através dos estádios, a idade embrionária (Huettner, 1949; Hamburger & Hamilton, 1951; Renoux, 1971; Arey, 1974 e Rauh, 1976).

As ilhotas sangüíneas somente são evidenciadas a partir do estágio 8 (26h - 29h de incubação), indicando que a angiogênese inicia no momento em que as dobras neurais ainda se encontram ao nível do mesencéfalo presuntivo (Huettner, 1949; Hamburger & Hamilton, 1951).

Com 48 horas de incubação (estádio 12 HH), o embrião apresenta entre outras características, 17 a 20 pares de somitos, botão caudal não evidente ou em início de formação, região cefálica contorcendo-se para a esquerda, vesícula óptica constringida na base, esboço da flexura cranial, presença das cinco vesículas cerebrais e neuróporo anterior fechado. A flexura cranial, a primeira observada no tubo neural, ocorre entre os estádios 11 e 14 e aproxima o prosencéfalo e o mesencéfalo em ângulo agudo, no corpo

embrionário ainda linear. A segunda flexura, cervical, desenvolve-se entre os estádios 16 e 18, aproximando o prosencéfalo da região torácica, devido ao dobramento amplo que envolve as regiões do rombencéfalo e da corda espinhal cervical (Hamburger & Hamilton, 1951; Arey, 1974 e Flynn et al., 1991).

São características das 72 horas (estádio 20 HH), a presença de 37 ou mais pares de somitos distribuídos ao longo do corpo, botão caudal curvado e voltado para a região anterior, rotação completa do corpo, alantóide vesicular do tamanho do mesencéfalo e vesícula óptica com pigmentação tênue. Os membros posteriores são relativamente maiores que os anteriores e os processos maxilar e mandibular apresentam tamanhos aproximadamente iguais. Em relação às flexuras do tubo neural, observa-se um ângulo agudo entre os eixos dos segmentos cervical e troncal, sendo que o contorno do tronco tende a formar uma linha reta até a cauda. Os eixos estabelecidos entre a cauda e a flexura cervical, e esta estrutura e o mesencéfalo, formam um ângulo aproximadamente reto (Hamburger & Hamilton, 1951; Arey, 1974 e Balinsky, 1981).

No estágio 23 (96 horas) o embrião apresenta os somitos atingindo a extremidade da cauda, botão caudal curvado para a região sacral, rotação completa do corpo, alantóide de tamanho aproximado ao da cabeça, vesícula óptica com pigmentação evidente, e flexura troncal correspondendo a uma ampla linha curva. Os membros apresentam comprimento igual ou maior à respectiva largura, com as extremidades terminando em placas digitais arredondadas. O processo maxilar é mais alongado que o mandibular e o eixo definido entre a cauda e a flexura cervical, forma um ângulo menor ou igual a 90° em relação ao eixo compreendido entre a flexura cervical e o mesencéfalo. O nível de desenvolvimento apresentado pelas estruturas acima relacionadas, confere ao embrião de 96 horas, os esboços de sua topografia geral e algumas características concernentes à própria espécie, primórdios que caracterizam o período embrionário (Huettner, 1949; Hamburger & Hamilton, 1951; Patten, 1951; Rauh, 1976; Balinsky,

1981; Freeman & Bracegirdle, 1982; Meier & Jacobson, 1982; Browder et al., 1991 e Shostak, 1991).

No plano geral do desenvolvimento, a pluripotencialidade de camadas celulares é progressivamente restringida por uma série de ações, reguladas por fatores ambientais, através de interações entre células e matriz extracelular. A definição dos destinos celulares envolve uma coordenação intrínseca de informação posicional, na qual as especificações quanto à forma e função celulares, vão se estabelecendo, nos eixos ântero-posterior e dorso-ventral, mediados por processos de indução embrionária. Tem sido demonstrado que regulação gênica a nível de informação posicional, dos genes Pax e En-2, deve ser provida, para a consolidação do complexo morfogênico nos eixos ântero - posterior e dorso - ventral (Bortier & Vakaet, 1992; Glover, 1994; Nakamura et al., 1994; Darnell & Schoenwolf, 1995 e Ekker et al., 1995).

Através de mecanismos de indução embrionária, proteoglicanas, hialuranas, colágenos e outros componentes da matriz extracelular viabilizam a proliferação celular e mudanças na forma das células. Em muitos tecidos, elementos da matriz extracelular como as glicosaminoglicanas e proteínas fibrosas, participam no reconhecimento de sinais que induzem proliferação, migração e outros mecanismos de diferenciação celular (Alberts et al., 1994; Ekblom, 1995 e Gerchman et al., 1995).

No mecanismo de reconhecimento das superfícies celulares, necessário à fusão, o qual ocorre em estruturas faciais, dobras neurais e em uma diversidade de outros processos morfogenéticos, é relevante que a composição das camadas celulares seja rica em macromoléculas. Tem sido amplamente reportado que perdas, excedentes e inativações das mesmas, podem levar a inadequações na comunicação intercelular, possivelmente como resultado de alterações nas etapas de recepção e transdução dos sinais indutores, com comprometimento da fisiologia celular e conseqüentes alterações na morfogênese. Algumas proteínas de membrana basal, tais como o nidogen, parecem ser

produzidas exclusivamente pelo mesênquima sendo recentemente demonstrado, que distúrbios na ligação nidogen-laminina, levam a erros em processos morfogênicos, estudados "in vitro" (Eto et al., 1981; Copp et al., 1988a; Brown et al., 1992; Grumet et al., 1993; Alberts et al., 1994; Célio & Blüncher, 1994; Faissner et al., 1994; Rahman et al., 1994; Wahl et al., 1994; Chen & Hales, 1995; Ekblom, 1995; Jaworski, et al., 1995; Simon et al., 1995 e Gumbiner, 1996).

Existe bastante evidência de que moléculas de adesão celular, participam de uma grande variedade de eventos de transdução de sinal, sendo relevantes para a regulação da adesividade, mobilidade e crescimento celular, apoptose, regulação de genes específicos e outros processos indispensáveis para a diferenciação e organização de tecidos. Nestes processos, provavelmente são necessários sinais intercelulares, altamente localizados, para viabilizar o controle dos padrões de morfogênese. E, neste plano inicial do desenvolvimento embrionário, a caderina - E provavelmente desempenha uma função chave, uma vez que, durante o dobramento da placa neural e a separação neuroectoderma - ectoderma superficial, gradualmente esta classe de moléculas é substituída por caderina - N (Copp et al., 1988b; Brown et al., 1992; Alberts et al., 1994; Chen & Hales, 1995; Ekblom, 1995 e Gumbiner, 1996).

Se por um lado os indutores presentes no espaço intercelular podem determinar destinos, relativos ao desenvolvimento embrionário, as superfícies teciduais detêm as moléculas-alvo, receptoras desses sinais (Faissner et al., 1994 e Ekblom, 1995).

Os fatores de sinalização e os genes provêm a base de informações necessária à efetivação dos processos descritos, por interagirem de modo específico nos campos embrionários, resultando no padrão normal de morfogênese. Modificações no ambiente podem perturbar essa interação, alterando os mecanismos que, dependendo da intensidade do fator e do período de tempo da interferência, levam a anormalidades na forma do organismo (Raff, 1977; Jacobson, 1993 e Harold, 1995).

Os embriões de *Gallus gallus domesticus* têm sido bastante utilizados também em experimentos no campo da Teratologia, onde foi estudada a ação de agentes físicos e da administração de fármacos, no organismo em desenvolvimento (Deuchar, 1952; Delphia & Elliott, 1965; Brook et al., 1991; Männer et al., 1993 e Eyal-Giladi et al., 1994). O problema da embriotoxicidade motiva a realização de pesquisas para o exame dos efeitos biologicamente relevantes, da exposição à radiação ionizante, atrito, calor e vibração, diferenças na gravidade, hipo e hiperóxia, efluentes gasosos, metais pesados, fibras de amianto, lubrificantes e combustíveis, pesticidas e outros produtos químicos utilizados na agricultura, agentes usados na desinfecção de água, componentes de cosméticos e produtos de higiene e limpeza, aditivos de alimentos, drogas ou medicamentos, além de constituintes moleculares de plantas e dos próprios animais. (Foà et al., 1965; Cole & Trasler, 1980; Kazuhiro et al., 1981; Spaventi et al., 1995; Bowden et al., 1993; Bellinger, 1994; Gospe et al., 1994; Mensah-Brown, 1994; Padmanabhan & Hameed, 1994; Bowden et al., 1995; Epstein, 1995; Pennington et al., 1995; Seller, 1995a; Sever, 1995; Sim et al., 1995 e Chen et al., 1996).

Mesmo considerando-se que alterações morfológicas ocorrem, inclusive nas condições mais adequadas ao desenvolvimento, constituindo-se portanto em manifestação inerente à dinâmica dos processos morfogenéticos, verificou-se que fatores do ambiente estão relacionados a tipos característicos de malformação, entre as quais, defeitos decorrentes de fusão incompleta das dobras neurais, dismorfismos em extremidades, anormalidades nas flexuras e na rotação do tubo neural, redução nas dimensões do corpo, indeterminações e duplicidades do eixo do corpo (Patten, 1951; Harrison, 1957; Bannigan, 1985; Gordon, 1985; Carles et al., 1991; Gilbert, 1994; Dias & Müller, 1995 e Epstein, 1995).

O desenvolvimento do sistema nervoso central, dotado de receptores e sinais amplamente regulados no tempo e espaço, é um campo para a ação de substâncias como a

pró-insulina, insulina e fatores-de-crescimento-semelhantes-à-insulina, e outros agentes do sistema de indução, filogeneticamente conservado durante a evolução, e no qual, se pode experimentalmente intervir (Cole & Trasler, 1980; Le Douarin et al., 1994; Székeli et al., 1994 e De Pablo & Delarosa, 1995).

A insulina é um polipeptídeo contendo 51 aminoácidos, produzido pelas células β das ilhotas de Langerhans, as quais são derivadas das cristas neurais. A molécula apresenta-se semelhante entre as espécies de vertebrados e embora algumas espécies, como as cobaias, tenham insulinas notavelmente diferentes da humana, esta e a da galinha doméstica e mesmo a da lampréia, diferem em apenas 5 aminoácidos (De Pablo et al., 1982; Raw et al., 1991 e Montgomery et al., 1994). Por apresentar uma grande variedade de formas, todas anabólicas e promovendo o crescimento e manutenção do organismo, a insulina age ligando-se a receptor específico na superfície celular, uma glicoproteína de 350.000 Da, com subunidades de domínios extracelular, transmembrana e intracelular (Low & Saltiel, 1988; Chan et al., 1989 e Raw et al., 1991).

Em *Gallus gallus domesticus*, a insulina é encontrada a partir do segundo dia de incubação, quando o pâncreas ainda não está formado, nem são reconhecidas as células β pancreáticas. Existem diversas evidências, de que essa substância já esteja presente no gameta feminino e que desempenhe uma importante função em processos de regulação do crescimento, implicando em um tipo de ação autócrina ou parácrina (Foà et al., 1965; De Pablo et al., 1982; De Pablo et al., 1990 e Spaventi et al., 1990).

Além da insulina, inúmeros fatores de crescimento, entre os quais o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), e seus receptores, estão caracterizados em relação à estrutura e à fisiologia, sendo os receptores de insulina e do IGF - I, estruturalmente bastante semelhantes. Em adição à ligação ao seu próprio receptor com alta afinidade, a insulina e o IGF - 1 ligam-se ao receptor do seu respectivo homólogo,

com uma reduzida afinidade, embora, mantendo sua atividade intrínseca total (De Pablo et al., 1990; De Pablo & Delarosa, 1995 e Cheatham & Kahn, 1995).

Durante a neurulação, em *Gallus gallus domesticus*, receptores de insulina e especialmente receptores de IGF, são amplamente distribuídos através do sistema nervoso. De Pablo et al. (1990) registraram a ocorrência de insulina e de IGF-1 marcados, ligados aos receptores, em estruturas derivadas do neuroectoderma e citam que o RNA mensageiro que transcreve proteínas de ligação ao IGF, do tipo 2 (IGF - BP2), foi encontrado, no desenvolvimento embrionário do rato, na placa do assoalho ventral da corda espinhal e do rombencéfalo (De Pablo & Delarosa, 1995 e Cheatham & Kahn, 1995).

A insulina liga-se ao receptor através de uma âncora (Raw et al., 1991), uma seqüência hidrofóbica, constituída de glicosamina, manose, galactosamina, fosfato, inositol e ácidos graxos. Quando ocorre a ligação, a âncora é hidrolizada por uma fosfolipase, há um aumento de dimeristoilglicerol, através da clivagem de inúmeros lipídeos de membrana, a exemplo do fosfatidil inositol - difosfato (PIP₂), resultando em diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP₃), e deste modo é liberado um complexo fosfatidil-inositol-glicosaminoglicana no espaço extracelular, onde este se acumula, antes de ser transportado para o interior das células (Romero et al., 1988 e Chan et al., 1989).

Os efeitos pleiotrópicos da insulina, no crescimento celular e no metabolismo, inicia-se por ligação ao seu receptor na superfície celular, ativando em cascata, múltiplas vias de transdução do sinal. Uma destas, consiste na ativação da via de fosforilação que leva à ativação de proteínas kinases ativadoras de mitógenos (MAPK), com influência direta sobre o metabolismo - por ativação da enzima glicogênio sintetase, e o crescimento celular (Cheatham & Kahn, 1995).

Além de aumentar a atividade da ornitina - descarboxilase, enzima correlacionada com a proliferação celular, a insulina, em concentração média (100 ng/ml) é também capaz de induzir sinais diferenciados em células de neuroblastoma. Em neurônios sensoriais e simpáticos, a insulina aumenta o número de neuritos, por estimular a produção e polimerização de proteínas do citoesqueleto e em adição, tem sido demonstrado que, em neurônios retiniais de embriões de rato e de galinha, a insulina exerce uma função indutiva do programa normal de diferenciação colinérgica (De Pablo et al., 1990; Pennington et al., 1995; Tesoriere et al., 1995 e Schreiber et al., 1995).

Outra substância, cuja ação pode interferir com a sinalização intercelular é a tunicamicina, um antibiótico isolado de *Streptomyces lysosuperificus* com algum significado no controle de viroses, como a Newcastle. Por ser um inibidor da glicosilação de proteínas, bloqueia a síntese de glicosaminoglicanas sulfatadas, reduz a quantidade total de matriz extracelular no tecido mesenquimal e induz alterações na morfologia da superfície celular, o que foi verificado em fibroblastos e em ectoderma de embriões de galinha, onde entretanto, nenhum efeito sobre a síntese de hialuranas, foi observado (Takatsuki & Tamura, 1971; Olden et al., 1978; Pratt et al., 1979; Thesleff & Pratt, 1980, Eto et al., 1981 e Kazuhiro et al., 1981).

A tunicamicina, que consiste de homólogos acilados, de uma estrutura conservada de uridina contendo trissacarídeos, inibe a glicosilação de proteína por bloquear a transferência de fosfato - 1 - N - acetilglicosamina do difosfato de uridina- 1 - N - acetilglicosamina para o dolicol - fosfato (Leist & Wendel, 1995 e Stryer, 1995).

Eto et al. (1981), utilizando uma técnica de administração localizada de tunicamicina, em cultura de embrião total de rato, registraram fenda labial em 14 dos 15 espécimens testados. Estudos recentes referentes à fusão dos processos faciais, evidenciam que o epitélio secreta uma cobertura rica em carboidratos, necessária ao reconhecimento e à adesão das camadas celulares, processos presumivelmente

susceptíveis de comprometimentos pela ação específica da tunicamicina, sobre o mecanismo de glicosilação.

Considerando que a estrutura das moléculas em que a vida está baseada - proteínas, lipídeos, carboidratos complexos e ácidos nucleicos, resulta da sua interação com o ambiente aquático, e que suas propriedades podem ser alteradas devido a modificações no potencial hidrogeniônico (pH) e/ou na pressão osmótica dos meios fluidos intra e extracelulares em que aquelas estão inseridas, soluções resistentes à variação nos parâmetros de acidez e isotonicidade, tampões ou solução salinas, presentes nestes fluidos, têm importante significado na manutenção da integridade dos organismos (Voet & Voet, 1995).

O fosfato é considerado o tampão mais fisiológico, uma vez que é encontrado nas próprias células, na forma de fosfatos inorgânicos e ésteres de fosfato, e no citoplasma, na forma de ácido fraco e sua base conjugada - compostos que agindo como doador e receptor de prótons, respectivamente, resistem à alterações no pH, quando pequenas quantidades de ácido ou bases são adicionadas ao sistema (Lehninger et al., 1993). O "phosphate - buffered saline" (PBS), é reativo do pH = 6,0 ao pH = 7,5, sendo muito empregado em cultura, para a manutenção do potencial hidrogeniônico fisiológico (Souza et al., 1989 e Bozzola & Russel, 1992).

Soluções salinas, tais como as de Ringer e Tyrode, são consideradas isosmóticas em relação a uma determinada categoria celular, se a pressão osmótica da célula e da solução forem iguais, o que implica em que a célula não exiba modificação de volume, quando mantida na solução (Beçak & Paulette, 1976; Souza et al., 1989 e Bozzola & Russel, 1992).

O uso de modelos animais em combinação com a aplicação de técnicas analíticas modernas, tem produzido uma quantidade imensa de informações referentes a

vários aspectos do desenvolvimento em condições normais e de anormalidade (Serbedzija et al., 1989; Brown et al., 1992; Bortier & Vakaet, 1992; Bowden et al., 1993; Männer et al., 1993; Le Douarin et al., 1994; Bowden et al., 1995; Burt et al., 1995; Epstein, 1995; Fuginaga, 1995; Moury & Schoenwolf, 1995; Chen et al., 1996).

A administração de substâncias exógenas em determinadas regiões do organismo em desenvolvimento e a possibilidade de se acompanhar a influência das drogas sobre a organização de sistemas e a diferenciação das estruturas embrionárias, tem-se constituído em um valioso instrumento de investigação dos mecanismos inerentes aos processos morfogenéticos normais (Gospe et al., 1994; Padmanabhan & Hameed, 1994; Rahman et al., 1994 e Pennington et al., 1995).

A presença precoce e relevante da insulina na espécie em estudo, motivaram a escolha dessa substância como um dos fatores de natureza química, utilizados nos experimentos. Devido à sua ação específica sobre componentes da sinalização intercelular nos embriões, propiciando por sua vez, uma atuação antagônica à fisiologia da insulina no organismo, a tunicamicina também foi uma das opções adotadas como fator, nos testes. Em virtude da reconhecida eficiência e importância como sistema tamponante, por não ser em princípio embriotóxico e por combinar certas propriedades com as das células, o PBS, bem como a solução de Ringer - salina com características de iso-osmolaridade bem conhecidas, em relação aos vertebrados, foram incluídas como agentes químicos, no presente estudo.

Segundo Shibley & Pennington (1995), o embrião de *Gallus gallus domesticus* oferece vantagens aos pesquisadores que estudam os efeitos causados por fatores neurotróficos e drogas de abuso, uma vez que provê um sistema fechado, no qual o estudo dos efeitos diretos de drogas sobre o desenvolvimento embrionário é viabilizado sem a necessidade de considerar efeitos maternos e ou placentários. O embrião desta espécie

possibilita ainda, a manipulação em estágio bastante inicial, aspecto especialmente relevante nos estudos sobre o crescimento e a morfogênese.

O período embrionário relativamente curto, literatura abundante referente à embriogênese da espécie, a disponibilidade do material para estudo, facilidades no acesso à estruturas dos sistemas em desenvolvimento, a possibilidade de manutenção de embriões totais em cultura, são propriedades que evidenciam o caráter e a importância da continuidade da utilização de ovos de *Gallus gallus domesticus* em pesquisas na área de Embriologia, que tradicionalmente tem se mostrado interativa com outras áreas de estudo.

Esses aspectos, combinados ao implemento de metodologias de manipulação e à utilização de técnicas analíticas adequadas, poderão revelar susceptibilidades espaciais e temporais da morfogênese do tubo neural, frente a diferentes agentes químicos, ampliando os conhecimentos acerca dos mecanismos de regulação, no ambiente dos processos epigenéticos. Paralelamente, podem se viabilizar modelos, para serem utilizados tanto em estudos comparativos, quanto em espécies, nas quais o acesso aos processos de morfogênese normal e anormal é dificultado (Copp et al. 1988a; Seilacher, 1991 e Shibley & Pennington, 1995).

O estudo da ontogênese do *Gallus gallus domesticus*, justifica-se também face à relevância econômica desta espécie, sendo oportuno o desenvolvimento de pesquisas com a variedade nativa, Araucana, devido ao seu potencial natural.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo geral

- Investigar processos relacionados à morfogênese do sistema nervoso central de embriões de *Gallus gallus domesticus*, através da manipulação do ectoderma, neuroectoderma e do acompanhamento de estruturas deles derivadas.

1.2. Objetivos específicos

- Analisar a ação de fatores físicos e químicos no desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus domesticus*, com ênfase no sistema nervoso.

- Comparar o desenvolvimento embrionário de ovos manipulados com aqueles mantidos intactos, em cultura visível *in ovo*.

- Desenvolver *in ovo*, modelos em teratologia, visando a avaliação do efeito de manipulação sobre a morfogênese dos embriões.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material de estudo

No presente trabalho foram manuseados ovos fecundados, com casca de coloração azul, de *Gallus gallus domesticus* (Linnaeus, 1758), variedade Araucana, obtidos no aviário do Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias, sendo os experimentos, realizados no Laboratório de Embriologia, do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

De acordo com Berger (1971), a espécie utilizada no presente estudo apresenta a seguinte classificação taxonômica:

- Classe Aves.
- Sub classe Neornithes.
- Super ordem Neognathae.
- Ordem Galliformes.
- Família Phasianidae.

Os ovos de *Gallus gallus domesticus*, são relativamente volumosos, devido principalmente à abundante presença de reserva nutritiva (ovos do tipo macrolécito) e ao conjunto de membranas acessórias. A região a qual originará o embrião, limita-se à camada discóide, de aproximadamente 3,0mm de diâmetro, concernente à cicatrícula. O

processo de segmentação, do tipo parcial, ocorre durante a passagem do zigoto através do oviduto (Houillon, 1971).

2.2. Metodologia

2.2.1. Condições de incubação

Os ovos, foram escolhidos segundo critérios de integridade da casca, homogeneidade de cor, forma e dimensões, datados, enumerados e estocados a um intervalo de temperatura entre 10°C e 20°C por um período não superior a sete dias (Magaldi, 1974 e Romboli et al., 1984). Este material foi incubado por um período de tempo de 96 horas, em estufa para cultura, marca Olidef, modelo CZ, a uma temperatura de 37,5°C com umidade atmosférica relativa de cerca de 55%.

As unidades amostrais foram designadas de forma casualizada a 13 modalidades de incubação, sendo manuseados no mínimo 12 ovos, em cada modalidade.

Inicialmente para manter uma referência com os dados descritos na literatura, foi realizada uma modalidade de incubação controle, com 17 ovos intactos, manuseados em 8 experimentos de incubação, onde 13 embriões foram analisados e fixados. Em outras 11 modalidades de incubação, a influência de fatores físicos e químicos sobre o material de estudo foi viabilizada através dos testes de manipulação. As 13 modalidades de incubação estão definidas na tabela I.

Tabela I - Modalidades de incubação, simbologias e respectivos procedimentos desenvolvidos no presente estudo, com ovos de *Gallus gallus domesticus*.

Modalidades de incubação	Simbologias	Procedimentos
Controle - Ovos intactos	i	Ovos incubados intactos.
1º teste - Ovos abertos	A	Ovos incubados com abertura na casca
2º teste - Ovos perfurados	a	Ovos incubados com abertura, perfurados com agulha hipodérmica, sem conteúdo injetado.
3º teste - Ovos injetados com Ringer	R	Ovos incubados com abertura, injetados com 5µl de solução de Ringer, para mamíferos, a 100% e pH=7,2.
4º teste - Ovos injetados com Ringer a 25%	R1	Ovos incubados com abertura, injetados com 5µl de solução de Ringer, para mamíferos, a 25% e pH=7,2.
5º teste - Ovos injetados com Ringer a 6,25%	R2	Ovos incubados com abertura, injetados com 5µl de solução de Ringer, para mamíferos, a 6,25% e pH=7,2.
6º teste - Ovos injetados com 0,5U de insulina.	I	Ovos incubados com abertura, injetados com 5µl de insulina suína a 0,5U (Neosulin / Biobrás).
7º teste - Ovos injetados com 0,125U de insulina	I1	Ovos incubados com abertura, injetados com 5µl de insulina suína a 0,125U (Neosulin / Biobrás).
8º teste - Ovos injetados com 0,031U de insulina	I2	Ovos incubados com abertura, injetados com 5µl de insulina suína a 0,031U (Neosulin / Biobrás).
9º teste - Ovos injetados com PBS (10mM)	P	Ovos incubados com abertura, injetados com 5µl de PBS (10 mM).
10º teste - Ovos injetados com tunicamicina (150 µg/ml)	T	Ovos incubados com abertura, injetados com 5µl de tunicamicina a 150 µg/ml (165 µM), Sigma Chem.
11º teste - Ovos injetados com tunicamicina (15 µg/ml)	T1	Ovos incubados com abertura, injetados com 5µl de tunicamicina a 15 µg/ml (16,5 µM), Sigma Chem.
12º teste - Ovos injetados com tunicamicina 0,66 µg/ml	T2	Ovos incubados com abertura, injetados com 5µl de tunicamicina a 0,66 µg/ml (0,72 µM), Sigma Chem.

A obtenção de pelo menos um embrião vivo nos primeiros 12 ovos incubados foi o critério adotado para a realização de incubações e efetivação de teste com fator, ou nível de fator de estudo.

Em cada teste, foi considerado o número mínimo de 10 embriões, passíveis de serem analisados quanto à forma e ao final do experimento, fixados.

2.2.2. Manuseio e análise do material de estudo

Os ovos, manuseados de acordo com o estabelecido na tabela I, obedeceram à seguinte metodologia:

1 - Cada unidade amostral designada como ovo intacto (i), foi mantida sem intervenção, na estufa, pelo período de incubação de 96h.

2 - As demais unidades amostrais, designadas para testes como ovos abertos perfurados e injetados, foram incubadas por um período inicial, de 24h (figura 1). Decorrido este tempo, cada ovo destinado a teste, foi retirado da estufa e em ambiente asséptico, com auxílio de pinças de pontas retas e de uma broca elétrica, foi efetuada na face mediana uma abertura de cerca de 1,5cm x 1,5cm na casca, sendo a mesma removida do local juntamente com as duas membranas ovulares.

Através da abertura, de dimensões suficientes para expor o embrião e a região extra-embriônica próxima, os espécimes foram preliminarmente analisados *in ovo*, conforme procedimento adaptado de Dias (1994), com auxílio de um estereomicroscópio da marca Micronal - Olympus, equipado com fontes de iluminação do tipo incidente e transmitida e com aumento total de 20 X.


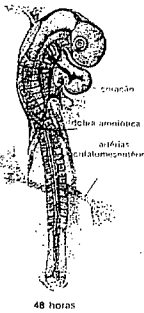
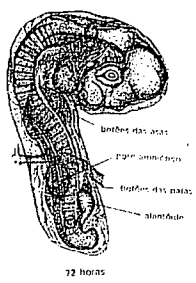
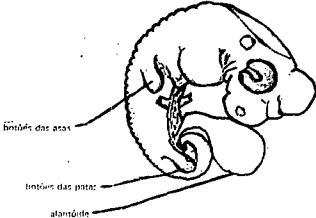
Eventos da morfogênese	Estádio (HH)	Tempo (h)	Procedimentos	Esquemas *
- Linha primitiva inicial	2	6 - 7	Período de Incubação, abertura, análise preliminar e tratamentos.	
- Linha primitiva definitiva	4	18 - 19		
- Processo cefálico	5	19 - 22		
- "Fold head"	6	23 - 25 (1º dia)		
- Dobras neurais	7	26 - 29		
- Fusão das dobras neurais	8			
Primeiras ilhas de sangue				
- Início da flexura cranial	10	33 - 38		
- Neuróporo anterior fechado	12	45 - 49 (2º dia)		
16 a 22 somitos				
- Início da flexura cervical	14	50 - 53	2º Período de Incubação Complementar	
- Rotação em desenvolvimento	15	50 - 55		
- Início da form. do botão caudal e presença de cristas de membros	16	51 - 56		
- Epífise evidente	17	52 - 64		
- Alantóide presente	18	65 - 69		
- Rotação completada	20	70 - 72 (3º dia)		
- Pigmentação do olho, tênue a marcante	23	84 - 96 (4º dia)	Análise complementar	
Flexuras em ampla linha curva				

Figura 1- Eventos marcantes do desenvolvimento de *Gallus gallus domesticus*, em relação aos estádios descritos por Hamburger & Hamilton (1951), o respectivo tempo de incubação padrão, os períodos de cultura intercalados aos procedimentos e esquemas relativos à forma embrionária básica, nos períodos de 24h, 48h, 72h, e 96h de incubação.

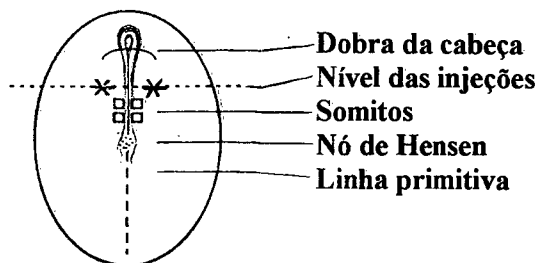
(*) Adaptados de Houillon (1972).

Os embriões foram certificados quanto à sua viabilidade e avaliados segundo o nível de desenvolvimento, com enfoque no sistema nervoso central e baseado nos critérios, estabelecidos por Hamburger e Hamilton (1951). Após as 24h iniciais de incubação, todos os ovos com desenvolvimento embrionário retornaram para a incubadora, após os procedimentos referentes ao teste em cada modalidade de incubação (tabela I e figura 1).

No 1º teste (A), a manipulação dos ovos consistiu apenas da abertura. Nos demais testes referentes a ovos abertos, foram adotados dois procedimentos distintos com agulhas hipodérmicas de até 0,2mm de diâmetro, de acordo com as técnicas descritas por Gerchman et al. (1995). Em um teste, a agulha foi inserida nos embriões, sem a injeção de conteúdo, perfazendo apenas um fator de natureza física, enquanto, do 3º ao 11º teste, os embriões foram injetados com volume correspondente a um dos fatores químicos, os quais foram testados em até 3 níveis de concentração. Após ter sido concluída a análise preliminar, os embriões submetidos ao 2º teste (a), foram tratados apenas com inserção de agulha, e os demais (R,R1,R2,I,I1,I2,P,T,T1,T2), injetados com dose única, à temperatura de 37,5°C, de 5µl de uma das substâncias, de acordo com cada modalidade de incubação descrita na tabela I.

Todas as injeções foram aplicadas utilizando-se suporte deslocável (estereotáxico) com seringas e agulhas hipodérmicas ultrafinas, introduzidas através da área pelúcida próxima a uma das dobras neurais (figura 2), a uma profundidade de até 1,0mm, no interior do saco vitelínico subjacente ao embrião, conforme Takamatsu & Fujita (1987) e Chen & Hales (1995).

Figura 2 - Diagrama representando o nível aproximado em que foram aplicadas as perfurações e injeções (asteriscos sobre a linha pontilhada transversal à região anterior do embrião).



(Estádio 7)

Adaptado de Chen et al. (1996).

Concluída a manipulação, a abertura na casca foi fechada com filme de PVC transparente e não-tóxico (Rolopac, Alba) e o ovo recolocado na estufa de modo a viabilizar por mais 72h a continuidade dos processos vitais.

Decorrido o tempo de incubação de 96h, todos os ovos foram retirados da estufa, abertos, ou liberados do filme de PVC, e os limites das aberturas, aumentados com auxílio de pinças, para um diâmetro aproximado de 2,5cm.

O embrião e a área vasculosa foram novamente analisados no ovo, sendo este procedimento, executado em estereomicroscópio e facilitado pela introdução, através de uma secção lateral ao nível do saco vitelínico, de uma cunha de papel cartão preto (medindo 1,0 x 3,0cm), alocada sob o embrião para conferir contraste a este em relação ao vitelo.

Após, com o uso de estiletes e de uma colher pequena, o embrião foi parcialmente separado do saco vitelínico, removido e colocado em placa de Petri contendo solução de Ringer (Beçak & Paulette, 1976), onde através de agitação suave e da utilização de dois bisturís (nº4 e nº11), foram retirados os remanescentes de vitelo e de membranas extra-embrionárias.

Transferido para uma segunda placa de Petri contendo a solução fisiológica, o embrião passou a ser analisado sob o estereomicroscópio (20 x) com iluminação transmitida.

Após a análise, os espécimens foram fixados em solução de formol a 10%, por no máximo 24h e conservados em solução de etanol a 70%.

2.2.3. Critérios utilizados na caracterização da morfogênese

No presente estudo, o critério utilizado para a análise da morfogênese foi a avaliação do nível de desenvolvimento de estruturas embrionárias consideradas relevantes, as quais são características, nos embriões de 84 - 96h de incubação (estádio 23).

Caracterizados quanto á morfologia, os embriões de 96h de incubação foram inicialmente distinguidos como "indivíduo normal ou malformado", sendo considerado normal, o embrião que apresentou:

1) disposição das flexuras do sistema nervoso resultando num perfil dorsal do corpo, que corresponde a uma ampla linha curva. Desse modo, o eixo definido entre a cauda e a flexura mesencefálica, forma um ângulo igual ou menor que 90° em relação ao eixo compreendido entre essa flexura e a região cervical;

2) rotação completa do corpo;

3) no tubo neural, as 5 vesículas cerebrais e a medula, marcadamente definidas;

4) vesícula óptica com pigmentação evidente;

5) nível de extensão de somitos atingindo a extremidade da cauda;

6) membros mostrando comprimento maior que a respectiva medida da largura, com as extremidades terminando em placas digitais arredondadas;

7) extremidade do botão caudal voltada para a região ventral;

8) alantóide com volume comparável ao do encéfalo e saco vitelínico apresentando ampla vascularização.

Nota: Os embriões que, após as 96h de incubação, não atingiram o nível referente a aquele estágio, porém mostraram o conjunto característico das estruturas, correspondente a estágio relativamente anterior, de acordo com padrão descrito por Hamburger & Hamilton (1951), foram considerados normais, a despeito do ritmo mais lento de desenvolvimento.

Embriões apresentando morfologia diferente da descrita para o estágio 23 (HH), ou que não atenderam aos termos da nota acima, foram considerados **malformados**. Nestes, as anormalidades referentes à forma, foram descritas e caracterizadas como categorias de malformação específicas. Também foram relacionadas as frequências de cada categoria, independentemente do número de indivíduos.

No estudo dos processos de morfogênese normal ou anormal relativos aos campos embrionários, é relevante interrelacionar tempo e espaço, princípios básicos da Embriologia, que viabilizam o reconhecimento de padrões morfológicos, através de uma avaliação baseada em níveis de complexidade.

Na classificação das categorias de forma embrionária, com base nos níveis de organização externa do corpo, integridade do sistema nervoso central e no tempo relativo à embriogênese, foi utilizado um protocolo de avaliação, adaptado do método de escores morfológicos utilizado por Bowden et al. (1993), que estabelece em uma escala, 5 níveis de morfogênese. De acordo com a seqüência mostrada, a escala se eleva a partir do nível

normal até o nível de comprometimento máximo da integridade dos processos morfogenéticos do embrião:

- Nível 1

Morfogênese padrão (de acordo com a literatura);

- Nível 2

Alterações na forma, relacionadas à posição (ao longo do eixo do corpo);

- Nível 3

Dismorfismo localizado (de campo morfogenético, região ou estrutura);

-Nível 4

Dismorfismo generalizado (alteração complexa de múltiplos campos);

- Nível 5

Anormalidades de referência (anormalidades de centro ou de eixos do corpo).

Todas as categorias morfológicas, incluindo a forma do padrão normal, foram classificadas com esse protocolo e representadas através de um dos 5 níveis morfogenéticos, correspondente a cada categoria. A partir destes valores, foram determinados o tamanho de cada amostra, a média e o desvio padrão, a mediana e a moda.

2.2.4. Fotografias

As características relevantes correspondentes à morfologia, foram demonstradas através de fotografias. O material foi manuseado sob estereomicroscópio

140 x), dotado de iluminação incidente fria, através de filtro de cor azul, equipado com câmera fotográfica.

2.2.5 - Estudo descritivo dos resultados

Para facilitar a análise, a escala ordinal dos níveis de morfogênese foi transformada em uma escala contínua de 1 a 5, sendo os dados organizados em sumário estatístico (Costa Neto, 1977; Hoel, 1981; Gomes, 1982; Murteira & Black, 1983; Levin, 1985 e Vieira e Hoffman, 1989). As médias de níveis referentes às modalidades de incubação, foram comparadas ($p \leq 0,05$), através da Análise de Variância Unifatorial (ANOVA) e as diferenças estatisticamente significativas, apontadas com o método de comparações múltiplas, no sistema Statgraphics (Statistical Graphics Corporation, University of Illinois, USA), 1991, versão 5.0.

3. RESULTADOS

No período de agosto de 1995 a maio de 1996, foram realizadas 66 incubações, com manuseio de 308 ovos, dos quais 47 (15,3%) não estavam fecundados e 261 (84,7%) apresentaram desenvolvimento. Deste total 163 (62,4%) possuíam embriões passíveis de serem analisados e fixados, 44 (16,9%) não foram utilizados devido à ruptura acidental da membrana vitelínica ou a outras inadequações durante o manuseio e 54 (20,7%) continham indivíduos que morreram no período complementar de 72h de incubação, sem possibilitar a análise.

O efeito de manipulação sobre a morfogênese embrionária foi avaliado nos 12 testes realizados em 58 incubações, onde a ação dos fatores físicos e químicos foi estudada no manuseio de 150 embriões (tabela II).

A frequência das incubações, com as respectivas quantidades de ovos e de embriões analisados em cada modalidade de incubação, está listada na tabela II.

Tabela II - Relação do número, percentagem de incubações, e das frequências absoluta e relativa de ovos e dos embriões fixados em cada modalidade de incubação.

Modalidades de incubação	Frequência de incubações		Frequência de ovos *		Frequência de embriões fixados **	
i	8	12,1%	17	5,5%	13	(76,4%)
A	8	12,1%	17	5,5%	13	(76,4%)
a	3	4,5%	18	5,8%	12	(66,6%)
R	9	13,6%	20	6,4%	15	(75,0%)
R1	4	6,0%	23	7,4%	14	(60,8%)
R2	4	6,0%	22	7,1%	16	(72,7%)
I	8	12,1%	24	7,7%	14	(58,3%)
I1	4	6,0%	19	6,1%	13	(68,4%)
I2	5	7,5%	22	7,1%	15	(68,1%)
P	6	9,0%	36	11,6%	16	(44,4%)
T	1	1,5%	12	3,8%	0	-
T1	5	7,5%	54	17,5%	12	(22,2%)
T2	1	1,5%	24	7,7%	10	(41,6%)
Totais	66	100%	308	100%	163	**/*

Nota: (**/*) Frequência relativa de embriões em relação ao número de ovos incubados.

A tabela II mostra que a menor frequência de ovos incubados - 12 (3,8%) correspondeu ao teste (T) com apenas 1 incubação, sendo este o único teste no qual não se verificou a presença de embrião viável.

A maior frequência de ovos incubados refere-se a 54 (17,5%) no teste (T1), onde em 5 incubações obteve-se o número mínimo de 12 embriões viáveis.

3.1. Análise das unidades amostrais

3.1.1. Período de 24h

Concluído o período inicial de incubação, a análise preliminar dos ovos abertos demonstrou que os embriões viáveis apresentavam nível de desenvolvimento definido entre o estágio de gástrula tardia e a nêurula inicial, fase em que o neuróporo posterior ainda se encontra aberto, intervalo com predominância no período de 23h (estádio 6) a 29h (estádio 8) do desenvolvimento embrionário. Durante este período de tempo, em que a média geral das idades foi de 25,5h, verificou-se como indício da formação do sistema nervoso, a presença das dobras neurais. A idade de cada embrião, em todas as modalidades de incubação em que foram abertos ovos após o período de cultura de 24h, está detalhada nos anexos de 1 a 13 e a média dessas idades embrionárias em cada modalidade de teste, foi relacionada na tabela III.

Tabela III - Relação da média de idade embrionária (h), média geral e respectivo estágio de desenvolvimento de *Gallus gallus domesticus*, registrado em cada modalidade de teste, no período de 24h de cultura.

Modalidade de teste	Média de idade dos embriões (h)	Estádio de desenvolvimento
A	23,5	6 HH
a	25,6	7 HH
R	23,3	6 HH
R1	24,0	6 HH
R2	28,1	8 HH
I	23,2	6 HH
I1	24,5	6 HH
I2	29,0	8 HH
P	25,5	7 HH
T	25,5	7 HH
T1	28,4	8 HH
T2	25,7	7 HH
Média geral	25,5	7 HH

A tabela acima demonstra que em qualquer modalidade de teste, o nível de desenvolvimento, pressuposto para a realização dos testes com abertura e injeções correspondeu em média ao estágio 7 de Hamburger e Hamilton (1951). A menor média de idade ocorreu com os indivíduos destinados ao teste (I), nos quais se evidenciava a prega cefálica e a maior média de tempo foi registrada nos submetidos ao teste (I2), que apresentaram o tubo neural fechado, em sítios de fusão das dobras anteriores ao 15º par de somitos.

3.1.2. Período de 96h

Com a continuidade da incubação pelo período complementar de 72h e efetivação do experimento, observou-se que do total de 163 embriões que apresentaram desenvolvimento pelo período de 96h, 36 (22,1%) foram considerados normais e 127 (77,9%), por apresentarem algum nível de alteração da forma, foram referidos como malformados. A figura 3 compara o número de embriões normais e malformados, entre as modalidades de incubação.

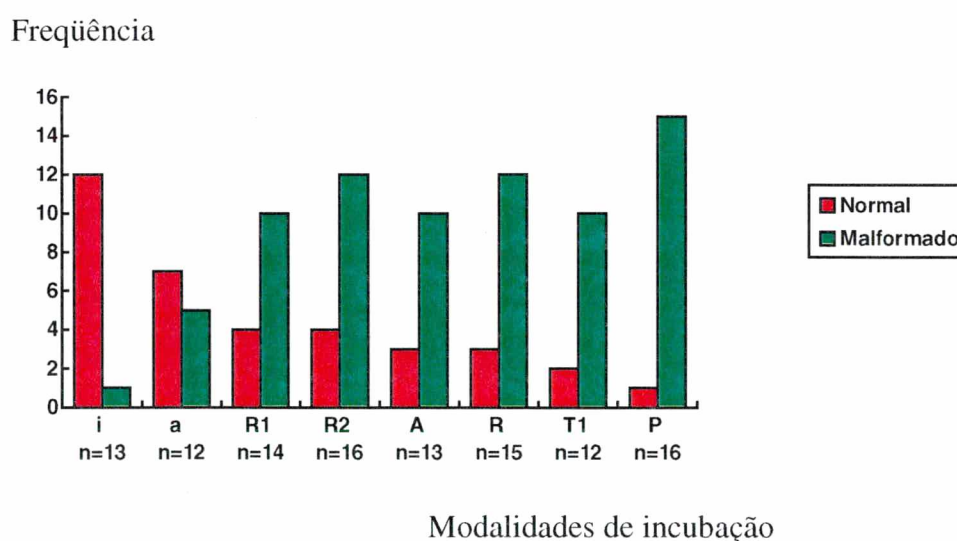


Figura 3 - Frequência dos embriões normais e malformados e número de indivíduos da amostra, entre as modalidades de incubação (i), (a), (R1), (R2), (A), (R), (T1) e (P), após o período de 96h.

Na figura 3 observa-se que a maior frequência de indivíduos normais (12 espécimes), foi registrada entre ovos incubados intactos (i), correspondendo a 92,3%, e a menor, foi verificada entre os ovos abertos injetados com PBS (P), referente a 6,2%. Nas modalidades de incubação: (a), (R1), (R2), (A), (R) e (T1), as frequências de indivíduos normais foram de 58,3%, 28,5%, 25,0%, 23,0%, 20,0% e 16,6%, respectivamente. Entre as modalidades (I), (I1), (I2), e (T2), não foram registrados embriões apresentando o padrão morfológico normal e no teste com injeção de 150 μ g/ml de tunicamicina (T), como todos os indivíduos morreram no início do período complementar do teste, não foi possível proceder a uma análise detalhada dos mesmos, após as 96h de incubação.

3.2. Caracterização dos embriões

3.2.1. Discriminação dos embriões normais entre as modalidades de incubação

Entre os 36 embriões normais, 20 (55,6%) mostraram nível de desenvolvimento relativo a 96h (figura 11), 11 (30,6%) corresponderam a 84h (figura 12), 4 (11,1%) a 72h (figura 13), e 1 embrião (2,7%) a 64h (estádios 23, 21, 20 e 18HH, respectivamente).

3.2.2. Discriminação dos embriões malformados entre as modalidades de incubação

Do total de 127 embriões que apresentaram malformações, o número de embriões malformados por modalidade de incubação correspondeu a:

- 1/13 (7,7%) entre os ovos incubados intactos (i);
- 5/12 (41,6%) dos abertos e submetidos à perfuração (teste a);
- 10/14 (71,4%) dos injetados com solução de Ringer a 25% (teste R1);
- 10/13 (77,0%) dos submetidos apenas à abertura (teste A);
- 12/16 (75%) dos injetados com solução de Ringer a 6,25% (teste R2);
- 12/15 (80%) dos injetados com solução de Ringer (teste R);
- 10/12 (83,3%) dos injetados com 15 µg/ml de tunicamicina (teste T1);
- 15/16 (93,7%) dos injetados com PBS 10mM, pH 4,0 (teste P);
- 14, 13, 15 e 10 (100%) dos espécimes injetados com as três concentrações de insulina e com tunicamicina (0,66 µg/ml), relativos às modalidades (I), (I1), (I2) e (T2), respectivamente.

3.2.3. Descrição das categorias de alterações da forma registradas nos embriões malformados

Os 127 embriões malformados, apresentaram 13 tipos característicos de alterações da forma, os quais foram relacionados como categorias de malformação.

Uma vez que as alterações registradas na forma das estruturas embrionárias geralmente estão presentes em mais de uma categoria no mesmo indivíduo, as mesmas foram também tratadas independentemente dos embriões, como unidades de casos.

Tabela IV - Frequência de embriões normais (NOR) e das categorias de malformação, em relação a todas as modalidades de incubação (Mod), com os respectivos totais (Tot).

Mod	NOR	ROT	FLE	ASS	TNF	AOP	DAN	DPO	RBC	ACD	PRO	NAN	PAD F/S	TED T/D	Total
i	12	-	-	-	-	01	-	-	-	-	-	-	-	-	13
a	07	01	04	03	-	-	01	-	01	01	-	02	-	-	20
A	03	-	01	04	-	02	01	03	03	03	01	03	-	1/-	25
R	03	03	-	04	-	01	02	01	02	02	-	05	1/-	-	24
R1	04	-	05	05	02	-	02	04	-	04	-	06	1/-	-/1	34
R2	04	-	04	04	02	-	02	02	01	01	-	04	-/3	2/-	29
I	-	-	-	-	01	-	-	03	-	-	-	-	/12	1/-	17
I1	-	-	01	04	01	-	02	02	01	01	-	06	1/5	1/-	25
I2	-	-	02	02	02	-	02	02	01	01	-	06	-/4	1/1	24
P	01	01	01	05	03	-	03	01	02	04	01	07	3/3	-	35
T1	02	-	-	03	-	-	04	04	01	-	01	06	/1	1/-	23
T2	-	-	02	01	02	-	01	01	-	-	-	09	-	1/-	17

As categorias de malformação correspondem a:

- erros de rotação (ROT),
- assimetrias (ASS),
- alterações ópticas (AOP),
- dismorfismo posterior (DPO),
- anormalidade cardíaca (ACD),
- desenvolvimento defasado/nanismo (NAN),
- teratoma - T ou duplicidade - D (TED).
- erros de flexura (FLE),
- tubo neural fendido (TNF),
- dismorfismo anterior (DAN),
- redução/ausência do botão caudal (RBC),
- protusão (PRO)
- alteração particular/padrões (PAD)
"Fish - shaped" (F) e "Sphinx - shaped" (S)

A tabela IV mostra que entre os testes, a maior frequência de alterações da forma ocorreu em relação à modalidade de incubação em que os ovos foram injetados com PBS 10 mM (P) e a menor frequência de malformação, está relacionada à modalidade de ovos perfurados (a).

Nos embriões submetidos ao teste (P), foram verificadas frequências altas de nanismo (7 casos) e de padrões de malformação "sphinx e fish - shaped" (6 casos) que, embora não sejam mais elevadas isoladamente, que as dos testes (T) e (I), correspondentes a 9 e 12 casos de anormalidades respectivamente, produzem no seu

conjunto um valor total maior naquele teste. O teste (P) resultou no mais representativo quanto à diversidade de categorias de malformação (tabela IV).

O nanismo ocorreu com maior frequência no teste com tunicamicina (T2) e o padrão "sphinx - shaped", que inclui entre outras características defasagem no crescimento, é representativo da modalidade de incubação (I), (I1) e (I2), embora também seja registrado em embriões submetidos a outras modalidades de teste (tabela IV e figura 4).

As figuras 4 e 5 evidenciam as frequências referentes às categorias de alteração particular da forma, os padrões "Sphinx" e "Fish - shaped", em relação às modalidades de incubação onde foram registradas. O primeiro padrão mostrou elevação no número de casos, na proporção do aumento de concentração da Insulina, nos 3 testes.

Os casos de teratoma e duplicidade permaneceram com frequências reduzidas nas modalidades de incubação em que se fizeram presentes, sendo (R2) o teste em que sua frequência foi mais elevada (tabela IV).

Com excessão dos padrões "Sphinx-shaped" e "Fish - shaped" (figuras 4 e 5), importantes nos testes com insulina e PBS, respectivamente, as demais categorias de malformação não demonstraram valores que constituíssem expoentes de frequência entre os testes realizados e a despeito das tendências apontadas anteriormente, não ocorreu especificidade absoluta de qualquer das categorias de malformação em relação a uma única substância.

Frequência

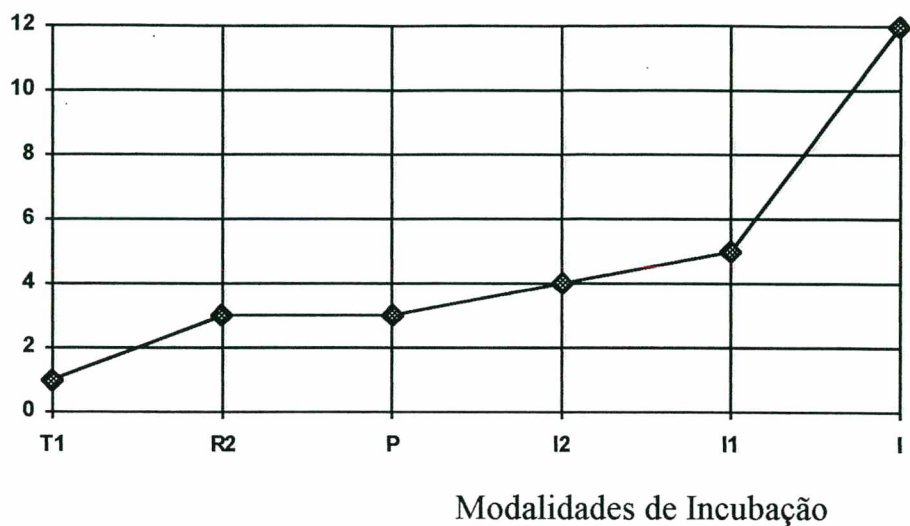


Figura 4 - Frequência absoluta do padrão de malformação "Sphinx - shaped" nas modalidades de incubação T1, R2, P, I2, I1 e I.

A figura 5 mostra que a distribuição do padrão "Fish - Shaped" foi mínima, em relação a três das quatro modalidades de incubação em que essa alteração da forma foi registrada e correspondeu a três o maior número de casos (teste P).

Frequência

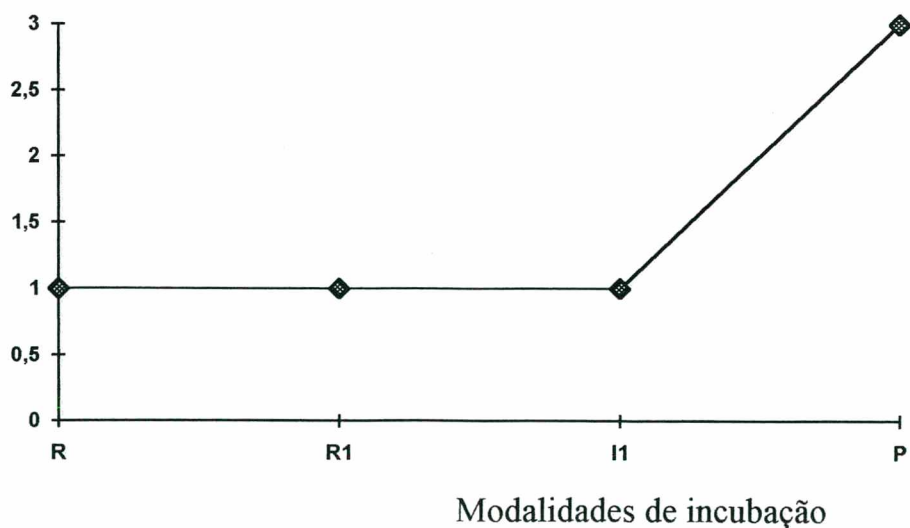


Figura 5 - Frequência absoluta do padrão de malformação "Fish - shaped" em relação às modalidades de teste R, R1, I1 e P.

O total de 250 malformações protocoladas conforme o nível de morfogênese, estão relacionadas a seguir, com os subtotais em cada nível:

- **Nível 2 (Alteração de posição)** - 60 casos -
 - Erro de rotação do corpo - 5/60 dos casos.
 - Defeitos de flexura do tubo neural - 20/60 dos casos.
 - Anormalidades decorrentes de assimetria (bilateral) - 35/60 dos casos.

- **Nível 3 (Dismorfismo localizado)** - 92 casos -
 - Tubo neural fendido - 13/92 dos casos.
 - Malformações ópticas (exceto assimetrias) - 4/92 dos casos.
 - Dismorfismo anterior - 20/92 dos casos.
 - Dismorfismo posterior (ou redução, ou ainda ausência dos membros posteriores) 23/92 dos casos;
 - Redução ou ausência do botão caudal - 12/92 dos casos;
 - Anormalidades cardíacas (hérnias ou posições ectópicas do coração) - 17/92 dos casos;
 - Protusão de estruturas - 3/92 dos casos.

- **Nível 4 (Dismorfismo generalizado)** - 88 casos -
 - Desenvolvimento defasado (nanismo) - 54/88 dos casos;
 - Alterações particulares (Formaram 2 padrões de alteração) - 34/88 dos casos, sendo:
 - "Sphinx - shaped" - 28 casos e
 - "Fish - shaped"- 6 casos.

- **Nível 5 (Anormalidade de referência)** -10 casos -
 - Teratoma - 8/10 dos casos ;
 - Duplicidades - 2/10 dos casos.

Os erros de rotação do tubo neural, consistem de escoliose e outros defeitos de torção (figura 14), enquanto os erros de flexura, incluem anormalidades em relação à flexão ventral (figura 15), alongamentos do tubo neural ou constrictões longitudinais do organismo. As anormalidades decorrentes de assimetrias, apareceram como disparidade de dimensão, forma, coloração, ou combinações destas características, entre estruturas pares como foi verificado em vesículas ópticas e membros (figura 16).

Presença de tubo neural fendido foi verificada como resultado do não fusionalamento das dobras neurais ou não fechamento de neuróporo. Anormalidades ópticas estão relacionadas a erros estruturais destas vesículas (figura 17), e dismorfismos localizados, atingiram tanto a região anterior, com modificações complexas das vesículas cerebrais, face e região cervical, como a região posterior, com redução ou ausência dos membros posteriores (figuras 18 e 19).

A redução ou a ausência do botão caudal, foi registrada como categoria de malformação específica dessa estrutura (figuras 14 e 16), e anormalidades cardíacas (figuras 19 e 20), consistiram de onfalocele ou hérnia cardíaca, que resultaram em posição ectópica do coração. Na figura 20 também se observa proeminência do botão caudal, anormalidade referida como protusão.

Todo processo de desenvolvimento uniformemente defasado (hipoplasia crânio - cervical e tronco - caudal), levou ao desenvolvimento de embriões com dimensões reduzidas (figura 20), sendo os graus de nanismo entre os indivíduos, muito variados.

Alterações particulares foram observadas em embriões que mostraram um conjunto característico de defeitos específicos, sendo caracterizados dois padrões de morfologia. No primeiro, denominado "sphinx - shaped" (figuras 21, 22 e 23), o embrião apresenta dimensões do corpo notadamente reduzidas e ausência de rotação e flexuras,

sendo possível reconhecer o eixo corporal ântero - posterior, devido à projeção cefálica estar organizada. Na região posterior o eixo corporal está menos demarcado, devido à presença de dimorfismo generalizado. Estas características observadas similarmente em 28 espécimes, lembram a configuração tridimensional de uma esfinge, razão da denominação utilizada para representar o padrão descrito. Nestes embriões malformados, o aspecto da área vasculosa mostra-se tipicamente modificado devido a uma desorganização drástica do padrão morfológico, em comparação com a estrutura do saco vitelínico, encontrada em embriões normais. Embora tenham decorrido 96h de incubação, não foi verificada a formação de vasos nesse anexo embrionário, mas apenas de ilhotas sanguíneas ou segmentos maiores de tecido angiogênico, esparçadamente encontrados na porção central, próxima ao embrião e concentrados perifericamente, na região do "sinus terminal" presuntivo. As ilhotas sanguíneas mostraram um aspecto de degeneração característico, assemelhando-se a um "estilhaçamento" (figura 23), principalmente nas áreas restritas em que essas estruturas exibiam alguma continuidade.

Um segundo padrão de alteração particular, denominado "fish - shaped" (figura 24), caracteriza-se inicialmente por um erro de rotação, no qual este evento somente ocorreu de modo normal (normotaxia) na região anterior do embrião, até o nível médio troncal. Posteriormente, numa distância longitudinal média entre os dois pares de membros, o sentido da rotação do tubo neural se deu ao contrário, para a direita (heterotaxia), conferindo ao corpo a conformação da letra "S". Em alguns destes indivíduos, há ausência da cauda e neuróporo posterior aberto. Em outros, a cauda apresenta-se muito reduzida e eventualmente flexionada lateralmente em relação ao plano ântero - dorsal e posterior. Os membros são morfológicamente normais, contudo o par posterior, nos indivíduos desprovidos de cauda, apresenta dimensões relativamente maiores que o padrão normal. Estas características, principalmente nos embriões sigmóides e sem o botão caudal, cuja extremidade posterior está "emoldurada" pelos

membros posteriores, únicos apêndices a se projetarem do extremo caudal, bilateralmente, conferem a esses indivíduos a aparência do peixe referido como cavalo - marinho (Hippocampus), motivo da denominação escolhida.

Formas caracterizadas pela indefinição de eixos corporais, impossibilitando determinar a direção ântero - posterior em virtude da massa amorfa de tecidos, sem estruturas visíveis foram registradas como teratomas (figura 25).

Duplicidades do neuroeixo foram verificadas em 2 embriões, sendo um caso de paralelismo e o outro (figura 26), uma forma toracópaga com um ângulo de aproximadamente 90° entre as estruturas cefálicas.

Na região extra-embriônica de espécimes apresentando desenvolvimento defasado (nanismo), padrão "sphinx - shaped" e nos teratomas, a área vascularizada mostra-se alterada em relação à forma, devido à redução do número de vasos e à presença tardia de ilhotas de sangue e segmentos maiores de tecido angiogênico.

3.3. Análise dos níveis de morfogênese

A classificação das categorias de malformação em níveis de morfogênese evidencia o 3° nível, relativo a distúrbios localizados como o de ocorrência mais frequente seguido de distúrbios generalizados (4° nível), alterações de posição (2° nível), formas correspondentes ao padrão normal (1° nível) e de anormalidades de referência (5° nível), o menos frequente (figura 6).

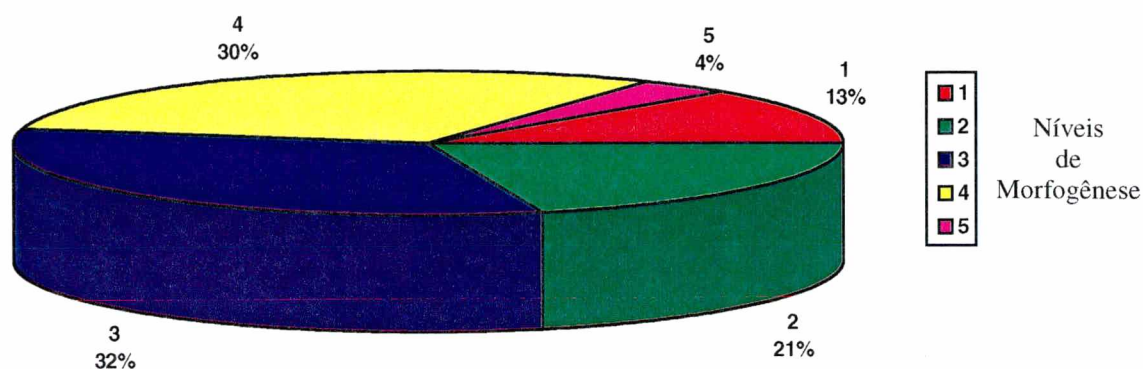


Figura 6 - Frequência relativa dos níveis morfogênicos de 1 a 5, em todas as categorias de forma embrionária, registradas nas diversas modalidades de incubação.

A tabela V relaciona um sumário dos níveis morfogênicos referentes a todas as categorias de forma dos embriões, registradas por modalidade de incubação. Neste procedimento, portanto, o número de observações (286), excede o número de indivíduos (163).

Tabela V - Tamanho das amostras, médias \pm desvio padrão, medianas e modas do nível de morfogênese referente a todas as categorias de forma embrionária, observadas nas modalidades de incubação controle (i) e testes (A, a, R, R1, R2, I, I1, I2, P, T1 e T2).

Modalidade de incubação	Tamanho da amostra	Média \pm desvio padrão	Mediana	Moda
i	13	1,15 \pm 0,55	1,0	1
a	20	2,00 \pm 0,97	2,0	2
A	25	2,60 \pm 0,91	3,0	3
R	26	2,73 \pm 0,96	3,0	3
R1	35	2,74 \pm 1,01	3,0	3
R2	29	2,82 \pm 1,16	3,0	3
T1	23	3,08 \pm 0,99	3,0	3
P	35	3,11 \pm 0,83	3,0	3
I1	25	3,36 \pm 0,86	4,0	4
I2	24	3,41 \pm 0,88	3,5	4
T2	17	3,47 \pm 0,87	4,0	4

A tabela V mostra que os valores de média \pm desvio padrão, mediana e moda, referentes à categoria normal (nível 1 de morfogênese) são verificados na modalidade de incubação controle (i) e evidencia que os valores mais altos correspondem ao 4º nível, referente a categorias de malformação que comprometem a integridade dos processos de morfogênese, conferindo formas particulares como nos espécimes anões e nos "sphinx-shaped" e "fish-shaped".

Na tabela V, embora a mediana e a moda relacionem as modalidades (I), (I1), (I2) e (T2) ao 4º nível, a média somente evidencia um valor mais elevado (3,83), em relação ao teste (I). Com excessão desses 4 testes e do controle (i), as demais modalidades de incubação produziram alterações morfogenéticas de tendência localizada - níveis 2 e 3.

Um segundo sumário de dados (Tabela VI), do mesmo modo que o anterior, relaciona o tamanho das amostras, médias \pm desvio padrão, medianas e modas dos dados morfológicos, contudo nestes cálculos foi considerado apenas a categoria de forma referente ao nível máximo registrado por embrião, desprezando-se categorias referentes a níveis inferiores. Neste procedimento, o número de observações corresponde ao número de indivíduos. (163 unidades).

Tabela VI - Tamanho das amostras, médias \pm desvio padrão, medianas e modas referentes ao nível morfogenético máximo, definido pelas categorias de forma em cada embrião.

Modalidade de incubação	Tamanho da amostra	Média \pm desvio padrão	Mediana	Moda
i	13	1,15 \pm 0,55	1	1
a	12	1,83 \pm 1,19	1	1
A	13	2,92 \pm 1,25	3	3
R	15	3,00 \pm 1,13	3	4
R1	14	3,07 \pm 1,43	4	4
R2	16	3,18 \pm 1,42	4	4
T1	12	3,41 \pm 1,24	4	4
P	16	3,62 \pm 0,88	4	4
I2	15	3,86 \pm 0,74	4	4
I	14	4,00 \pm 0,39	4	4
I1	13	4,07 \pm 0,27	4	4
T2	10	4,10 \pm 0,31	4	4

A tabela VI, com base principalmente nos valores de média e desvio padrão, demonstra que o nível mais acentuado de comprometimento dos processos de morfogênese, correspondeu ao 4º (alterações particulares na forma), nas modalidades de incubação em que ovos abertos foram injetados com: 0,5U de insulina (I), 0,25U de insulina (II) e tunicamicina - 0,66µg/ml, (T2). Já nas modalidades de incubação (i) - ovos intactos e (a) - ovos perfurados, o nível de morfogênese médio tendeu ao 1º (100% de integridade dos processos morfogenéticos), sendo este o valor da mediana e da moda para as duas modalidades. As medianas de nível morfogenético referente às modalidades de incubação (A) e (R), corresponderam ao 3º nível (dismorfismo localizado).

Em relação às demais modalidades, os valores de mediana e moda referentes ao 4º nível de morfogênese, ao contrário da tabela anterior, mostram-se generalizados e as médias, evidenciam valores iguais ou superiores ao 4º nível, nas modalidades (I), (II) e (T2). A partir da modalidade (I2) - com média e desvio padrão iguais a $3,86 \pm 0,74$, os valores da média decrescem nas modalidades (P), (T1), (R2), (R1), (R), (A), (a) e (i), respectivamente.

A ANOVA ($p \leq 0,05$) evidenciou que ocorreram diferenças entre as médias em diferentes testes.

O método de comparações múltiplas (95%) mostrou que as médias de nível morfogenético dos testes (I), (II), (T2), (I2), (P) e (T1) constituem grupos homogêneos, relação também verificada em relação aos testes (A), (R), (R1), (R2), (P) e (T1). Apontou ainda, diferenças estatisticamente significativas entre as médias de nível morfogenético dos testes (i) e (a), grupos homogêneos entre si, em relação às médias das demais modalidades de incubação e mostrou que as médias de nível morfológico intermediário, dos testes (A),(R) e (R1), são significantemente diferentes da média dos testes (I), (II) e (T2).

A figura 7 compara os intervalos das médias em todos os testes. Verifica-se a tendência à elevação nos níveis de alterações na forma até o teste (II) e redução nesses níveis a partir do teste (P) até o teste (T2), o qual possui a maior média.

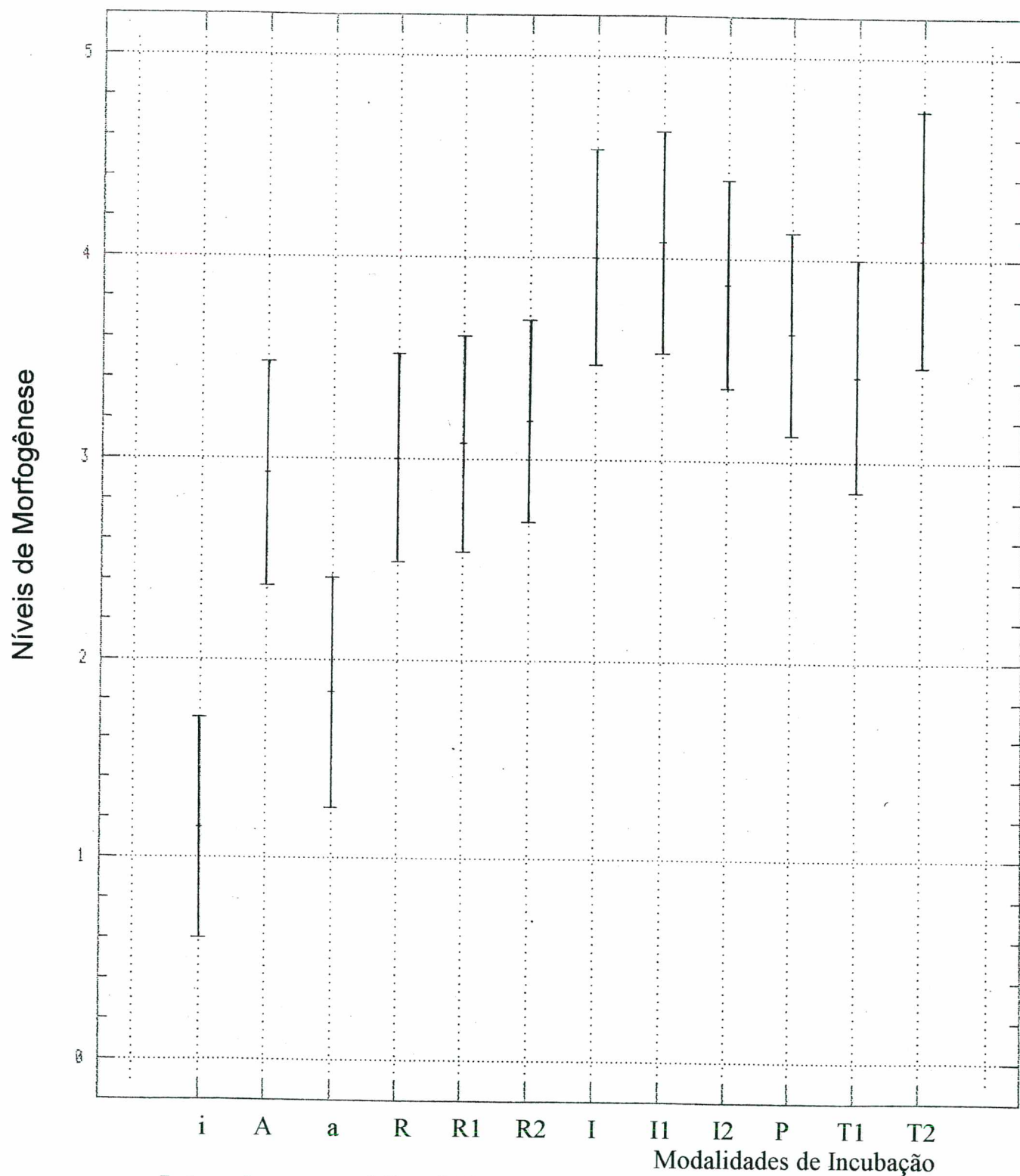


Figura 7 - Intervalos para médias (95% de confiança) de nível morfológico para as modalidades de incubação: (i), (A), (a), (R), (R1), (R2), (I), (II), (I2), (P), (T1) e (T2).

As figuras 8 e 9 evidenciam através da elevação médias e dos dados de frequência dos níveis, a tendência à redução da integridade da forma embrionária, verificada na tabela VI a partir da modalidade de incubação controle.

Modalidades de incubação

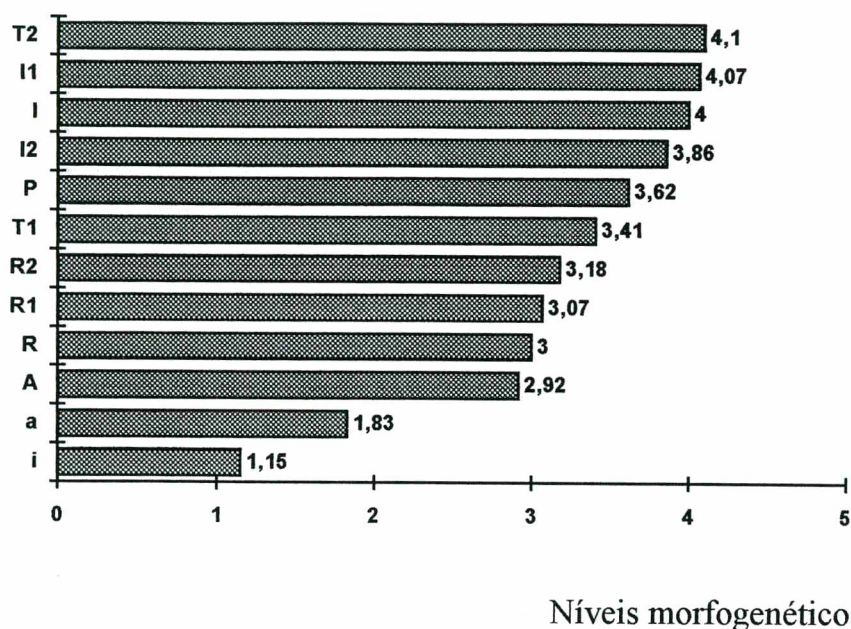


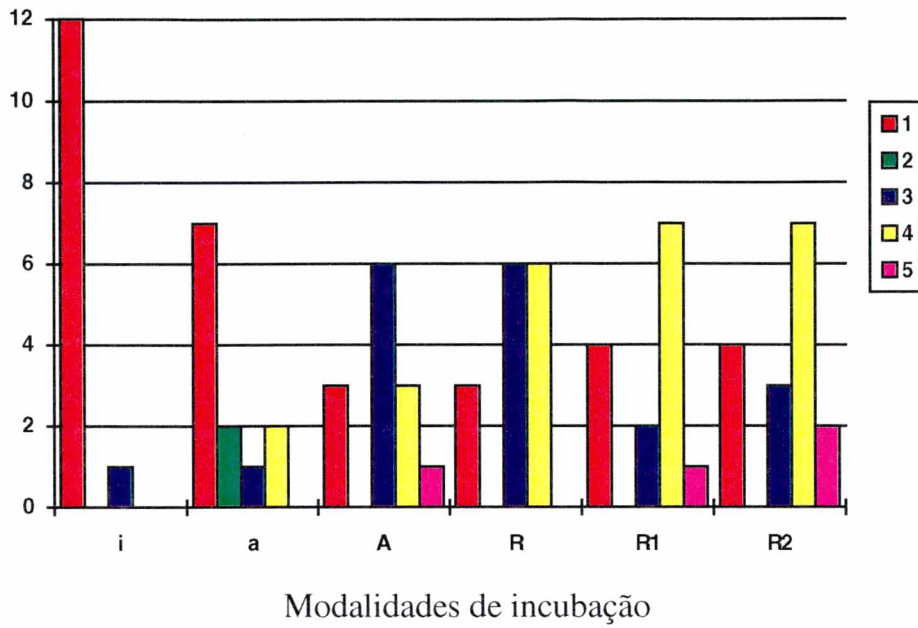
Figura 8 - Médias de nível morfológico máximo por embrião de *Gallus gallus domesticus*.

As modalidades de incubação em que os embriões apresentaram os níveis morfogênicos médios mais elevados (4º nível), referem-se às 2 maiores concentrações de insulina e à menor concentração de tunicamicina (teste T2).

Na figura 9 a e b os resultados a partir do controle mostram a queda na frequência do padrão normal - 1º nível, enquanto aumentou a diversidade e a frequência dos níveis mais elevados de comprometimento dos processos de morfogênese.

a)

Frequência absoluta



b)

Frequência absoluta

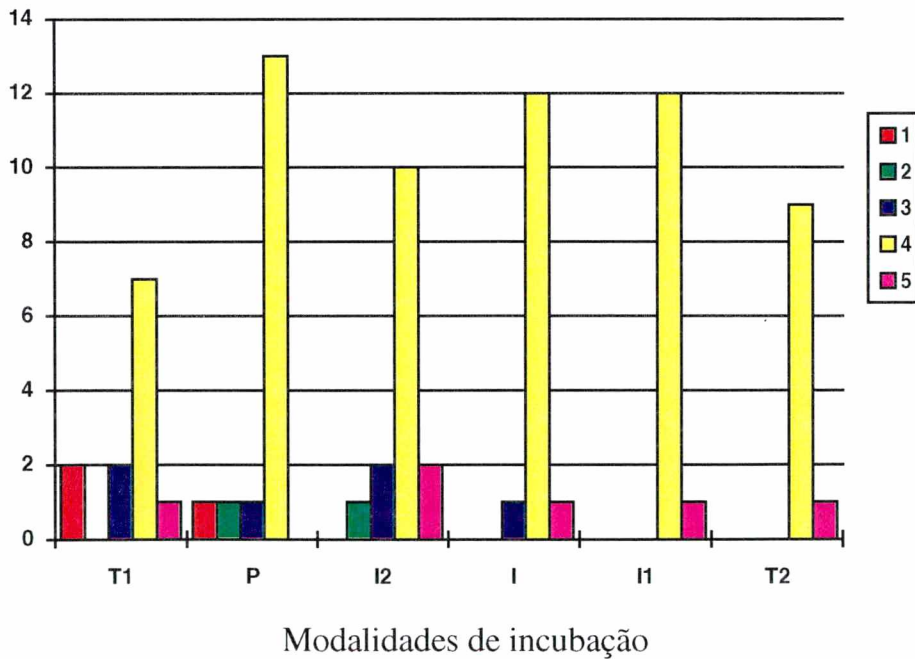


Figura 9 - Frequência de embriões referidos por nível de morfogênese máximo, nas modalidades de incubação: i, a, A, R, R1e R2 (a), e T1, P, I2, I, I1e T2 (b).

A partir do desenvolvimento normal e das categorias de malformação, classificados em níveis de integridade / comprometimento dos processos de morfogênese do sistema nervoso central, verifica-se que o 1º, 2º e 5º níveis estão ontogeneticamente relacionados a um período de tempo de ocorrência mais inicial, quando comparados ao 3º e 4º níveis. Sendo estes relacionados a anormalidades que se instalaram em processos do segmento médio-superior do neuroeixo - em especial o fechamento do neuróporo posterior, o desenvolvimento das flexuras e do botão caudal e a efetivação da rotação do eixo corporal (Figura 10) - o que implica em modificações, no intervalo de tempo de 24h a 48h após o tratamento.

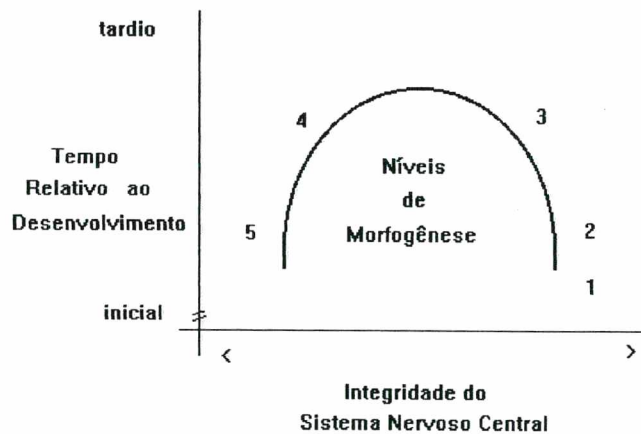


Figura 10 - Esquema interpretativo dos 5 níveis de morfogênese, quanto à integridade do sistema nervoso central e ao tempo relativo ao desenvolvimento embrionário, de acordo com os resultados obtidos no presente estudo.

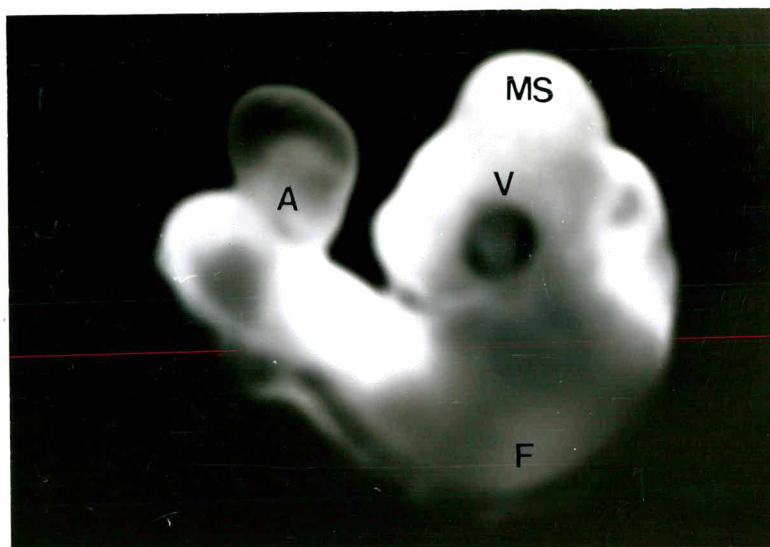


Figura 11 - Embrião normal de *Gallus gallus domesticus* (72h), estágio 12HH; controle i — (A) Alantóide; (F) Flexura cervical; (MS) Mesencéfalo e (V) Vesícula óptica. Aumento 42 X.

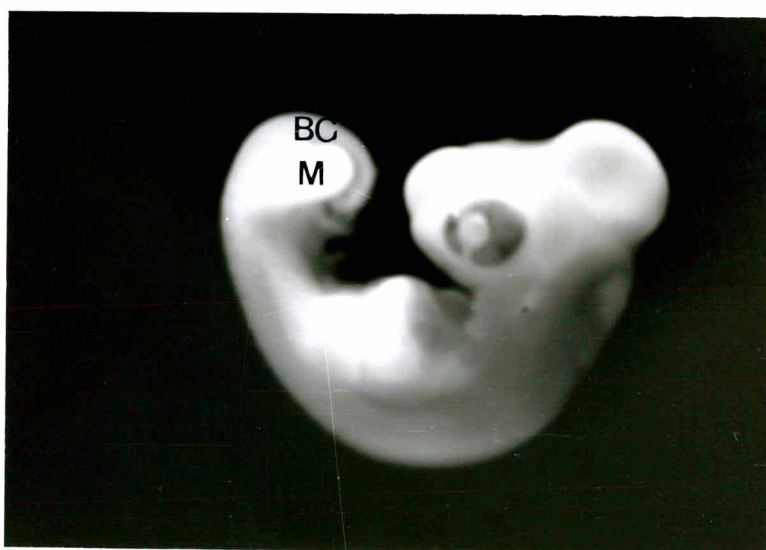


Figura 12 - Embrião normal de *Gallus gallus domesticus* (84h), estágio 20HH; controle i — (M) Membros posteriores; (BC) Botão caudal. Aumento 32 X

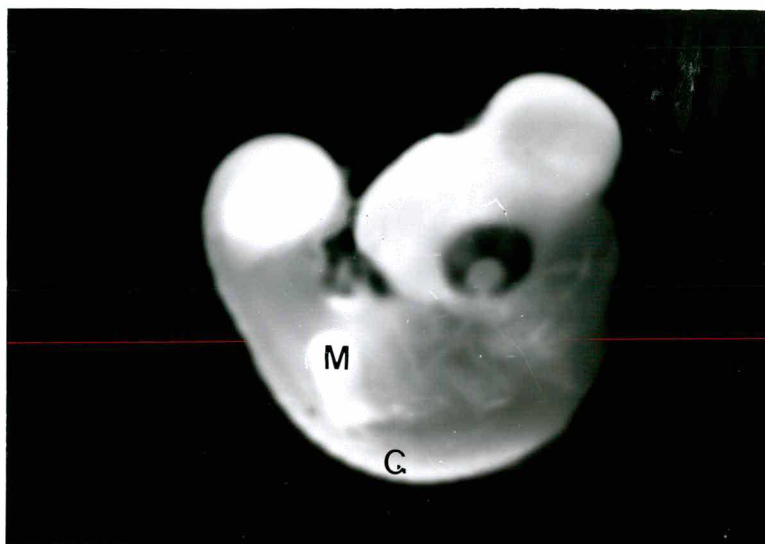


Figura 13 - Embrião normal de *Gallus gallus domesticus* (96h), estágio 23HH; controle i — (M) Membros superiores e (C) Curvatura dorsal. Aumento 28 X.

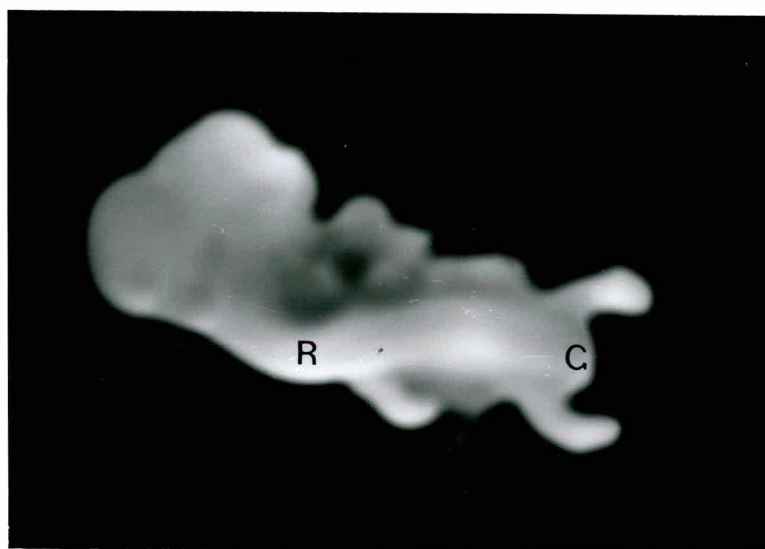


Figura 14 - Embrião de *Gallus gallus domesticus*, malformado; teste A — (R) Erro de rotação; (C) Ausência do botão caudal. Aumento 20 X.

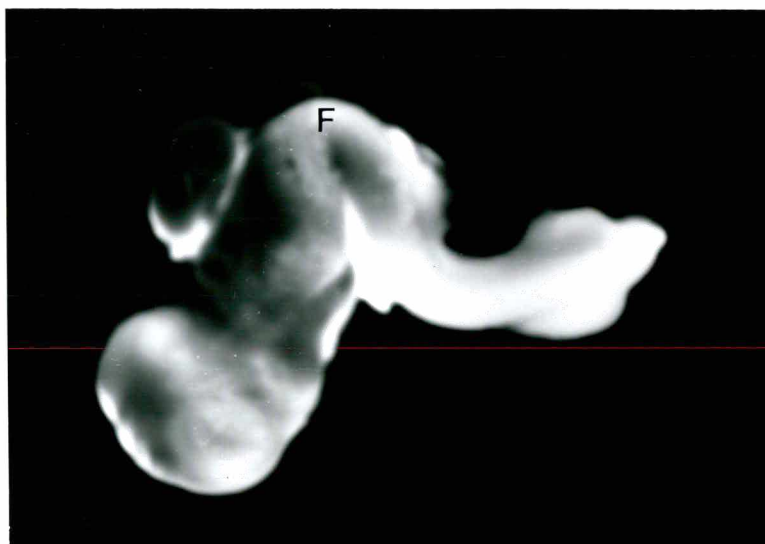


Figura 15 - Embrião de *Gallus gallus domesticus*, malformado; teste R1 — (F) Defeito de flexura do tubo neural. Aumento 42 X.

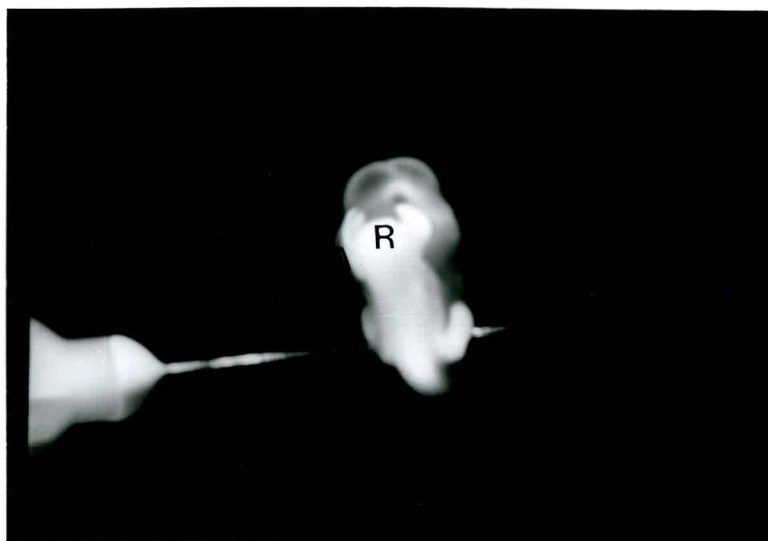


Figura 16 - Embrião de *Gallus gallus domesticus*, malformado; teste I2 — (A) Assimetria da vesícula óptica e (R) Redução do botão caudal. Aumento 20 X.



Figura 17 - Embrião de *Gallus gallus domesticus*, malformado; teste I2
— (O) Anormalidade óptica. Aumento 20 X.



Figura 18 - Embrião de *Gallus gallus domesticus*, malformado; teste T1
— (DA) Dismorfismo anterior e (DP) Dismorfismo posterior -
ausência de membros posteriores. Aumento 28 X.

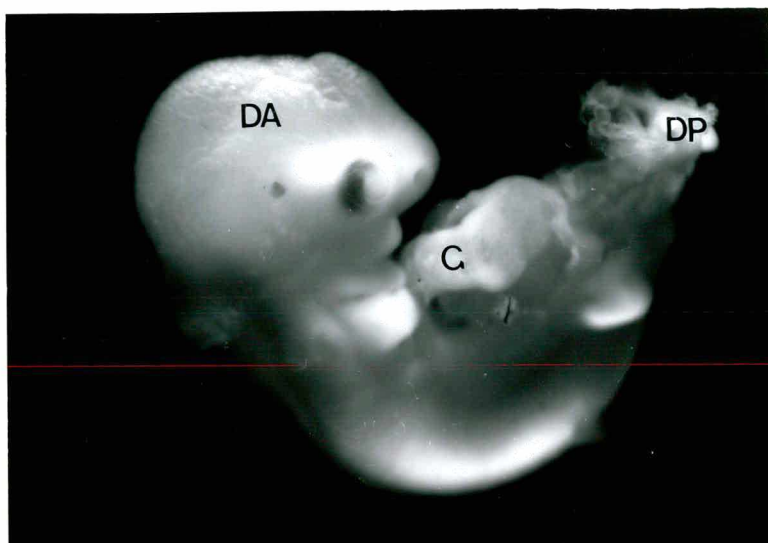


Figura 19 - Embrião de *Gallus gallus domesticus*, malformado; teste P — (DA) Dismorfismo anterior; (DP) Dismorfismo posterior e (C) Anormalidade cardíaca. Aumento 70 X.

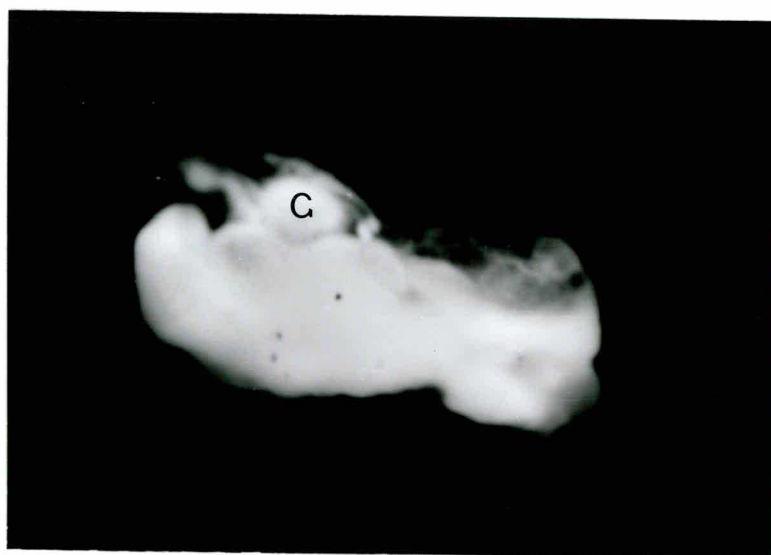


Figura 20 - Embrião de *Gallus gallus domesticus*, malformado; teste P — Nanismo; (P) Protusão e (C) Anormalidade cardíaca. Aumento 70X.

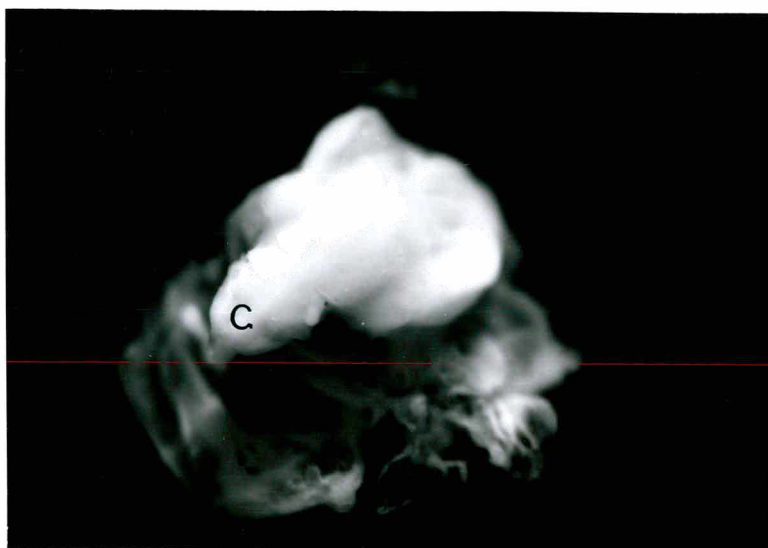


Figura 21 - Embrião de *Gallus gallus domesticus*, malformado; teste I — Padrão "sphinx - shaped", região dorsal. (C) Projeção cefálica. Aumento 84 X.

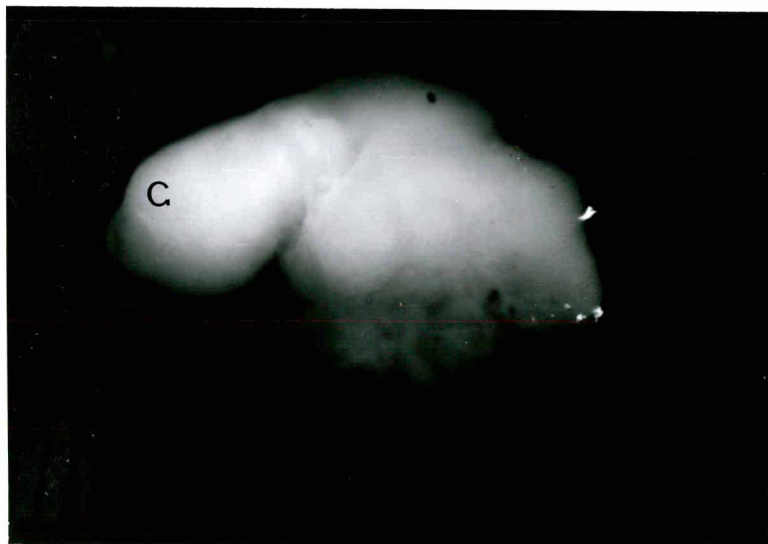


Figura 22 - Embrião de *Gallus gallus domesticus*, malformado; teste I — Padrão "sphinx - shaped". (C) Projeção cefálica. Aumento 140 X.

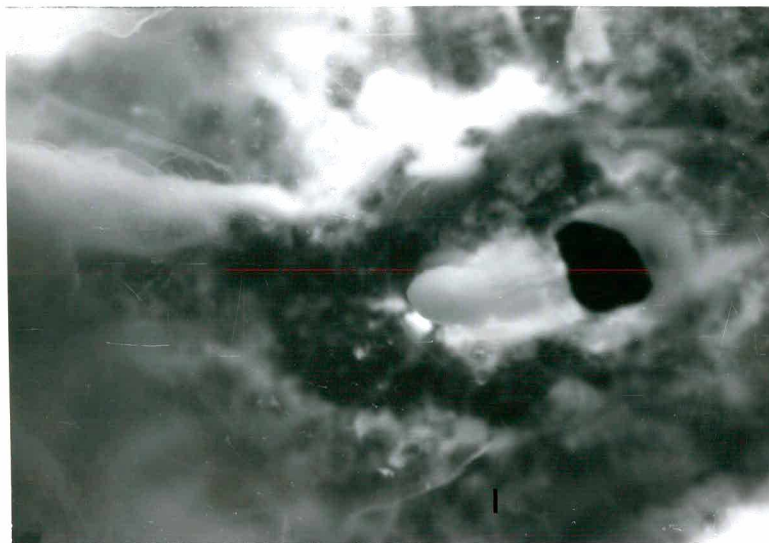


Figura 23 - Embrião de *Gallus gallus domesticus*, malformado; teste R2 — Padrão "sphinx - shaped". (I) Ilhotas sanguíneas. Aumento 84 X.

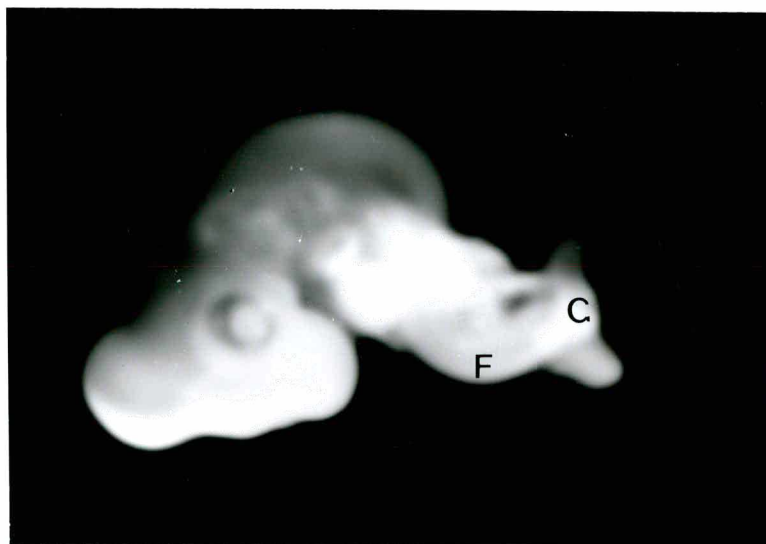


Figura 24- Embrião de *Gallus gallus domesticus*, malformado; teste P — Padrão "fish - shaped". (C) Ausência de cauda e (F) Erro de flexura. Aumento 28 X.



Figura 25 - Embrião de *Gallus gallus domesticus*, malformado; teste R2
— Teratoma. Aumento 84 X.

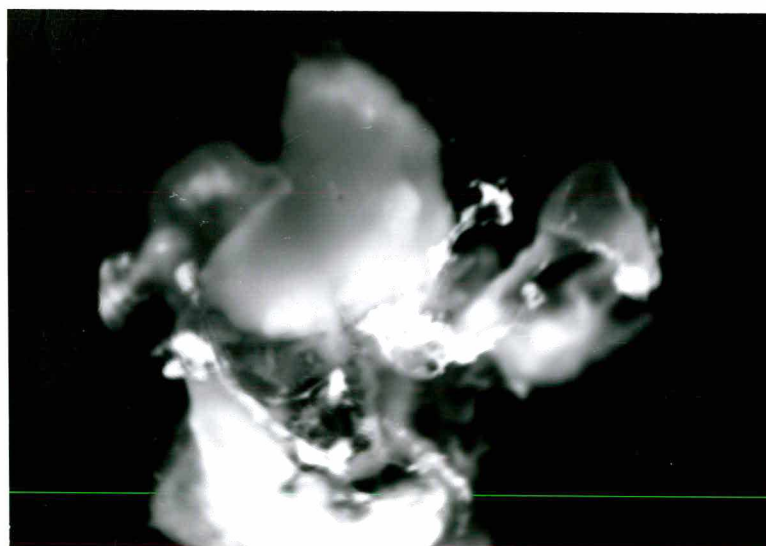


Figura 26 - Embrião de *Gallus gallus domesticus*, malformado; teste R1
— Duplicidade. Aumento 84X.

4. DISCUSSÃO

O período embrionário compreende uma sucessão de eventos marcantes, os quais têm origem com a formação e organização inicial dos folhetos. Concomitantemente aos movimentos de neurulação, ocorrem outros processos de morfogênese e organogênese, importantes para o estabelecimento progressivo da forma básica, que predomina nesse período do desenvolvimento sobre características específicas (Bellairs, 1971 e Shostak, 1991). A partir do início da formação do tubo neural, durante o período embrionário, tornou-se possível acompanhar, coordenadamente, os movimentos de rotação lateral do corpo, de curvatura ao nível das flexuras, o desenvolvimento dos somitos, do coração, dos membros e, com o fechamento do neuróporo posterior, a formação do botão caudal. Devido à relevância destes eventos para a caracterização da morfogênese do sistema nervoso central e do plano geral do organismo, os mesmos foram os mais considerados na análise da ação de fatores físicos e químicos no desenvolvimento embrionário, em relação ao tempo e às modalidades de incubação (tabela I).

As disparidades verificadas em relação às freqüências de incubação, de ovos e de embriões fixados entre as diversas modalidades (tabela II), independentemente da susceptibilidade do material aos diversos fatores de teste, resultaram provavelmente de variações na freqüência de ovos fecundados entre os lotes fornecidos e de influências

atribuídas ao padrão do ciclo sexual das aves, nas estações do ano, durante a realização do presente trabalho.

Com a efetivação do período de 24h de incubação, a análise dos ovos abertos e viáveis demonstrou que a média da idade embrionária correspondeu ao tempo no qual se processa elevação e fusão das dobras neurais. Contudo, mesmo aqueles indivíduos cujo desenvolvimento diferiu dessa média (estádio 7 HH), mostraram-se morfológicamente compatíveis com o processo de neurulação e portanto, com o quadro ontogenético de susceptibilidade, necessário à efetivação dos experimentos nos diversos fatores de estudo.

As variações no tempo de desenvolvimento, apresentadas por 44,5% dos embriões considerados normais ao final de 96h de incubação (figura 3), incluindo os submetidos à modalidade de incubação controle (i), podem ter ocorrido em função de diferenças individuais, possivelmente de heterocronias entre as estruturas embrionárias, resultando em ritmo de desenvolvimento normal, embora diferenciado entre esses espécimens (Bellairs, 1971; Aymar et al., 1981; Shostak, 1991 e Duboule, 1994).

Esta observação se fundamenta nos estádios descritos por Hamburger e Hamilton (1951), referentes ao nível de desenvolvimento dos somitos e das flexuras do tubo neural que, de acordo com Freeman & Bracegirdle (1982), se mostram inespecíficos em relação a alguns períodos de tempo. As observações efetuadas quanto à cronologia da ontogênese de *Gallus gallus domesticus*, corroboram as afirmações desses autores quanto a divergências na presença de estruturas, também apontadas por Dias (1994), para o período de 72h de incubação.

Batt (1980) e Vakaet (1984) mencionam alternâncias entre os "picos" das curvas de desenvolvimento de estruturas embrionárias, as quais indicam que os processos organogenéticos não são absolutamente uniformes em relação ao tempo, mas ao contrário, parecem sofrer oscilações no ritmo de desenvolvimento. Os dois autores citam ainda, que

alternâncias nesse ritmo, nos períodos de 72h e 96h de incubação, também denominadas curvas de desenvolvimento, dificultam a avaliação precisa da idade embrionária, uma vez que a diferenciação dos tecidos não se distribui a uma taxa uniforme nas diversas regiões de um mesmo organismo.

No presente estudo, malformações registradas em embriões submetidos a abertura e injeções tópicas nas adjacências do tubo neural em formação, resultaram em inúmeras categorias de alteração morfológica (tabela IV), as quais por serem comuns a mais de uma etiologia estão também referidas na literatura consultada (Patten, 1951; Deuchar, 1952; Harrison, 1957; Delphia & Elliot, 1965; Bannigan, 1985; De Pablo et al., 1990; Brook et al., 1991; Männer et al., 1993; Rahman et al., 1994; Dias & Müller, 1995 e Shibley & Pennington, 1995).

O levantamento de categorias de malformação e a sua classificação em níveis morfogenéticos, através do protocolo definido na metodologia, foram inicialmente discutidos segundo um enfoque principalmente quantitativo da sua ocorrência, com base nas figuras de número 5 a 8, bem como, nas tabelas IV, V e VI. No segundo momento, as categorias de malformação e os respectivos níveis morfogenéticos considerados quanto a aspectos qualitativos, permitem uma abordagem etiológica, fundamentada na literatura pertinente.

Embora não relacionem as modalidades de incubação, os dados de frequência da figura 6, que mostram o 3º nível de morfogênese, referente a dismorfismos localizados, como o de ocorrência mais comum, seguido por dismorfismos generalizados (4º nível), alterações de posição (2º nível), forma correspondente ao padrão normal (1º nível) e anormalidades de referência (5º nível), fornecem uma perspectiva, com base no nível de integridade dos processos de organogênese, do modo pelo qual o estabelecimento da forma foi alterado nos organismos.

O comprometimento dos processos morfogenéticos a nível de uma região específica (3º nível) ou de múltiplos campos do organismo (4º nível), predominantes cerca de 64% em relação às demais anormalidades, ocorreram em períodos relativamente tardios - 27h a 60h, devido a erros na fusão das dobras neurais e na morfogênese cefálica, dos membros e/ou caudal. Por outro lado, as alterações da forma menos frequentes, sendo decorrentes da não formação de um centro organizador, desorganização deste ou da duplicação do eixo longitudinal (5º nível), surgiram durante a gastrulação ou no período embrionário inicial - 6h a 24h (figuras 1 e 10), evidenciando que o tempo de incubação é um fator preponderante na dismorfogênese, de modo que a gravidade dos defeitos na forma do indivíduo tende a aumentar em extensão, na direção do desenvolvimento mais inicial (Huettner, 1949; Hamburger & Hamilton, 1951; Deuchar, 1952; Delphia & Elliot, 1965; Houillon, 1972; Patten, 1973; Shostak, 1991; Jacobson, 1993 e Gilbert, 1994).

Embora as orientações ântero - posterior, dorso - ventral ou mesmo de campos morfogenéticos estejam determinadas no blastoderma, os processos envolvidos em estabelecer eixos de referência no corpo do embrião poderiam, mesmo assim, ser alterados. Indivíduos portadores do 5º nível de morfogênese, mas que no momento da manipulação apresentaram idade compatível ao período de 24 horas de incubação (tabela III), emprestam suporte a essa possibilidade.

A ANOVA ($p \leq 0,05$) e o método de comparações múltiplas evidenciaram diferenças estatisticamente significativas entre as médias das modalidades de incubação controle (i) e de ovos perfurados (a), em relação às demais modalidades de incubação. Os testes (i) e (a), que apresentaram mediana e moda iguais ao primeiro nível morfogenético e grupos de médias de níveis homogêneos, sugerem que a perfuração da área pelúcida (Figura 2), não comprometeu a morfogênese embrionária, nos mesmos parâmetros evidenciados em relação aos demais testes, que causaram acentuado número de malformações de nível morfogenético elevado (Tabela VI e figuras 7 e 8).

A partir da modalidade (A), e das 3 concentrações da solução de Ringer (R), (R1) e (R2), a frequência das alterações na forma embrionária elevou-se, com predominância de anormalidades relacionadas à posição e distúrbios localizados (figura 9a). Como mostra a figura 9b, nos testes (T1), (P), (I2), (I), (II) e (T2) o 4º nível de morfogênese, permaneceu o mais frequente, acentuando-se ainda uma tendência à redução da diversidade dos níveis morfogenéticos por modalidade de teste. Nessa seqüência de testes o padrão normal de desenvolvimento (1º nível) tende a diminuir, mas os dados de média em (R), (R1) e (R2) (figura 8), revelam que o número de indivíduos normais tende a aumentar à medida que diminui a concentração do fator de estudo nos três testes, permitindo supor, que houve susceptibilidade dos organismos às interferências, conferidas pelos fatores utilizados no presente estudo, e que estas se deram, provavelmente, a nível dos mecanismos epigenéticos, reportados por Cole & Trasler (1980); Darnell & Schoenwolf (1995); Ekblom (1995); Ekker et al. (1995); Epstein (1995) e Gumbiner (1996).

Os dados referentes a nível morfogenético apresentados na tabela V, baseados no levantamento de todos os casos de malformação por modalidade de incubação, evidenciam que estes são mais numerosos que o próprio número de indivíduos malformados e mostram que os espécimes que apresentaram as médias mais elevadas de morfogênese alterada (4º nível), foram submetidos à insulina (I), (I1), (I2) e tunicamicina (T2). Na tabela VI, onde os dados se baseiam na frequência de categorias de malformação, definidas por nível morfogenético máximo registrado por indivíduo, os valores de médias ratificam o 4º nível como o mais elevado e também o relacionam aos espécimes submetidos à insulina e tunicamicina (I), (I1), (I2) e (T2). Os dados da tabela VI, além de confirmar a viabilidade das análises realizadas através do protocolo descrito na metodologia, fornecem em adição à tabela V, uma estimativa mais precisa do efeito de cada teste sobre os processos de morfogênese, pois a comparação de médias, medianas e

modas realizada nas duas tabelas, permite compensar as diferenças sofridas por estas 3 medidas de tendência central em face às características particulares de cada conjunto de dados. Efetuado isoladamente, o levantamento do nível de morfogênese máximo registrado por indivíduo, demonstra ser o procedimento mais adequado à avaliação, uma vez que facilita o estudo da forma, ao resumir o número de dados na análise exploratória.

Quanto à natureza das anormalidades, as concernentes ao 3º nível de morfogênese consistem em um conjunto de defeitos relacionados ao tubo neural ou referentes a toda a região anterior, ou à posterior, incluindo estruturas específicas, que em sua formação envolvem a participação de mais de um folheto embrionário, tais como vesículas ópticas, coração, membros anteriores e posteriores, e cauda.

As anormalidades referentes ao 4º nível de morfogênese, são representadas pelos casos de defasagem no desenvolvimento como um todo (padrão de nanismo), e pelas alterações particulares da forma ("sphinx" e "fish - shaped"), padrões que se relacionam mais diretamente aos fatores testados (figuras 4 e 5). O padrão "sphinx - shaped", o mais freqüente na modalidade de incubação com a insulina (no teste I) e seguido de freqüências menores nas outras 5 modalidades de testes, (II), (I2), (P), (R2) e (T1), permite vincular o respectivo conjunto característico de alteração, pelo menos às três concentrações de insulina suína utilizadas.

Provavelmente devido ao nível de diferenciação no neuroeixo ter avançado pouco após 24h de incubação, falhas nos movimentos morfogenéticos, consideradas por níveis e relacionadas à ação dos fatores físicos e químicos aplicados nesse período, tenham comprometido a organização das estruturas embrionárias desde um aspecto geral - o nanismo, até um mais regionalizado - mostrado por embriões "sphinx" e "fish - shaped", anormalidades concernentes a dismorfismos generalizados, característicos do 4º nível de morfogênese (Harrison, 1957; Delphia & Elliott, 1965 e Eyal-Giladi, 1991).

Além do 4º, o 3º e o 2º níveis de morfogênese, onde se caracterizam dismorfismos localizados e anormalidades de posição em relação ao eixo embrionário, indicam pela cronologia das estruturas embrionárias (figura 1), que as modificações introduzidas nos processos de morfogênese, se deram principalmente dentro do período de 24 horas consecutivo à aplicação dos fatores, ressaltando com os níveis, que as alterações ocorreram em resposta a uma ação singular, neste tempo de desenvolvimento.

Com excessão dos padrões "fish e "sphinx - shaped", que envolvem conjuntos particulares de alterações, as demais categorias de malformação não parecem se vincular a um fator de estudo específico, demonstrando portanto, uma ocorrência generalizada em relação aos diversos testes (tabela IV) e assinalando a conveniência do reconhecimento de padrões de malformação, para evidenciar a relação entre estes e a ação de fatores do ambiente.

De acordo com Patten (1973) e Jacobson (1993), a divisão de uma área de diferenciação axial, no início de sua formação no disco embrionário, pode levar ao desenvolvimento de duplicidades (figura 26). Em relação a teratomas (figura 25), encontra-se na literatura o termo aplicado a praticamente qualquer espécie de tumor misto. Sob esta denominação se agrupam processos muito heterogêneos de desenvolvimento, mas que resultam em formas limitadas e com evolução corporal tão defeituosa, que os espécimens deixam de evidenciar externamente, o eixo ântero - posterior. Nestas categorias os fatores físicos e químicos podem ter interferido nos tecidos embrionários a nível de mecanismos celulares refletindo na morfologia dos embriões estudados. Contudo, segundo Yuan et al. (1995), embora no estágio de nêurula inicial o destino celular não esteja irrevogavelmente estabelecido, a origem precoce de duplicidades e teratomas, e sua frequência reduzida nas modalidades de incubação, parecem estar vinculadas preponderantemente à ação de fatores intrínsecos.

Os embriões que apresentaram anormalidade cardíaca - 3º nível de morfogênese (figuras 19 e 20), mostraram apenas formação incompleta da parede ventral torácica, o que levou ao surgimento de hérnias, posições ectópicas do coração, e portanto, ao nível da análise realizada neste estudo, não ficou demonstrada qualquer alteração resultante da supressão de outra característica morfológica do tubo cardíaco. Em alguns destes espécimes, a dobra pericardial, transitoriamente impedida de recobrir o coração em desenvolvimento pode efetivamente ter recoberto este obstáculo mecânico. Deste modo os ventrículos terminaram sendo incorporados na cavidade peritoneal, voltando à sua posição normal e ajustando-se adequadamente ao organismo em desenvolvimento (Männer et al., 1995b). Este processo regulatório, referente a auto organização (Seilacher, 1991 e Dias & Müller, 1995), pode explicar os diferentes graus de anormalidades cardíacas observados nos embriões manuseados.

Männer et al (1995b) concluíram que em embriões de *Gallus gallus domesticus*, desordens do desenvolvimento da parede torácica, em particular da dobra peritoneal, podem resultar em defeitos congênitos do coração, por interferência mecânica nos dobramentos do coração embrionário. Erros no recobrimento deste órgão por parte da dobra pericardial, poderiam ter origem em movimentos morfogenéticos inadequados, principalmente na diferenciação de arcos branquiais, provocadas pela manipulação, na região próxima à cabeça do embrião.

Enquanto Männer et al. (1993), afirmam não ter encontrado nenhuma associação entre anomalias extracardíacas e malformações individuais do coração, correlações relacionando defeitos no tubo neural, foram sugeridas por Seller (1995b) e Sever (1995). A análise do padrão de malformação "fish - shaped" (figura 24), parece indicar interdependência entre defeitos de rotação e flexuras do tubo neural, e anormalidades referentes ao botão caudal.

Diferentes causas potenciais, relativas a determinadas categorias de alteração da forma registradas nos embriões manuseados, foram anteriormente consideradas por diversos autores, em importantes trabalhos referentes à teratogênese de aves e mamíferos (Deuchar, 1952; Carles et al., 1991; Bowden et al., 1993; Männer et al., 1993; Bowden et al., 1995; Epstein, 1995 e Fuginaga, 1995).

Männer et al. (1995b), afirmam que durante os dois primeiros dias de desenvolvimento, o suprimento de oxigênio dos embriões de galinha é independente do fluxo sanguíneo, sendo suprido por difusão direta, através da casca do ovo, da camada de albúmem e da membrana vitelínica, que recobrem o embrião. Durante o 3º dia de incubação, este processo é gradualmente suplementado por provimento mediado pelo fluxo sanguíneo, que se torna o mecanismo pelo qual o embrião em desenvolvimento é suprido de oxigênio.

Por outro lado, a formação do âmnio na região anterior, segundo Bell & Freeman (1971) e Männer et al. (1995b) representa uma barreira à difusão, provocando uma demanda precoce de oxigênio nas regiões cefálica e cervical uma vez que, a partir destes locais se desenvolvem os processos de dobramento, flexura e rotação do tubo neural. Sendo assim, os fatores de estudo podem ter agido indiretamente, alterando mecanismos que levaram a eventos anormais da angiogênese, com efeitos negativos sobre a forma embrionária como um todo.

A presença de embriões normais (figuras 11, 12 e 13) em diversos testes aponta para a hipótese anterior de um modo não absoluto, condicionando a ação dos agentes físicos e químicos à tangível dependência em relação ao tempo, ou idade dos embriões, no momento em que cada tratamento foi realizado (tabela III e figura 10). Esses dois fatores, juntamente com características intrínsecas, de potencial individual, possivelmente interagiram nos experimentos.

Assimetria (figura 16), uma anormalidade de posição, referida como de 2º nível na alteração da morfogênese, foi relacionada por Männer et al. (1995b), como decorrente de hipóxia, sendo que nesta condição, embriões de *Gallus gallus domesticus* desenvolveram assimetria bilateral, levando os autores à conclusão de que as estruturas adjacentes às membranas secundárias, tendem à condição de normoxia e apresentam conseqüentemente, um nível de desenvolvimento relativamente mais avançado que aquelas adjacentes ao saco vitelínico. Alguns embriões manuseados, apresentando assimetria nas dimensões das vesículas ópticas - menores do lado esquerdo, apóiam essa afirmativa.

De acordo com Almirantis (1995), sendo o blastoderma um sistema totipotente, as micro-estruturas seriam orientadas no primeiro momento apenas por fatores especificadores dos eixos ântero - posterior e dorso - ventral, resultando diretamente na diferenciação dos lados direito e esquerdo do campo morfogenético tridimensional total. Os dados referentes a anormalidades na simetria bilateral de estruturas pares, permitem postular que uma desorganização de caráter inicial, no gradiente "default" de referência dos eixos, pode ter ocorrido como consequência imediata da manipulação mecânica, nos tratamentos com abertura e injeções.

Defeitos nas flexuras do tubo neural (figura 15), anormalidades também correspondentes ao 2º nível de morfogênese, sugerem que taxas de crescimento diferencial entre as porções ventral e dorsal das estruturas axiais (tubo neural, notocorda, vasos e tubo digestivo), podem ser determinantes dos eventos de flexão ventral do embrião, ao menos a nível cranial (Männer et al., 1995a), e por conseguinte, constituir processo alvo dos fatores, levando ao comprometimento das flexuras. Outro mecanismo envolvido no desenvolvimento de flexão, são mudanças ativas na forma das células neuroepiteliais, mediadas pelo citoesqueleto e considerada por Schoenwolf & Yuan (1995), como uma das forças intrínsecas da neurulação. E segundo Männer et al. (1995a),

o metabolismo de monoaminas em células da notocorda e na placa do assoalho do tubo neural está também correlacionado, temporal e espacialmente, com as flexuras do corpo do embrião.

O tubo neural aberto, categoria de malformações referente ao 3º nível de avaliação da morfogênese - dismorfismo localizado, surge, de acordo com a teoria de Van Allen (Seller, 1995b), devido a falhas em um ou mais sítios de fusionamento do tubo neural ou em um de seus neuróporos (Schoenwolf, 1994 e Van Straaten et al., 1995).

Alterações no processo de neurulação, resultando em anencefalia e espinha bífida, podem originar-se de alterações em um grande número de mecanismos e componentes celulares, incluindo a interação célula - célula, divisão celular e mudanças na forma das células do ectoderma superficial ou neural, sendo esse tipo de defeito consequência do estágio de desenvolvimento em que ocorreu o comportamento anormal, bem como do nível rostro - caudal específico em que se encontrava aquele processo (Triplett & Meier, 1982; Eyal-Giladi, 1991; Eyal-Giladi et al., 1992 e Schoenwolf, 1994).

Defeitos na formação do tubo neural têm sido associados diretamente à ação de teratógenos, sendo o exemplo da espinha bífida em humanos, vinculado ao anticonvulsivo valproato de sódio e o da exencefalia em ratos, à exposição das mães à hipertermia (Seller, 1995b). Neuróporo anterior aberto foi provocado em 10% dos embriões de rato em cultura por até 45h, após micro - injeção de PBS (Chen & Hales, 1995). Os embriões caracterizados como "fish - shaped", apresentaram também defeito a nível de fechamento do neuróporo, contudo neste caso, na região posterior.

Injeções com diferentes drogas têm provocado efeitos de tendência regionalizada, em relação às porções cefálica, troncal e caudal do tubo neural, indicando que os mecanismos envolvidos nos eventos morfogenéticos nestas regiões, são provavelmente distintos (Schreiber et al., 1995). Especificidades em determinados níveis

do eixo corporal, foram relacionadas ao teste (P) com PBS 10mM, cuja ação, voltada à morfogênese da região posterior do corpo, ficou evidente no padrão "fish-shaped" (4º nível de morfogênese), marcado pela alta frequência de torções troncais anormais, redução, ou ausência, do botão caudal e neuróporo posterior aberto.

A insulina também mostrou uma ação relacionada a diferentes regiões do eixo ântero - posterior, sendo que Cole & Trasler (1980), demonstraram com estudos embriológicos, que essa substância alterou o padrão de fechamento e levou à perda do movimento normal de rotação do tubo neural e postularam que a perda extensiva de rotação leva à forma corporal anormal, em ratos, provendo base mecânica para casos de tubo neural fendido. Além da ausência de rotação implícita no âmbito das características do padrão "sphinx-shaped", os 5 casos de erros de rotação - 8,4% das categorias de malformação do 2º nível de morfogênese (figura 14), não possibilitaram sua correlação à ação de uma substância particular e denotam sua presença junto a outras anormalidades, porém sem uma vinculação específica (tabela IV).

Anormalidades de fechamento do tubo neural, defeitos no mesênquima da cabeça, arcos branquiais, somitos e nos botões de membros, segundo Chen & Behringer (1995), foram induzidos por inativação do gene "twist" (xtwi), que se expressa na notocorda e no mesoderma lateral, presente cronologicamente, desde a gástrula inicial até a nêurula, regulando intrinsecamente a morfogênese e o comportamento das células mesenquimais da cabeça, que por sua vez, atuam na morfogênese do próprio tubo neural cranial. Schorle et al. (1996) e Zhang et al. (1996), estudando a função do gene "AP - 2" na embriogênese, através de mutantes para esse fator, reportaram que além de severa dismorfogênese da região anterior, a falha do fechamento do tubo neural cranial coincidiu com o aumento da apoptose no mesencéfalo anterior, rombencéfalo e no 1º arco branquial. Contudo não envolveu a perda da expressão de "twist" ou do "pax - 3", os dois genes regulatórios citados, reconhecidamente requeridos para o fechamento do tubo

neural cranial. Durante o fechamento do tubo neural em ratos, o fator AP - 2 é expressado no ectoderma e nas células das cristas neurais, provendo informação posicional e estrutural à morfogênese cefálica.

As afirmações acima, conferem suporte à sugestão de que mecanismos de indução embrionária, e os referidos genes, embora estejam aptos a operar sob ação de drogas como a insulina, poderiam estar também envolvidos nas alterações registradas pelo menos nos embriões que apresentaram dismorfismo anterior e padrões de malformação "sphinx e fish - shaped", níveis 3 e 4 de morfogênese, respectivamente.

Conforme os resultados obtidos por Yuan et al., (1995), além do nó de Hensen, áreas de ectoderma laterais à linha primitiva teriam potencialidade de transdeterminação para formar notocorda na ausência das células precursoras notocordais, provendo inclusive os sinais indutivos para a re-especificação desta estrutura. Esses resultados fundamentam a hipótese de que no padrão "sphinx - shaped" (figuras 21, 22 e 23), os mecanismos celulares que controlam os movimentos pró - notocordais de regressão do nó de Hensen e linha primitiva (Schoenwolf, 1994), estão sujeitos às intervenções experimentais nos flancos de ectoderma da área pelúcida adjacente ao neuroeixo, por interferir com a camada de células que estaria se movendo caudalmente. A remoção desse "motor", responsável pela propulsão na placa neural posterior, levaria ao desenvolvimento troncal - caudal defasado, ou mesmo, à paralização deste processo, aspectos característicos dos embriões "sphinx - shaped".

Em relação ao nanismo (figura20), Shibley & Pennington (1995) afirmam que o crescimento de um embrião pode ser alterado pela interrupção da cascata de sinalização que afeta os níveis da ornitina descarboxilase (ODC). Testando a ação de drogas de abuso em embriões, registraram em resposta, uma diminuição da ODC, enzima também relacionada à biossíntese de poliaminas, moléculas que estabilizam o ácido desoxi-

ribonucléico e ribonucléico, regulando o ciclo celular normal e portando, através da função mitogênica, o desenvolvimento e o crescimento do corpo.

Pennington et al (1995) reportaram, porém, que o tratamento com insulina exógena não estimulou o crescimento de embriões e quando administrado juntamente com álcool, produziu efeitos inibitórios sobre o crescimento. Cole & Trasler (1980) mostraram que o tratamento com insulina alterou significativamente o índice mitótico, o padrão de rotação e fechamento do tubo neural e o metabolismo de carboidratos, causando secundariamente, queda na glicose disponível.

Sendo componentes do sistema de sinalização, insulina, pró-insulina, IGF e outros fatores de crescimento possuem receptores específicos na superfície celular e segundo Raw et al. (1991), os receptores de IGF-1 são semelhantes aos da insulina. Estudos de competição evidenciam a existência de receptores especiais de IGF-1, diferentes dos da insulina, entretanto os dois receptores não apresentam uma especificidade absoluta sendo que em altas concentrações os dois hormônios podem incorrer em reação cruzada, uma possível explicação para os efeitos ocasionados por altas doses de insulina sobre o crescimento. (Cole & Trasler, 1980; Triplett & Meier, 1982; Vakaet, 1984; Low & Saltiel, 1988; Raw et al., 1991; Shostak, 1991; Montgomery et al., 1994; Schoenwolf & Yuan, 1995; Burt et al., 1995 e Stryer, 1995).

Conforme Fox (1986), Ishihara et al. (1987) e Chan et al. (1989), a insulina também estimula a hidrólise de compostos ligados à membrana da célula que, por se acumularem extracelularmente, poderiam vir a influenciar negativamente a sinalização intercelular, por meio da saturação dos mecanismos de recepção ou de transdução do sinal, ocasionando deste modo, erros de coordenação posicional na organogênese (Saltiel & Cuatrecasas, 1986 e Faresē et al., 1988).

Em estudos com baixas concentrações (0,1 a 1,0 ng/ml), a insulina aumentou em aproximadamente 50% o consumo de glicose na discogástrula, estimulando o desenvolvimento, entretanto, segundo Reusch et al. (1995) e De Pablo et al. (1990), altas doses (μg /embrião de galinha) de insulina e pró-insulina, causaram morte, ou crescimento anormal - acompanhado da diminuição na concentração total de proteínas e ácidos nucleicos, e ausência de extremidade posterior nos embriões de aves, de 96h de incubação.

A ação da insulina sobre o metabolismo de glicose e o ciclo celular (Cole & Trassler, 1980; Cheatham & Kahn, 1995 e Gumbiner, 1996) repercute no organismo como um todo (Pennington, et al 1995), como mostram os quadros de defasagem referidos como nanismo e "sphinx - shaped". Embora no presente estudo estes resultados não estejam relacionados somente à ação da insulina, o modo como esta substância atuou, particularmente no padrão "sphinx - shaped", confirmou e estendeu os efeitos reportados por De Pablo et al. (1990), quanto à dismorfogênese na região posterior dos embriões de aves, sendo que as 3 concentrações administradas - elevadas, segundo os critérios de Reusch et al. (1995), mesmo não tendo causado mortes, foram provavelmente determinantes das anormalidades na morfogênese e no crescimento por bloquear os movimentos celulares e a sua proliferação no segmento caudal do neuroeixo. E nesse caso, a perda da especificidade absoluta dos receptores de IGF em relação à insulina - condição assinalada por Raw et al. (1991), constitui uma causa plausível das malformações em questão.

Mudanças no ambiente intercelular, a nível da matriz, devem ainda agir mecanicamente, por exemplo através da pressão higróstática resultante da hidratação, e assim provendo ou auxiliando dobramentos e outros movimentos morfogenéticos no ectoderma neural normal (Schoenwolf, 1994). Além disso, uma vez que a matriz extracelular, conecta diversas estruturas adjacentes como somitos, tubo neural, notocorda,

endoderma, aorta, ductos de Wolf (Jacobson, 1993; Schoenwolf, 1994; Christ & Ordahl, 1995 e Trousse et al., 1995), é possível considerar que a ação dos fatores de teste também tenham interagido com aquela estrutura tridimensional, comprometendo espacial e cronologicamente, a morfogênese neural, determinada mas ainda não terminantemente processada, no desenvolvimento inicial do embrião.

Diversos sinais instrutivos estão envolvidos na indução normal e na formação de uma notocorda única, com fatores indutores e polarizadores (Moiseiwitsch & Lauder, 1995). Experimentos recentes com anfíbios e aves, realizados por Yuan et al (1995) indicam que o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento e transformação β (TGF β) estão envolvidos na indução do mesoderma axial. Esta sinalização inicial, chave na determinação do neuroeixo embrionário, não pode ser desconsiderada quanto ao seu possível envolvimento no bloqueio do crescimento ântero - posterior, observado no padrão "sphinx - shaped", como também nos erros de torção a nível troncal, peculiares no padrão de malformação "fish - shaped".

Em "fish - shaped", principalmente nos embriões desprovidos de cauda, que incluíram tubo neural com neuróporo posterior aberto, a presença de vesículas cerebrais e de medula de dimensões normais, evidencia que os processos de oclusão e reabertura de neurocele espinhal ocorreram normalmente, apenas em níveis anteriores ao lombo - sacral, o que está em conformidade com Schoenwolf & Desmond, (1986), os quais reportam a ocorrência da oclusão do tubo neural, antes do fechamento do neuróporo posterior e portanto antes de completar a alongação axial do corpo (estádios 18 a 23 HH), sendo que, segundo Catala et al. (1995), a partir do estágio 4HH, o botão caudal e estruturas afins já estão determinadas.

A cito-embriotoxicidade por parte da tunicamicina, foi referida por Leist & Wendel (1995), quando em concentrações mais elevadas que 0,007 $\mu\text{g/ml}$ e um relevante conjunto de trabalhos relaciona diversas concentrações e efeitos similares deste

antibiótico (Takatsuki & Tamura, 1971; Olden et al., 1978; Pratt et al., 1979; Eto et al., 1981; Kage et al., 1995 e Pedemonte, 1995).

A menor concentração de tunicamicina utilizada em testes, mencionada por Takatsuki et al. (1975), foi de 0,005 µg/ml e a maior, foi de 50 µg/ml. Thesleff et al. (1980), reportam que 0,15 µg/ml foi usado com sucesso em cultura de células, ao reduzir a quantidade de matriz extracelular. Entretanto, importante apoio à sugestão de uma acumulação extracelular de componentes de matriz, foi provido por Olden et al. (1978), que demonstraram que a inibição marcante do mecanismo de glicosilação de fibronectina pela tunicamicina, não previne a exportação daquela proteína para a superfície celular. Assim, tanto a ausência como o excesso de componentes de matriz extracelular, imputados à ação da tunicamicina na dependência da dose administrada, constituem causas possíveis para malformações de 3° e 4° níveis de morfogênese.

Com excessão do teste (T), onde a dose de tunicamicina - elevada segundo os padrões citados por Thesleff & Pratt (1980) - 150 µg/ml, foi 100% letal, os embriões submetidos ao teste (T1), em que a concentração foi cerca de 33% inferior ao máximo citado pelos autores, mostraram além de redução no ritmo de crescimento, frequências importantes de dismorfismos, anterior e posterior. Isto permite supor que nesta concentração a tunicamicina tende a exercer uma ação localizada (3° nível de morfogênese), que se evidencia comparando-se estes resultados aos do teste (T2), onde na menor concentração desta substância, a tendência anterior ao contrário do esperado parece se inverter, com maior frequência de nanismo (4° nível) e número reduzido de dismorfismo localizado, o que se admite estar relacionado à idade embrionária por ocasião do tratamento, mais avançada e portanto menos permissiva, no teste (T1). A ação deste antibiótico, em concentrações superiores às referidas por Leist & Wendel (1995) como embriotóxica a nível celular, como as demais drogas, não induziu nos embriões manuseados, o surgimento de uma malformação específica.

Soluções salinas, tais como a de Hank, Loche, Tyrode e Ringer, embora eventualmente associadas a resultados não esperados e relacionados a fatores desconhecidos, não foram na literatura consultada (Flynn et al, 1991; Männer et al., 1993; Burt et al., 1995 e Gerchman et al., 1995), vinculadas diretamente ao surgimento das malformações. No presente estudo o pH das soluções salinas e do tampão utilizados pode estar implicado nos resultados obtidos, particularmente em relação ao PBS, uma vez que se aproxima mais do limite do respectivo intervalo de reação, citado por Souza et al. (1989).

Esses autores afirmam que o tampão fosfato pode formar precipitados no interior das células, quando em presença do cálcio e que mesmo no caso de tampões, a composição química pode alterar a morfologia celular, a densidade da matriz citoplasmática e a integridade de inúmeros constituintes celulares, em função da concentração do soluto, das faixas de temperatura e pH, e de outros fatores, como a hipo ou hipertonicidade, pressão de perfusão, ou mesmo a natureza do material ou sistema biológico, no qual a solução é administrada. Tais aspectos, devem ser considerados, como possíveis causadores de malformação, nos embriões manuseados com solução de Ringer e PBS, que inesperadamente mostraram elevadas frequências totais de alteração da forma.

Os resultados acima podem ter ainda, outras implicações, sendo que as injeções de drogas no interior do saco vitelínico subjacentemente ao embrião, podem ter interferido na função deste anexo. Segundo Chen & Hales (1995), a função do saco vitelínico, neste estágio da organogênese, é crítica para o desenvolvimento normal, mas na sua maior parte, os comprometimentos por disfunção deste anexo embrionário têm sido associados principalmente ao retardamento do crescimento (nanismo) ou malformações ligadas a redução de estruturas.

Devido à importância que o neuroectoderma, o ectoderma epitelial e o saco vitelínico assumem no contexto da organização e modelagem do corpo, infere-se que a

manipulação por meio de fatores químicos, aliada ao componente mecânico deste procedimento, nas regiões da área pelúcida ou mesmo da área vascular, podem estar repercutindo, concorrentemente nos movimentos morfogenéticos embrionários.

Os embriões que apresentam altos índices de alteração da forma, na modalidade de incubação (A), com ovos abertos sugerem, mas não comprovam, que as condições experimentais apropriadas não foram encontradas. Há alguma possibilidade de que isto tenha ocorrido, nos experimentos onde a técnica de abertura dos ovos vinha sendo ainda aperfeiçoada, com utilização de mais de um tipo de instrumento sendo empregado neste procedimento. Todos os experimentos foram realizados por apenas um pesquisador e, tendo sido (A) o primeiro teste realizado, pode ter havido neste caso, influência da performance do operador, com injúrias experimentais não intencionais inculcadas nos resultados concernentes aos embriões em questão.

Utilizando ovos como amostra controle, os quais, similarmente ao teste (A), foram incubados após a realização de apenas uma abertura efetuada na casca, Sim et al. (1995), verificaram que o número de sobreviventes nesta amostra, não superou os 17%, no 11º dia e os 13%, no 18º dia pós-operatório. No presente estudo, o número de mortes no teste (A) foi reduzido, pois não ultrapassou os 6% dos espécimes, implicando em 94,2% de indivíduos viáveis nas 96 horas de incubação, mesmo exibindo o elevado percentual de malformação.

Nos testes que realizaram, Sim et al. (1995) induziram defeitos do tubo neural, em embriões de *Gallus gallus domesticus*, através de incisões cirúrgicas longitudinais de até 4,0mm, realizadas com agulhas no interior da neurocele. Isto permitiu àqueles autores, comparar morfologicamente as lesões reproduzidas pelo modelo experimental com a mieloquise humana e sendo ambas morfologicamente similares, evidenciaram o potencial daquele modo de ação mecânica, em provocar defeitos no sistema nervoso central.

É relevante observar que no presente estudo, os resultados obtidos com a ação mecânica das perfurações - realizadas com agulhas sem injeção de conteúdo (teste a), foram em termos de nível morfogenético, semelhantes aos do controle (i), mas mesmo assim, intermediários entre este e os testes com fatores químicos (figuras 7 e 8). A partir da avaliação dos níveis de morfogênese, os resultados possibilitam admitir que o fator físico quando combinado ao químico, incrementa o nível de comprometimento da integridade dos processos responsáveis pelo estabelecimento da forma embrionária. O teste (a) reforça este argumento pela inexistência do fármaco e ausência do componente de pressão de perfusão, agentes potenciais na alteração do desenvolvimento, tanto do saco vitelínico - no aspecto fisiológico (Chen & Hales, 1995), como dos ectodermas neural, superficial e de outras camadas celulares - no nível morfológico documentado por Souza et al. (1989), Eyal-Giladi (1991), Jacobson, (1993), Schoenwolf, (1994), Christ & Ordhal (1995) e Gumbiner (1996).

Na esfera de todas as possibilidades, acerca dos mecanismos pelos quais, os fatores físicos e químicos utilizados nos testes, interagiram com processos epigenéticos, nenhum dos aspectos relacionados anteriormente deveriam ser excluídos de sua provável participação nos resultados relativos a anormalidades na morfogênese. Todos os estímulos propiciados pelo ambiente, parecem concorrer junto ao genoma, para fazer expressar no tempo adequado, um programa em parâmetros compatíveis com a vida (Lewin, 1994 e Moury & Schoenwolf, 1995). Estruturas alteradas em qualquer nível morfológico, podem ser consideradas padrões de adaptação complexos, e adequadamente interpretados, proporcionam um banco de dados sobre o padrão de morfogênese inicial dos sistemas orgânicos.

Mesmo nos ovos selecionados e manuseados em condições adequadas ao desenvolvimento, as malformações podem ser observadas (figura 3, tabela IV), sendo que a presença de indivíduo do total de ovos intactos (teste i) a apresentar malformação,

mostra que erros da morfogênese devem ser considerados manifestações inerentes ao processo (Gordon, 1985; Seilacher, 1991 e Dias & Müller, 1995).

Em relação ao surgimento de malformação, Moury & Schoenwolf (1995), argumentam que nos embriões de aves, se um movimento relativo à morfogênese é perturbado experimentalmente, mesmo assim o processo de desenvolvimento deve continuar, embora o padrão morfológico normal seja eventualmente comprometido, pois tal como os fatores extrínsecos, também os intrínsecos, não são responsáveis isoladamente, pelo provimento da forma embrionária.

Em relação ao tubo neural, a causa da maioria dos defeitos é desconhecida e evidências sugerem serem eles etiologicamente heterogêneos (Sever, 1995). Pesquisas adicionais necessitam ser dirigidas, entre outros aspectos, para exames anatômicos e embriológicos dos tipos de anormalidades, em relação a uma gama crescente de agentes teratogênicos químicos e físicos, cada vez mais relevantes devido a sua presença no ambiente. Atenção especial deve ser destinada aos mecanismos de fechamento, rotação e flexuras do tubo neural, em relação a diferentes formas de exposição como fator de estudo.

A interação tempo - espaço inerente aos eventos do desenvolvimento, denotam a importância dos níveis de morfogênese considerados no estudo da complexidade e integridade dos processos de estabelecimento da forma, para caracterizar a organização do padrão morfológico dos embriões. Esta metodologia permitiu avaliar, em relação ao tempo a topografia embrionária normal e anormal, relacionando por meio da seqüência de níveis os processos morfogenéticos em diferentes campos, com ênfase no neuroeixo. Isto viabilizou o reconhecimento de padrões de anormalidades e sua vinculação aos fatores do estudo.

Na escala morfológica utilizada, os embriões de *Gallus gallus domesticus* mostraram-se viáveis como modelo, constituindo-se com a morfogênese inicial do sistema nervoso, em um "lay-out" dinâmico do próprio ciclo vital.

5. CONCLUSÃO

O intervalo evidenciado pela média de idade dos embriões após 24h de incubação, mostrou-se compatível com o período de susceptibilidade necessário, para a realização dos tratamentos e a efetivação dos experimentos.

A classificação das diversas categorias morfológicas em 5 níveis de morfogênese, mostrou-se eficiente na comparação dos resultados das modalidades de incubação, sobretudo com médias de nível morfogenético máximo registradas por embrião. Também possibilitou o reconhecimento de padrões de malformação e facilitou a avaliação da forma embrionária, uma vez que no mesmo indivíduo há presença de mais de uma categoria de malformação.

A ausência de fármaco e a inexistência da pressão de perfusão no teste (a), permite admitir que o fator físico quando combinado ao químico, incrementa potencialmente o nível de comprometimento dos processos morfogenéticos.

As médias de nível morfogenético mostraram ser significativas ($p \leq 0,05$) as diferenças entre o teste (a) e o controle (i), em relação aos demais testes, o que implica, ter havido susceptibilidade dos organismos aos fatores físicos e químicos utilizados neste estudo.

Dismorfismos localizados, em regiões ou campos morfogenéticos (3° nível) e dismorfismos generalizados, envolvendo múltiplos campos (4° nível), sendo predominantes sobre os demais níveis morfogenéticos, mostraram que a interferência nos processos, ocorreu no tempo de desenvolvimento imediatamente subsequente aos procedimentos de teste, e que neste período, de 24h de incubação, os destinos das camadas celulares não estão definitivamente determinados.

A identificação do padrão de malformação "sphinx-shaped", permite inferir que as diferentes doses de insulina aplicadas nos 3 testes, não promoveram o crescimento padrão dos organismos, ao contrário, modificaram o ritmo de desenvolvimento e alteraram acentuada e regionalizadamente a forma do corpo e da área vascular do saco vitelínico dos embriões estudados. Isto vincula essa substância ao padrão "sphinx - shaped", confirmando dados da literatura, referentes à teratogenicidade deste agente.

O padrão "fish - shaped", com frequência relativamente maior no teste com PBS, pode ser também relacionado com as duas soluções de Ringer mais concentradas.

Os embriões de *Gallus gallus domesticus* expostos aos agentes físicos e químicos, mostraram-se viáveis como modelo no estudo da morfogênese do sistema nervoso central.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIMAR, C.; DELARUE, M. & VILAIN, C. Cytoplasmatic Regulation of the Duration of Cleavage in Amphibian Eggs. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 64. 1981, 259 - 274.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. & WATSON, J. D. Molecular Biology of the Cell. 3. ed. New York. : Garland, 1994, 1327 p.
- ALMIRANTIS, Y. Left - Right Asymmetry in Vertebrates. BioEssays, 17 (1), 1995, 79 - 83.
- AREY, L. B. Developmental Anatomy. London : Saunders,. 1974, 695 p.
- BALINSKY, B. I. An Introduction to Embryology. 5. ed. London : Saunders, 1981, 768p.
- BANNIGAN, J. G. The Effects of 5 - Bromodeoxyuridene on Fusion of the Cranial Neural Folds in the Mouse Embryo. Teratology, 32, 1985, 29 - 239.
- BATT, R. A. L. Influences on Animal Growth Development. In: Studies in Biology, 116. London : Edward Arnold,. 1980, 61 p.
- BEÇAK, W. & PAULETTE, J. Soluções Salinas. In: Técnicas de Citologia e Histologia. Rio de Janeiro : Ed. Livros Técnicos e Científicos, 1976, I v., 169 - 175.
- BELL, D. J. & FREEMAN, B. M. Physiology and Biochemistry of the Domestic Fow. New York : Academic Press, 1971, v. II, 1151 p.
- BELLAIRS, R. Developmental Processes in Higher Vertebrates., Florida : Ed. University of Miami, 1971, 366 p.

- BELLINGER, D. Teratogen Update: Lead. Teratology, 50, 1994, 367 - 373.
- BERGER, A. J. Bird Study, Systematics. cap. 11. New York : Dover, 1971, 104 p.
- BORTIER, H. & VAKAET, C. A. Fate Mapping the Neural Plate and the Intraembryonic Mesoblast in the Upper Layer of the Chicken Blastoderm, with Xenografting and Time-Lapse Videography. Development, Suppl., 1992, 93 - 97.
- BOWDEN, H. C.; TESH, J. M. & ROSS, F. W. Effects of Female Sex Hormone in Whole Embryo Culture. Toxicology in vitro, 7 (6): 1993, 799 - 802.
- BOWDEN, H. C.; WILBY, O. K.; BOTHAM, C. A.; ADAM, P. J. & ROSS, F. W. Assessment of the Toxic and Potential Teratogenic Effects of Four Glycol and Two Derivatives Using the Hydra Regeneration Assay and Rat Whole Embryo Culture. Toxicology in Vitro, 9 (5), 1995, 773 - 781.
- BOZZOLA, J. J. & RUSSEL, L. D. Electron Microscopy. Boston : Jones and Bartlett, 1992, 542 p.
- BROOK, F. A.; SHUM, ASW; VAN STRAATEN, H. W. M.; & COPP, A. J. Curvature of the Caudal Region is Responsible for Failure of Neural Tube Closure in the Curly Tail (ct) Mouse Embryo. Development, 113, 1991, 671 - 678.
- BROWDER, L. W.; ERICKSON, C. A. & JEFFERY, W. R. 1991. Developmental Biology. 3. ed. Philadelphia : Saunders College, 695 p.
- BROWN, M. C.; HOPKINS, W. G. & KEYNES, R. J. Essentials of Neural Development. 2. ed. Cambridge : Cambridge, 1992, 176 p.
- BURT, D. W.; BUMSTEAD, N.; BITGOOD, J. J.; PONCE DE LEON, F. A. & CRITTENDEN, L. B. Chicken Genome Mapping: A New Era in Avian Genetics. Trends in Genetics, 11 (5), 1995, 190 - 194.
- CATALA, M.; TEILLET, M. A. & LE DOUARIN, N. M. Organization and Development of the Tail Bud Analysed with the Quail - Chick Chimaera System. Mechanisms of Development, 51, 1995, 51 - 65.
- CARLES, D.; ALBERTI, E. M.; SERVILLE, F.; BONDONNY, J. M.; DALLAY, D.; LENG, J. J. & CHATEIL, J. F. Foetus *in fetu* and Acardic Monster: Can the Similar Patterns of these Distinct Malformations Be Explained By a Single Morphogenetic Mechanism? Archives of Anatomy, Cytology and Pathology, 39 (3), 1991, 77 - 82.
- CÉLIO, M. R. & BLÜNCHE, I. Perineuronal Nets - a Specialized Form of Extracellular Matrix in the Adult Nervous System. Brain Research Reviews, 19, 1994, 128 - 145.

- CHAN, B. L.; CHAO, M. V. & SALTIEL, A. R. Nerve Growth Factor Stimulates the Hydrolysis of Glycosylphosphatidyl-Inositol in PC-12 Cell. A Mechanism of Protein Kinase C Regulation. Proceedings of National Academy of Sciences, **86**, 1989, 1756 - 1760.
- CHEATHAM, B. & KAHN, C. R. Insulin Action and the Insulin Signaling Network. Endocrine Reviews, **16** (2), 1995, 117 - 142.
- CHEN, B. & HALES, B. F. Antisense Oligonucleotide Down - Regulation of E - Cadherin in the Yolk Sac and Cranial Neural Tube Malformations. Biology of Reproduction, **53**, 1995, 1229 - 1238.
- CHEN, Y.; DONG, D.; KOSTETSKII & ZILET, M. H. Hensen's Node from Vitamin A - Deficient Quail Embryo Induces Chick Limb Bud Duplication and Retains its Normal Asymmetric Expression of Sonic Hedgehog (Shh). Developmental Biology, **173**, 1996, 256 - 264.
- CHEN, Z. F. & BEHRINGER, R. R. Twist is Required in Head Mesenchyme for Cranial Neural Tube Morphogenesis. Genes and Development, **9**, 1995, 686 - 699.
- CHRIST B. & ORDAHL, C. P. Early Stages of Chick Somite Development. Anatomy and Embryology, **191**, 1995, 381 - 396.
- COLE, W. A. & TRASLER, D. G. Gene - Teratogen Interaction in Insulin - Induced Mouse Exencephaly. Teratology, **22**, 1980, 125 - 139.
- COPP, A. J.; BROOK, F. A. & ROBERTS, H. J. A Cell - Type - Specific Abnormality of Cell Proliferation in Mutant (Curly Tail) Mouse Embryos Developing Spinal Neural Tube Defects. Development, **104**, 1988a, 258 - 295.
- COPP, A.J.; CROLLA, J. A. & BROOK, F. A. Prevention of Spinal Neural Tube Defects in the Mouse Embryo by Growth Retardation During Neurulation. Development, **104** (2), 1988b, 297 - 303.
- COSTA NETO, P. L. O. Estatística. São Paulo : Edgard Blücher, 1977, 265 p.
- DARNELL, D. K. & SCHOENWOLF, G. C. Dorsventral Patterning of the Avian Mesencephalon/Metencephalon: Role of the Notocord and Floor Plate in Suppressing Engrailed-2. Journal of Neurobiology, **26** (1), 1995, 62 - 74.
- DELPHIA, J. M. & ELLIOTT, J. The Effect of High Temperature Incubation up on The Myocardial Glycogen in The Chick Embryo. Journal of Embryology and Experimental Morphology, **14** (3), 1965, 273 - 280.

- DE PABLO, F. & DELAROSA, E. J. The Developing CNS: A Scenario for the Action of Proinsulin, Insulin and Insulin-Like Growth Factors. Trends In Neurosciences, **18** (3), 1995, 143 - 150.
- DE PABLO, F.; ROTH, J.; HERNANDEZ, E. & PRUSS, R. M. Insulin is Present in Chicken Eggs and Early Chick Embryos. Endocrinology, **111** (6), 1982, 1909 - 1916.
- DE PABLO, F.; SCOTT, L. A. & ROTH, J. Insulin and Insulin - Like Growth Factor I in Early Development: Peptides, Receptors and Biological Events. Endocrine Reviews, **11** (4), 1990, 558 - 577.
- DEUCHAR, E. M. The Effect of a High Temperature Shock on Early Morphogenesis in the Chick Embryo. Anatomy, **86**, 1952, 443 - 458.
- DIAS, P. F. Estabelecimento de Metodologias Adequadas ao Acompanhamento do Desenvolvimento Embrionário de *Gallus gallus domesticus*. Trabalho de Conclusão de Curso de Especialização em Biologia do Desenvolvimento. Depto de Biologia - UFSC, 1994.
- DIAS, P. F. & MÜLLER, Y. M. R. Caracterização e Contextualização de Malformações Observadas em Embriões de *Gallus gallus domesticus*. Caderno de Resumos da Xª Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Serra Negra : 1995, p. 373.
- DUBOULE, D. Temporal Colinearity and the Phylotypic Progression: a Basis for the Stability of a Vertebrate Bauplan and the Evolution of Morphologies through Heterochrony. Development, Suppl, 1994, 135 - 142.
- EKBLOM, P. Extracellular Matrix in Animal Development. Role of Extracellular Matrix in Animal Development - An Introduction, Experientia, **5**, 1995, 851 - 852.
- EKKER, S. C.; UNGAR, A. R.; GREENSTEIN, P.; VON KESSLER, D. P.; PORTER, J. A.; MOON, R. T. & BEACHY, P. A. Patterning Activities of Vertebrate Hedgehog Proteins in the Developing Eye and Brain. Current Biology, **5** (8), 1995, 944 - 955.
- EPSTEIN, C. J. The New Dymorphology: Application of Insights from Basic Developmental Biology to the Understanding of Human Birth Defects. Proceedings of National Academy of Sciences, **92**, 1995, 566 - 8573.
- ETO, K.; FIGUEROA, A.; TAMURA, G. & PRATT, R. M. Induction of Cleft in Cultured Rat Embryos by Localized Administration of Tunicamycin Journal of Embryology and Experimental Morphology, **64**, 1981, 1- 9.

- EYAL - GILADI, H. The Early Embryonic Development of the Chick, as an Epigenetic Process. Critical Review of Poultry Biology, 3, 1991, 143 - 166.
- EYAL - GILADI, H.; DEBBY, H. & HAREL, N. The Posterior Section of the Chick Area Pellucida and its Involvement in Hipoblast and Primitive Streak Formation. Development, 116, 1992, 819 - 830.
- EYAL - GILADI, H.; GOLDBERG, M.; REFAEL, H. & AVNER, O. A Direct Approach to the Study of the Effect of Gravity on Axis Formation in Birds. Space Research, 14 (8), 1994, 271 - 279.
- FAISSNER, A.; CLEMENT, A.; LOCHTER, A.; STREIT, A., MANDL, C. & SCHACKNER, M. Isolation of a Neural Chondroitin Sulfate Proteoglycan with Neurite Outgrowth Promoting Properties. The Journal of Cell Biology, 126 (3), 1994, 783 - 799.
- FARESE, R. V.; COOPER, D. C.; KONDA, T. S.; NAIR, G.; STANDAERT, M. L. & POLLET, R. J. Insulin Provokes Co-Ordinated Increases in the Synthesis of Phosphatidylinositol, PI Fosfatos and PI Glycan in BC3H-1 Myocytes. Biochemistry Journal, 256, 1988, 185 - 188.
- FLYNN, M. E.; PIKALOW, A. S.; KIMMELMAN, R. S. & SEARLS, R. L. The Mechanism of Cervical Flexure Formation in the Chick. Anatomy and Embriology, 184, 1991, 411 - 420.
- FOÀ, P. P.; MELLI, M.; BERGER, C. K.; BILLINGER, D. GUIDOTTI, G. G. Action of Insulin on Chick Embryo Heart. Federation Proceedings, 24 (2), 1965, 1046 - 1050.
- FOX, J. A.; SOLIZ, N. M. & SALTIEL, A. R. Purification of a Phosphatidylinositol - Glycan - Specific Phospholipase C from Liver Plasma Membranes: A Possible Target of Insulin Action. Proceedings of National Sciences, 84, 1986, 263 - 2667.
- FREEMAN, W. H. & BRACEGIRDLE, B. An Atlas of Embryology. 3. ed. London : Heinemann,. 1982, 110 p.
- FUGINAGA, M. Rat Whole Embryo Culture System as a Tool to Investigate Developmental Mechanisms of Left/Right Body Axis. Toxicology in Vitro, 9 (5), 1995, 593 - 600.
- GERCHMAN, E.; HILFER, S. R. & BROWN, J. W. Involvement of Extracellular Matrix in the Formation of Inner Ear. Developmental Dynamics, 202, 1995, 421 - 432.
- GILBERT, S. F. Developmental Biology. 4. ed. Massachusets : Sinauer, 1994, 893 p.

- GLOVER, J. C. The Organization of Vestibulo - Ocular and Vestibulospinal Projections in the Chicken Embryo. European Journal of Morphology, 32 (2 - 4), 1994, 193 - 200.
- GOMES, F. P. Curso de Estatística Experimental. 10. ed. São Paulo : Livraria Nobel, 1982, 468 p.
- GOODRUM, G. R. & JACOBSON, A. G. Cephalic Flexure Formation in the Chick Embryo. Journal of Experimental Zoology, 216, 1981, 339 - 408.
- GORDON, R. A Review of the Teories of Vertebrate Neurulation and Their Relationship to the Mechanics of the Neural Tube Birth Defects. Journal of Embriology and Experimental Morphology, 89 Suppl., 1985, 229 - 255.
- GOSPE, S. M.; SAEED, D. B.; ZHOU, S. S. & ZEMAN, F. J. The Effects of High-Dose Toluene on Embryonic Development in the Rat. Pedriatic Research, 36 (6), 1994, 811 - 815.
- GRUMET, M.; FLACEUS, A. & MARGOLIS, R. R. U. Functional Characterization of Chondroitin Sulphate Proteoglycans of Brain: Interaction with Neuron and Neural Cell Adhesion Molecules. The Journal of Cell Biology, 120 (3), 1993, 815 - 824.
- GUMBINER, B. M. Cell Adhesion: The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis. Cell, 84, 1996, 345 - 357.
- HAMBURGER, V. & HAMILTON, H. A Series of Normal Stages in the Development of the Chick Embryo. Journal of Morphology, 88, 1951, 49 - 92.
- HAROLD, F. M. From Morphogenes to Morphogenesis. Microbiology, 141, 1995, 2765 - 2778.
- HARRISON, J. R. Morphogenesis of Chick Embryo *in vitro* After Exposure to Lowered Temperature *in ovo*. Physiological Zoology, 30 (3), 1957, 187 - 197.
- HOEL, P. G. Estatística Elementar. São Paulo : Atlas, 1981, 431 p.
- HOUILLON, C. Sexualidade. São Paulo : Edgard Blücher, 1971, 171 p.
- _____. Embriologia. São Paulo : Edgard Blücher, 1972, 162 p.
- HUETTNER, A. Fundamentals Comparative Embryology of the Vertebrates. New York : Mac Millan, 1949, 309 p.
- ISHIHARA, M.; FEDARKO, N. S. & CONRAD, H. E. Involvement of Phosphatidylinositol and Insulin in the Coordinate Regulation of the Proteoheparan Sulphate Metabolism and Hepatocyte Growth. The Journal of Biological Chemical, 262 (10), 1987, 4708 - 4716.

- JACOBSON, M. Developmental Neurobiology. 3. ed. New York : Plenum, 1993, 782 p.
- JAWORSKI, D. M.; KELLY, G. M. & HOCKFIELD, S. The CNS-Specific Hyaluronan-Binding Protein BEHAB is Expressed in Ventricular Zones Coincident with Gliogenesis. Journal of Neurosciences, 15 (2), 1995, 1352 - 1362.
- KAGE, R.; HERSHEY, A. D.; KRAUSE, J. E.; BOYD, N. D. & LEEMAN, S. E. Characterization of the Substance P (NK - 1) Receptor in Tunicamycin - Treated Transfected Cells Using a Photoaffinity Analogue of Substance P. Journal of Neurochemistry, 64, 1995, 316 - 321.
- KAZUHIRO, E.; FIGUEROA, A.; TAMURA, G. & PRATT, R. M. Induction of Cleft Lip in Cultured Rat Embryos by Localized Administration of Tunicamycin. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 64, 1981, 1 - 9.
- LE DOUARIN, N. M.; HALLONET, M. E.R. & POURQUIÉ, O. Cell Migrations and Establishment of Neuronal Connections in the Developing Brain: a Study Using the Quail - Chick Chimaera System. Progress In Brain Research, 100, 1994, 3 - 18.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. & COX, M. M. Principles of Biochemistry. 2. ed. New York : Worth, 1993, 1103 p.
- LEIST, M. & WENDEL, A. Tunicamycin Potently Inhibits Tumor Necrosis Factor - Induced Hepatocyte Apoptosis. European Journal of Pharmacology, Environmental Toxicology and Pharmacology Section, 292, 1995, 201 - 204.
- LEVIN, J. Estatística Aplicada a Ciências Humanas. 2. ed. São Paulo : Harbra, 1985, 392 p.
- LEWIN, R. Complexidade: A Vida no Limite do Caos. Rio de Janeiro : Rocco, 1994, 248 p.
- LOW, M. G. & SALTIEL, A. R. Structural and Functional Roles of Glycosyl - Phosphatidylinositol in Membranes. Science, 239, 1988, 268 - 275.
- MAGALDI, M. A. Incubacion. In: Produccion de Aves. Argentina : Cathebra, 1974, 259 - 278.
- MÄNNER, J.; SEIDL, W. & STEDING, G. Correlation Between the Embryonic Head Flexures on Cardiac Development. An Experimental Study in Chick Embryo. Anatomy and Embryology, 188, 1993, 269 - 285.
- _____. Formation of Cervical Flexure: An Experimental Study on Chick Embryos. Acta Anatomica, 152, 1995a, 1 - 10.

- _____. The Role of Extracardiac Factors in Normal and Abnormal Development of the Chick Embryo Heart: Cranial Flexure and ventral Thoracic Wall. Anatomy and Embryology, 191, 1995b, 61 - 72.
- MEIER, S. & JACOBSON, A. G. Experimental Studies of the Origin and Expression of Metameric Pattern in the Chick Embryo. Journal of Experimental Zoology, 219, 1982, 217 - 232.
- MENSAH-BROWN, E. P. K. Direct vs. Indirect Effects of Trypan Blue on the Ectodermal Cells of the 11.5-Day Rat Embryo? Acta Anatomica, 151, 1994, 159 - 164.
- MOISEWITSCH, J. R. D. & LAUDER, J. M. Serotonin Regulates Mouse Cranial Neural Crest Migration. Developmental Biology, 92, 1995, 7182 - 7186.
- MONTGOMERY, R.; CONWAY, T. W. & SPECTOR, A. A. Bioquímica, uma abordagem dirigida por casos. 5. ed. São Paulo : Artes Médicas, 1994, 447 p.
- MOURY, J. D. & SCHOENWOLF, G. C. Cooperative Model of Epithelial Shaping and Bending During Avian Neurulation: Autonomous Movements of the Neural Plate, Autonomous Movements of the Epidermis and Interactions in the Neural Plate/Epidermis Transition Zone. Developmental Dynamics, 204, 1995, 323 - 337.
- MURTEIRA, B. J. F. & BLACK, G. H. J. Estatística Descritiva., Lisboa : Mc Graw - Hill, 1983, 286 p.
- NAKAMURA, H.; ITASAKI, N. & MATSUNO, T. Rostrocaudal Polarity Formation of Chick Optic Tectum. International Journal of Developmental Biology, 38, 1994, 281 - 286.
- OLDEN, K.; PRATT, R. M. & YAMADA, K. M. Role of Carbohydrates in Protein Secretion and Turnover: Effects of Tunicamycin on the Major Cell Surface Glycoprotein of Chick Embryo Fibroblasts. Cell, 13, 1978, 461 - 473.
- PADMANABHAN, R. & HAMEED, M. S. Exencephaly and Axial Skeletal Malformations Induced by Maternal Administration of Sodium Valproate in the MF1 Mouse. Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology, 14: 1994, 192 - 205.
- PATTEN, B. M. Early Embryology of the Chick. 4. ed. Philadelphia : Blakiston, 1951, 244 p.
- _____. Gemelos y Monstruos Dobles. In: Embriología Humana. 5. ed. Buenos Aires : Atheneo, 1973, 168 - 206.

- PEDEMONTE, C. H. Inhibition of Na⁺ - Pump Expression by Impairment of Protein Glycosylation is Independent of the Reduced Sodium Entry into the Cell. Journal of membrane Biology, 147, 1995, 223 - 231.
- PENNINGTON, S. N.; SHIBLEY Jr., I. A.; KOOCHEK, K.; GAVIGAN, M. D.; MONAGHAN, J. M.; SANDSTROM, L. P. & MORGAN, J. L. Insulin Signaling in Chick Embryos Exposed to Alcohol. Alcoholism Clinical and Experimental Research, 19 (3), 1995, 701 - 707.
- PRATT, R. M.; YAMADA, K. M.; OLDEN, K.; OHANIAN, S. H. & HASCALL, V. C. Tunicamycin-Induced Alterations in the Synthesis of Sulfated Proteoglycans and Cell Surface Morphology in the Chick Embryo Fibroblast. Experimental Cell Research, 118, 1979, 245 - 252.
- RAFF, R. A. The Molecular Determination of Morphogenesis. Bioscience, 27 (6), 1977, 394 - 401.
- RAHMAN, H.; KENTROTI, S. & VERNADAKIS, A. Neuroblast Cell Death in Ovo and in Culture: Interaction of Ethanol and Neurotrophic Factors. Neuralchemical Research, 19 (12), 1994, 495 - 1502.
- RAUH, Y. M. Aspectos Metodológicos e Histológicos de Medula de Gallus gallus domesticus Cultivadas "in vitro". Dissertação MSc. Rio de Janeiro :Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1976, 60 p.
- RAW, I.; MENUCCI, L. & MIGLIORINI, R. H. Bases Moleculares da Medicina. Diabetes e outras Doenças Endócrinas e de Receptores. São Paulo : Atheneu - EDUSP, 1991, 177 p. V.2
- RENOUX, J. Travaux Pratiques de Biologie Animale (Atlas Photographique de Morphologie et de dissections) L'Embryon de Poulet. Doin, 1971, 171 p.
- REUSCH, J. E.-B.; HSIEH, P.; BHURIPANYO, P.; CAREL, K.; LEITNER, J. W.; OLEFSKY, J. M. & DRAZNIN, B. Insulin Inhibits Nuclear Phosphatase Activity: Requirement for the C - Terminal Domain of the insulin Receptor. Endocrinology, 136 (6) 1995, 2464 - 2469.
- ROMBOLI, I; MORI, B.; SALAMI, A. & FEDELI-AVANZI, C. Storage Condition and Hatchability in Muscovy Duck Eggs. Proceedings and Abstracts. Finnish Branch of the World's Poultry Science Associated, 1984, 218 - 219.
- ROMERO, G.; LUTHELL, L.; ROGOL, A.; ZELLER, K.; HEWLETT, E. & LARNER, J. Phosphatidylinositol - Glycan Anchors of Membrane Proteins: Potential Precursors of Insulin Mediators. Reports, 22, 1988, 509 - 511.

- SALTIEL, A. R. & CUATRECASAS, P. Insulin Stimulates the Generation from Hepatic Plasma Membranes of Modulators Derived from an Inositol Glycolipid. Proceedings of National Academy of Sciences., 83, 1986, 5793 - 5797.
- SCHOENWOLF, G. C. Formation and Patterning of the Avian Neuraxis: One Dozen Hypotheses. Ciba Foundation Symposium, 181, 1994, 25 - 50.
- SCHOENWOLF, G. C. & DESMOND, M. E. Timing and Positioning of Reopening of the Occluded Spinal Neurocele in the Chick Embryo. The Journal of Comparative Neurology, 246, 1986, 459 - 466.
- SCHOENWOLF, G. C. & YUAN, S. Experimental Analyses of the Rearrangement of Ectoderm Cells During Gastrulation and Neurulation in Avian Embryos. Cell and Tissue Research., 280, 1995, 243 - 251.
- SCHORLE, H.; MEIER, P.; BUCHERT, M., JAENISCH, R. & MITCHELL, P. J. Transition Factor AP - 2 Essential for Cranial Closure and Craniofacial Development. Nature, 381, 1996, 235 - 238.
- SCHREIBER, B. D.; HUGHES, M. L. & GROGGER, G. C. Insulin - Like Growth Factor - 1 Stimulates Production of Mesangial Cell Matrix Components. Clinical Nephrology, 43 (6), 1995, 368 - 374.
- SEILACHER, A. Self - Organization Mechanisms in Morphogenesis and Evolution. In: Constrution, Morphology and Evolution. Berlin : Springer-Verlag, 1991, 253 - 271.
- SELLER, M. J. Multi-Site Neural Tube Closure in Humans and Maternal Folate Supplementation. American Journal of Medical Genetics, 58, 1995a, 222 - 224.
- SELLER, M. J. Sex, Neural Tube Defects, and Multisite Closure of the Human Neural Tube. American Journal of Medical Genetics, 58, 1995b, 332 - 336.
- SERBEDZIJA, G. N.; BRONNER-FRASER, M. & FRASER, S. E. A Vital Dye Analysis of the Timing and Pathways of Avian Trunk Neural Crest Cell Migration. Development, 106, 1989, 809 - 816.
- SEVER, L. E. Looking for Causes of Neural Tube Defects: Where does the Environment Fit in? Environmental Health Perspectives. 103 (Suppl 6), 1995, 165 - 171.
- SHIBLEY Jr., I. A. & PENNINGTON, S. N. Signaling Pathways Regulating Ornithine Decarboxylase Activity in the Embryonic Chicken. Biology of Neonate, 67, 1995, 441 - 449.

- SHOSTAK, S. Embryology: an Introduction to Developmental Biology. New York : Harper-Collins, 1991, 778 p.
- SIM, K.-B.; CHO, J. G. & WANG, K.-C. Morphological Study of Surgically induced Open Neural Tube Defect in Old (14 and 21 Days) Chick Embryos. Neuroscience Letters, 192, 1995, 61 - 64.
- SIMON, H.; HORNBRUCH, A & LUMSDEN, A. Independent Assignment of Antero-Posterior and Dorso-Ventral Positional Values in the Developing Chick Hindbrain. Current Biology, 5 (2), 1995, 205 - 214.
- SOUZA, W.; HADDAD, A.; SESSO, A.; SILVEIRA, M.; BARTH, O. M.; MACHADO, R. D. & SOUTO-PADRÓN, T. Manual Sobre Técnicas Básicas em Microscopia Eletrônica. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica. Rio de Janeiro : Luxor, 1989, 106 p. V. I.
- SPAVENTI, R.; ANTICA, M. & PAVELIC, K. Insulin and Insulin - Like Factor I (IGF - I) in Early Mouse Embryogenesis. Development, 108, 1990, 491 - 495.
- STRYER, L. Protein Targeting. In: Biochemistry. 4. ed. London : Freeman, 1995, 911 - 948.
- SZÉKELI, A. D.; BOXER, M. I.; STEWART, M. G. & CSILLAG, A. Connectivity of the Lobus Paraolfactorius of the Domestic Chicken (*Gallus domesticus*): an Anterograde and Retrograde Pathway Tracing Study. The Journal of Comparative Neurology, 348, 1994, 374 - 393.
- TAKAMATSU, T. & FUJITA, S. Growth of Notochord and Formation of Cranial and Mesencephalic Flexures in Chicken Embryo. Developmental Growth and Differentiation, 29(5), 1987, 497 - 502.
- TAKATSUKI, A. & TAMURA, G. Effect of Tunicamycin on the Synthesis of Macromolecules in Culture of Chick Embryo Fibroblasts Infected with Newcastle Disease Virus. Journal of Antibiotics., 24, 1971, 785 - 794.
- TAKATSUKI, A.; KOHNO, K. & TAMURA, G. Inhibition of Biosynthesis of Poly - Isoprenol Sugarsin Chick Embryo Microsomes by Tunicamycin. Agricultural and Biological Chemistry, 39 (10), 1975, 2089 - 2091.
- TESORIERE, G.; VENTO, R.; MORELLO, V.; TOMASINO, R. M.; CARABILLÓ, M. & MAURICELLA, M. Chick Embryo Retina Development in Vitro: The Effect of Insulin. Neurochemical Research, 20 (7), 1995, 803 - 813.

- THESLEFF, I. & PRATT, R. M. Tunicamycin Inhibits Mouse Tooth Morphogenesis and Odontoblast Differentiation in Vitro. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 58, 1980, 195 - 208.
- TRIPLETT, R. L. & MEIER, S. Morphological Analysis of the Development of the Primary Organizer in Avian Embryos. Journal of Experimental Zoology, 220, 1982, 191 - 206.
- TROUSSE, F.; GIESS, M. C.; SOULA, C.; GHANDOUR, S.; DUPRAT, A.-M. & COCHARD, P. Notochord and Floor Plate Stimulate Oligodendrocyte Differentiation in Cultures of the Chick Dorsal Neural Tube. Journal of Neuroscience Research, 41, 1995, 552 - 560.
- VAKAET, L. The Initiation of Gastrular Ingression in the Chick Blastoderm. American Zoology, 24, 1984, 555 - 562.
- VAN STRAATEN, H. W. M.; JASKOLL, T. & ROUSSEAU, A. M. J. Closure and Reopening of the Neural Tube Raphe, Studied in Living Chick Embryos with a High Definition Light Microscope. European Journal of Morphology, 33 (2), 1995, 190.
- VIEIRA, S. & HOFFMAN, R. Estatística Experimental. São Paulo : Atlas, 1989, 179 p.
- VOET, D. & VOET, J. G. Biochemistry. 2. ed. New York : Wiley, 1995, 1376 p.
- WAHL, C. M.; NODEN, D. M. & BAKER, R. Developmental Relations between Sixth Nerve Motor Neuron and their Targets in the Chick Embryo. Developmental Dynamics, 201, 1994, 191 - 202.
- WISCHNITZER, S. Atlas y Guía de Laboratorio de Embriología de Vertebrados. Barcelona : Omega, 1980, 154 p.
- YUAN, S.; DARNELL, D. K. & SCHOENWOLF, G. C. Mesodermal Patterning During Avian Gastrulation: Experimental Induction of Notochord From Non - Notochordal Precursor Cells. Developmental Genetics, 17, 1995, 38 - 54.
- ZHANG, J.; HAGOPIAN - DONALDSON, S.; SERBEDZIJA, G.; ELSEMORE, J.; PLEHN - DUJOWITCH, D.; MC MAHON, A. P.; FLAVEL, R. A. & WILLIAMS, T. Neural Tube Skeletal and body Wall Defects in Mice Lacking Transcription Factor AP - 2. Nature, 381, 1996, 238 - 241.

ANEXOS

MORFOLOGIA EMBRIONÁRIA POR FATOR DE INCUBAÇÃO - II

Modalidade de incubação: ovos abertos													(Concentração: ---)			Simbologia A	
<i>Níveis de Morfogênese:</i>																	
→																	
Σ 25	03	05			13						03			01			
Níveis:	-----1-----	-----2-----	-----3-----								-----4-----			-----5-----			
- Caracterização da Forma -																	
Embrião (n°/data)	Normal	Erro de Rotação	Erro de Flexura *	Assimetria	Tube Neural Fendido	Alteração Óptica **	Dismorfismo Anterior	Dismorfismo Posterior ***	Redução/Ausência do Botão Caudal	Alt. cardíaca	Produção	Natismo (Des. Defas)	Alteração particular F/S	Teratoma	Tempo Injet.		
05-14/8/95	X														20		
a6-14/8/95			X	X		X		X		X					24		
a8-14/8/95				X						X					27		
a2-21/8/95														X	20		
vd3-28/8/95												X			24		
vd4-28/8/95				X		X			X	X					20		
vd3-28/8/95								X							20		
vd4-04/9/95	X														24		
a3-10/9/95									X						26		
a4-10/9/95									X						24		
a3-11/9/95	X										X	X			27		
a4-11/9/95											X	X			24		
8-13/5/96				X			X	X				X			26		
Σ	03		01	04		02	01	03	03	03	01	03		01	23,5 h		
% normal	23%																
Frequências																	
	Parcial		Total														
Estatísticas	Absol.	Relat.	Absol	Relat		Nível	Freq.										
Incubações	08	-	65	12,1		Max	Indiv										
Ovos Incub.	17	100%	308	5,5		01	03										
Ovos n. fert.	03	17,6	47	6,3		02	-										
Perd. manus.	01	5,8	44	2,2		03	06										
Perd. morte	-	-	54	-		04	03										
Embr fixados	13	76,4	163	7,9		05	01										
							13										

Legendas: (*) Inclui alongamentos, constrictões longitudinais do organismo;
(**) Exceto assimetrias;
(***) E/ou redução ou ausência de membros posteriores;
(F) Alteração particular (Padrão) do tipo "Fish-shaped";
(S) Alteração particular (Padrão) do tipo "Sphinx-shaped".

MORFOLOGIA EMBRIONÁRIA POR FATOR DE INCUBAÇÃO - III

Modalidade de incubação: ovos abertos injet. sem polo (Concentração: ---) Simbologia a																	
<i>Níveis de Morfogênese:</i> →																	
Σ 20	07	08	03									02					
Níveis:-----1-----2-----3-----4-----5-----																	
Categorias - Caracterização da Forma -																	
Embrião (nº/data)	Normal	Erro de Rota- ção	Erro de Flexu- ra *	Assi- me- tria	Tubo Neural Fen- dido	Altera- ção Óptica **	Dismor- fismo Anterior	Dismor- fismo Posterior ***	Redução/ Ausência do Botão Caudal	Altera- ção cardi- aca	Produ- ção	Nanis- -mo	Alterção particular F/S	Teratoma	Tempo Injet.		
J-25/3/95	X														22		
K-15/3/95			X				X			X		X			25		
21-31/3/95	X														26		
17-31/3/95		X	X	X					X						27		
A-14/8/95	X														24		
B-13/5/95			X	X											30		
D-13/5/95	X														26		
E-13/5/95	X														20		
G-13/5/95			X	X											24		
I-15/5/95	X														30		
J-13/5/95												X			24		
L-13/5/95	X														30		
Σ	07	01	04	03			01		01	01		02			25,6h.		
% normal	58,3%																
Frequências																	
	Parcial			Total													
Estatísticas	Absol.	Relat.	Absol	Relat		Nível	Freq.										
Incubações	03	-	66	4,5		Max	Indiv										
Ovos Incub.	18	100%	306	5,8		01	07										
Ovos n. fert.	03	16,6	47	6,3		02	02										
Perd. manus.	02	11,1	44	4,5		03	01										
Perd. morte	01	5,5	54	1,8		04	02										
Embr fixados	12	66,6	163	7,3		05	-										
							12										

Legendas: (*) Inclui alongamentos, constrictões longitudinais do organismo;
 (**) Exceto assimetrias;
 (***) E/ou redução ou ausência de membros posteriores;
 (F) Alteração particular (Padrão) do tipo "Fish-shaped";
 (S) Alteração particular (Padrão) do tipo "Sphinx-shaped".

MORFOLOGIA EMBRIONÁRIA POR FATOR DE INCUBAÇÃO - IV

Modalidade de incubação: ovos abertos injet. c/ Ringer (Concentração: Padrão) Simbologia R															
<i>Níveis de Morfogênese:</i>															
→															
Σ 26	03	07				10				06					
Níveis: -----1-----2-----3-----4-----5-----															
- Caracterização da Forma -															
Embrião (nº/data)	Normal	Erro de Rotação	Erro de Flexura *	Assimetria	Tubo Neural Fendido	Alteração Óptica **	Dismorfismo Anterior	Dismorfismo Posterior ***	Redução/Ausência do Botão Caudal	Alteração cardíaca	Produção	Nanismo	Alteração particular F/S	Teratoma	Tempo Injet.
12-07/8/95	X														27
03-07/8/95	X														33
a10-14/8/95		X													24
a18-14/8/95												X			20
a3-21/8/95				X				X		X					20
a4-21/8/95		X					X		X						20
a6-23/8/95	X														21
vd5-04/9/95									X						20
vd6-04/9/95								X		X					24
vd5-28/8/95		X		X			X								21
a6-10/9/95												X			21
a5-11/9/95								X				X			21
a6-11/9/95				X								X			24
H-25/3/96													F		28
L-25/3/96				X								X			26
Σ	03	03		04			02	04	02	02		05	01		23,3h.
% normal	20 %														
Frequências															
Estatísticas	Parcial		Total		Nível	Freq. Indiv									
	Absol.	Relat.	Absol	Relat											
Incubações	09	-	66	13,6	Max										
Ovos Incub.	20	100%	308	6,4	01	03									
Ovos n. fert.	04	20,0	47	8,5	02	-									
Perd. manus.	-	11,1	44	-	03	06									
Perd. morte	01	5,0	54	1,8	04	06									
Embr fixados	15	75,0	163	9,2	05	-									
						15									

Legendas: (*) Inclui alongamentos, constrictões longitudinais do organismo;
 (**) Exceto assimetrias;
 (***) E/ou redução ou ausência de membros posteriores;
 (F) Alteração particular (Padrão) do tipo "Fish-shaped";
 (S) Alteração particular (Padrão) do tipo "Sphinx-shaped".

MORFOLOGIA EMBRIONÁRIA POR FATOR DE INCUBAÇÃO - V

Modalidade de incubação: ovos abertos injet. e/ Ringer (Concentração: 25%) Simbologia R ₁															
<i>Níveis de Morfogênese:</i>															
→															
Σ 35	04	10	13	07	01										
Níveis:-----1-----2-----3-----4-----5-----															
- Caracterização da Forma -															
Embrião (nº/data)	Normal	Erro de Rotação	Erro de Flexura *	Assimetria	Tube Neural Fenido	Alteração Óptica **	Dismorfismo Anterior	Dismorfismo Posterior ***	Redução/Ausência do Botão Caudal	Alteração cardíaca	Produção	Nanis-mo	Alteração particular F/S	Teratoma (Duplicidade) D	Tempo Injet.
10-24/3/96														D	20
11-24/3/96	X														22
2-31/3/96								X				X			26
3-31/3/96				X									F		26
6-31/3/96			X	X						X		X			30
7-31/3/96										X		X			22
1-07/4/96	X														20
2-07/4/96	X														20
6-07/4/96	X														20
1-14/4/96			X				X	X		X		X			20
2-14/4/96			X	X	X	X		X							30
3-14/4/96			X	X	X										30
4-11/9/95							X	X		X		X			24
5-14/4/96			X	X								X			27
Σ	04		05	05	02	01	02	04		04		06	01	01	24,0h.
% normal	28,5%														
Frequências															
	Parcial		Total												
Estatísticas	Absol.	Relat.	Absol	Relat	Nível	Freq.									
Incubações	04	-	66	6,0	Max	Indiv									
Ovos Incub.	23	100%	308	7,46	01	04									
Ovos n. fert.	04	17,3	47	8,5	02	-									
Perd. manus.	03	13,0	44	6,8	03	02									
Perd. morte	02	8,6	54	6,8	04	07									
Embr fixados	14	60,8	163	8,5	05	01									

Legendas: (*) Inclui alongamentos, contrações longitudinais do organismo;
 (**) Exceto assimetrias;
 (***) E/ou redução ou ausência de membros posteriores;
 (F) Alteração particular (Padrão) do tipo "Fish-shaped";
 (S) Alteração particular (Padrão) do tipo "Sphinx-shaped".

MORFOLOGIA EMBRIONÁRIA POR FATOR DE INCUBAÇÃO - VI

Modalidade de incubação: ovos abertos injet. c/ Ringer (Concentração: 6,25%) Simbologia R ₂															
Níveis de Morfogênese:															
→															
Σ 29	04	08	08	08	07	02									
Níveis:-----1-----2-----3-----4-----5-----															
- Caracterização da Forma -															
Embrião (nº/data)	Normal	Erro de Rotação	Erro de Flexura *	Assimetria	Tubo Neural Fendido	Alteração Óptica **	Dismorfismo Anterior	Dismorfismo Posterior ***	Redução/Ausência do Botão Caudal	Alteração cardíaca	Produção	Nanismo	Alteração particular F/S	Teratoma	Tempo Injet.
19-31/3/96													S		28
20-31/3/96	X														33
1-08/4/96			X	X	X							X			26
2-08/4/96	X														26
3-08/4/96			X	X	X										26
6-08/4/96												X			37
G-15/4/96			X	X					X			X			26
H-15/4/96	X														37
K-15/4/96	X														27
L-15/4/96				X						X					48
3-21/4/96													S		25
4-21/4/96							X	X				X			26
5-21/4/96			X				X	X							24
6-21/4/96														X	20
7-21/4/96													S		20
8-21/4/96														X	21
Σ	04		04	04	02		02	02	01	01		04	03	02	28,1h
% Normais	25%														
Frequências															
	Parcial		Total												
Estatísticas	Absol.	Relat.	Absol	Relat		Nível	Freq.								
Incubações	04	-	66	6,0		Max	Indiv								
Ovos Incub.	22	100%	308	7,1		01	04								
Ovos n. fert.	-	-	47	-		02	-								
Perd. manus.	06	27,2	44	13,6		03	03								
Perd. morte	-	-	54			04	07								
Embr fixados	16	72,7	163	9,8		05	02								
							16								

Legendas: (*) Inclui alongamentos, constrictões longitudinais do organismo;

(**) Exceto assimetrias;

(***) E/ou redução ou ausência de membros posteriores;

(F) Alteração particular (Padrão) do tipo "Fish-shaped";

(S) Alteração particular (Padrão) do tipo "Sphinx-shaped".

MORFOLOGIA EMBRIONÁRIA POR FATOR DE INCUBAÇÃO - VII

Modalidade de incubação: ovos abertos injet. c/ Insulina (Concentração: 0,5 U) Simbologia I																	
<i>Níveis de Morfogênese:</i>																	
→																	
Σ 17						04						12					1
Níveis:	1	2	3	4	5												
Categorias - Caracterização da Forma -																	
Tempo Injet.	Normal	Erro de Rotação	Erro de Flexura *	Assimetria	Tube Neural Fendido	Alteração Óptica **	Dismorfismo Anterior	Dismorfismo Posterior ***	Redução/Ausência do Botão Caudal	Alteração cardíaca	Produção	Nanis-mo	Alteração particular F/S	Teratoma			
24													S				
21								X					S				
20														X			
24													S				
24													S				
21													S				
29													S				
24								X					S				
24					X												
24													S				
21													S				
24								X					S				
20													S				
25													S				
23,2h.					01			03					12	01			
	0%																
Frequências																	
	Parcial		Total														
Estatísticas	Absol.	Relat.	Absol	Relat	Nível	Freq.											
Incubações	08	-	66	121	Max	Indiv											
Ovos Incub.	24	100%	308	77	01	-											
Ovos n. fert.	04	16,6	47	8,5	02	-											
Perd. manus.	06	25,0	44	13,6	03	01											
Perd. morte	-	-	54		04	12											
Embr fixados	14	58,3	163	8,5	05	01											
						14											

Legendas: (*) Inclui alongamentos, constrictões longitudinais do organismo;
 (**) Exceto assimetrias;
 (***) E/ou redução ou ausência de membros posteriores;
 (F) Alteração particular (Padrão) do tipo "Fish-shaped";
 (S) Alteração particular (Padrão) do tipo "Sphinx-shaped".

MORFOLOGIA EMBRIONÁRIA POR FATOR DE INCUBAÇÃO - VIII

Modalidade de incubação: ovos abertos injet. c/ Insulina (Concentração: 0,125 U) Simbologia I₁															
<i>Níveis de Morfogênese:</i>															
→															
Σ 25	05		07		12		01								
Níveis: -----1-----	-----2-----		-----3-----		-----4-----		-----5-----								
Categorias - Caracterização da Forma -															
Embrião (nº/data)	Normal	Erro de Rotação	Erro de Flexura *	Assimetria	Tubo Neural Fenido	Alteração Óptica **	Dismorfismo Anterior	Dismorfismo Posterior ***	Redução/Ausência do Botão Caudal	Alteração cardíaca	Produção	Nanismo	Alteração particular F/S	Teratoma	Tempo Injet.
A-23/3/96												X			26
B-25/3/96													S		24
C-25/3/96													S		23
II-27/3/96				X						X			F		29
10-31/3/96												X			26
14-31/3/96				X								X			30
15-31/3/96				X					X				S		22
16-31/3/96							X						S		30
7-07/4/96			X				X	X				X			20
8-07/4/96														X	20
9-07/4/96													S		23
10-07/4/96				X	X			X				X			20
11-07/4/95												X			26
Σ			01	04	01		02	02	01	01		06	06	01	24,5h.
% Normais	0%														
Frequências															
	Parcial		Total												
Estatísticas	Absol.	Relat.	Absol.	Relat.	Nível	Freq.									
Incubações	04	-	66	6,0	Max	Indiv									
Ovos Incub.	19	100%	308	6,1	01	-									
Ovos n. fert.	-	-	47	-	02	-									
Perd. manus.	04	21,0	44	9,0	03	-									
Perd. morte	02	10,5	54	3,7	04	12									
Embr fixados	13	68,4	163	7,9	05	01									
						13									

Legendas: (*) Inclui alongamentos, constrictões longitudinais do organismo;
 (**) Exceto assimetrias;
 (***) E/ou redução ou ausência de membros posteriores;
 (F) Alteração particular (Padrão) do tipo "Fish-shaped";
 (S) Alteração particular (Padrão) do tipo "Sphinx-shaped".

MORFOLOGIA EMBRIONÁRIA POR FATOR DE INCUBAÇÃO - IX

Modalidade de incubação: ovos abertos injet. c/ Insulina (Concentração: 0,031 U) Simbologia I₂															
<i>Níveis de Morfogênese:</i>															
→															
Σ 24	04	08	10	02											
Níveis:-----1-----	-----2-----	-----3-----	-----4-----	-----5-----											
- Caracterização da Forma -															
Embrião (nº/data)	Normal	Erro de Rotação	Erro de Flexura *	Assimetria	Tubo Neural Fendido	Alteração Óptica **	Dismorfismo Anterior	Dismorfismo Posterior ***	Redução/Ausência do Botão Caudal	Alteração cardíaca	Produção	Nanismo	Alteração particular F/S	Teratoma (Duplicidade) D	Tempo Injet.
22-31/3/96												X			33
24-31/3/96													S		26
7-08/4/96					X							X			26
9-08/4/96				X								X			20
10-08/4/96										X		X			37
11-08/4/96			X				X	X							37
12-08/4/96				X					X						26
9-14/4/96													S		29
10-14/4/96														D	29
11-14/4/96													S		27
12-14/4/96												X			30
B-14/4/96					X		X	X				X			30
C-15/4/96													S		30
9-21/4/96			X									X			29
12-21/4/96														X	26
Σ			02	02	02		02	02	01	01		06	04	02	29,0h.
% normal	0%														
Frequências															
	Parcial		Total												
Estatísticas	Absol.	Relat.	Absol	Relat		Nível	Freq.								
Incubações	05	-	66	7,5		Max	Indiv								
Ovos Incub.	22	100%	308	7,1		01	-								
Ovos n. fert.	05	22,7	47	10,6		02	01								
Perd. manus.	02	9,0	44	4,5		03	02								
Perd. morte	-	-	54	-		04	10								
Embr fixados	15	68,1	163	9,2		05	02								
							15								

Legendas: (*) Inclui alongamentos, constrictões longitudinais do organismo;
(**) Exceto assimetrias;
(***) E/ou redução ou ausência de membros posteriores;
(F) Alteração particular (Padrão) do tipo "Fish-shaped";
(S) Alteração particular (Padrão) do tipo "Sphinx-shaped".

MORFOLOGIA EMBRIONÁRIA POR FATOR DE INCUBAÇÃO - X

Modalidade de incubação: ovos abertos injet. c/ PBS (Concentração: 10 mM) Simbologia P																
<i>Níveis de Morfogênese:</i>																
Σ 35	01	07	14	13												
Níveis:	1	2	3	4	5											
- Caracterização da Forma -																
Embrião (nº/data)	Normal	Erro de Rotação	Erro de Flexura *	Assimetria	Tubo Neural Fendido	Alteração Óptica **	Dismorfismo Anterior	Dismorfismo Posterior ***	Redução/Ausência do Botão Caudal	Alteração cardíaca	Produção	Nanismo	Alteração particular F/S	Teratoma	Tempo Injet.	
2-12/2/96													S		20	
4-12/2/96													F		20	
3-19/2/96					X								F		20	
4-19/2/96							X			X					20	
8-19/2/96				X				X				X			27	
10-19/2/96													S		27	
1-25/2/96													S		20	
6-25/2/96									X			X			20	
C-04/3/96													F		30	
E-04/3/96	X														30	
9-17/3/96				X						X	X	X			30	
10-17/3/96					X		X			X		X			20	
11-17/3/96			X							X		X			24	
14-17/3/96		X		X	X				X			X			37	
13-17/3/96				X											26	
17-17/3/96				X			X					X			37	
Σ	01	01	01	05	03		03	01	02	04	01	07	06		25,5h.	
% normal	6,2%												3S:3F			
Frequências																
Estatísticas	Parcial		Total		Nível	Freq. Indiv										
	Absol.	Relat.	Absol.	Relat.												
Incubações	06	-	66	9,0	Max											
Ovos Incub.	36	100%	308	11,6	01	01										
Ovos n. fert.	08	22,2	47	17,0	02	01										
Perd. manus.	07	19,4	44	15,9	03	01										
Perd. morte	05	13,8	54	9,2	04	13										
Embr fixados	16	44,4	163	9,8	05	-										
						16										

Legendas: (*) Inclui alongamentos, constrictões longitudinais do organismo;
 (**) Exceto assimetrias;
 (***) E/ou redução ou ausência de membros posteriores;
 (F) Alteração particular (Padrão) do tipo "Fish-shaped";
 (S) Alteração particular (Padrão) do tipo "Sphinx-shaped".

