

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

**AÇÃO DE FATORES FÍSICOS E QUÍMICOS SOBRE O
PADRÃO DA ATIVIDADE NEUROMUSCULAR EM
EMBRIÕES DE *Gallus domesticus***

SILVIO LUIZ INDRUSIAK WEISS

FLORIANÓPOLIS, MARÇO DE 1999.

*Aos meus filhos Lucas, Luiza e Júlia,
por me mostrarem o verdadeiro amor.*

*Aos meus pais Léa e Juarez e
aos irmãos queridos.*

*À Mônica, amiga e companheira,
que sempre me incentivou ao estudo e
a realização pessoal.*

Agradecimentos

*À Professora Yara, pela orientação,
mas também por sua grande sabedoria e paciência;
Ao amigo Dário Berger,
atual Prefeito Municipal de São José,
pelo incentivo de todas as horas;
Ao Prof. Paulo Fernando Dias, companheiro atuante
nos momentos principais desta pesquisa;
Aos amigos do laboratório,
sempre constantes e dedicados;
À Empresa Frangos Macedo, pelo fornecimento
do material de estudo;
Ao Prof. Guerra, pelo material bibliográfico
e informações valiosas;
À Prof^ª Marta, pela contribuição com a serotonina;
Ao Curso de Pós-graduação em Neurociências,
através dos professores e funcionários,
pelo convívio e aprendizado;
Aos funcionários e amigos da Prefeitura Municipal
e da Fundação Municipal de Esportes de São José, pelo apoio;
Aos amigos especiais,
que ficaram no anonimato, mas que muito
contribuíram durante toda esta jornada.*

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Tipos de movimento em feto humano de 14 semanas por registro em actograma durante 60 minutos (Modificado de Prechtl, citado por Carlson, 1996).....	09
Figura 2 - Padrão em relação a frequência média de movimentos por minuto e por dia de incubação no embrião de galinha (adaptado de Bekoff, 1981).....	10
Figura 3 - Abertura da janela na casca, mostrando a localização do embrião de <i>Gallus domesticus</i> , a membrana cório-alantóica e outros componentes do ovo (adaptado de Houillon, 1972).....	25
Figura 4 - Suporte plástico e capa para acondicionamento e proteção do ovo após a abertura	26
Figura 5 - Local das injeções realizadas no âmnio (a), no alantóide (b) e na membrana cório-alantóica (c) do ovo de <i>Gallus domesticus</i> (adaptado de Arey, 1974).....	27
Figura 6 - Referência ao padrão da posição inicial do embrião de <i>Gallus domesticus</i> no período de E3 a E10 (adaptado de Houillon, 1972)	28
Figura 7 - Nome, simbologia e representação de movimentos corpóreos de alavanca peduncular (AP), bico (B), cabeça (C) e céfalo-caudal (CC) do embrião de <i>Gallus domesticus</i>	32
Figura 8 - Nome, simbologia e representação de movimentos corpóreos de extensão (Ex), extremidade inferior (EI), membro inferior (MI) e membro superior (MS) do embrião de <i>Gallus domesticus</i>	33
Figura 9 - Embriões de <i>Gallus domesticus</i> representando os padrões característicos da morfologia do 3º ao 10º dia embrionário (adaptado de Hamburger & Hamilton, 1992)	37
Figura 10 - Embrião de <i>Gallus domesticus</i> no 6º dia de incubação, com morfologia atrasada; grupo 3	41
Figura 11 - Embrião de <i>Gallus domesticus</i> no 6º dia de incubação, com morfologia adiantada; grupo 5	41

Figura 12 – Posição inicial do embrião de <i>Gallus domesticus</i> , de E3 a E10, nos grupos de G2 a G8	42
Figura 13 - Posição alterada de embrião de <i>Gallus domesticus</i> , em E5.....	43
Figura 14 - Manifestação de MGI, MAx e MSg no desenvolvimento embrionário de <i>Gallus domesticus</i> do grupo 2, de E4 até E10	45
Figura 15 - Tempo médio de movimentação durante a vida embrionária de <i>Gallus domesticus</i> de E4 até E10	47
Figura 16 – Representação do movimento de alavanca peduncular, na seqüência A, B e C, de embrião de <i>Gallus domesticus</i> , no 6º dia de incubação	50
Figura 17 - Manifestação dos padrões de movimentos em embriões de <i>Gallus domesticus</i> , de E4 a E10, nos grupos 3 e 5	64
Figura 18 - Percentuais médios de tempo de movimentação durante a vida embrionária de <i>Gallus domesticus</i> até E10 em G3 e G5.....	65
Figura 19 - Distribuição do tempo efetivo de movimento nos embriões do G3 (temperatura baixa) e G5 (temperatura alta)	66
Figura 20 - Manifestação de padrões de movimentos de embriões de <i>Gallus domesticus</i> , de E4 a E10, nos grupos 7 e 8 ...	74
Figura 21 - Percentuais médios de tempo de movimentação de <i>Gallus domesticus</i> de E4 até E10, nos grupos 7 e 8.....	75
Figura 22 - Distribuição do tempo efetivo de movimento nos embriões do G7 (Salina) e G8 (Serotonina – 5-HT).	76
Figura 23 – Curva de distribuição das médias de Tempo Efetivo de Movimento nos embriões do grupo 7 tratados com salina.	77
Figura 24 - Curva de distribuição das médias de Tempo Efetivo de Movimento nos embriões do grupo 8 tratados com serotonina (5-HT).	77
Figura 25 - Distribuição do tempo efetivo de movimento (TEM) nos embriões em cada grupo experimental.	79

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela I - Modalidades de incubação e variáveis de estudo nos grupos G1 a G8, para análise da morfologia e movimentos corpóreos do embrião de <i>Gallus domesticus</i> no período de E3 a E10	24
Tabela II - Volumes de solução salina e serotonina injetados nos embriões de <i>Gallus domesticus</i> do 3º ao 10º dia embrionário	27
Tabela III - Nome, simbologia e descrição de padrões motores do embrião de <i>Gallus domesticus</i> durante o desenvolvimento da atividade neuromuscular de E3 a E10	31
Tabela IV - Características morfológicas do embrião de <i>Gallus domesticus</i> no período do 3º ao 10º dia embrionário.....	35
Tabela V - Percentagem média de embriões de <i>Gallus domesticus</i> em relação ao desenvolvimento morfológico, por grupo de incubação	39
Tabela VI - Média (m) de peso corporal (g) de embrião de <i>Gallus domesticus</i> do 3º ao 10º dia, por grupo de incubação.....	40
Tabela VII - Média (m) do comprimento céfalo-caudal (mm) de embrião de <i>Gallus domesticus</i> do 3º ao 10º dia, por grupo de incubação.....	40
Tabela VIII - Frequência e percentagens dos padrões de movimentos do embrião de <i>Gallus domesticus</i> de E4 a E8, no grupo 2	44
Tabela IX - TEM total, TEM por minuto, movimentos por minuto (MP/M) e duração média de cada movimento (DMM) em embriões de <i>Gallus domesticus</i> de E4 a E10, no grupo 2	46
Tabela X - Intensidade dos movimentos em embriões de <i>Gallus domesticus</i> de E4 a E10 no grupo 2	48
Tabela XI - Frequência e percentagens dos padrões de movimentos do embriões de <i>Gallus domesticus</i> de E5 a E9, no grupo 3	57

Tabela XII - TEM total, TEM por minuto, movimentos por minuto (MP/M) e duração média de cada movimento (DMM) nos embriões de <i>Gallus domesticus</i> de E5 a E10, no grupo 3	59
Tabela XIII - Intensidade dos movimentos em embriões de <i>Gallus domesticus</i> de E5 a E10 no grupo 3	59
Tabela XIV - Frequência e percentagens dos padrões de movimentos do embrião de <i>Gallus domesticus</i> de E4 a E8, no grupo 5	61
Tabela XV - TEM total, TEM por minuto, movimentos por minuto (MP/M) e duração média de cada movimento (DMM) nos embriões de <i>Gallus domesticus</i> de E4 a E10, no grupo 5	62
Tabela XVI - Intensidade dos movimentos em embriões de <i>Gallus domesticus</i> de E4 a E10, no grupo 5	63
Tabela XVII - Frequência e percentagens dos movimentos de embriões de <i>Gallus domesticus</i> de E4 a E8, no grupo 7	68
Tabela XVIII - TEM total, TEM por minuto, movimentos por minuto (MP/M) e duração média de cada movimento (DMM) em embriões de <i>Gallus domesticus</i> de E4 a E10, no grupo 7	69
Tabela XIX - Intensidade dos movimentos em embriões de <i>Gallus domesticus</i> de E4 a E10, no grupo 7	70
Tabela XX - Frequência e percentagens dos movimentos corpóreos nos embriões de <i>Gallus domesticus</i> de E4 a E7, no grupo 8	71
Tabela XXI - TEM total, TEM por minuto, movimentos por minuto (MP/M) e duração média de cada movimento (DMM) nos embriões de <i>Gallus domesticus</i> de E4 até E10, no grupo 8	72
Tabela XXII - Intensidade dos movimentos em embriões de <i>Gallus domesticus</i> de E4 a E10, no grupo 8	73

LISTA DE ABREVIATURAS

a -	alantóide
E -	dia embrionário
fca -	flexura caudal
fc -	flexura cervical
fd -	flexura dorsal
m -	mesencéfalo
ma -	membro anterior
mp -	membro posterior
p -	pescoço
SN -	sistema nervoso
vo -	vesícula ótica

RESUMO

Com o objetivo de avaliar os movimentos corpóreos durante o desenvolvimento da atividade neuromuscular em embriões de *Gallus domesticus*, investigando possíveis alterações pela ação de fatores físicos e químicos, acompanhou-se o desenvolvimento do 3º ao 10º dia embrionário (E) em 8 modalidades de incubação, sendo 1 grupo para determinar padrão de movimento (37,5°C), 4 grupos para os fatores de temperatura baixa (35°-36°C), alta (39°-40°C), injeção de salina e serotonina e 3 grupos para controle da morfologia nessas temperaturas. Os ovos controle ficaram intactos na estufa até o dia de abertura, enquanto os demais foram abertos em E2-E3, na posição horizontal, utilizando a técnica da janela lateral (3x3cm), e recolocados na estufa para observação posterior. A injeção de salina e serotonina (0,003M) foi aplicada na membrana interna do ovo, em volumes de 50-500µl, entre 15 e 60 minutos antes da análise. A observação do embrião foi realizada em sessão de 10 minutos, registrando o tipo, frequência, tempo e intensidade dos movimentos corpóreos, em fichas individuais e em vídeo (sistema VHS). Em geral, a análise da morfologia nos embriões incubados em temperatura normal revelou uma adequação entre a idade estrutural e de incubação, enquanto na temperatura baixa e alta os embriões apresentaram morfologia inferior e superior ao padrão. Foi possível identificar, no embrião normal de E4 até E10, 8 padrões motores característicos com diversas adaptações nas variáveis estudadas em cada idade e um aumento progressivo da atividade neuromuscular embrionária. Nos embriões em que a temperatura de incubação foi abaixo e acima do normal observou-se um retardamento e uma aceleração geral na manifestação dos padrões motores e de suas variáveis. A salina não demonstrou afetar os padrões motores embrionários nesse período, enquanto a serotonina provocou alterações marcantes nas características de movimentação em todas as idades, na manifestação dos padrões motores, no aumento da frequência e dos tempos de movimento, na diminuição da intensidade dos movimentos. As estruturas internas do ovo e a posição do embrião exerceram influência na execução dos padrões motores em todas as modalidades experimentais. A atividade neuromuscular do embrião, manifestando-se através dos movimentos corpóreos, representou o resultado de inúmeras interações entre fatores intrínsecos e extrínsecos durante o desenvolvimento.

ABSTRACT

With the goal of evaluating the body movements during the development of retromuscular activity in embryos of *Gallus domesticus*, investigating possible changes caused by the action of physical and chemical factors, it was accompanied the development since the third until the tenth embryonic day (called 'E') in eight incubation modalities. In one control-group it was supposed to have determined movement pattern (37,5°C); four groups for the lower temperature factor (35-36°C) and higher ones (39-40°C) and saline and serotonin injection. Also, three groups were used to control the morphology in those temperatures. The control-eggs became intact into the stove until the day of the egg opening, awhile the other ones were open in E2-E3, at the horizontal position, using the "lateral window" technique (3x3cm) and they where put back into the stove for posterior observation. The injection of salin and serotonin (0,003M) was applied in the internal membrane of the egg, on contents of 50-500µl between 15 and 60 minutes before the analysis. Embryo's observation was performed in a session of 10 minutes to each one. It was recorded the type, the frequency, the time and the intensity of the body movements in individual records and in video (VHS system). In general, the morphology analysis in the embryos wich were incubated in normal temperature showed an adaptation between structural age and incubation age, awhile lower and higher temepatures made the embryos able to present lower and higher morphology in relation to the pattern. In the commom embryo (from E4 until E10) ir was possible to identify 8 motor patterns characteristic with several adaptations in the variable wich were studied in each age and also a progressive increase of the embryonic neuromuscular activity. In the embryos whose incubation temperature was below and above the normal, it was observed a retardation and a general acceleration over the expression of the motor patterns and their variables. The saline didn't affect the embryonic motor patterns in the studied period, but the serotonin made amazing changes in the movement features all over the ages, in the expression of the motor patterns, in the frequency increase, in the movements time increase, in the decrease of movements intensity. The internal structures of the egg and the embryo's position practised influency in the performance of the motor patterns in every experiment modalities. The embryo's neuromuscular activity which was showed through the body movements represented the result of many interations among intrinsic and extrinsic factors through the development.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
SUMÁRIO	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo Geral	21
2.2. Objetivos Específicos	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Material de Estudo	22
3.2. Procedimentos	23
3.2.1. Amostragem dos ovos	23
3.2.2. Procedimento de abertura dos ovos e injeção	24
3.2.3. Análise e registro dos movimentos corpóreos do embrião	28
3.2.4. Análise de características morfológicas do embrião	34
3.2.5. Análise biométrica dos embriões	35
3.2.6. Análise descritiva e inferencial dos resultados	36
4. RESULTADOS	38
4.1. Análise das características morfológicas dos embriões de G1 a G8	38
4.2. Análise biométrica dos embriões	39
4.3. Posição inicial do embrião	42
4.4. Descrição dos movimentos corpóreos do embrião	44
4.4.1. Padrões de movimentos corpóreos no embrião do G2	44
4.4.2. Movimentos corpóreos do embrião sob a ação de fatores físicos	56
4.4.3. Movimentos corpóreos do embrião sob a ação de fatores químicos	67

4.4.4. Comparação na distribuição das médias de Tempo Efetivo de Movimento em todos os grupos experimentais	76
5. DISCUSSÃO	80
CONSIDERAÇÕES FINAIS	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do sistema nervoso em vertebrados é desencadeado de forma ordenada por complexas estratégias biológicas, a nível morfológico, celular e molecular, respeitando padrões de espaço e tempo (Guthrie, 1991; Schoenwolf, 1994).

No embrião, após terminado o período de intensas divisões que caracterizam a clivagem, as células organizam-se em três camadas germinativas, sobrepostas, que darão origem à diversidade celular do organismo. Ao término da gastrulação, o ectoderma dorsal diferencia-se, dando início ao processo de neurulação (Cooke, 1985; Gilbert, 1994), considerado um evento multifatorial complexo, que envolve diferentes tipos de interação celular, tanto na placa neural, como em tecidos adjacentes a ela (Schoenwolf, 1994).

Processos indutivos entre grupos de células embrionárias atuam na formação da placa e do tubo neural, na coordenação dos movimentos morfogenéticos da neurogênese e na padronização regional durante a formação do neuroeixo (Glover, 1991; Guthrie, 1991). Estas interações célula-célula podem induzir modificações na função de determinado grupo celular ou suprimir algumas potencialidades de diferenciação (Smith & Schoenwolf, 1997; Bhat, 1998).

Estudos relacionados ao desenvolvimento do sistema nervoso em vertebrados têm demonstrado a presença de padrões definidos de regionalização e organização espacial das estruturas neurais (Puelles & Rubenstein, 1993; Altaba, 1994; Ang, 1996; Goetz, 1998). A segmentação do sistema nervoso central, com a existência de neurômeros nas vesículas cerebrais e a organização dos neurônios do sistema nervoso periférico procedentes da crista neural, revelam a presença de

mecanismos referentes a ação molecular de genes posicionais, bem como a localização anatômica de certas estruturas morfológicas (Le Douarin et al., 1981; Keynes & Stern, 1984; Lumsden, 1990; Guthrie, 1995; Christ et al., 1998).

De acordo com Brown et al. (1991), o processo de determinação e diferenciação fenotípica das células nervosas e gliais do sistema nervoso é regulado por ação indutiva ou determinativa, sendo que em vertebrados ela é do tipo indutiva (Jacobson, 1993).

Considerando a ação de mecanismos epigenéticos sobre o desenvolvimento do sistema nervoso, tem sido discutido a abrangência de conceitos como, células neurais-tronco (Lumsden, 1989; Svendsen & Rosser, 1995; Doe et al., 1998), quimiotropismo e orientação axonal (Lander, 1989; Tessier-Lavigne & Placzek, 1991), fatores neurotróficos (Bartheld, 1998; Ibáñez, 1998), morte neuronal (Oppenheim, 1989; Sherrard & Bower, 1998), assim como mecanismos biológicos relativos a plasticidade do sistema nervoso (Thomson, 1990; Annunziato, 1994; Abraham & Bear, 1996).

Durante a maturação do sistema nervoso, para o estabelecimento das conexões neuronais com tecidos neurais e não-neurais, tem sido demonstrado a existência de uma complexa interação multifatorial para a efetivação deste processo (Purves & Lichtman, 1983; Landmesser, 1984; Jacobson, 1993). O crescimento do axônio é orientado por intermédio de sinalização molecular específica do órgão para o qual se destina (Tessier-Lavigne & Placzek, 1991) e por outros componentes da superfície da célula, responsáveis pelo mecanismo de reconhecimento celular (Edelman, 1987; Reese & Drapeau, 1998). Após o axônio atingir as proximidades do “órgão-alvo”, ocorrem interações elétricas e químicas entre ambos, até o reconhecimento definitivo e o estabelecimento de sinapses duradouras (Harris, 1981; Brown et al., 1991; Reese & Drapeau, 1998).

Estudos sobre os mecanismos envolvidos na formação das conexões sinápticas demonstram que tanto a estrutura pré-sináptica (Sherrard & Bower, 1998), quanto a pós-sináptica (Plunkett et al., 1998), possuem funções determinantes na

definição fenotípica do neurônio e do tecido-alvo, bem como no padrão funcional da sinapse. Ramificações dendríticas de vários tipos neuronais formam-se e diferenciam-se em conjunto ou somente após a definição do tipo de conexão sináptica do axônio (Jacobson, 1993).

Em diferentes estudos, tem sido demonstrada a ação exercida pelo órgão-alvo no desenvolvimento e na sobrevivência de neurônios, sensoriais e motores, em vertebrados (Calderó et al., 1998; Li et al., 1998), como também na regeneração axonal em adultos após injúria (Kreutzberg et al., 1988; Da-Silva, 1995), em invertebrados (Schildberger & Huber, 1988) e vertebrados, como peixes (Zippel, 1988), anfíbios (Lamb, 1981), aves (Maier, 1997) e mamíferos (Wigston & Sanes, 1982; Bähr & Bonhoeffer, 1994).

O processo de morte natural de neurônios durante a maturação do sistema nervoso revela a grande quantidade de prolongamentos axônicos direcionados a um tecido pós-sináptico e a forma seletiva como formam-se as conexões duradouras, resultando na degeneração da grande maioria das fibras restantes, atingindo em alguns casos a 70% (Bennett & Lavidis, 1982; Cowan et al., 1984; Oppenheim, 1985; Milligan & Schwartz, 1997; Wetts & Vaughn, 1998).

Durante a embriogênese do sistema nervoso, alguns fatores são de fundamental importância no estabelecimento das conexões neurais definitivas, como a ação das neurotrofinas, estudadas a partir da descoberta do fator de crescimento do nervo (Levi-Montalcini & Angeletti, 1968; Levi-Montalcini, 1987). Atualmente sabe-se que os fatores neurotróficos atuam regulando, entre outros processos, a sobrevivência, o crescimento e a plasticidade dos neurônios, podendo inclusive modificar os níveis ou mesmo o tipo de neurotransmissor sintetizado pela célula (Annunziato, 1995; Da-Silva, 1995; Levi-Montalcini et al., 1996). Diversos desses neuropeptídeos estão bem caracterizados, incluindo NGF (fator de crescimento do nervo), BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), CNTF (fator neurotrófico ciliar), GDNF (fator neurotrófico derivado da glia), NT-3 (neurotrofina-3), NT-4/5 (neurotrofina-4/5) e NT-6 (neurotrofina-6), juntamente com seus receptores, sendo

um de baixa afinidade por NGF denominado p75, e outros três de alta afinidade, trkA, trkB, trkC (Thoenen, 1991; Ibáñez, 1998; von Bartheld, 1998).

Pesquisas relacionando os mecanismos da morte neuronal natural com a produção dos fatores neurotróficos têm sido feitas utilizando células do sistema nervoso central (Davies, 1988) e periférico (Lumsden & Davies, 1983; Herzog & von Bartheld, 1998), com técnicas *in vitro* (Davies et al., 1986) e *in vivo* (Hofer & Barde, 1988). Trabalhos bastante significativos para a compreensão desse processo plástico do SN, foram feitos com a utilização de motoneurônios e da junção neuromuscular, em modelos de anfíbio (Lamb, 1981), ave (Hsu et al., 1982) e mamífero (Lance-Jones, 1982).

A conexão neuromuscular em vertebrados inicia com o crescimento de motoneurônios, organizados segmentalmente em grupos e localizados na medula espinhal e tronco cerebral, sendo esta uma atividade coordenada conjuntamente com a proliferação de mioblastos e a organização dos miotúbulos (Jacobson, 1991).

O desenvolvimento da musculatura esquelética de vertebrados deriva do mesoderma somítico do embrião e durante o processo de migração das células miogênicas apresenta diferentes maneiras de segmentação para a formação dos músculos da cabeça, do tronco e dos membros, (Beresford, 1983; Searls, 1990; Wahl et al., 1994; Hayashi & Ozawa, 1995; Wigmore & Dunlison, 1998).

A diferenciação da musculatura axial e segmentar no embrião de galinha segue um padrão estereotipado de segmentação, determinado por genes posicionais (Gibson-Brown et al., 1998) e pela localização do mesoderma somítico (Beresford, 1983), os mioblastos migram para formar o tecido muscular, respeitando uma organização temporo-espacial (Searls, 1990), posicionando-se no tronco e nos membros (Laing & Lamb, 1983).

Nos estudos em vertebrados foi demonstrado que os músculos originados dos somitos são inervados por motoneurônios localizados no nível segmental correspondente (Jacobson, 1991; Izumi & Kida, 1998; Widmer et al., 1998). Pettigrew et al. (1979) estudaram a inervação do membro anterior de galinha

e confirmaram a existência de um padrão segmentar nos músculos bíceps, tríceps, extensor radial do metacarpo, flexor ulnar do carpo e flexor profundo do dígito.

Hollyday (1981) enxertou um membro extranumerário em diferentes posições do tronco de embrião de galinha e observou que o padrão de inervação para o enxerto foi semelhante em todos os casos, variando de acordo com a origem embrionária do músculo, a orientação espacial do membro e a posição do membro em relação ao eixo rostrocaudal do corpo. Já Lewis et al. (1981), utilizando embrião de galinha no 2º dia embrionário, evitou o desenvolvimento do músculo pela destruição do mesoderma somítico, e em consequência os motoneurônios relacionados também não desenvolveram.

Além do padrão segmentar, diversas outras relações podem ser encontradas entre motoneurônios e músculos durante a embriogênese, sendo o estabelecimento da junção neuromotora de fundamental importância para a existência e diferenciação de ambos (Jolesz & Sreter, 1981).

O neurotransmissor acetilcolina, liberado pelo motoneurônio mesmo antes do contato com a massa muscular, influencia a organização dos miofibrilos (Ishikawa & Shimida, 1982), enquanto que o mecanismo que determina a velocidade de contração do músculo, lenta ou rápida, envolve a participação do motoneurônio (Laing & Lamb, 1983; Jacobson, 1991). O desuso prolongado ou o bloqueio da transmissão neuromuscular causa atrofia no músculo (Harris, 1981).

Por outro lado, o músculo em desenvolvimento exerce grande influência na maturação nervosa, sendo responsável pela produção de moléculas tróficas, incluindo o NGF, que atuam na orientação do cone de crescimento, na seletividade da conexão sináptica e na morte de motoneurônios (Jansen & Lomo, 1981; Jacobson, 1991).

O estabelecimento da junção neuromuscular, assim como os processos de eliminação da inervação polineuronal e sinaptogênese, dependem de mecanismos interativos entre o motoneurônio e o músculo, como o caso da “atividade neural”, caracterizada por uma estimulação assíncrona na membrana do tecido muscular

pelos axônios em competição, com *feedback* do músculo sobre o fortalecimento de algumas conexões e enfraquecimento de outras (Colman & Lichtman, 1992). A atividade neuromuscular parece desempenhar uma função crítica em relação a vários mecanismos durante o desenvolvimento embrionário e influenciar alterações em alguns processos do sistema neuromotor adulto (Oppenheim et al., 1997; Kanda & Hashizume, 1998). Características plásticas próprias do tecido nervoso estão envolvidas nesses eventos, participando da sua regulação a nível morfológico, celular e molecular (Horn et al., 1973; Black et al., 1984; Annunziato, 1994).

Oppenheim (1989) considerou fundamental no desenvolvimento da junção neuromuscular e outros mecanismos relacionados, a atividade neuromuscular espontânea que ocorre durante a embriogênese em todas as espécies de vertebrados.

Em estudos sobre a redução de inervação polineuronal no músculo de embriões de galinha *in ovo*, a atividade neuromuscular foi monitorada nos grupos controle e experimental e considerada um mecanismo determinante nesse processo (Oppenheim et al., 1982; Oppenheim et al., 1988). Em outros casos, a administração de drogas bloqueadoras da atividade muscular (curare, Hemicholinium-3, α -bungarotoxina) foi utilizada, comprovando o efeito da paralisia motora na prevenção da morte de motoneurônios (Laing, 1982; Oppenheim & Núñez, 1982, Oppenheim et al., 1982).

Estudos *in vitro* (Pockett, 1981; Magchielse & Meeter, 1982) e *in vivo* (Oppenheim & Núñez, 1982) através da estimulação elétrica direta no músculo, houve um aumento na morte neuronal natural de motoneurônios, substituindo a atividade muscular do embrião.

Oppenheim et al. (1997) em estudo sobre o desenvolvimento neuromuscular em ave paralítica mutante “Crooked Neck Dwarf (*cn/cn*)”, que não apresenta qualquer tipo ou variação de atividade motora em seus embriões, observou, a partir do 8º dia, a redução significativa da morte dos motoneurônios em diversos músculos do corpo, concluindo pelo papel preponderante da atividade neuromuscular na regulação desse mecanismo.

Em mamíferos, pesquisas utilizando procedimentos semelhantes também têm demonstrado a influência exercida pela atividade muscular na regressão da inervação polineuronal durante o desenvolvimento neuromotor (Jansen et al., 1973; Ijkema-Paassen & Gramsbergen, 1998).

Kanda & Hashizume (1998) analisando os efeitos do exercício físico a longo prazo, em motoneurônios espinhais e nervos periféricos em adultos, submeteram ratos a um programa de exercício (natação) durante 10 meses (30 min., 3 vezes por semana) e posteriormente analisaram os motoneurônios e as fibras nervosas mielinizadas do músculo gastrocnêmio medial e suas modificações, em relação ao grupo controle de ratos de meia-idade e velhos. Os autores constataram que, apesar de não serem significativos, os resultados demonstraram que o exercício físico retarda as mudanças progressivas relacionadas com a idade, as quais ocorrem com os motoneurônios e nervos periféricos.

A atividade neuromuscular no embrião além de ser considerada como mecanismo epigenético na formação do sistema nervoso, é também responsável por adaptações ontogenéticas da vida embrionária, e suporte fundamental para a preparação do comportamento pós-natal (Michel & Moore, 1995).

Michel & Moore (1995) relacionam a atividade neuromuscular do embrião com diversos processos da vida embrionária, perinatal e neonatal primitiva, envolvendo a atividade motora ou sensorial do organismo e mostrando a influência que elas exercem na formação do sistema nervoso.

Nesse sentido, o desenvolvimento neurocomportamental, durante a vida embrionária, estaria dividido em dois processos distintos, sendo um mais adaptado para as condições embrionárias e o outro, de preparação para o desenvolvimento dos processos pós-natais. O repertório comportamental espontâneo do embrião pode ser considerado uma valiosa fonte de informações sobre a sua organização neurocomportamental (Michel & Moore, 1995).

Sob o ponto de vista clínico, o diagnóstico de movimentos fetais é considerado “sinal de bem estar” e a sua ausência “sinal de alarme” e sofrimento

fetal (Delascio & Guariento, 1981), o que segundo Dawes (1988), equivale a um “index da saúde normal”.

Durante a embriogênese do SN de vertebrados, a atividade neuromuscular é organizada em padrões reconhecíveis, modificando de acordo com as especificidades temporais e espaciais próprias da maturação de cada espécie, tais como: dia embrionário, desenvolvimento neuromuscular, condições do ambiente intraovo, intrauterino ou social primitivo (Delprato, 1987; Dawes, 1988; Michel & Moore, 1995), ou por determinadas intervenções nos processos de desenvolvimento, mantendo no entanto um regulamento de especificação motora do SN (Lamb, 1981; Le Douarin, 1993).

Pesquisas utilizando membros transplantados, músculos transplantados e inervação transversal para músculos antagonistas têm confirmado a hipótese que os padrões de coordenação motora específica de cada espécie desenvolvem-se de acordo com um programa pré-estabelecido dentro do sistema nervoso central, ou seja, a especificação central da atividade motora. No entanto, em alguns casos pode ocorrer a plasticidade sináptica em neurônios centrais, em resposta a modulação do músculo (Jacobson, 1991).

Em embriões de peixe *Sciliorhinus* ocorrem contrações rítmicas independentes de miótomos antes das conexões neurais serem estabelecidas. Já na salamandra *Ambystoma*, observa-se a seqüência de estágio não-motor (nem com estimulação), estágio de flexura simples e torção espontânea, estágio de contrações locomotoras. (Prosser & Greenough, 1991).

Em aves, a atividade neuromuscular do embrião precede as conexões aferentes, em consequência da atividade endógena primitiva dos motoneurônios e interneurônios da medula espinhal (Bekoff, 1981; Prosser & Greenough, 1991). Por outro lado, em mamíferos, os movimentos espontâneos iniciam somente após as conexões aferentes estarem formadas na medula espinhal, ou seja, sua regulação é comandada pela informação sensorial (Michel & Moore, 1995).

No desenvolvimento humano, a atividade neuromuscular inicia entre a 7ª e a 8ª semana (Dawes, 1988) e aumenta rapidamente em relação a padrões de frequência e diferenciação de movimentos (Michel & Moore, 1995). Os primeiros movimentos espontâneos descritos na literatura consistem numa lenta flexão e extensão da coluna vertebral, aparecendo em seguida tipos diferentes de movimentos fetais (Carlson, 1996).

Metodologias de estudo envolvendo monitoramento contínuo de embriões humanos por longos períodos com ultra-som possibilitam o reconhecimento de diversos padrões de atividade neuromuscular (Birnholtz, 1981; Carlson, 1996; DiPietro et al, 1998). A figura 1 apresenta alguns resultados desses estudos, mostrando padrões de atividade neuromuscular embrionária em humanos monitorados por 60 minutos.

Figura 1 – Tipos de movimento de feto humano de 14 semanas por registro em actograma durante 60 minutos (Modificado de PrechtI, citado por Carlson, 1996)

Técnicas de registro eletromiográfico foram utilizadas para estudar a organização e o funcionamento de grupos de motoneurônios na musculatura de embrião galinha, sendo estabelecidas diversas relações entre a atividade motora embrionária e o padrão de desenvolvimento e maturidade dos circuitos neurais. A natureza espontânea dos movimentos no embrião foi considerada uma atividade endógena adaptativa dos circuitos neurais, uma atividade muscular, ou ambos, durante os diferentes períodos do desenvolvimento (Bekoff, 1981), apresentando padrão seqüencial de manifestação, que iniciou com movimentos de pescoço, depois de tronco, e posteriormente de membros (Prosser & Greenough, 1991).

A figura 2 apresenta padrões de atividade neuromuscular no desenvolvimento embrionário de galinha, onde a eclosão ocorre no 21º dia embrionário. O aumento da freqüência média de movimentos por dia embrionário alcança o pico entre o 10º e o 13º dia, declinando em seguida (Bekoff, 1981).

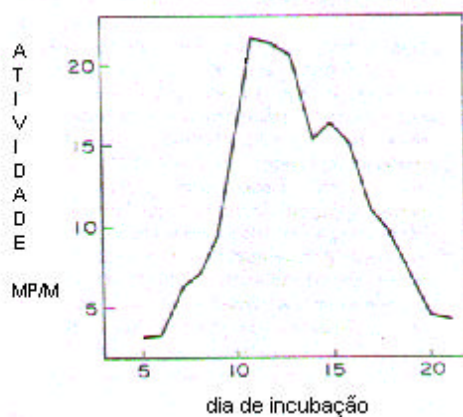


Figura 2 – Padrão em relação a freqüência média de movimentos por minuto e por dia de incubação no embrião de galinha (Oppenheim, 1972, adaptado por Bekoff, 1981)

Essa espécie de ave favorece estudos sobre o desenvolvimento do sistema nervoso e da atividade neuromuscular “in vivo” considerando a facilidade de acesso para intervenção e acompanhamento durante todas as etapas da neurogênese (Cruz, 1993).

A formação do sistema nervoso nos embriões de *Gallus domesticus* inicia entre 16 e 18 horas de incubação com o espessamento do ectoderma dorsal para formar a placa neural, e até o final do 1º dia embrionário podem ser reconhecidas as pregas neurais (Patten, 1951; Freeman & Bracegirdle, 1982). A nível celular, a origem e a diferenciação dos neurônios centrais e periféricos podem ser acompanhadas juntamente com a migração dos neuroblastos e células da crista neural (Witschi, 1956; Jacobson, 1991).

No 2º dia embrionário, da 24º à 29º hora de incubação, as pregas neurais fecham-se na altura do cérebro médio, e inicia a formação do tubo neural, sendo observadas, até o final deste período, as cinco vesículas cerebrais e o fechamento do neuróporo anterior (Arey, 1974). Na coluna motora lateral da medula espinhal começa a originar-se os motoneurônios e aproximadamente na 40º hora de incubação são reconhecidas fibras nervosas em motoneurônios do cérebro posterior (Jacobson, 1991).

Durante o 3º dia embrionário em *Gallus domesticus*, as vesículas cerebrais tornam-se bem evidentes e diferenciadas, podendo ser vistas raízes sensoriais e motoras de nervos cranianos e espinhais emergindo em direção a órgãos-alvos (Arey, 1974; Kuratani et al, 1988; Kuratani & Tanaka, 1990). Nesse período, em todos os níveis da medula espinhal, pode ser observado grande produção de motoneurônios, em função de intensas divisões das células ventriculares, enquanto outros motoneurônios já estão em fases adiantadas de diferenciação (Jacobson, 1991).

Até o final do 4º dia embrionário, continua a produção de motoneurônios somáticos na medula e projeções de axônios motores alcançam a

musculatura axial e do pescoço (Kuratani et al., 1988; Kuratani & Tanaka, 1990; Jacobson, 1991; Wahl et al., 1994).

Com 3½ dias de incubação, axônios motores fazem contato com músculos anteriores do tronco (Jacobson, 1991), e, nesse mesmo período, o embrião de galinha realiza seus primeiros movimentos envolvendo a musculatura do pescoço e do tronco, em intervalos regulares superior a um minuto entre um e outro movimento (Huntingford, 1991; Oppenheim et al., 1997). Segundo Bekoff (1981), no transcorrer do 4º dia embrionário iniciam movimentos leves de cabeça, desencadeando contrações ao longo da coluna, em direção à cauda, e produzindo movimentos em forma de S.

O período do 5º ao 7º dia embrionário é caracterizado pelo aparecimento de conexões sinápticas entre neurônios sensoriais e motores, assim como pelo contato de axônios de motoneurônios com a musculatura proximal e distal dos membros. Nesse período, em diversos pontos da medula, completa-se o arco reflexo da pele, podendo no 6º dia ser provocado por estimulação. Observa-se um aumento acentuado na coluna motora ventrolateral a nível braquial e lombosacral, em função do crescimento dos motoneurônios somáticos dos membros, iniciando uma expressiva morte dos motoneurônios da medula (Pettigrew et al, 1979; Jacobson, 1991).

Em embriões de galinha com 7 dias de incubação, através de registro eletromiográfico do músculo da perna, podem ser acompanhados os primeiros movimentos de membro inferior. Também ocorrem movimentos de membro superior, além de uma seqüência céfalo-caudal de movimentos sem padrões determinados, caracterizados por contrações irregulares (susto repentino) que atingem rapidamente o corpo (Bekoff, 1981). De acordo com Oppenheim et al (1997), os movimentos espontâneos dos membros posteriores iniciam no 6º dia embrionário, aumentando no 7º e 8º dia, onde os embriões já alcançam uma média de 6 a 12 movimentos por minuto (Oppenheim & Núñez, 1982).

Estudos realizados por Oppenheim et al. (1982; 1988) indicam que, no 8º dia de desenvolvimento, os embriões de galinha do grupo controle dos experimentos referidos alcançaram uma frequência média por minuto de 14.3 ± 3.8 e de 9.2 ± 2.6 , respectivamente.

O desenvolvimento que prossegue até o 10º dia em *Gallus domesticus* é caracterizado pela redução da morte de neurônios motores somáticos na medula (9º dia) e pela continuidade das projeções axonais dos motoneurônios para os músculos do corpo, enquanto diferenciam-se as junções neuromusculares nos membros. Além disso, até o 11º dia embrionário, podem ser vistos reflexos de estiramento, depois que circuitos reflexos monossinápticos entre o fuso muscular e o motoneurônio foram completados (Jacobson, 1991).

Por volta do 9º até o 11º dia, os movimentos de *Gallus domesticus* já estão independentes e dissociados, sendo que o embrião nesse período executa movimentos bruscos de partes individuais do corpo, apresentando um padrão irregular (Huntingford, 1991). De acordo com outro estudo (Oppenheim et al., 1988), embriões de galinha no 10º dia atingem a frequência de 15.6 ± 2.4 movimentos por minuto.

No período compreendido entre o 10º e 15º dia do desenvolvimento da galinha, a atividade neuromuscular alcança seu maior pico em relação ao tempo e à frequência, declinando gradativamente até a eclosão do ovo (Bekoff, 1981; Huntingford, 1991; Oppenheim et al., 1997).

Nos últimos cinco dias de incubação (16º ao 20º dia), os padrões no desenvolvimento da atividade neuromuscular, considerada de pré-eclosão, são de dois tipos: movimentos aleatórios e coordenados, caracterizados por movimentação geral, movimentos de cabeça-pescoço e movimentos rotatórios coordenados (Kovach, 1970; Bekoff, 1981). Kovach (1970) descreve que em embriões de galinha, entre o 16º e o 20º dia, os movimentos aleatórios são irregulares e de baixa amplitude podendo ocorrer em todas as partes do corpo ou isoladamente, em combinações imprevisíveis. Já os movimentos coordenados caracterizam-se por um

serpear vigoroso, mas não muito rápido em todo o corpo, envolvendo a cabeça; uma forte extensão do tronco na altura das costas; um levantamento e batimento coordenado das asas. No 17º dia de incubação, aparece um componente rotatório, além dos padrões descritos, na altura da cabeça, pescoço e ombros, com uma regularidade rítmica que aumenta no último dia de incubação, próximo à eclosão.

O padrão de frequência e duração da atividade neuromuscular em embriões de galinha, no 16º dia, sofre uma diminuição gradativa, voltando a aumentar um pouco no 19º e 20º dia, quando então declina. Somente 12 – 18 horas antes de quebrar a casca é que a atividade neuromuscular do embrião volta a ser vigorosa (Kovach, 1970; Petry & Wittman, 1978).

Bekoff (1981) observou ao longo do desenvolvimento de *Gallus domesticus* que todo, ou apenas partes do corpo do embrião movimentou-se durante o período de atividade neuromuscular, e que estes períodos de atividade foram alternados por períodos de completa inatividade motora.

Analisando diferentes técnicas de observação e registro “in ovo” dos movimentos embrionários da galinha doméstica, Oppenheim et al. (1973) demonstraram a eficiência de cada uma em relação ao tempo de sobrevivência do embrião e sua visualização, comparando o desempenho em relação a diferentes fatores, como posição de incubação do ovo (vertical / horizontal), procedimento de rotação do ovo (rotado / não-rotado), tipo de fechamento da casca (parafilme / casca-tampão), tratamento experimental na janela (vaselina / tinta seca / remoção total de membranas / remoção parcial de membranas / aberto), dia embrionário de abertura. Entre as técnicas mais eficientes ficaram as de incubação horizontal não-rotadas e abertura de janela lateral com remoção parcial das membranas da casca.

O conjunto de processos e mecanismos biológicos que ocorre durante o desenvolvimento embrionário, seja de natureza progressiva ou regressiva, de características quantitativas ou qualitativas, por determinação ou interação celular (Gilbert, 1994), pode, devido a interferências por causas naturais ou provocadas, mudar o curso normal de desenvolvimento de *Gallus domesticus*.

Diversas pesquisas foram realizadas com embriões de galinha doméstica utilizando a manipulação de fatores físicos, como o implante de membros, reinervação, lesões, axotomia (Narayanan & Narayanan, 1978; Summerbell & Stirling, 1981), assim como expondo os mesmos a diferentes temperaturas de incubação (Dias, 1994).

O desenvolvimento embrionário normal de *Gallus domesticus* ocorre quando o ovo é incubado a uma temperatura estável de 37,5°C. Quando é incubado a uma temperatura de 40°C desenvolve-se duas vezes mais rápido que outro incubado a 35°C (Witschi, 1956).

Dias (1994) analisou embriões de galinha, distribuídos em cinco grupos em diferentes temperaturas de incubação (37,5°C, 42°C, 40°C, 34°C, 32°C), para verificar até o 4º dia embrionário, possíveis alterações no desenvolvimento de estruturas morfológicas. Os resultados demonstraram que embriões submetidos a temperaturas muito altas ou baixas alteram o padrão normal referentes a características morfológicas, como também o peso e o comprimento corporal, determinando acelerações e retardamentos no ritmo normal de desenvolvimento.

Buckiová et al. (1998), provocou hipertermia ($43^{\circ} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) em embriões de galinha em diversos estágios embrionários, observando diferentes comprometimentos ao desenvolvimento embrionário normal, como malformações e morte celular, que se manifestaram em tempos diferentes, dependendo do estágio em que o embrião foi exposto.

Na embriogênese, durante a formação do sistema nervoso, diversos fatores químicos também podem influenciar os processos celulares e moleculares que ocorrem, desencadeando mudanças reversíveis ou irreversíveis, que podem beneficiar ou comprometer o organismo em desenvolvimento. O uso de drogas como etanol, nicotina e cocaína afetam significativamente o funcionamento de diversos mecanismos no sistema nervoso que ficaram expostos, tanto nos constituintes moleculares específicos que regulam o funcionamento da célula, como em relação ao tempo exato da sinalização molecular. Além disso, as drogas

influenciam os receptores dos neurotransmissores, os canais de íons, a atividade quinase intracelular e podem causar efeitos crônicos no comportamento das células nervosas e na expressão de genes (Levitt, 1998).

A utilização de agentes químicos também altera o desenvolvimento embrionário de galinha, como se pode constatar em estudos sobre a influência de acetyl-L-carnitine nos fenótipos neuronais (Kentroti et al., 1992), ou a ação irreversível de α -bungarotoxina, injetada na membrana cório-alantóica do ovo, que paralisa definitivamente toda a atividade neuromuscular do embrião (Oppenheim & Núñez, 1982).

Em estudo realizado com embriões de *Gallus domesticus* até o 4º dia, foram constatados diferentes níveis de malformações (erros de rotação e flexura, dismorfismos, assimetrias, nanismo, protusão) de estruturas, incluindo os padrões de “*Fish-shaped*” e “*Sphinx-shaped*”, em decorrência da aplicação de insulina e tunicamicina, no ambiente intra-ovo (Dias, 1996).

Outra substância química que, além de sua função neurotransmissora, atua no desenvolvimento do sistema nervoso, é a serotonina (5-HT), cuja atividade e efeitos no funcionamento neuronal vem sendo estudados (Moiseiwitsch & Lauder, 1995; Levitt et al., 1997).

O 5-Hydroxytryptamina (5-HT_{2A}, serotonina) consiste em um neurotransmissor amino, derivado do aminoácido triptofano, convertido primeiro em 5-HTP (5-Hydroxytryptophan) pela enzima triptofano hydroxylase, e depois em 5-HT pela enzima 5-HTP decarboxylase (McGeer et al., 1987; Bear et al., 1996). Grande parte dos corpos celulares dos neurônios serotoninérgicos de vertebrados concentram-se no núcleo da rafe e outros núcleos próximos, no tronco cerebral, formando o maior sistema monoaminérgico do sistema nervoso (McGeer et al., 1987; Role & Kelly, 1991). A serotonina também pode ser localizada (síntese e armazenamento) nas células enterocromafins do trato gastrointestinal, onde inicialmente foi isolada e estudada (Powis & Bunn, 1995; Lördal et al., 1998).

Os neurônios serotonérgicos do tronco cerebral interagem com diferentes regiões do sistema nervoso central, projetando seus axônios para o córtex cerebral, corpo estriado, estruturas límbicas, hipocampo, diencéfalo, cerebelo, medula espinhal, bem como para dentro de outros núcleos do próprio tronco (Kandel et al., 1991).

A serotonina foi inicialmente identificada como uma substância vasoconstrictora periférica, exercendo grande influência sobre diversos sistemas fisiológicos (regulação cardiovascular, respiração e termo-regulação), e sobre uma extensa variedade de funções comportamentais (apetite, agressão, comportamento sexual, padrões motores, aprendizagem), incluindo desordens psiquiátricas (File, 1987; Adell et al., 1997; Blanchard et al., 1997; Duxon et al., 1997; Blanchard et al., 1998; Lucki, 1998; Siemiakowski et al., 1998).

Estudos realizados principalmente com mamíferos têm apresentado respostas em relação a 5-HT que mostram que esta substância pode ser tanto excitatória (despolarização, facilitação da transmissão sináptica, aumento da liberação neurotransmissora) quanto inibitória (hiperpolarização, inibição da transmissão sináptica, diminuição da liberação neurotransmissora) (Fozard, 1984; Bradley et al., 1986; Lucki, 1998), no cérebro (Davies et al., 1988; Adell et al., 1997; Aghajanian & Marek, 1997) e na medula espinhal (Fozard, 1984), sendo esta diversidade de efeitos na ação serotonérgica causada pela grande variedade de tipos e sub-tipos de receptores para 5-HT (Fozard, 1984; Bradley et al., 1986; Richardson & Engel, 1986; Peroutka, 1988; Glennon & Dukat, 1995; Sanders-Bush & Canton, 1995; Hoyer & Martin, 1997).

Do tronco cerebral, particularmente dos núcleos serotonérgicos, são projetados grande número de fibras para todos os segmentos da medula espinhal, em mamíferos (Gerin & Privat, 1998; Hermann et al., 1998) e aves (Okado et al., 1988). Maeshima et al.(1998) examinou o padrão de distribuição celular do sub-tipo de receptor 5-HT_{2A} na medula espinhal do rato, demonstrando a presença de um número maior desses receptores no corno ventral em relação ao corno dorsal, e

também um padrão de distribuição dos receptores 5-HT_{2A}, idêntico nos diferentes níveis da medula espinhal. Em função da presença maciça de motoneurônios no corno ventral da medula, os autores discutem a provável mediação desse receptor na facilitação que a serotonina exerce em relação a atividade dos motoneurônios.

No sistema nervoso motor, no cérebro, e principalmente na medula espinhal a ação de 5-HT é quase sempre excitatória podendo, em alguns casos, haver hiperpolarização e diminuição da excitabilidade de motoneurônios (Fozard, 1984).

Estudos *in vitro*, com aplicação direta de 5-HT por iontoforese e registro por eletrodos em motoneurônios de vários segmentos ventrais da medula espinhal de rato neonato e adulto, demonstraram sua ação excitatória (Barasi & Roberts, 1977; Parry & Roberts, 1980; Connell & Wallis, 1988; Takahashi & Berger, 1990; Wang & Dun, 1990). Resultados semelhantes foram comprovados utilizando a mesma metodologia, mas com drogas agonistas e antagonistas para receptores de 5-HT (Connell & Wallis, 1989; Larkman & Kelly, 1997). Também foi comprovado o efeito de drogas agonistas e antagonistas para receptores de 5-HT em motoneurônios da medula espinhal (Roberts et al., 1988).

A ação de 5-HT foi avaliada “*in vitro*”, em relação aos reflexos mono e poli-sinápticos, com extratos da medula espinhal contendo motoneurônios. Os resultados mostraram que a droga provoca respostas excitatórias no caso dos circuitos neurais de reflexos poli-sinápticos (Yamazaki et al., 1992) e inibitória no caso dos reflexos mono-sinápticos (Crick & Wallis, 1991; Wallis et al., 1993; Crick et al., 1994).

Gerin & Privat (1998) implantaram uma sonda de microdiálise no segmento L4 da medula de rato *in vivo* para definir precisamente a relação entre os sistemas monoaminérgicos descendentes e o sistema motor durante o exercício físico. A presença de 5-HT foi registrada no período de repouso (maior concentração), exercício (concentração intermediária) e pós-exercício (menor concentração), sendo evidenciada a função tônica dos neurônios serotoninérgicos, com

a liberação maior de 5-HT no início do exercício para excitação dos motoneurônios alfa e gama, e diminuição nas fases posteriores.

A ação de agonistas e antagonistas para receptores de 5-HT foi testada *in vivo*, após injeção intraperitoneal, em ratos entre 5 e 20 dias de idade, tendo como parâmetro para análise dos efeitos da droga a locomoção, movimentos de cabeça, movimentos rítmicos dos membros anteriores e estiramento de membros posteriores.. Como resultado da ação dessas drogas, verificou-se alteração significativa de todos os padrões motores analisados (Jackson & Kitchen, 1989).

Iizuka et al. (1998) registraram as alterações, *in vitro*, no desenvolvimento do ritmo locomotor na medula espinhal (corno ventral) de fetos de rato, induzido por aplicações de 5-HT, em E16.5, E18.5 e E20.5. A atividade motora foi registrada por eletrodos nos segmentos medulares L2/ L3 e L5, representando a atividade de flexores e extensores, respectivamente, ficando evidente que a ação de 5-HT desencadeia descargas rítmicas em todos os segmentos nos dias embrionários estudados, ocorrendo também sincronia entre as descargas rítmicas do corno ventral direito e esquerdo no mesmo nível segmentar.

A utilização de vertebrados superiores em estudos envolvendo atividade neuromuscular embrionária “*in vivo*” requer a utilização de técnicas que possibilitem visualizar e registrar os movimentos do embrião, mantendo o seu sistema de suporte o mais íntegro possível, sendo para isso, os ovos de ave uma opção muito apropriada (Oppenheim et al., 1973; Michel & Moore, 1995). Nesse sentido, a espécie *Gallus domesticus* é um modelo de estudo eficiente, pois conta com embriões relativamente grandes para análise, o período *in ovo* é de 21 dias, apresenta facilidade no controle de certas variáveis e o seu desenvolvimento possui fases regulares e bem caracterizadas (Beig & Garcia, 1987; Cruz, 1993), podendo ser estudado no ovo intacto (Kovach, 1970; Petry & Wittmann, 1977), e também aberto para observação (Oppenheim et al., 1973). Por esses motivos e com o interesse de observar possíveis alterações na organização e na atividade neuromuscular de aves, em decorrência da aplicação de substâncias como a

serotonina ou de mudanças provocadas na temperatura de incubação, foram utilizados embriões de *Gallus domesticus* e analisados os seus movimentos corpóreos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar características do desenvolvimento de *Gallus domesticus*, relacionadas aos padrões motores na atividade neuromuscular, durante o 3º ao 10º dia embrionário (E3-E10).

2.2. Objetivos Específicos

- Descrever os padrões do desenvolvimento embrionário, relacionados com a atividade neuromuscular em idades compreendidas entre o 3º e o 10º dia.
- Averiguar as possíveis modificações que ocorrem em nível de desenvolvimento no embrião, relacionadas aos padrões motores em consequência da ação de fatores físicos e químicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material de Estudo

O material deste estudo consiste de embriões de *Gallus domesticus* (Linnaeus, 1758), cujos ovos foram obtidos nos aviários da Empresa Frangos Macedo, localizada no Distrito de Albardão, Município de Palhoça-SC.

Os ovos dessa espécie possuem grande reserva nutritiva, sendo os embriões originados do blastodisco (camada discóide com 3 mm de diâmetro), que sob condições ideais de incubação, completa seu desenvolvimento em 21 dias (Beig & Garcia, 1987).

A classificação taxonômica de *Gallus domesticus* é a seguinte (Berger, 1971):

- Classe Aves
- Sub classe Neornithes
- Sub ordem Neognathae
- Ordem Galliformes
- Família Phasianidae
- Espécie *Gallus domesticus*

Os ovos foram armazenados no Laboratório de Embriologia / CCB / UFSC a uma temperatura que variou entre 22° C e 27° C, por um período não superior a sete dias (Magaldi, 1974; Romboli et al, 1984). A incubação foi realizada em estufas de cultura, com umidade atmosférica relativa entre 55% e 60% (Beig & Garcia, 1987),

onde primeiramente os ovos eram identificados por um número de registro, sendo após, incubados até E10, numa das modalidades do experimento.

3.2. Procedimentos

3.2.1. Amostragem dos ovos

A amostra foi composta por 336 embriões "in ovo", com nível de desenvolvimento compreendido entre o 3º e o 10º dia embrionário, distribuídos de forma casual em 8 modalidades experimentais (grupos). Cada grupo experimental (G1, G2, G3, G5, G7, G8) foi constituído por 48 embriões, correspondendo a 6 embriões por dia embrionário (E). Os grupos G4 e G6 foram formados com 24 embriões cada, utilizando-se 3 embriões por dia de desenvolvimento.

Os ovos foram utilizados, no grupo 1, como controle do padrão normal de desenvolvimento e, nos grupos 4 e 6, como controle do desenvolvimento em temperatura baixa e alta, sendo incubados sem abertura da casca, na estufa, do 3º ao 10º dia embrionário, e abertos somente no dia previamente determinado. Nesse dia o embrião foi analisado, determinado o peso corporal e medido o comprimento céfalo-caudal, estabelecendo-se relações entre a idade estrutural e a idade embrionária descrita na literatura (Hamburger & Hamilton, 1951).

Nos demais grupos experimentais, os ovos foram abertos no 3º dia e mantidos na estufa para análise até no máximo o 10º dia, visando, além de mostrar relações de características morfológicas do embrião com seus respectivos controles, estabelecer no G2 os padrões de movimentos corpóreos para este estudo, e no G3 (temperatura baixa), G5 (temperatura alta), G7 (salina) e G8 (serotonina), os padrões motores e as possíveis modificações em relação a G2. A descrição detalhada das 8 modalidades experimentais encontra-se na tabela I.

Tabela I – Modalidades de incubação e variáveis de estudo nos grupos G1 a G8, para análise da morfologia e movimentos corpóreos do embrião de *Gallus domesticus* no período de E3 a E10

Grupo	Modalidade do experimento	Manipulação de variáveis
1º grupo (G1)	Controle - Idade Estrutural (IE)	Ovos incubados em 37.5°C sem abertura
2º grupo (G2)	Controle -Padrão de Movimento	Ovos incubados em 37.5°C com abertura
3º grupo (G3)	Teste – Temperatura Baixa	Ovos incubados em 35°-36°C com abertura
4º grupo (G4)	Controle - Idade Estrutural – G3	Ovos incubados em 35°-36°C sem abertura
5º grupo (G2)	Teste – Temperatura Elevada	Ovos incubados em 39°-40°C com abertura
6º grupo (G6)	Controle - Idade Estrutural – G5	Ovos incubados em 39°-40°C sem abertura
7º grupo (G7)	Controle - Injeção Salina	Ovos incubados em 37.5°C com abertura e injeção salina
8º grupo (G8)	Teste - Injeção 5-HT	Ovos incubados em 37.5°C com abertura e injeção 5-HT

3.2.2. Procedimento de abertura dos ovos e injeção

O procedimento para abertura dos ovos no 2º, 3º, 5º, 7º e 8º grupo foi realizado entre 48 e 72 horas após o início da incubação, em uma câmara de fluxo laminar, em condições assépticas, com a utilização de pinças e instrumentos cortantes. O ovo foi posicionado horizontalmente, sendo a casca e demais membranas internas retiradas na região mediana, com abertura aproximada de 3 cm x 3 cm (adaptado de Oppenheim et al, 1973), permanecendo o embrião visível para a análise (Figura 3).

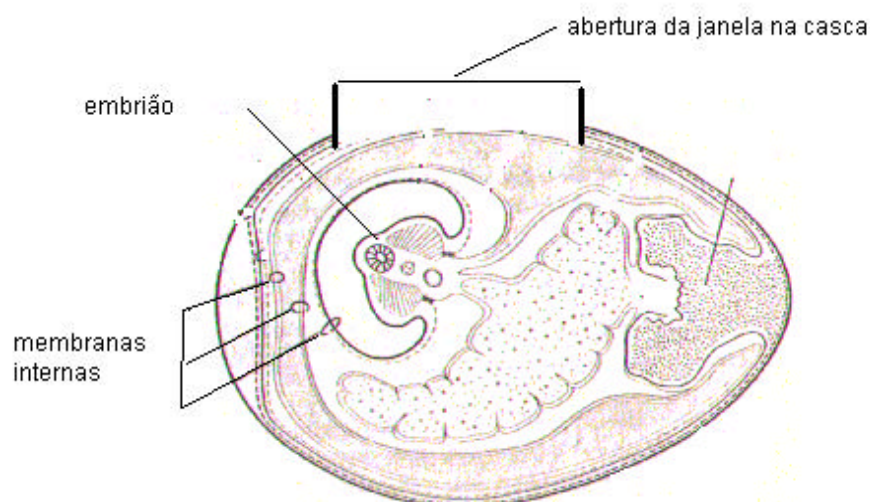


Figura 3 – Abertura da janela na casca mostrando a localização do embrião de *Gallus domesticus*, a membrana cório-alantóica e demais componentes do ovo (adaptado de Houillon, 1972)

Após a abertura, o ovo foi acondicionado num suporte plástico oval, estando protegido contra possíveis alterações mecânicas bruscas. Recobrimo o ovo, foi utilizada uma capa plástica semi-flexível, côncava, incolor, apoiada sobre o suporte, sem contato direto, isolando o embrião do meio exterior, sendo somente retirada no momento da observação (Figura 4).

Figura 4 – Suporte plástico e capa para acondicionamento e proteção do ovo após a abertura

Logo após a abertura, em ficha individual, foram feitos os registros referentes às condições gerais do embrião e o reconhecimento do dia embrionário, sendo o ovo recolocado na estufa para a continuidade do período de incubação até o dia da observação.

O procedimento de injeção nos ovos dos grupos G7 e G8 foi realizado fora da estufa entre 15 minutos e 1 hora antes da observação (adaptado de Yamazaki et al., 1992), nas seguintes regiões (figura 5):

- **a:** em E3 – no âmnio, próximo ao embrião
- **b:** em E4 e E5 – no alantóide
- **c:** de E6 em diante – na membrana cório-alantóica, próximo ao embrião

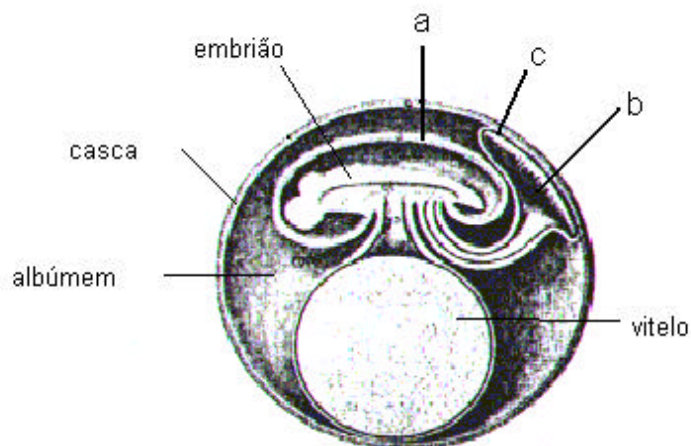


Figura 5 – Local das injeções realizadas no âmnio (a), no alantóide (b) e na membrana cório-alantóica (c) do ovo de *Gallus domesticus* (adaptado de Arey, 1974)

Nos ovos dos grupos G7 e G8, foi calculado o volume a ser injetado, de acordo com o peso corporal dos embriões. Em G1 (tabela II), foi injetado solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Basa), e em G8 foi adicionado serotonina hidrócloride (Sigma), na concentração de 0,003 M (Iizuka et al., 1998).

Tabela II – Volumes de solução salina e serotonina injetados nos embriões de *Gallus domesticus*, do 3º ao 10º dia embrionário

Dia de incubação	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º
Volume em µl	5	10	30	50	80	180	290	500

3.2.3. Análise e registro dos movimentos corpóreos do embrião

O desenvolvimento embrionário de *Gallus domesticus* apresenta características específicas, podendo ser identificadas diferenças marcantes nas diferentes idades embrionárias. Os critérios para a análise e o registro do desenvolvimento embrionário referente à motricidade, foram estabelecidos a partir de estudos preliminares realizados no Laboratório de Embriologia.

A posição inicial do embrião foi avaliada como primeiro procedimento antes da observação, em função da possível influência que exerce na atividade neuromuscular e pela necessidade de estabelecer padrões mensuráveis em relação a este item.

Foram identificadas 3 posições durante o desenvolvimento embrionário de E3 até E10 (figura 6), observadas a partir do nível de profundidade em que se encontra o corpo do embrião em relação à superfície das membranas e demais estruturas, sendo a :

- **posição 1** – superficial, acompanhando as membranas
- **posição 2** – intermediária, mais aprofundada
- **posição 3** – profunda

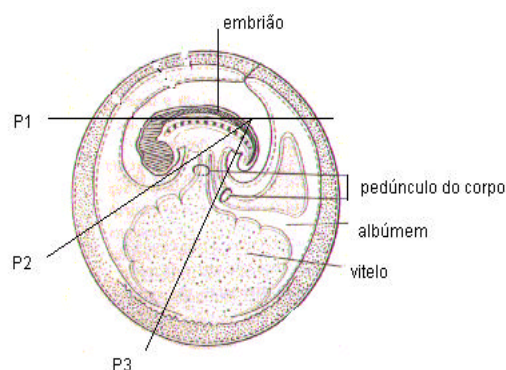


Figura 6 – Referência ao padrão da posição inicial do embrião de *Gallus domesticus* no período de E3 a E10 (adaptado de Houillon, 1972)

Para a determinação dos padrões motores do embrião de galinha durante o desenvolvimento (E3 a E10), foi necessário caracterizar todos os movimentos observados a partir de:

- uma posição-referência (anatômica) do corpo do embrião, com o plano sagital, o frontal e o transversal;
- referências espaciais estabelecidas entre duas ou mais partes do corpo;
- referências do ambiente interno do ovo.

Os principais movimentos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário de galinha (E3 a E10) estão sumarizados na tabela III e representados na figura 7 e 8, sendo que os padrões espaciais e temporais da atividade neuromuscular utilizados como referência comparativa para os outros grupos deste estudo foram estabelecidos a partir da observação dos embriões do grupo 2.

Foram determinados critérios qualitativos e quantitativos para a análise das características da atividade neuromuscular do embrião, levando-se em consideração os fatores temporais e espaciais que regulam a embriogênese.

Procedeu-se a análise por padrão motor e por dia embrionário em relação a:

- tipos de movimento
- incidência (ausência/presença)
- frequência (repetições)
- tempo de movimentação no período e por minuto
- duração do movimento
- intensidade do movimento, sendo registrado: (+) fraco; (++) moderado; (+++) vigoroso

No procedimento de registro do movimento corpóreo durante o desenvolvimento, os embriões foram observados em sessões individuais. A duração total de cada observação foi de 10 minutos, a partir do momento da colocação do embrião "in ovo" no estereomicroscópio (aumento 10x) em condições de

observação, sendo o primeiro minuto considerado tempo de adaptação, quando foi identificada a posição inicial do embrião (figura 6) e reconhecidas suas características morfológicas, conforme tabela IV e figura 9.

Durante a observação foram quantificados:

- os tipos de movimentos apresentados pelo embrião;
- a frequência de cada tipo de movimento no período total e por minuto;
- o tempo total e parcial de movimentação, em minutos e segundos, obtido para cada embrião durante a observação, denominado tempo efetivo de movimento (TEM).

Foram utilizados dois cronômetros durante o estudo, sendo um para controlar o tempo de adaptação e de observação, e o outro para registrar o tempo efetivo de movimento do embrião. Todos os resultados foram registrados em ficha individual.

O registro de todos os embriões observados foi realizado através de filmagem em VHS, em uma filmadora marca Sony, modelo DXC-107A, acoplada ao estereomicroscópio com iluminação incidente fria, utilizando fitas de videocassete marca JVC (T-120SX).

Tabela III – Nome, simbologia e descrição de padrões motores do embrião de *Gallus domesticus* durante o desenvolvimento da atividade neuromuscular de E3 a E10

Nome	Símbolo	Descrição do padrão motor
Alavanca peduncular	AP	Movimento global do corpo, tendo como referência e alavanca o pedúnculo do corpo. Caracteriza-se pelo deslocamento do embrião para cima e logo em seguida para baixo, ou vice-versa, semelhante à trajetória de um dos lados da gangorra.
Bico	B	Movimento caracterizado pela abertura e fechamento do bico.
Cabeça	C	Movimento caracterizado pelo deslocamento da cabeça em qualquer direção, sem o auxílio de outra parte do corpo.
Céfalo-caudal	CC	Movimento caracterizado pelo deslocamento simultâneo, em sentidos opostos, da cabeça e da cauda, afastando-se da linha que determina o plano sagital do corpo.
Extensão	Ex	Movimento originado no tronco do embrião e caracterizado pelo afastamento simultâneo da cabeça e da cauda.
Extremidade inferior	EI	Movimento caracterizado pelo deslocamento lateral da cauda e parte inferior do embrião, afastando-se da linha mediana que determina o plano sagital do corpo.
Membro inferior	MI	Movimento caracterizado pelo deslocamento do MI em qualquer direção, sem o auxílio de outra parte do corpo.
Membro superior	MS	Movimento caracterizado pelo deslocamento do MS em qualquer direção, sem o auxílio de outra parte do corpo.

Alavanca Peduncular (AP)	Bico (B)
Cabeça (C)	Céfalo-caudal (CC)

Legenda: Repouso Movimento Plano transversal Veia e artéria vitelínica

* Embrião com 96 horas de incubação (Adaptado de Arey, 1974)

Figura 7 - Nome, simbologia e representação de movimentos corpóreos de alavanca peduncular (AP), bico (B), cabeça (C) e céfalo-caudal (CC) do embrião de *Gallus domesticus*

Extensão (Ex)	Extremidade Inferior (EI)
Membro Inferior (MI)	Membro Superior (MS)

Legenda: Repouso Movimento Plano sagital Eixo central

* Embrião em E7 (adaptado de Arey, 1974)

** Embrião em E4 - vista frontal (adaptado de Patten, 1951)

Figura 8 - Nome, simbologia e representação de movimentos corpóreos de extensão (Ex), extremidade inferior (EI), membro inferior (MI) e membro superior (MS) do embrião de *Gallus domesticus*

3.2.4. Análise de características morfológicas do embrião

Foi possível caracterizar o período de desenvolvimento dos embriões nas modalidades experimentais estudadas, através da observação de certas características morfológicas nos diferentes dias embrionários, com base na tabela IV e figura 9.

O embrião de galinha até o final do 3º dia de desenvolvimento, a nível morfológico, apresenta evidente: os botões dos membros, a pigmentação acinzentada do olho, a rotação do corpo completada, assim como a flexura cervical acentuada e o dobramento para frente do botão caudal. No 4º dia, os botões dos membros alongam-se, as cinco vesículas e os hemisférios cerebrais são evidentes, as flexuras pronunciam-se dando ao corpo o formato de um C, aparecendo a vesícula óptica mais pigmentada (Hamburger & Hamilton, 1951; Patten, 1951; Arey, 1974; Goodrum & Jacobson, 1981; Flynn et al, 1991; Männer et al, 1993).

No 5º dia embrionário são evidentes as juntas do cotovelo e do joelho, e uma pequena projeção do bico do embrião. No 6º dia o membro anterior dobra na junta do cotovelo e no 7º dia ocorre o dobramento da perna no joelho, apresentando-se bem demarcados os três segmentos de braços e pernas. Já aos 8 dias de desenvolvimento a mandíbula alcança a ponta do bico, e o pescoço bem alongado separa a cabeça do tórax. Durante o 9º e 10º dia embrionário, é evidente um aumento pronunciado dos segmentos distais dos membros, com o aparecimento em E10 de garras alongadas nos dedos do pé do embrião (Hamburger & Hamilton, 1951; Searls, 1990).

Tabela IV – Características morfológicas do embrião de *Gallus domesticus* no período do 3º ao 10º dia embrionário

Característica morfológica	Dia Embrionário							
	3	4	5	6	7	8	9	10
Botão dos membros		X						
Braço dobra no cotovelo				X				
Corpo c/ formato em C		X						
flexura cervical	X							
Junta do cotovelo			X					
Junta do joelho			X					
Membros (superior e inferior)			X					
Perna dobra na junta-joeelho					X			
Pescoço						X		
Rotação completa do corpo	X							
Segmentos distais dos membros							X	
Segmentos distais dos membros(garras)								X

3.2.5. Análise biométrica dos embriões

Após os procedimentos experimentais, os embriões foram cuidadosamente removidos do ambiente interno do ovo por meio de uma pinça e colher e colocados em uma placa de petri com solução de Ringer para limpeza, e fixados em formol a 10% e conservados em álcool. Os embriões foram pesados (g) em uma balança eletrônica de precisão, marca Marte (0,00) e medidos no comprimento céfalo-caudal (mm) através do paquímetro, sendo os dados registrados na ficha individual.

3.2.6. Análise descritiva e inferencial dos resultados

Em cada grupo experimental, os resultados relativos à biometria foram sumariados, através de média e desvio-padrão, o mesmo ocorrendo para análise do tipo e da frequência dos padrões de movimentos corpóreos.

Para comparar a distribuição do tempo efetivo de movimento (TEM) entre os grupos experimentais (G2, G3, G5, G7, G8), foi aplicada a ANOVA, com um Nível de Significância $p = 0,05$.

Foi utilizado o Teste de Levene para verificar a Homocedasticidade (Nível de Significância $\alpha = 0,05$) das variâncias entre os grupos G3 e G5 (fatores físicos), e também entre os grupos G7 e G8 (fatores químicos). No último caso também foi necessário aplicar o Teste de Normalidade.

A análise estatística inferencial, aplicada em relação a TEM, para rejeitar a Hipótese nula (H_0) ou aceitar a experimental (H_1), entre os grupos G3 e G5 (fatores físicos) e G7 e G8 (fatores químicos), foi o teste não-paramétrico U de Mann Whitney, sendo as diferenças consideradas significativas quando $\alpha = 0,05$ (Siegel, 1975; Costa Neto, 1977).

Figura 9 – Embriões de *Gallus domesticus* representando os padrões característicos da morfologia do 3º ao 10º dia embrionário. (Adaptado de Hamburger & Hamilton, 1992)

4. RESULTADOS

No presente estudo foram manuseados ao todo 336 embriões, distribuídos nas diferentes modalidades experimentais. Para obtenção deste número, utilizou-se o procedimento da reposição de ovos, sempre que os mesmos não se apresentavam em condições de análise, sendo necessária incubar no total 502 ovos. Deste número, 8,2% não estavam fertilizados e 24,9% foram descartados, sendo 7,8% por aderência do embrião à casca no momento da abertura do ovo e 17,1% por morte do embrião antes do período de observação.

4.1. Análise das características morfológicas dos embriões de G1 a G8

Os embriões que apresentaram características morfológicas próprias da sua idade embrionária foram considerados normais (Tabela IV e Figura 9), enquanto aqueles, onde as características morfológicas eram de idades inferiores e superiores, foram considerados atrasados e adiantados, respectivamente (Tabela V).

Tabela V - Percentagem média de embriões de *Gallus domesticus* em relação ao desenvolvimento morfológico, por grupo de incubação.

Morfologia	Grupo de Incubação							
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
Atrasada	-	-	100	100	-	-	4,2	-
Normal	100	100	-	-	27,1	10,4	95,8	95,8
Adiantada	-	-	-	-	72,9	89,6	-	4,2

Os embriões incubados em temperatura normal mostraram níveis de desenvolvimento adequados para o estudo no seu grupo de incubação específico, enquanto os dos grupos G3 e G4, conforme nossos registros, apresentavam de 1½ a 2 dias de atraso no desenvolvimento, e os grupos G5 e G6 tiveram seu desenvolvimento acelerado por temperaturas altas, apresentando em sua maioria, características morfológicas de 1 a 2 dias à frente da sua idade (Tabela V).

4.2. Análise biométrica dos embriões

Os resultados registrados em relação a peso corporal e comprimento céfalo-caudal indicaram que os embriões incubados nas diversas modalidades experimentais sofreram alterações decorrentes principalmente da temperatura de incubação. Os dados apresentados nas tabelas VI e VII mostram que nos embriões incubados em temperatura normal, as medidas de peso e comprimento céfalo-caudal estão no padrão esperado, o mesmo não ocorrendo com os embriões incubados em temperatura baixa (G3 e G4) e temperatura alta (G5 e G6), que apresentaram essas medidas modificadas, no caso dos primeiros abaixo e o segundo acima do padrão normal estabelecido. Observou-se que especificamente nesses grupos os resultados foram equivalentes, permanecendo próximas às medidas entre G3 e G4, assim como também entre G5 e G6 (Tabela VI e VII)

Tabela VI – Média (m) de peso corporal (g) de embrião de *Gallus domesticus* do 3º ao 10º dia, por grupo de incubação

E	Média de peso corporal (g)							
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
3	0,02	0,02	0,01	0,01	0,03	0,04	0,03	0,02
4	0,02	0,04	0,04	0,04	0,05	0,04	0,06	0,05
5	0,15	0,12	0,06	0,05	0,14	0,46	0,13	0,16
6	0,27	0,24	0,09	0,10	0,43	0,57	0,31	0,37
7	0,45	0,59	0,23	0,35	0,78	0,77	0,63	0,90
8	1,16	1,13	0,40	0,64	1,39	1,41	0,99	1,51
9	2,26	1,47	0,95	1,07	2,45	2,33	1,96	2,16
10	2,88	2,79	1,58	2,17	3,03	3,37	2,70	3,35

Tabela VII – Média (m) do comprimento céfalo-caudal (mm) de embrião de *Gallus domesticus* do 3º ao 10º dia, por grupo de incubação

E	Média de comprimento céfalo-caudal (mm)							
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
3	5	5	3	4	4	6	6	5
4	7	6	5	6	7	10	7	7
5	10	10	7	8	11	20	10	11
6	14	12	9	10	15	20	15	17
7	16	17	14	13	21	23	20	22
8	21	22	15	18	26	28	24	27
9	30	24	20	21	32	32	29	30
10	36	28	23	24	32	35	34	38

Figura 10 – Embrião de *Gallus domesticus* no 6º dia de incubação, com atraso no desenvolvimento das características morfológicas; grupo 3

Figura 11 – Embrião de *Gallus domesticus* no 6º dia de incubação, com desenvolvimento acelerado das características morfológicas ; grupo 5.

4.3. Posição inicial do embrião

No grupo G2, os embriões permaneceram na posição P1 até E6. No 3º e 4º dia, ainda com pouco peso corporal, os embriões ficaram bem acima do vitelo, dispostos horizontalmente à membrana vitelínica, deitados sobre o lado esquerdo do corpo e na grande maioria dos casos, com a rotação completada e as flexuras evidentes. Apenas um embrião completou a rotação para o lado direito. Em E5 e E6, apesar do aumento progressivo no peso corporal (Tabela VI), os embriões do grupo G2 mantiveram a mesma posição, apresentando maior liberdade de movimentos. Em E7 e E8, os embriões assumiram uma posição intermediária (P2), com maior afundamento do corpo, dispondo de maior espaço no ovo para movimentos. Em E9 e E10, os embriões foram registrados em sua maioria na posição P3, com maior liberdade para movimentação dos membros, com um afundamento completo, repousando o corpo sobre o vitelo e dificultando sua visualização completa. Os membros do embrião apresentavam maior liberdade de movimentação (Figura 12).

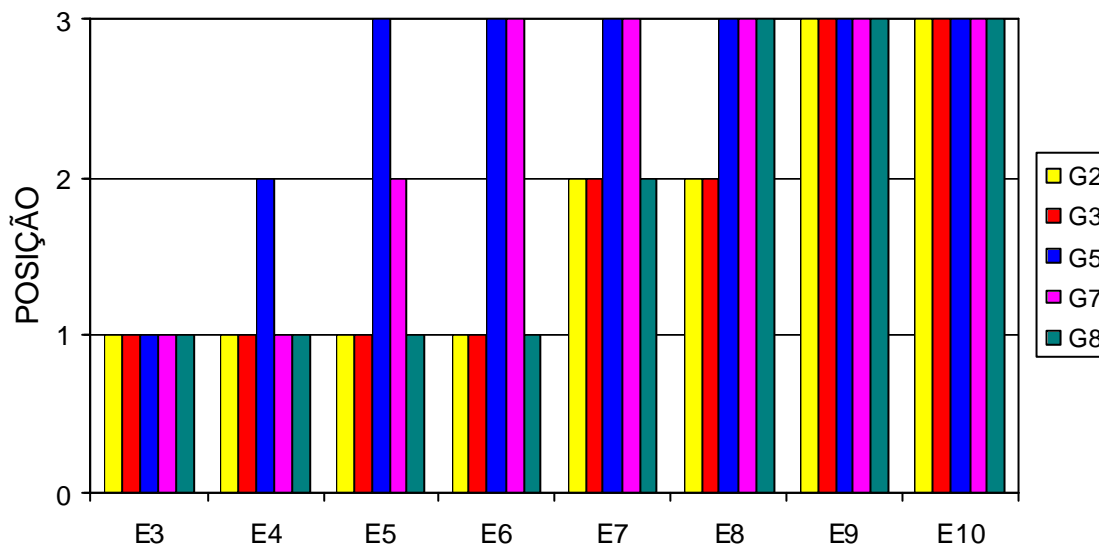


Figura 12 - Posição inicial do embrião de *Gallus domesticus*, de E3 a E10, nos grupos de G2 a G8

No 3º dia de incubação, os embriões dos demais grupos foram observados na posição P1, indicando ser comum a todos nessa idade. Já em E4, os embriões do grupo 5 assumiram a posição 2, ficando mais afundados, enquanto nos outros grupo a posição predominante permanece em P1. A partir do 5º dia os embriões do grupo G5 aprofundaram-se para P3, permanecendo nessa posição até E10. Os embriões dos demais grupos apresentaram variações em relação às idades anteriores até E8, sendo que no 9º e 10º dia praticamente todos se deslocam para a posição P3 (Figura 12).

Figura 13 – Posição alterada de embrião de *Gallus domesticus*, em E5

4.4. Descrição dos movimentos corpóreos do embrião

Foram caracterizados 8 tipos de movimentos corpóreos nos grupos, quantificados em relação a frequência, tempo, intensidade e período de manifestação, com padrões espaciais e temporais, diferenciados em função principalmente da idade do embrião e da influência de fatores físicos e químicos.

4.4.1. Padrões de movimentos corpóreos nos embriões do grupo 2

Os embriões de galinha doméstica, incubados sob condições adequadas de desenvolvimento, iniciaram seus movimentos no 4º dia e tiveram um aumento geral e gradativo da movimentação nas idades subseqüentes até E10 (Tabela VIII), apresentando 8 padrões motores diferentes.

Tabela VIII – Frequência e percentagens dos padrões de movimentos do embrião de *Gallus domesticus* de E4 a E8, no grupo 2

Movimentos	Médias de frequência dos movimentos (%)				
	E4	E5	E6	E7	E8
Ex	7,4 (100)	14,7 (44,1)	14,7 (40,5)	9 (14,3)	6,8 (6,9)
AP	-	9,8 (29,5)	13,7 (37,8)	17,3 (27,5)	9,7 (9,9)
CC	-	1,5 (4,5)	4,7 (12,9)	17 (26,9)	20,8 (21,4)
EI	-	7,3 (21,9)	3,2 (8,8)	8 (13,7)	9,5 (9,8)
MI	-	-	-	11,7 (18,6)	38,3 (39,4)
MS	-	-	-	-	12,2 (12,6)
totais	7,4 (100)	33,3 (100)	36,3 (100)	63 (100)	97,3 (100)

Observando os embriões em movimentação, pode ser realizada uma classificação funcional de acordo com a natureza e localização morfológica desses movimentos corpóreos em relação ao corpo. Os embriões analisados apresentaram movimentos com características globais (MGI), axiais (MAx) e segmentares (MSg), possibilitando a apresentação dos resultados expressos na Figura 14.

Os primeiros movimentos realizados pelo embrião envolveram a musculatura axial, sendo seguidos de movimentos globais e, após, segmentares (Tabela VIII). A partir de E9 aparece o movimento segmentar de cabeça e em E10 o de bico.

MS	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MI	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
EI	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Ex	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
C	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AP	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
E	4	5	6	7	8	9	10

Legenda: MGI; MAx; MSg;

Figura 14 - Manifestação de MGI(globais), Max(axiais) e MSg(segmentares) no desenvolvimento embrionário de *Gallus domesticus* do grupo 2, de E4 até E10

Até o 7º dia, em todos os embriões observados, a movimentação predominante iniciou-se a partir dos músculos de tronco e pescoço, movimentando quase sempre todo o corpo. A partir de E7-E8, ao mesmo tempo em que os

movimentos globais e axiais diminuíram, os segmentares aumentaram, chegando a E10 com 85,7% da movimentação total, havendo até o final desse período o predomínio dos movimentos da musculatura segmentar ou de regiões anatômicas de extremidade, principalmente aqueles executados pelos membros superiores, inferiores, cabeça e bico (figura 14).

Tabela IX – TEM total, TEM por minuto, movimentos por minuto (MP/M) e duração média de cada movimento (DMM) em embriões de *Gallus domesticus* de E4 a E10, no grupo 2

E	Médias de movimento			Media MP/M (desvio padrão)
	TEM	TEM p/ minuto	DMM	
4	7s49	0s83	0s83	0,8 ($\pm 0,1$)
5	1m16s32	8s22	1s71	3,7 ($\pm 0,2$)
6	1m36s95	10s76	2s30	4,1 ($\pm 1,24$)
7	2m08s49	14s27	1s98	7,1 ($\pm 1,16$)
8	2m15s19	15s01	1s31	11 ($\pm 4,11$)
9	4m10s42	27s82	-	-
10	4m16s60	28s51	-	-

Os resultados relacionados ao tempo de movimentação do embrião no grupo 2 (Tabela IX) evidenciaram aumentos de um dia para o outro, mas de maneira não linear. As maiores variações ocorreram a cada dois dias, sendo que em E3 e E4 os embriões quase não realizaram movimentos; em E5 e E6 apresentaram uma movimentação um pouco maior, em E7 e E8 o tempo de movimento dos embriões

aumentou consideravelmente e, em E9 e E10 os embriões praticamente dobraram o tempo de movimentação em relação ao período anterior.

Conforme consta da Tabela IX, no período do 4º para o 6º dia de desenvolvimento, o embrião aumentou progressivamente o número de movimentos por minuto e a duração individual de cada um, indicando movimentos lentos, podendo chegar a 2s30 (E6). A partir de E7 os embriões quase duplicaram a frequência média dos movimentos por minuto em relação a E6, diminuindo gradativamente o tempo de duração individual do movimento.

Durante a sessão de registro, independente da idade embrionária, alguns movimentos corpóreos foram mais lentos como, por exemplo, o de alavanca peduncular.

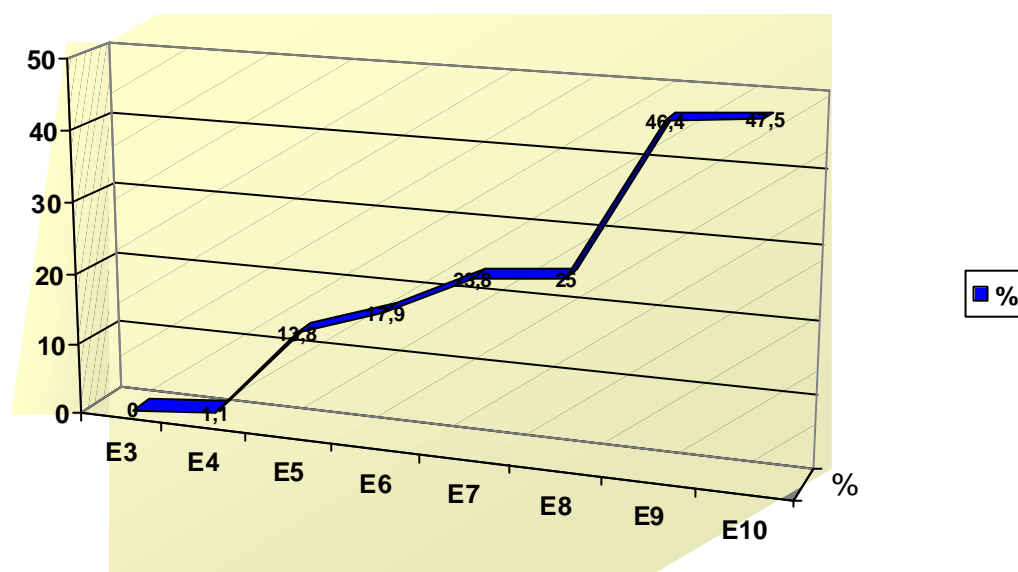


Figura 15 - Tempo médio de movimentação durante a vida embrionária de *Gallus domesticus* de E4 até E10

Em relação ao tempo, a movimentação embrionária no grupo 2, apresentou um aumento progressivo no 4º dia embrionário, quando correspondeu a 1,1% do tempo total dessa idade, até E10, com 47,5% (Figura 15).

Outro fator observado no grupo 2, relacionado a um critério qualitativo, foram as variações ocorridas na intensidade dos movimentos realizados pelo embrião. A tabela X apresenta estes resultados, evidenciando a tendência até E8 do movimento AP (movimento global) ser mais vigoroso, e a partir de E9, os movimentos segmentares (C, MI, MS) terem mais intensidade (moderado e vigoroso).

Tabela X – Intensidade dos movimentos em embriões de *Gallus domesticus* de E4 a E10 no grupo 2

Tipo	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
AP		+	+++	+++	+++	++	
B							+
C						+++	++
CC		+	++	++	++	++	
Ex	+	++	+	+	+	++	+
EI		+	++	+	+	+	
MI				+	++	+++	+++
MS					+	++	++

Intensidade: (+) fraco (++) moderado (+++) vigoroso

Tipos de movimentos corpóreos do embrião

Os movimentos corpóreos do embrião registrados tiveram variações espaciais e temporais, caracterizando-se por tipos, descritos a seguir:

- **Movimento de Extensão (Ex):** Este movimento foi o primeiro a manifestar-se no 4º dia embrionário (Tabela VIII), com poucas repetições e intervalos prolongados entre um movimento e outro. Até E6 manifestou-se com médias de frequência elevadas no embrião, decaindo até E10. Iniciou lento em E4, aumentando em intensidade e rapidez até E10. Observou-se que este movimento esteve presente em todos os dias em que o embrião movimentou-

se. Nos dias iniciais em que se manifestou, sua amplitude foi dependente do nível de espaço que o embrião possuía em relação às membranas extra-embriônicas no ovo. Alguns embriões, em E4 e E5, ao executarem este movimento, desencadearam uma ondulação no tronco, no sentido céfalo-caudal e em E5 terminaram com o movimento de EI.

- **Movimento de Alavanca Peduncular (AP):** a presença desse movimento ocorreu pela primeira vez em E5 estendendo-se até E9. Uma característica marcante foi o deslocamento rítmico de todo o corpo para cima e para baixo, apresentando-se com intensidade e rapidez variável conforme a idade e também o próprio embrião, em relação às condições de espaço no ovo. Caracterizou-se também com maior amplitude sempre que o embrião esteve na posição 2 e 3, ficando mais solto em relação à membrana vitelínica e demais estruturas do ovo. Em alguns embriões este movimento foi tão amplo e vigoroso que sua trajetória circundou o pedúnculo. Com o aumento gradativo na sua frequência até E7, seu desempenho em relação aos outros movimentos no período diminuiu, até desaparecer em E9. Ele foi realizado simultaneamente com outros movimentos, principalmente no período E7-E8, indicando uma característica dissociativa (Tabela VIII).
- **Movimento Céfalo-caudal (CC):** Este movimento iniciou em E5 com uma participação pequena na movimentação embrionária, e aumentou gradativamente, apresentando maior expressão em E7 e E8. Observou-se que o padrão de execução de CC é complexo, com a participação de várias partes do corpo, como cabeça, pescoço, tronco e cauda, sempre para ambos os lados, e sua realização lembra um arco retesado. Em geral manifestou-se moderado, ocorrendo muitas vezes simultâneo com outros movimentos (Tabela VIII). Quando executado indicou um padrão de repetição idêntico no mesmo embrião (E7-E9).

A

B

C

Figura 16 – Representação do movimento de alavanca peduncular, na seqüência A, B e C, de embrião de *Gallus domesticus*, no 6º dia de incubação

- **Movimento de Extremidade Inferior (EI):** Este movimento caracterizou-se por um padrão semelhante ao “rabear”, executado com a musculatura abdominal e lombar do tronco e foi registrado no período de E5 a E9 (tabela VIII). No 5º dia embrionário apresentou-se fraco e lento, aumentando posteriormente em intensidade (Tabela X) e rapidez (E6). Embriões observados na posição 2 e 3 realizaram EI com maior amplitude, em função de permanecerem mais livres em relação às estruturas do ovo. Não foi observado um padrão na manifestação desse movimento.
- **Movimento de Membro Inferior (MI) / Membro Superior (MS):** O início dos movimentos de membro inferior e membro superior foi registrado em E7 (MI) e E8 (MS), respectivamente, estendendo-se até E10. O movimento de MS foi limitado no início, intensificando-se posteriormente. Os primeiros movimentos de MI foram lentos e fracos, executados de forma localizada, apenas pela região do membro inferior abaixo do joelho, apresentando autonomia segmentar, e aumentando a intensidade gradativamente. Em E8-E9 observou-se que MI foi de aproximação e afastamento, em relação ao corpo, com os dois membros conjuntamente. O padrão de movimentos alternados dos membros inferiores iniciou no 10º dia embrionário, e foi semelhante ao caminhar. Nesse dia a ampla movimentação de MI foi limitada pela falta de espaço dentro do ovo. Estes padrões observados e descritos se alternaram com movimentos de MI vigorosos, rápidos, em todas as direções, sem padrão espacial definido e simultâneo com outros movimentos. A soma da frequência de MI e MS em E8 representou 52% do total de movimentos nesse dia (Tabela VIII), indicando um crescimento em relação aos outros movimentos corpóreos.
- **Movimento de bico (B):** Caracterizou-se por um abrir e fechar do bico e foi registrado no embrião durante o 10º dia de incubação. Nessa idade, a mandíbula já bem desenvolvida, encosta na ponta do bico, caracterizando sua

execução. Movimento com pouca intensidade e frequência, quase sempre se apresentou junto ou imediatamente depois do movimento de cabeça. Apenas dois embriões apresentaram o movimento em E10.

- **Movimento de Cabeça (C):** Este movimento foi registrado como padrão motor do embrião somente no 9º e 10º dia embrionário, e caracterizou-se por um movimento rápido, vigoroso, repetitivo, sem um padrão temporal definido, em todas as direções e dissociado de outros movimentos. Sendo o embrião nessa idade bem desenvolvido, muitas vezes encostou a cabeça nos membros inferiores durante o movimento de ambos.

Movimentos corpóreos por dia embrionário

Os movimentos corpóreos dos embriões em G2, descritos anteriormente, apresentaram características peculiares, quando analisados em relação a toda movimentação embrionária em cada dia específico. Assim como ocorreu na tipologia dos movimentos, cada dia embrionário apresentou determinados padrões de movimentação, conforme os critérios estabelecidos nesse estudo (tipo, frequência, tempo, intensidade), sendo necessário analisá-los conjuntamente.

3º dia embrionário

Não foram registrados movimentos corpóreos, com exceção apenas de movimentos provocados por batimentos cardíacos.

4º dia embrionário

A movimentação do embrião foi quase ausente, manifestando-se através de poucos movimentos de extensão, originados no tronco, sem muita intensidade (Tabela X) e com poucas repetições durante o tempo de observação (Tabela VIII), caracterizando-se como um período de grande inatividade. Observou-se que o embrião encontrou resistência por parte de estruturas no ovo, como a membrana e a vascularização vitelínica, chegando a ficar algumas vezes “espremido” ou “preso” nessas estruturas. Apresentou uma frequência média inferior a um movimento por minuto (Tabela IX).

5º dia embrionário

O embrião apresentou um repertório maior de movimentos, com 4 diferentes padrões. A ocorrência desses padrões indicou a predominância da movimentação do tronco, em função dos movimentos axiais e globais. O movimento de extensão ocorreu com a maior frequência e predominou nos embriões, seguido do movimento de alavanca peduncular (Tabela VIII). O embrião nesse dia movimentou-se mais, em relação ao tempo total de registro, apresentando um número maior de movimentos por minuto (Tabela IX).

6º dia embrionário

O embrião nessa idade não apresentou tipos de padrões motores diferentes em relação à idade anterior alterando, no entanto, a frequência média de cada um. Observou-se mais uma vez a predominância dos movimentos de extensão, porém com menor frequência e mais rápido, sendo marcante em todos os embriões desse grupo, seguido de um aumento na frequência do movimento de alavanca peduncular (Tabela VIII), mais vigoroso (Tabela X) e que ocorreu também em

função do “afrouxamento” e da diminuição da resistência exercida pelas estruturas do ovo.

7º dia embrionário

No 7º dia o embrião apresentou 5 padrões motores, com o início dos movimentos dos membros inferiores e a diminuição marcante na frequência do movimento de extensão. O padrão de alavanca peduncular, muito vigoroso (Tabela X), foi observado com a maior frequência em praticamente todos os embriões nesse dia, sendo seguido do movimento céfalo-caudal (Tabela VIII).

Os movimentos de membro inferior registrados apresentaram-se fracos (Tabela X) e pouco frequentes (Tabela VIII), sendo observados com um padrão motor que envolveu a articulação do joelho, movimentando-se com a parte mais distal do membro, de forma assincrônica.

O tempo efetivo de movimento do embrião quase duplicou, em relação ao período anterior, havendo um aumento no número de movimentos por minuto, e uma diminuição na duração média de cada um, indicando movimentos mais rápidos que em outras idades (Tabela IX), sendo também os movimentos dissociados e simultâneos.

8º dia embrionário

Os embriões modificaram acentuadamente o padrão dos movimentos, apresentando uma diversificação maior no repertório motor desse período, com 6 tipos diferentes, podendo ser observado uma diminuição considerável na frequência da movimentação geral e da musculatura de tronco, um aumento nos movimentos dos membros inferiores e a ocorrência dos movimentos de membro superior (Tabela VIII).

O movimento de membro inferior teve uma frequência maior que a dos outros movimentos, manifestando-se em geral sem uma organização temporal e espacial definida, indicando somente um padrão seqüencial de aproximação-afastamento da porção proximal do membro (os dois segmentos executam simultaneamente) com a região abdominal do corpo. Os movimentos de membro superior e inferior, somados, totalizaram 52,2% da frequência total desse dia, indicando um padrão acentuado de movimentos segmentares (Tabela VIII).

Os dados registrados em E8 mostram um aumento na velocidade dos movimentos do embrião, sendo mais rápidos (Tabela IX), indicando um padrão mais acentuado de dissociação e simultaneidade na sua realização.

9º dia embrionário

O embrião apresentou o maior número de padrões motores em relação aos outros dias estudados, manifestando além dos movimentos relacionados na Tabela VIII, o movimento autônomo da cabeça, independente de outras partes do corpo.

Os movimentos segmentares predominaram, apresentando-se mais vigorosos e o movimento de alavanca peduncular diminuiu consideravelmente sua intensidade (Tabela X). O movimento de membro inferior apresentou de forma acentuada um padrão de flexão-estiramento, nos dois segmentos simultaneamente, enquanto, e o registro nas fitas de vídeo mostrou movimentação aleatória, sem um padrão temporal definido. O tempo de movimentação nesse dia praticamente dobrou em relação ao dia anterior (Tabela IX).

10º dia embrionário

Nesse dia foram registrados 5 padrões motores, com a manifestação do movimento de bico e grande predominância dos movimentos segmentares (C, MI,

MS). A movimentação do embrião no período foi considerada intensa (Tabela X). No movimento de membro inferior foi observado um padrão motor de seqüência alternada entre um membro e outro, semelhante à marcha.

Os registros em vídeo indicam a presença do movimento de extensão em todos os embriões analisados nesse dia, porém fracos (Tabela X).

A média de tempo de movimento total nesse dia foi o mais alto, registrando 4m16s60 por embrião, e 28s51 de TEM por minuto (Tabela IX).

Os movimentos em E10 já foram executados com uma certa limitação no espaço interno do ovo, devido ao tamanho do corpo do embrião.

4.4.2. Movimentos corpóreos do embrião sob a ação de fatores físicos

Dois grupos experimentais de embriões de *Gallus domesticus*, o G3 e o G5 (Tabela I), foram sujeitos às variáveis, temperatura baixa (G3) e temperatura alta (G5), caracterizadas como alteração de fatores físicos.

Os resultados de cada grupo experimental são apresentados individualmente, comparando-os em seguida em relação à tipologia de movimentos, tempo de movimentação e tempo efetivo de movimento, procurando estabelecer inferências em relação aos dois grupos.

GRUPO 3

Os embriões do grupo 3 apresentaram uma redução geral nas frequências dos movimentos, um retardamento na ocorrência e uma diminuição na intensidade de movimentação, em relação ao grupo 2 (controle – padrão de movimento).

O tempo efetivo de movimento (TEM) nos embriões submetidos ao tratamento experimental com baixa temperatura de incubação, apesar de não apresentarem diferenças significativas em relação a G2 ($\alpha \leq 0,05$), evidenciaram valores menores na distribuição de suas médias (Figura 25). Além dessas modificações, os embriões desse grupo expressaram várias alterações na manifestação específica de cada tipo de movimento nos diversos dias embrionários (Figura 17).

Tabela XI – Frequência e percentagens dos padrões de movimentos do embrião de *Gallus domesticus* de E5 a E9, no grupo 3

Movimento	Médias de frequência dos movimentos (%)				
	E5	E6	E7	E8	E9
Ex	17,3 (94,5)	14,7 (71,7)	12,2 (32,2)	12,3 (23,2)	7,6 (12,4)
AP	1 (5,5)	2,8 (13,6)	13,3 (35,1)	30,3 (57,1)	36,6(59,8)
CC	-	0,8 (3,9)	3,7 (9,8)	6,8 (12,8)	16 (26,2)
EI	-	2,2 (10,8)	8,7 (22,9)	3,7 (6,9)	1 (1,6)
Totais	18,3 (100)	20,5 (100)	37,9 (100)	53,1 (100)	61,2 (100)

Neste grupo, os embriões iniciaram seus movimentos no 5º dia com uma pequena frequência média por embrião. Observou-se nesse grupo que grande parte da movimentação limitou-se aos padrões de AP e Ex, onde somados, manifestaram percentuais de frequência sempre altos, acima de 70%, de E5 a E9. Outros movimentos destacaram-se de maneira isolada, como EI no 7º dia e CC no 9º dia.

De maneira geral, o padrão motor de extensão no grupo 3 foi normal, predominando no primeiro dia e diminuindo gradativamente nos dias posteriores, mas aumentando sua intensidade (Tabela XIII). Por outro lado, o movimento de

alavanca peduncular iniciou com pouca frequência e intensidade fraca, aumentando progressivamente (tabela XI e XIII).

Os embriões do grupo 3 evidenciaram alterações no padrão dos movimentos segmentares em relação ao G2, ocorrendo seu início no 10º dia com a presença de movimentos de cabeça, membro inferior e superior, com características um pouco mais rápidas que os outros movimentos desse dia. Em E10, com exceção do movimento de bico (B), manifestaram-se todos os padrões motores (Figura 17), não sendo possível, em função da simultaneidade e rapidez, registrar a frequência dos movimentos.

Nos registros realizados observou-se que, até o 6º dia, os embriões permaneceram presos às estruturas do ovo, como também à membrana vitelínica, tendo dificuldade para movimentar-se. Durante esse período, diversos embriões desse grupo, apresentaram movimentos de extensão, seguido de ondulação do tronco em direção à cauda.

Os embriões do grupo 3 apresentaram padrões temporais que evidenciam uma diminuição marcante no tempo médio de movimentação em relação a G2, a partir do 5º dia de desenvolvimento, registrando tempos de movimento muito baixos mas aumentando até E9 e diminuindo em E10. Os movimentos dos embriões incubados em baixas temperaturas foram mais lentos, com um número menor de movimentos por minuto e duração individual maior (Tabela XII).

Tabela XII– TEM total, TEM por minuto, movimentos por minuto (MP/M) e duração média de cada movimento (DMM) nos embriões de *Gallus domesticus* de E5 a E10, no grupo 3

E	Médias de tempo			MP/M (desvio padrão)
	TEM total	TEM p/ minuto	DMM	
5	17s88	1s98	0s99	2 (\pm 0,63)
6	27s03	3s	1s35	1,9 (\pm 1,09)
7	1m42s04	11s34	2s04	4,2 (\pm 2,85)
8	2m17s97	15s33	2s09	6 (\pm 3,59)
9	2m49s71	18s77	2s62	6,8 (\pm 2,32)
10	2m03s52	13s72	-	-

Analisando a distribuição das médias de tempo efetivo de movimento no grupo 3, em relação aos demais grupos experimentais, evidenciou-se diferenças significativas ($\alpha \leq 0,05$) em relação a G5, G7 e G8 (Figura 25).

Tabela XIII – Intensidade dos movimentos em embriões de *Gallus domesticus* de E5 a E10 no grupo 3

Movimento	E5	E6	E7	E8	E9	E10
AP	+	+	+	++	++	++
C						++
CC		++	++	++	++	++
Ex	+	+	++	++	++	+
EI		++	++	++		
MI						++
MS						+

Intensidade: (+) fraco (++) moderado (+++) vigoroso

O critério intensidade de movimentos corpóreos do embrião, observado durante o experimento no grupo 3, apresentou diversas variações em relação a G2, conforme resultados na tabela XIII. A principal evidência foi a tendência de todos os movimentos nesse grupo apresentarem-se fracos e moderados.

GRUPO 5

Modificações características no padrão normal de desenvolvimento morfológico (Tabela V) e motor foram registrados nos embriões desse grupo, indicando uma aceleração nos processos de desenvolvimento, com modificações específicas na manifestação e frequência (Tabela XIV), nos tempos (Tabela XV) e na intensidade (Tabela XVI) dos movimentos nos dias embrionários estudados.

Nos embriões incubados em temperaturas altas, os padrões motores manifestaram-se a partir do 4º dia embrionário, com o predomínio dos movimentos de extensão, acompanhado em pequena escala pelo movimento de alavanca peduncular. Até o 7º dia embrionário é bem característica a predominância dos movimentos globais (AP) que aumentaram gradativamente, e dos axiais que, ao contrário, diminuíram a ocorrência, com exceção do movimento céfalo-caudal (Tabela XIV). Em E7-E8 ficou bem caracterizada a simultaneidade e dissociação dos movimentos durante a sessão de registro.

A partir de E8, todos os movimentos de tronco e pescoço diminuíram, manifestando-se os movimentos segmentares (MI e MS) com 72,4% da movimentação do embrião (Tabela XIV), logo se ampliando em E9 com a ocorrência do movimento de cabeça e em E10 com o aparecimento do movimento de bico (Figura 17), formando um padrão específico dos movimentos segmentares para essa idade embrionária. Embriões no 9º dia embrionário apresentaram movimentos alternados dos membros inferiores, semelhantes a marcha.

Tabela XIV – Frequência e percentagens dos padrões de movimentos do embrião de *Gallus domesticus* de E4 a E8, no grupo 5

Movimento	Média de frequência de movimentos (%)				
	E4	E5	E6	E7	E8
Ex	12,3 (96,1)	8,8 (18,4)	5,7 (5,3)	4,3 (5,5)	3,7 (3,6)
AP	0,5 (3,9)	15,5 (32,4)	71,2 (66,3)	50,3 (65)	2,7 (2,6)
CC	-	2,3 (4,8)	15,2 (14,2)	20,5 (26,5)	22 (21,4)
EI	-	21,2 (44,4)	15,2 (14,2)	2,3 (3)	-
MI	-	-	-	-	37,7 (36,7)
MS	-	-	-	-	36,6 (35,7)
totais	12,8 (100)	47,8 (100)	107,3 (100)	77,4 (100)	102,7 (100)

A frequência de movimentação por embrião nas idades embrionárias do grupo 5 foi alta (Tabela XIV) em relação a G2, ultrapassando os padrões normais (Tabela VIII).

O aumento da temperatura de incubação (39°- 40°C) provocou uma alteração das estruturas internas do ovo, que juntamente com o aumento do peso corporal nesse grupo (Tabela VI), facilitou a maior ocorrência da posição corporal 3 (Figura 6), e a modificação de algumas características motoras.

Os resultados relacionados com o tempo de movimento e com o número médio de movimentos por minuto efetuados pelos embriões deste grupo, caracterizaram-se por um padrão quantitativo de maior movimentação geral (Tabela XV) em relação ao grupo 2, apesar que os resultados de Tempo Efetivo de Movimento (TEM) em G5, comparados ao controle (G2), não apresentaram diferenças significativas na distribuição das médias ($\alpha \leq 0,05$). Por outro lado, em relação aos resultados de TEM dos grupos experimentais G3 e G8, as médias apresentaram diferenças a um nível de significância de 5% (Figura 25).

Tabela XV – TEM total, TEM por minuto, movimentos por minuto (MP/M) e duração média de cada movimento (DMM) nos embriões de *Gallus domesticus* de E4 a E10, no grupo 5

E	Médias de tempo			MP/M (desvio padrão)
	TEM total	TEM p/ minuto	DMM	
4	11s17	1s18	0s90	1,4 (± 0,47)
5	1m14s83	8s31	1s59	5,2 (± 1,59)
6	4m14s90	28s32	2s13	11,9 (± 5,38)
7	3m51s25	25s69	2s58	8,6 (± 4,22)
8	2m46s85	18s57	1s44	13,1 (± 2,17)
9	3m03s	20s33	-	-
10	4m06s86	27s43	-	-

No 6º dia de desenvolvimento, foi registrado o maior tempo de movimentação embrionária nos embriões incubados em temperatura alta, caindo gradativamente em E7-E8, e tornando a aumentar até E10. A média de movimentos por minuto no grupo 5 apresentou-se alta em todas as idades embrionárias, aumentando acentuadamente do 4º para o 8º dia de desenvolvimento. Da mesma forma os embriões de G5 apresentaram características próprias em relação à duração individual de cada movimento, indicando uma diminuição cada vez maior no tempo para sua realização (Tabela XIV), mostrando maior rapidez na execução dos padrões motores.

O critério intensidade de movimentos corpóreos do embrião, observado durante o experimento no grupo 5, apresentou poucas alterações em relação a G2, conforme resultados na tabela XVI. Uma das evidências foi a

execução de todos os movimentos embrionários, já em E5, apresentar intensidade moderada, diferenciando do padrão estabelecido no grupo controle (G2).

Tabela XVI – Intensidade dos movimentos em embriões de *Gallus domesticus* de E4 a E10 no grupo 5

Tipo	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
AP	+	++	+++	+	+		
B							+
C						++	+++
CC		++	++	+++	++		
Ex	+	++	++	+	+	+++	
EI		++	++	++			
MI					++	+++	+++
MS					++	+++	+++

Intensidade: (+) fraco (++) moderado (+++) vigoroso

4.4.2.1. Comparação dos movimentos corpóreos em embriões do G3 e G5

Iniciando a movimentação no 5º dia, observou-se nos embriões do grupo 3 que os padrões motores predominantes em todos os dias estudados até E10 envolveram a musculatura de tronco e pescoço (MAx, MGI), sendo bem menor a manifestação dos movimentos segmentares. Nos embriões do grupo 5 ocorreu o contrário, aparecendo, já no 4º dia, movimentos axiais e globais, enquanto os movimentos segmentares ocorreram em E8 (Figura 17).

MS								
MI								
EI								
Ex								
CC								
C								
B								
AP								
E	4	5	6	7	8	9	10	

Legenda: **G3**; **G5**

Figura 17 - Manifestação dos padrões de movimentos em embriões de *Gallus domesticus*, de E4 a E10, nos grupos 3 e 5

Nos embriões em que a temperatura de incubação foi inferior às condições normais (grupo 3), foram registrados 7 padrões motores durante o desenvolvimento, cada um apresentando características diferentes do grupo controle (G2). Por outro lado, os embriões incubados com a temperatura superior (grupo 5), apresentaram 8 padrões de movimentos, sendo todos com modificações específicas em relação ao grupo padrão (Figura 17).

A manifestação dos padrões relacionados ao tempo de movimentação geral, apresentou resultados específicos para os embriões dos grupos 3 e 5. Em relação à influência da temperatura baixa de incubação (G3), registrou-se tempos reduzidos de movimentação em praticamente todos os dias embrionários. Por outro

lado, nos embriões incubados em temperatura alta (G5), foram registrados tempos de movimentação altos do 4º ao 8º dia, diminuindo em E9 e E10 (Figura 18).

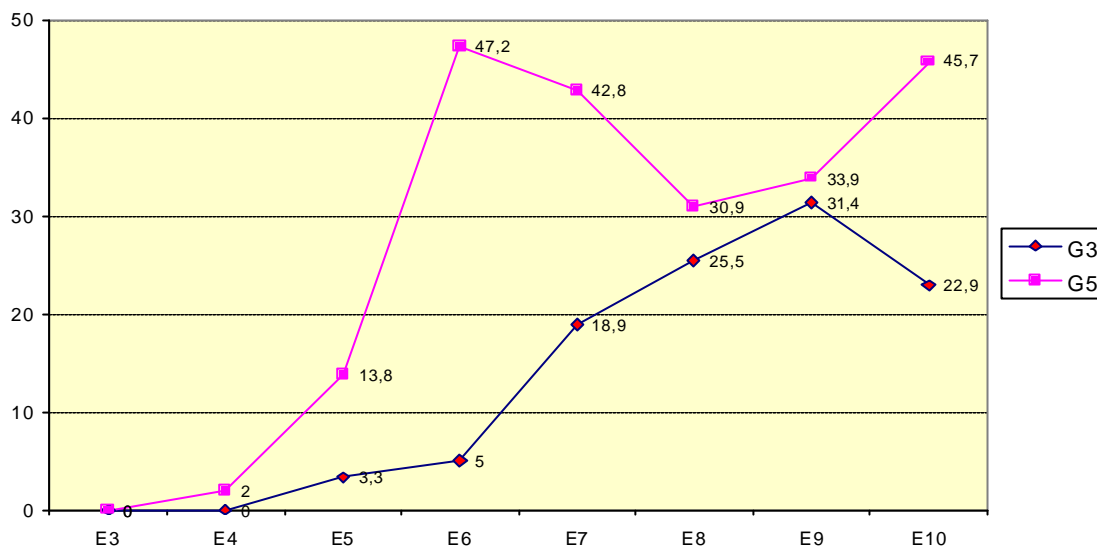


Figura 18 - Percentuais médios de tempo de movimentação durante a vida embrionária de *Gallus domesticus* até E10 em G3 e G5

Obteve-se uma média de movimentação geral em cada grupo, sendo que os embriões expostos a temperaturas inferiores (G3) e temperaturas superiores (G5), movimentaram-se em média durante 13,4% e 27% respectivamente do tempo total no período embrionário do 3º ao 10º dia de desenvolvimento.

O tempo efetivo de movimento (TEM) apresentado pelos embriões do grupo 3 e do grupo 5, foi testado para verificar a existência de diferenças significativas entre os tratamentos experimentais com temperatura baixa e alta, respectivamente.

Para estabelecer inferências em relação ao Tempo Efetivo de Movimento dos grupos experimentais G3 e G5, cuja variável foi o fator físico temperatura, considerou-se as seguintes hipóteses:

- **H₀**: Os resultados obtidos de TEM nos grupos G3 e G5, independem do tratamento experimental.

- **H1**: O tratamento experimental nos grupos G3 e G5 influenciou o resultado de TEM.

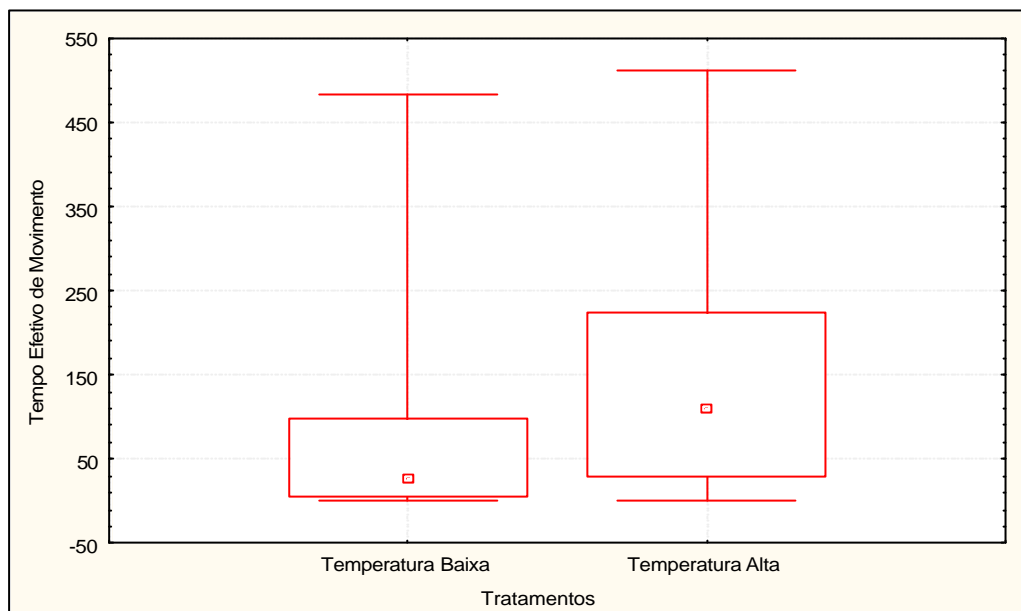


Figura 19 - Distribuição do tempo efetivo de movimento nos embriões do G3 (temperatura baixa) e G5 (temperatura alta)

Para definição do teste a ser aplicado na inferência, foi necessário verificar a homocedasticidade das variâncias em G3 e G5, utilizando-se o teste de Levene. O resultado demonstrou que a variável não é homocedástica, apresentando variâncias diferentes nos tratamentos de fatores físicos. Em função disso o teste inferencial mais indicado para o caso de apenas dois grupos de dados é o Teste U de Mann-Whitney (Nível de Significância $\alpha = 0,05$).

Comparando o nível de significância adotado para a pesquisa ($\alpha = 0,05$) com p-valor calculado que foi 0,00204, levando-se em consideração que o teste é bilateral, rejeita-se a hipótese H_0 , afirmando que existe diferença significativa nos valores obtidos de tempo efetivo de movimento entre os embriões tratados com temperatura baixa (G3) e temperatura alta (G5).

4.4.3. Movimentos corpóreos do embrião sob a ação de fatores químicos

Dois grupos experimentais de embriões de *Gallus domesticus*, o G7 (controle do G8) e o G8 (Tabela I), foram sujeitos às variáveis, injeção de salina (G7) e injeção de serotonina (G8), caracterizados como alteração de fatores químicos.

A seguir, os resultados de cada grupo experimental são apresentados, estabelecendo-se relação entre a tipologia de movimentos, tempo de movimentação e tempo efetivo de movimento, procurando estabelecer inferências em relação aos dois grupos.

GRUPO 7

No grupo 7 os movimentos iniciaram no 4º dia embrionário, com a ocorrência do movimento de extensão, enquanto os movimentos globais de alavanca peduncular foram registrados a partir do 5º dia de desenvolvimento. Já os movimentos segmentares iniciaram em E8 com frequência média de 52,5% (Tabela XVII).

Tabela XVII – Frequência e percentagens dos movimentos de embriões de *Gallus domesticus* de E4 a E8, no grupo 7

Movimento	Média de frequência dos movimentos (%)				
	E4	E5	E6	E7	E8
Ex	11,8 (100)	12 (30,4)	3,3 (4,7)	5,7 (8,1)	4,1 (3,9)
AP	-	11,3 (28,6)	44,2 (62,5)	54,3 (76,8)	18,2 (17,7)
EI	-	16,2 (41)	23,2 (32,8)	-	7,5 (7,3)
CC	-	-	-	10,7 (15,1)	19 (18,6)
MI	-	-	-	-	34,3 (33,4)
MS	-	-	-	-	19,6 (19,1)
Totais	11,8 (100)	39,5 (100)	70,7 (100)	70,7 (100)	102,7 (100)

Os movimentos de extensão e de alavanca peduncular mantiveram seus padrões muito próximos ao estabelecido no grupo controle (G2) (Tabela VIII), sendo que o primeiro iniciou com grande frequência diminuindo, e o segundo iniciou com frequência pequena, aumentando gradativamente, voltando a diminuir em E8 (Tabela XVII).

O 8º dia embrionário corresponde ao início dos movimentos de membros superiores e inferiores, ocasionando uma diminuição na ocorrência dos movimentos globais e axiais (Tabela XVII). No 9º e 10º dia embrionário o aumento da frequência, a simultaneidade e os padrões dissociados dos movimentos não possibilitaram o registro das frequências, sendo apropriado destacar que em E9 não ocorreram os movimentos AP e CC, iniciou o movimento de cabeça, e em E10 foram registrados os movimentos segmentares C, MI e MS (Figura 20).

Tabela XVIII – TEM total, TEM por minuto, movimentos por minuto (MP/M) e duração média de cada movimento (DMM) em embriões de *Gallus domesticus* de E4 a E10, no grupo 7

E	Médias de tempo			Média MP/M (desvio padrão)
	TEM total	TEM p/ minuto	DMM	
4	10s64	1s18	0s90	1,2 (\pm 0,45)
5	1m08s93	7s66	1s66	4,4 (\pm 1,44)
6	2m58s24	19s80	2s54	7,4 (\pm 3,76)
7	3m26s17	22s90	2s34	8,8 (\pm 5,50)
8	2m42s19	16s96	1s45	11,4 (\pm 3,43)
9	2m49s80	18s86	-	-
10	4m37s32	30s81	-	-

De maneira geral, os embriões incubados em temperatura normal e expostos à ação da salina (controle de G8 – serotonina), mantiveram o tempo total de movimentos, o número de movimentos por minuto e duração individual dos movimentos, em níveis próximos ao normal (Tabela IX). Em relação ao G2, os resultados de TEM não apresentaram diferenças significativas na distribuição das médias nos dois grupos ($\alpha \leq 0,05$) (Figura 25). O TEM médio por embrião iniciou no 4º dia embrionário, aumentando gradativamente até chegar em E10 com 4m37s32. A frequência dos movimentos por minuto apresentou um aumento em cada período de desenvolvimento, atingindo em E4 um pouco mais de um movimento por minuto, chegando em E8 com 11,4 m.p/m., assim como a duração individual de cada movimento aumentou até E6, voltando posteriormente a diminuir.

O critério intensidade de movimentos corpóreos do embrião, observado durante o experimento no grupo 7, apresentou bem poucas alterações em relação a G2, conforme resultados apresentados na tabela XIX.

Tabela XIX – Intensidade dos movimentos em embriões de *Gallus domesticus* de E4 a E10 no grupo 7

Tipo	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
AP		++	+++	+++	+++		
C						++	+++
CC				++	++	++	
Ex	+	++	++		++	++	
EI		++	++	++	++	++	
MI					++	++	+++
MS					+	++	+++

Intensidade: (+) fraco (++) moderado (+++) vigoroso

GRUPO 8

O efeito da serotonina, depois de injetada próxima ao embrião, pôde ser observado na movimentação embrionária pouco tempo depois de sua aplicação (aproximadamente 15 minutos) em um período que se estendeu por não mais de uma hora, retornando então o embrião à sua situação inicial. Os registros nas fitas de vídeo mostraram que a ação dessa substância nos embriões analisados foi crescente, alcançando um período de grande alteração nos padrões motores, e diminuindo em seguida.

Tabela XX – Frequência e percentagens dos movimentos corpóreos nos embriões de *Gallus domesticus* de E4 a E7, no grupo 8

Movimento	Média de frequência dos movimentos (%)			
	E4	E5	E6	E7
AP	18,3 (55,8)	70,5 (81)	64,2 (65,6)	54,5 (45,1)
Ex	9 (27,4)	-	1 (1)	2 (1,6)
EI	5,5 (16,8)	10,2 (11,8)	14,5 (14,8)	-
CC	-	6,3 (7,2)	8,3 (8,5)	17,7 (14,7)
MI	-	-	9,8 (10)	32,3 (26,8)
MS	-	-	-	14,2 (11,8)
Total	32,8 (100)	87 (100)	97,8 (100)	120,7 (100)

Os movimentos do embrião no grupo 8 iniciaram no 4º dia com frequência média de 32,8 movimentos, apresentando 3 padrões motores, e aumentaram progressivamente até o 10º dia, sendo que em E7 obteve uma frequência muito elevada (tabela XX), não sendo possível, a partir do 8º dia, quantificar a frequência dos movimentos, devido à grande rapidez, dissociação e simultaneidade com que ocorreram.

O movimento global de alavanca peduncular (categoria MGI) esteve presente do 4º ao 10º dia embrionário, com percentuais de frequência elevados até E5 (em relação a G2), diminuindo gradativamente até E10. Os movimentos axiais diminuíram acentuadamente em relação à sua manifestação, ocorrência e intensidade nos embriões expostos a serotonina, quando comparados com o grupo controle (G2 – padrão de movimento). A frequência do movimento de extensão no 4º dia embrionário foi baixa e, até o 9º dia, manifestou-se pouco. Já o movimento de extremidade inferior, pouco frequente, foi registrado apenas de E4 a E6, enquanto o

movimento céfalo-caudal, que iniciou no 5º dia, diminuiu gradativamente manifestando-se até E9 (Tabela XX).

Nos embriões do grupo 8, os movimentos segmentares até o 10º dia embrionário apresentaram modificações marcantes nos seus padrões. O movimento de bico manifestou-se muito característico em E10, o movimento de cabeça ocorreu antecipadamente em E8, o movimento de membro inferior manifestou-se no 6º dia e o movimento de membro superior foi observado nos embriões expostos a serotonina já em E7, aumentando gradativamente sua frequência até o 10º dia embrionário (Tabela XX).

Nos embriões desse grupo, através dos registros em vídeo, registrou-se movimentos marcantes de alavanca peduncular, que em muitos casos, como no 5º dia, equivaleu a 81% da movimentação embrionária (Tabela XX); em outros, chegou a ser ininterrupto, sendo executado do início até o final da sessão de registro, de forma rítmica, apresentando sempre a mesma característica.

Tabela XXI – TEM total, TEM por minuto, movimentos por minuto (MP/M) e duração média de cada movimento (DMM) nos embriões de *Gallus domesticus* de E4 até E10, no grupo 8

E	Médias de tempo			Média de MP/M (desvio padrão)
	TEM total	TEM p/ minuto	DMM	
4	1m11s39	7s97	1s82	3,8 (± 1,60)
5	4m46s27	31s80	3s24	9,7 (± 1,94)
6	4m27s27	29s76	2s77	10,7 (± 2,42)
7	4m12s24	28s03	2s05	13 (± 3,95)
8	5m00s97	33s80	-	-
9	5m49s38	38s82	-	-
10	4m49s87	32s21	-	-

Os padrões motores dos embriões no grupo 8 manifestaram-se por um tempo maior já no 4º dia embrionário, em relação ao grupo controle (G2) (Tabela VIII), obtendo um Tempo Efetivo de Movimento (TEM) de 1m11s39. Em geral, os tempos de movimentação dos embriões expostos a serotonina foram os maiores registrados nesse estudo, chegando em E9 a apresentar uma média por embrião de 5m49s87. Em relação a G2, a distribuição das médias de TEM em G8, apresentou diferenças significativas ($\alpha \leq 0,05$), assim como em relação aos demais grupos experimentais (G3, G5, G7). Por outro lado, os embriões do grupo 8 foram os mais lentos, obtendo em E5, 3s24 de duração para cada movimento (Tabela XXI). Esses resultados devem-se a grande frequência da alavanca peduncular, que é um movimento mais lento por ser global, envolvendo todo o corpo.

Tabela XXII – Intensidade dos movimentos em embriões de *Gallus domesticus* de E4 a E10, no grupo 8

Tipo	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
AP	+	+++	+++	+++	++	++	+
B							++
C					++	++	++
CC		++	++	++	++	++	
Ex	+	+	++	+		+	
EI	+	++	++				
MI			+	++	++	++	++
MS				+	++	++	++

Intensidade: (+) fraco (++) moderado (+++) vigoroso

Em geral os movimentos do embrião no grupo 8, com exceção da alavanca peduncular, tiveram um padrão moderado de intensidade na sua realização (Tabela XXII).

4.4.3.1. Comparação dos movimentos corpóreos em embriões do G7 e G8

Os embriões de *Gallus domesticus* do grupo 7 e 8, incubados em temperatura normal e expostos a quantidades específicas de solução salina (G7) e serotonina (G8), sofreram influências no decorrer do seu desenvolvimento, em relação aos padrões de movimento, em todas as idades embrionárias, com ênfase nas alterações do grupo 8.

Os embriões durante o desenvolvimento, apresentaram um repertório de 8 padrões motores no caso do G8 e 7 padrões no G7 (Figura 20).

MS							
MI							
EI							
Ex							
CC							
C							
B							
AP							
E	4	5	6	7	8	9	10

Legenda: G7; G8

Figura 20 - Manifestação dos padrões de movimentos de embriões de *Gallus domesticus*, de E4 a E10, nos grupos 7 e 8

Os padrões motores dos embriões no grupo 7 (modalidade controle), apresentaram movimentos globais de alavanca peduncular no 6º e 7º dia

embrionário, desaparecendo em E8. Também o período de manifestação dos movimentos axiais, que iniciaram no 4º dia, estenderam-se até E9, enquanto os movimentos segmentares iniciaram no 8º dia e manifestaram-se até E10 (Figura 20).

A manifestação dos movimentos nos embriões do grupo 8 foi caracterizada por grandes modificações em relação ao grupo controle (G2 – padrão de movimento), apresentando no 4º dia embrionário movimentos globais de alavanca peduncular e axiais de extensão e extremidade inferior, estendendo-se a alavanca peduncular até E10. Os movimentos segmentares em geral anteciparam sua manifestação, aparecendo o padrão motor de bico em E10, cabeça em E8, membro inferior em E6 e membro superior em E7 (Figura 20).

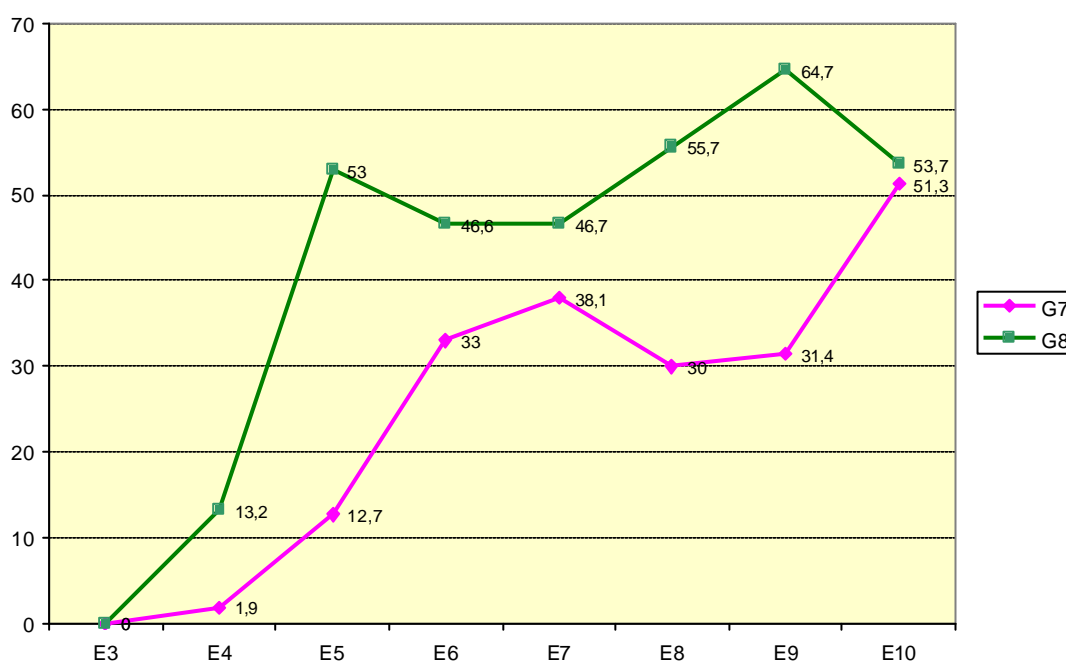


Figura 21 - Percentuais médios de tempo de movimentação de *Gallus domesticus* de E4 até E10, nos grupos 7 e 8

Os padrões de tempo de movimentação mostram que o tratamento com salina não provocou alterações significativas no desenvolvimento, ficando próximo

do padrão normal. No entanto, embriões em que foi injetada serotonina, comparados com o padrão, os tempos de movimentação embrionária atingiram percentuais altos, sendo que em todas as idades, com exceção do 4º dia, os embriões mostraram tempos de movimentação sempre acima de 45 e 50% , atingindo no 9º dia de desenvolvimento o maior tempo registrado no presente estudo (64,7%). Os embriões expostos a solução salina (G7) e serotonina (G8) movimentaram-se em média 24,8% e 41,7% do tempo total embrionário, respectivamente (Figura 21).

4.4.4. Comparação na distribuição das médias de Tempo Efetivo de Movimento em todos os grupos experimentais

O tempo efetivo de movimento (TEM) foi maior nos embriões do Grupo 8 tratados com serotonina (5-HT), do que nos embriões do Grupo 7 tratados com salina. A figura 22 mostra as diferenças encontradas entre o TEM nestes dois grupos experimentais.

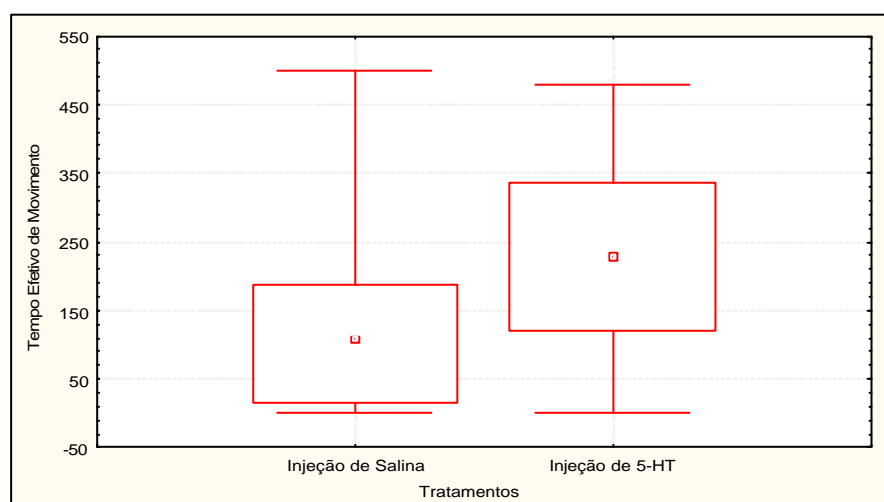


Figura 22 - Distribuição do tempo efetivo de movimento nos embriões do G7 (Salina) e G8 (Serotonina – 5-HT).

O teste de Levene aplicado para os resultados obtidos nos Grupos 7 e 8 demonstrou que estes dois grupos apresentam variâncias iguais com relação ao TEM

sendo esta variável dita homocedástica. O teste subsequente de normalidade das amostras está representado nas Figuras 23 e 24.

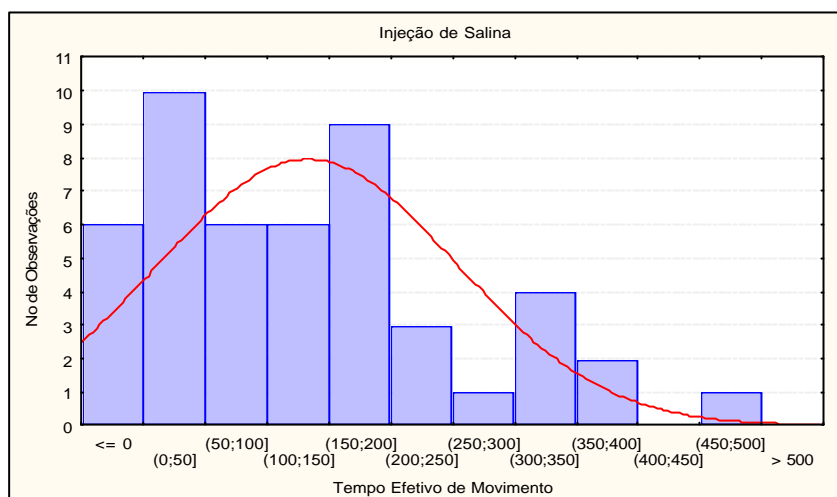


Figura 23 – Curva de distribuição das médias de Tempo Efetivo de Movimento nos embriões do grupo 7 tratados com salina.

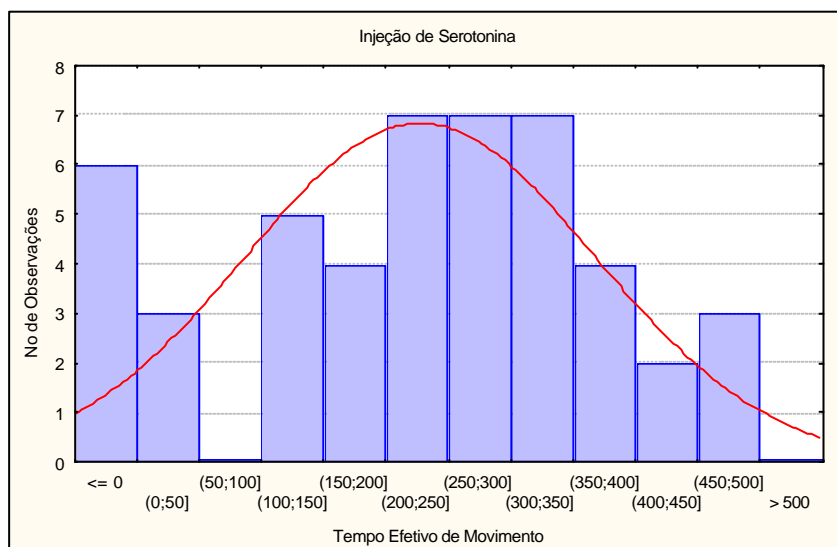


Figura 24 - Curva de distribuição das médias de Tempo Efetivo de Movimento nos embriões do grupo 8 tratados com serotonina (5-HT).

De acordo com os resultados do Teste de Normalidade aplicados nos Grupos 7 e 8, verificou-se que a variável TEM não possui uma distribuição normal nos dois grupos analisados.

A distribuição das médias do tempo efetivo de movimento (TEM) nos diferentes grupos experimentais está representada na Figura 25. A análise de variância (Teste U de Mann-Whitney, $\alpha = 0,05$) entre os grupos experimentais demonstrou que existe diferença significativa nos valores obtidos de tempo efetivo de movimento (TEM) entre os embriões tratados com salina (G7) e serotonina (G8) ($p \leq 0,00080$).

A partir da análise de variância verificou-se que existem diferenças significativas ($\alpha = 0,05$) entre o Grupo 2 (Controle) e o Grupo 8 ($p \leq 0,000018$).

Com relação à influência da temperatura (Grupos 3 e 5) na atividade neuromuscular de embriões, a análise de variância mostrou que não há diferenças significativas entre o tempo efetivo de movimento (TEM) nestes dois Grupos e o Grupo 2 (Controle). Contudo, o valor de p calculado entre os Grupos 3 e 5 foi de 0,003214 ($\alpha \leq 0,05$), indicando que há diferenças significativas entre as médias de TEM nestes dois Grupos.

Já no caso da influência da salina e serotonina (Grupos 7 e 8, respectivamente) na atividade neuromuscular de embriões, a análise de variância ($\alpha = 0,05$) demonstrou que não há diferenças significativas entre os Grupos 2 (controle) e Grupo 7 (salina).

Considerando que o Grupo 2 e o Grupo 7 são controles do Grupo 8, o primeiro para padrão de movimento, e o segundo para substância química, pôde-se constatar que a distribuição nas médias de TEM em ambos os grupos, diferem significativamente do resultado do Grupo 8 ($\alpha \leq 0,05$), obtendo para o Grupo 2 valor calculado de $p = 0,000018$, e para o G7 valor calculado de $p = 0,000185$.

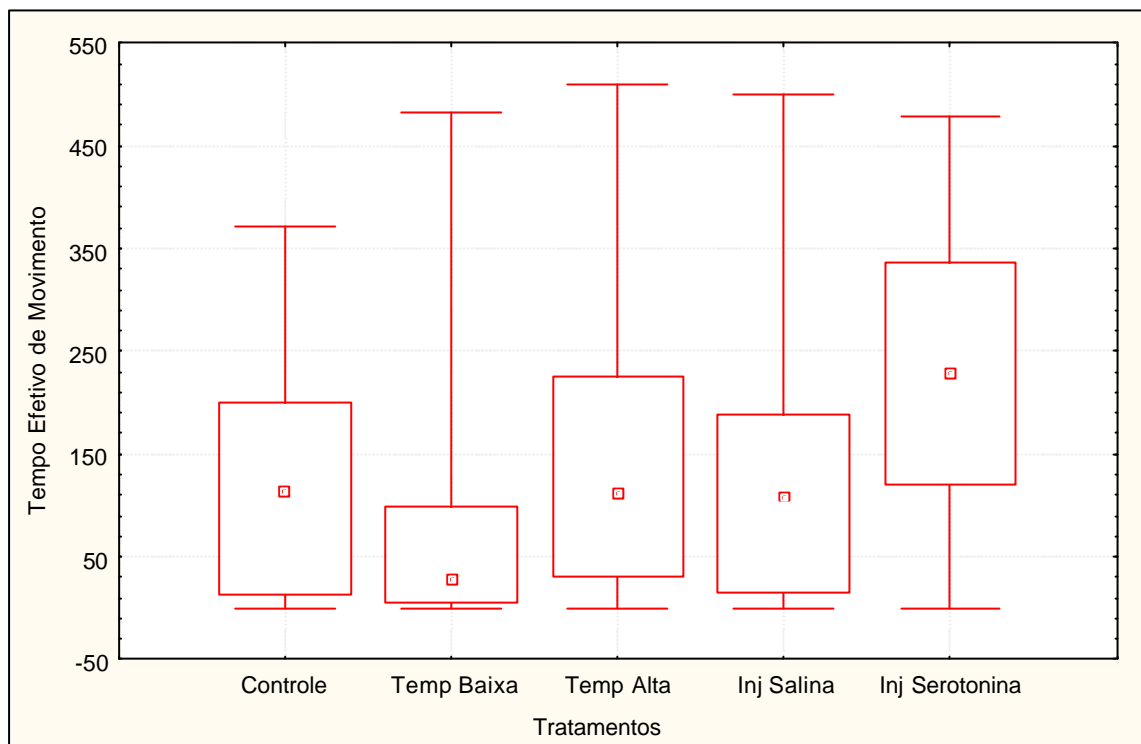


Figura 25 - Distribuição do tempo efetivo de movimento (TEM) nos embriões em cada grupo experimental.

5. DISCUSSÃO

O processo de desenvolvimento de *Gallus domesticus* no período do 3º ao 10º dia ocorre em fases bem distintas, caracterizadas por mudanças progressivas temporais. As observações realizadas no presente estudo indicam que após o 4º e 5º dia o embrião cresce mais, se comparado com as modificações menos intensas de sua morfologia. Na série de estágios normais do embrião de galinha, Hamburger & Hamilton (1992) deixam evidente este aumento do corpo, com padrões espaciais e temporais específicos, ocasionando as adaptações do embrião ao seu ambiente.

O processo de desenvolvimento neuromuscular parece estar associado a uma movimentação característica, que obedece a padrões gerais de manifestação e de organização espaço-temporal, em relação aos diversos movimentos. Jacobson (1991) demonstrou que a coordenação motora do embrião desenvolve-se de acordo com um programa de especificação central, regulado pelo sistema nervoso.

Oppenheim (1989) analisando os movimentos corpóreos do embrião, os caracterizou como sendo uma atividade embrionária espontânea, própria da maturação do sistema nervoso e muscular. Nesse sentido, foram observados padrões motores característicos, semelhantes em todos os embriões e independentes do grupo de incubação.

Os movimentos corpóreos, além de se manifestarem por períodos determinados, comuns à espécie, apresentam características diferentes de uma para outra fase embrionária, em relação ao mesmo movimento ou não, o que pode evidenciar funções diversas para o embrião. Michel & Moore (1995) discutem a possibilidade deste desenvolvimento comportamental estar relacionado a adaptações ontogenéticas à vida embrionária e pós-embrionária primitiva.

Oppenheim et al. (1997) observaram em ave mutante uma completa inatividade muscular e demonstraram a importância e influência que a motricidade embrionária espontânea exerce na formação do organismo.

Além desses fatores de natureza intrínseca, acredita-se que fatores extrínsecos ao embrião, também provocam alterações nas características espaciais e temporais dos movimentos, e exercem influência sobre o desenvolvimento embrionário.

Ações mecânicas temporárias no ovo relacionadas à manipulação, posição do embrião em relação às demais estruturas do ovo e a ele próprio, à diminuição do espaço disponível no ovo em função do crescimento do embrião, à injúria de anexos embrionários causada pela manipulação e à técnica de incubação dos ovos, podem evidenciar alterações nos movimentos corpóreos, bem como no tempo de vida embrionária, conforme foi analisado por Oppenheim et al. (1973), utilizando diversas metodologias para estudos dessa natureza.

Fatores como, a modificação permanente na temperatura de incubação, foram utilizados por Dias (1994) nos embriões de galinha até 96 horas, tanto acima como abaixo do normal, analisando, após, as conseqüências no desenvolvimento morfológico dos embriões. Em relação à atividade motora embrionária, nossos resultados aproximaram-se dos estudos de morfologia, indicando alterações semelhantes de retardamento e aceleração, referindo os movimentos corpóreos provavelmente como também sendo uma manifestação do estágio de desenvolvimento embrionário.

A aplicação de substâncias químicas no ambiente interno do ovo também demonstrou provocar alterações no desenvolvimento em geral. Dias (1996) distinguiu mal-formações na morfologia em diversos embriões expostos a doses de insulina e tunicamicina, enquanto Ophenheim & Núñez (1982) paralisaram definitivamente a atividade neuromuscular do embrião utilizando doses de bungarotoxina. No caso da serotonina (5-HT), utilizada nesse estudo, provocou diversas modificações nos padrões da motricidade embrionária, aumentando o tempo de manifestação, diminuindo sua intensidade, intensificando alguns tipos e diminuindo outros.

Um fator importante que exerce influência na realização dos diferentes padrões motores do embrião é a sua posição corporal em relação à membrana vitelínica, ao vitelo, ao albúmem, assim como outros componentes internos do ovo. Observou-se que embriões mais novos moveram-se com mais dificuldade, também em função dessa circunstância. Já embriões com mais idade apresentaram uma tendência a moverem-se mais facilmente. Nas incubações em temperaturas normais, os embriões em geral mantiveram uma posição constante ao longo do desenvolvimento até o 6º dia embrionário (posição 1), afundando gradativamente até E10 (Figura 12), principalmente em função do aumento do peso corporal (Tabela VI).

Analisando os movimentos embrionários nos primeiros dias de incubação, pôde-se observar a membrana vitelínica, juntamente com outros componentes internos do ovo, exercendo uma resistência considerável à realização dos movimentos, ficando o embrião preso às estruturas e realizando poucos movimentos. Oppenheim et al. (1973) registraram diferentes frequências de movimentos corpóreos no embrião, diversificando a posição do ovo.

No grupo 5, onde houve aumento de temperatura de incubação, os embriões, a partir do 4º dia, apresentaram posições com níveis de afundamento consideráveis (posição 2 e 3) (Figura 12), tendo maior liberdade em relação às

estruturas ovulares, e provavelmente com isso facilitando a movimentação geral e de alguns padrões motores específicos.

De acordo com o descrito por Bekoff (1981), Jacobson (1991) e Michel & Moore (1995), o desenvolvimento da atividade neuromuscular, levando-se em consideração fatores intrínsecos e extrínsecos ao embrião, está relacionada a diversos mecanismos celulares e moleculares em nível de sistema nervoso, como também aos processos de adaptação do embrião ao seu espaço físico.

Nossos estudos demonstraram que os movimentos corpóreos durante as fases iniciais do desenvolvimento, são executados em seqüências motoras repetidas, com intervalos regulares de tempo e marcados por períodos de atividade e de inatividade motora, estando bem caracterizada a relação entre o aumento do repertório motor do embrião e a diminuição da regularidade entre os períodos de movimento, bem como a indefinição progressiva dos ciclos atividade-inatividade. Em estudo semelhante, Bekoff (1981) descreveu este processo. Também Petry & Wittmann (1977) consideram provável que a posição do embrião, juntamente com modificações naturais ou provocadas nos componentes internos do ovo, influencie as alterações em padrões de atividade neuromuscular.

Os diferentes movimentos corpóreos abordados neste estudo, e manifestados em forma de padrões espaciais e temporais, durante o desenvolvimento embrionário de galinha e conforme os estudos de Jacobson (1991) e Oppenheim et al. (1997), possibilitaram aproximações com este processo, evidenciando a organização temporal no surgimento desses padrões e a identificação dos movimentos com diversos aspectos caracterizados na literatura.

O padrão motor denominado em nossa classificação como extensão é considerado por Huntingford (1990) e Oppenheim et al. (1997) um movimento espontâneo da musculatura de pescoço e tronco, e por Prosser & Greenough (1991) como movimento aleatório do pescoço, indicado por ambos como sendo um dos primeiros movimentos realizados pelo embrião. Nos estudos descritos por Jacobson (1991) é enfatizado que o primeiro contato de um motoneurônio com o músculo

ocorre em nível de pescoço durante o 3º dia de incubação, em temperatura normal. No 4º dia embrionário o motoneurônio se contacta com o músculo anterior do tronco podendo, portanto, estar relacionado com o início dos movimentos corpóreos.

No desenvolvimento neuromuscular, a migração dos mioblastos ao seu destino, sua fixação e diferenciação seguem um padrão ordenado, ocorrendo primeiro no tronco e pescoço (Beresford, 1983; Noden, 1983), juntamente com os motoneurônios (Kuratani et al, 1988; Wahl et al, 1994). Isso pode evidenciar que o início da atividade neuromuscular ocorre a nível axial, desencadeando primeiro os movimentos do tronco. No grupo 2, considerado padrão de movimento, a extensão ocorreu durante o 4º dia, conforme foi referido por Huntingford (1991), marcando a primeira manifestação da atividade neuromuscular de *Gallus domesticus*. Alguns autores indicam este movimento como uma flexão do pescoço, acompanhada por movimentação da cabeça (Bekoff, 1981), sendo que no presente estudo, não foi considerada essa terminologia, em função de o embrião envolver todo o seu corpo no movimento, resultado da contração muscular originada na flexura cervical.

A partir do início dos movimentos de extensão no tronco, aparecem, em E5 até E9, padrões motores que chamamos de extremidade inferior e céfalo-caudal, referido na literatura como uma movimentação irregular, com padrões aleatórios e passando rapidamente pelo corpo do embrião, numa seqüência céfalo-caudal (Bekoff, 1981), ou como movimentos irregulares de tronco que deslocam partes individuais do corpo (Huntingford, 1991). Esses movimentos, realizados pela musculatura cervical, torácica e lombar, ventral e dorsal do embrião, juntamente com o estabelecimento de suas conexões neuromusculares, predominam na vida embrionária até o 7º dia de desenvolvimento, quando então diminuem.

O movimento de alavanca peduncular é um padrão motor executado a partir da musculatura axial, com uma determinada coordenação da atividade neuromuscular envolvida, provavelmente na ação em cadeia dos motoneurônios ao longo da medula espinhal, permitindo ao embrião criar uma oscilação rítmica do corpo, através de contrações e relaxamentos ordenados, para cima e para baixo, ou

vice-versa. O desempenho deste movimento também depende do suporte dado pelo pedúnculo do corpo, que serve de alavanca, e pelo nível de resistência das estruturas ovulares. Foi registrado nos embriões de E5 e esteve presente em todos os grupos experimentais e em praticamente todas as idades embrionárias até E10, e é considerado por Kovach (1970) como uma movimentação geral do embrião.

Já os movimentos de membros inferiores e membros superiores foram bem caracterizados e estudados na literatura, sendo usualmente denominados como movimentos de membro anterior e posterior (Kovach, 1970; Oppenheim et al, 1997), inclusive com registros eletromiográficos do seu desempenho geral ou do músculo isolado da perna (Bekoff, 1981; Michel & Moore, 1995). Em relação à atividade neuromuscular do membro inferior, Pokett (1981) demonstrou que a massa de músculo indiferenciada na coxa do embrião de galinha já pode se estimular no 5º - 6º dia de incubação, enquanto o desenvolvimento neuromuscular da asa foi registrado por Pettigrew et al. (1979) no 5º dia de incubação, com a formação do músculo flexor e extensor, e um padrão de crescimento muscular próximo-distal (Searls, 1990), estabelecendo-se nessa região o contato nervo-músculo, a partir do 5º e 6º dia (Al-Ghaith & Lewis, 1982). Os embriões incubados no grupo 2 executaram os movimentos de membro inferior a partir do 7º dia de desenvolvimento, e o movimento de membro superior no 8º dia (Tabela VIII), demonstrando, em ambos os casos, estarem de acordo com os padrões normais de desenvolvimento neuromuscular. De acordo com Oppenheim et al. (1997), os movimentos de membro inferior podem ser registrados na atividade neuromuscular embrionária de galinha a partir do 6º dia, intensificando-se em E7-E8, não ocorrendo dessa forma em relação ao nosso estudo, onde este padrão motor foi registrado um dia depois.

Kovach (1970) reconheceu e classificou o movimento de cabeça como sendo um movimento aleatório de “cabeça-pescoço”, de baixa amplitude, surgindo de forma irregular ou combinado a outros padrões. Ficou demonstrado que este movimento é realizado a partir da musculatura de pescoço, movendo a cabeça de forma dissociada, em todas as direções, independente da interferência de outras

partes do corpo, mas podendo irradiar, desencadeando a execução de outros movimentos a partir dele, como o de bico.

O movimento de bico analisado neste trabalho foi identificado no desenvolvimento da atividade neuromuscular de galinha com a denominação de “bater-bico” (Oppenheim et al., 1973) ou “batida de bico” (Kovach, 1970). O processo mandibular do embrião de galinha no 5º dia é visível, sendo que no 9º e 10º dia a mandíbula já encosta a ponta do bico (Hamburger & Hamilton, 1992), juntamente com o estabelecimento da conexão neuromuscular apropriada (Kuratani & Tanaka, 1990), permitindo a manifestação deste padrão motor.

De maneira geral, a organização da atividade neuromuscular de *Gallus domesticus*, neste estudo, seguiu os passos descritos por Prosser & Greenough (1991) e foi estabelecida num padrão seqüencial, em primeiro lugar com o aparecimento dos movimentos de pescoço e tronco, predominando até o 7º dia embrionário, depois com movimentos dos membros, que se intensificaram até o 10º dia, e manifestando-se posteriormente, a partir do 9º-10º dia, a movimentação de outros padrões motores específicos, como cabeça e bico, sendo nesse período praticamente toda a atividade neuromuscular do embrião, segmentar.

Diversas evidências são encontradas no período embrionário, em relação ao desenvolvimento dos padrões temporais da atividade neuromuscular. O movimento do membro inferior no embrião, por exemplo, tem seu início em E7, com características aleatórias e assíncronas, aparecendo em E8-E9 com alguns padrões de aproximação-estiramento, executados por ambos os lados do corpo conjuntamente, e em E10 o embrião realiza diversas vezes os mesmos padrões, só que de maneira alternada, semelhante a marcha. Nessa seqüência de organização neuromuscular, os movimentos, de forma geral, estariam sendo realizados não apenas para o desenvolvimento de conexões neuromusculares ou fortalecimento das articulações (Bekoff, 1981; Jacobson, 1991; Oppenheim et al., 1997), mas também, conforme Michel & Moore (1995), como adaptação ontogenética em relação à vida embrionária e de preparação para um comportamento pós-natal.

Nosso estudo procurou demarcar o início dos movimentos corpóreos do embrião de *Gallus domesticus*, sendo possível demonstrar que, sob condições normais de incubação, e sem a interferência de fatores físicos e químicos, o sistema nervoso, estabelece conexões apropriadas com o sistema muscular, em diversos níveis do corpo, manifestando a atividade neuromuscular no 4º dia embrionário, com movimentos de pescoço e de tronco, seguindo grandes intervalos de inatividade (Bekoff, 1981; Jacobson, 1991; Oppenheim et al., 1997).

No 5º e 6º dia do desenvolvimento, a atividade neuromuscular é marcada por um aumento acentuado dos movimentos, em relação aos tipos, frequência e tempo de movimentação. Jacobson (1991) demonstrou que durante este mesmo período há intensa morte neuronal natural que ocorre nos motoneurônios somáticos da medula em embriões de galinha e que se estende até o 9º dia. Pode-se evidenciar uma relação entre estes dois eventos, indicando que a movimentação embrionária como foi destacada por Oppenheim (1989), exerce um papel fundamental no estabelecimento das conexões definitivas dos motoneurônios com seus respectivos alvos, bem como na eliminação dos neurônios excedentes.

Jacobson (1991) mostra que neste período há um crescimento acentuado dos motoneurônios na medula espinhal ventrolateral motora, na região branquial e lombo-sacral, considerada equivalente ao alargamento cervical e lombar da medula espinhal em outros vertebrados (Kelly, 1991). Essa alteração morfológica e funcional ocorre também em função do crescimento e das conexões que estão sendo estabelecidas entre motoneurônios de membros superiores e inferiores com interneurônios e fibras descendentes, para possibilitar a atividade neuromuscular dos membros, que, segundo foi registrado nesse estudo iniciam em E7-E8 .

Resultados de outros estudos (Oppenheim & Núñez, 1982; Oppenheim et al., 1988) mostram que, em torno do 7º dia de incubação, os movimentos do embrião de galinha atingem uma frequência média de 6 a 8 movimentos por minuto, aumentando esse número em E8 para $9,2 \pm 2,6$. Esses dados são compatíveis com o nosso estudo, onde os embriões do grupo padrão atingiram médias semelhantes.

Em relação aos padrões espaciais, a movimentação observada no período de E7 e E8 apresenta características irregulares, com atividade neuromuscular dissociada de membros inferiores e superiores, o aumento da intensidade na realização de diversos padrões motores e o destaque para o movimento axial céfalo-caudal, que ainda possui uma média elevada, podendo ser uma forma complexa de composição dos movimentos de extensão e extremidade inferior, que diminuem acentuadamente. Bekoff (1981) em relação à mesma análise confirma, as mesmas características apresentadas pelos resultados deste estudo.

No período de E9 até E10, na atividade neuromuscular do embrião há uma modificação nos padrões motores, manifestando diminuição dos movimentos originados no tronco e aumentando a ocorrência de movimentos segmentares, de forma simultânea e dissociada, dando a impressão de movimentos sem padrões específicos. Isso também ocorre devido a redução na morte neuronal natural dos motoneurônios somáticos da medula, provocando uma diminuição na movimentação axial a segmentar-proximal do embrião, com um aumento progressivo de movimentos segmentares, em função de conexões neurais que possibilitam os reflexos de estiramento em determinadas regiões do corpo (Jacobson, 1991). As características gerais descritas na literatura sobre a movimentação nesse período (Huntingford, 1991), coincidem com os resultados deste estudo.

Analisando a atividade neuromuscular no desenvolvimento de *Gallus domesticus*, em relação aos padrões de frequência e tempo de movimento (Tabela IX), até o 10º dia embrionário, pode-se demonstrar, de acordo com o conjunto de informações deste estudo, que a progressiva movimentação do embrião, vai aumentando ao longo das idades embrionárias (Bekoff, 1981). Por outro lado, em relação aos resultados relacionados à duração individual do movimento (Tabela IX), é possível verificar um aumento progressivo dos tempos de movimento até E6, indicando que o embrião executa os movimentos com mais lentidão, para, a partir de E7, os tempos decrescerem, ficando seus movimentos mais rápidos.

A análise comparativa das tabelas VIII e IX permite identificar um aumento gradual da frequência no movimento de alavanca peduncular, que coincide com o tempo de duração maior de cada movimento até o 6º-7º dia. A partir desta idade, diminui a frequência desse movimento, sendo registrada uma diminuição na duração individual geral. Com isso, podemos sugerir que o movimento global de alavanca peduncular é mais lento, em função de sua trajetória ser maior que a dos outros padrões motores.

De acordo com Oppenheim et al. (1982), Dias (1994) e Ries (1998), diversas alterações podem ser acompanhadas no desenvolvimento embrionário de *Gallus domesticus*, a nível morfológico, tecidual e celular, em decorrência de modificações na temperatura de incubação, nas estruturas internas do ovo, por lesão de estruturas embrionárias, pela aplicação de substâncias químicas. Conseqüentemente, em função dessas alterações no organismo, pode haver mudanças nos padrões da atividade neuromuscular do embrião, sendo possível estabelecer comparações entre ambas (Oppenheim et al, 1997).

Os embriões dos grupos 3 e 5, tiveram a temperatura de incubação alterada, abaixo e acima do normal, sendo evidenciadas nos resultados, alterações referentes às características morfológicas (Tabela V), ao peso corporal (Tabela VI) e ao comprimento céfalo-caudal (Tabela VII) de ambos os grupos, bem como em relação ao desenvolvimento dos padrões da atividade neuromuscular.

Dias (1994), analisando a morfologia de embriões incubados em temperaturas baixas, obteve resultados também confirmados em nossa pesquisa, nos embriões dos grupos 3 e 4, verificando-se um retardamento geral no desenvolvimento embrionário, sendo possível acompanhar as modificações em suas características morfológicas, onde a totalidade dos embriões desses grupos foi considerada atrasada (Tabela V). Em relação ao peso corporal (Tabela VI) e comprimento céfalo-caudal (Tabela VII), houve uma redução generalizada das medidas, na maioria dos embriões incubados abaixo da temperatura normal.

A atividade neuromuscular dos embriões no grupo 3, acompanhando a mesma tendência apresentada em sua morfologia, sofreu um retardamento em relação a motricidade, se comparada ao grupo controle (G2). Mesmo não tendo havido diferença significativa ($\alpha \leq 0,05$) na comparação estatística de TEM entre os grupos, houve uma forte tendência na diminuição da motricidade embrionária em embriões incubados em baixas temperaturas.

Nos padrões motores apresentados pelos embriões do grupo 3, os primeiros movimentos ocorreram somente no 5º dia embrionário, com características marcantes da musculatura de tronco, e estendendo-se dessa maneira até E9, iniciando somente em E10 os movimentos segmentares (Tabela XI), enquanto no grupo controle (G2), a motricidade embrionária inicia em E4 e os padrões motores segmentares já aparecem em E7 (Tabela VIII).

Este atraso na atividade neuromuscular ocorreu provavelmente em função de um retardamento no desenvolvimento neuromuscular do embrião provocado pela redução da temperatura de incubação, da mesma forma como ocorre na morfologia (Dias, 1994), e em consequência impossibilitou os embriões de executarem seus movimentos nos períodos considerados normais, atrasando sua ocorrência em E10, incluindo o movimento independente de cabeça.

Jolesz & Sreter (1981) destacaram que os processos de maturação dos músculos segmentares seguem uma especificação, juntamente com os motoneurônios correspondentes, na definição dos tipos de fibras, quanto à velocidade de execução. A alteração desses padrões temporais pode desencadear mudanças permanentes semelhantes às aquelas relacionadas à morfologia, prejudicando definitivamente o organismo, sem inclusive definir padrões estáveis de coordenação motora (Hollyday, 1981; Lewis et al, 1981).

Analisando as características dos padrões motores do 5º ao 9º dia embrionário, em relação à distribuição das frequências por dia e por movimento (Tabela XI), notou-se que, além de os movimentos representarem somente a manifestação da musculatura axial, predominaram apenas extensão e alavanca

peduncular, podendo essa grande limitação no repertório motor dos embriões representar um atraso nos mecanismos de desenvolvimento neuromuscular, descritos por Jacobson (1991), tanto no movimento das células musculares e dos neurônios, como no estabelecimento de conexões entre ambos (Jansen & Lomo, 1981).

Outro fator que pode influenciar a redução dos movimentos nesses embriões é a situação do corpo em relação à membrana vitelínica, vitelo e albúmem. Com o peso corporal e o comprimento céfalo-caudal reduzidos (Tabelas VI e VII), e um atraso no desenvolvimento neuromuscular, o embrião pode não conseguir opor-se à resistência criada pelas estruturas internas do ovo e não executar, até uma determinada idade, qualquer padrão motor.

A alteração também ocorreu na motricidade embrionária em relação ao tempo (Tabela XII) e a intensidade (Tabela XIII) dos movimentos dos embriões do grupo 3. Os resultados indicaram uma tendência de atraso no desenvolvimento, causada por temperaturas baixas, onde os tempos de movimento reduziram-se consideravelmente em relação aos embriões do grupo padrão (Tabela IX), e a intensidade não foi vigorosa, realizando o embrião apenas movimentos fracos e moderados. Isso provavelmente aconteceu, como já demonstraram Bekoff (1981) e Oppenheim et al. (1997), por um conseqüente atraso no desenvolvimento neuromuscular geral, ou por uma debilidade nas juntas e articulações em função da imobilidade ou diminuição de movimentos por longos períodos.

Por outro lado, nos grupos 5 e 6, onde os embriões foram incubados com aumento de temperatura houve uma aceleração geral nos processos de desenvolvimento embrionário, desenvolvendo-se estruturas morfológicas e atividade neuromuscular característica de idades embrionárias posteriores.

Analisando os resultados da tabela V, constatou-se que os embriões nesses dois grupos apresentaram morfologia de dias subseqüentes, em torno de 1 a 2 dias. O mesmo ocorreu em relação ao peso corporal (Tabela VI) e comprimento céfalo-caudal (Tabela VII) que foram superiores em relação ao resultado do grupo controle para a idade estrutural (Dias, 1994). Esses registros demonstram que as

alterações no ambiente físico do organismo suscitam modificações de diversos tipos na vida embrionária, principalmente de antecipação de processos biológicos, que provavelmente estendem-se à organização e ao desenvolvimento neuromuscular sem, no entanto, causar distúrbios, danos na formação do tubo neural e morte acentuada de neurônios (Buckiová et al, 1998).

Em relação ao grupo controle padrão de movimento (G2), os movimentos corpóreos dos embriões no grupo 5 mostraram uma aceleração da atividade neuromuscular, com o início já no 4º dia embrionário, de movimentos de alavanca peduncular e extensão, além de um aumento generalizado na frequência dos movimentos em todos os dias (Tabela XIV). O tempo efetivo de movimento (TEM) dos embriões do grupo 5 foi mais alto em relação ao grupo controle (G2), apesar do teste estatístico não ter apresentado diferenças significativas (Oppenheim et al., 1982) nos resultados entre os grupos (Figura 25). Essa evidência demonstra que o aumento da temperatura de incubação dos embriões (39º-40ºC) parece não ter comprometido severamente a integridade de seus organismos em relação ao desenvolvimento neuromuscular, pelo menos nos primeiros dias de incubação até E7, provocando somente o surgimento precoce de algumas características motoras no embrião, e também alterando os componentes internos do ovo, facilitando a posição 3 desde o 5º dia de desenvolvimento (Figura 12), permitindo maior liberdade de movimentos. Nesse sentido a motricidade embrionária quase triplicou de E5 para E6, justamente pelo aumento abrupto de AP, que é executado com maior facilidade em função do espaço físico.

A análise dos resultados de frequência (Tabela XIV) e tempo de movimento (Tabela XV), no 6º dia embrionário, sendo os maiores registrados nesse grupo, pode indicar uma série de fatores atuando para o aumento da atividade neuromuscular, como o processo de morte neuronal natural, o estabelecimento de conexões neuromusculares, a sinaptogênese dos neurônios (Jansen & Lomo, 1981; Oppenheim, 1985; 1989).

Analisando os resultados do desenvolvimento neuromuscular nos embriões incubados a baixa, alta e temperatura normal, respeitadas as alterações de retardamento e aceleração do desenvolvimento, pode-se demonstrar a aproximação, entre os grupos, dos padrões temporais dos movimentos, primeiro com a atividade neuromuscular de tronco, depois a dos membros e em seguida de outros grupos musculares específicos (Prosser & Greenough, 1991). Comparando estatisticamente as médias de TEM dos grupos 3 e 5, a um nível de significância de 5%, constatou-se diferença significativa (Figura 19) no resultado, o que demonstra a evidência de alterações na atividade neuromuscular dos embriões, em decorrência da manipulação do fator físico temperatura, durante o desenvolvimento embrionário.

O 8º dia embrionário no grupo 5 caracterizou-se pelo início dos movimentos de membros, modificando os padrões motores do embrião e deixando a atividade neuromuscular basicamente segmentar, com poucos movimentos axiais (Tabela XIV). Observou-se que os embriões incubados a temperaturas mais altas retardaram o início dos movimentos de membros inferiores, mas anteciparam para E9 a manifestação do movimento de cabeça, permanecendo em E10 somente movimentos segmentares. A diminuição gradativa dos movimentos axiais no embrião e a sua ausência no 10º dia pode representar o agravamento de efeitos da manipulação desse fator físico, conforme demonstraram Dias (1994) e Buckiová et al. (1998) em seus estudos, pode aumentar a morte de células, interferir na proliferação e sinaptogênese de neurônios, além de alterar a constituição morfológica do embrião. Nesse contexto pode-se demonstrar que os embriões deste grupo tiveram uma redução na atividade neuromuscular em E7-E8, ficando a partir daí muito próximo do desempenho padrão.

A aplicação de substâncias químicas em embriões de *Gallus domesticus*, em diferentes períodos de desenvolvimento, evidencia seus efeitos em relação ao sistema nervoso, a nível morfológico (Dias, 1996) e tecidual (Ries, 1998), podendo causar efeitos também no desenvolvimento da atividade neuromuscular do embrião, temporária (Oppenheim, 1985) ou definitivamente (Oppenheim et al., 1982).

Openheim et al. (1982) utilizaram embriões controle evidenciando resultados semelhantes aos registros da atividade neuromuscular nos embriões do grupo 7, em relação aos tipos de padrões motores, à ordem de manifestação, à frequência, aos padrões espaciais, ao tempo de movimento, à duração de cada movimento, demonstraram uma aproximação de resultados com o grupo padrão da motricidade. Neste caso, a análise de variância ($\alpha = 0,05$) demonstrou que, em relação as médias de tempo efetivo de movimento, não há diferenças significativas entre os Grupos 2 (controle) e Grupo 7 (salina), evidenciando que a introdução de líquidos (salina - substância química do grupo controle) e de agulha hipodérmica no ambiente do ovo praticamente não alterou os padrões de atividade neuromuscular.

Nos embriões do grupo 8, que foram tratados com serotonina, houveram alterações muito expressivas na atividade neuromuscular em todos os dias de desenvolvimento, com características transitórias, sem provocar modificações definitivas, demonstrando que, a nível de desenvolvimento neuromuscular, esta substância atua alterando o desempenho qualitativo e quantitativo dos padrões motores, em proporções que variam de acordo com as concentrações e volumes injetados e também com o período de tempo que dura seu efeito no organismo (Iizuka et al, 1998; Siemiatkowski et al, 1998).

Os resultados demonstraram que a serotonina provocou modificações na manifestação (Figura 20), na frequência (Tabela XX), na intensidade (Tabela XXII) de certos padrões motores embrionários e nos tempos de movimentação (Tabela XXI). As alterações no TEM dos embriões submetidos a injeção de serotonina foi tão marcante constatando-se diferenças significativas ($\alpha \leq 0,05$) em relação, não somente aos grupos-controle (G2 e G7), mas a todos os grupos do experimento (Figura 25). Essa alteração generalizada da atividade neuromuscular dos motoneurônios pode estar relacionada com a presença, em todos os segmentos da medula espinhal de aves, de projeções serotoninérgicas originadas nos núcleos do tronco cerebral (Okado et al, 1988) e, também, com a provável presença de um

grande número de receptores 5-HT_{2A}, nos diversos níveis da medula (no corno ventral) de mamíferos, distribuídos de forma homogênea (Maeshima et al, 1998).

Analisando os resultados, em relação ao grupo controle (G2 – padrão de movimento), verificou-se que o início da movimentação do embrião no 4º dia é marcado por uma grande frequência de movimentos e pela presença de 2 padrões motores axiais e 1 global, bem caracterizados, com predomínio para o movimento alavanca peduncular. Este movimento, manifestando-se em todas as idades, manteve até E7 índices de frequência muito altos, enquanto outros movimentos apresentaram frequências bem inferiores no mesmo período. Isto pode estar relacionado a uma ação generalizada da serotonina nos motoneurônios somáticos de toda a medula espinhal, provocando uma excitação inicial (Gerin & Privat, 1998) e, em seguida, uma ação moduladora, produzindo uma movimentação geral intensa do corpo (Tabela XXII), porém ritmada (Iizuka et al., 1998).

A duração individual dos movimentos nesse grupo (Tabela XXI) ficou bem acima da registrada para os embriões do grupo padrão, sendo as maiores nesse estudo. O movimento de alavanca peduncular provavelmente foi o responsável por este resultado, em função de sua trajetória ser maior, por ser um movimento mais lento e por ter estado presente em todas as idades embrionárias.

Os padrões motores segmentares do embrião anteciparam sua ocorrência, sob o efeito da serotonina, sempre aparecendo um dia antes do previsto, evidenciando que o desenvolvimento neuromuscular nesses casos já está se estabelecendo ou está em fase adiantada de maturação, apenas não se manifestando (Pettigrew et al., 1979; Pockett, 1981; Al-Ghaith & Lewis, 1982). A esse respeito, a ação da serotonina nos motoneurônios da medula espinhal parece ser excitatória (Fozard, 1984), atuando a partir do momento em que existem condições para manifestação da atividade neuromuscular, como uma certa organização no tecido muscular e o contato definitivo dos motoneurônios com seus respectivos músculos.

A intensidade dos movimentos segmentares nos embriões do grupo 8 foi fraca ou moderada em todos os dias estudados (Tabela XXII). Isto pode

demonstrar que, após o efeito excitatório inicial da serotonina, sua ação parece ter função tônica, modulando a atividade do músculo (Gerin & Privat, 1998). Poder-se-ia considerar também a possibilidade de uma ação inibitória desse neurotransmissor em certos grupos de motoneurônios, mantendo os níveis de intensidade desses movimentos segmentares fracos e moderados (Crick & Wallis, 1991; Wallis et al., 1993; Crick et al., 1994).

A serotonina como substância química injetada na membrana cório-alantóica do ovo, e agindo no embrião como um todo, não pôde ser avaliada em toda a extensão de seus efeitos, mas, no que diz respeito aos padrões motores da atividade neuromuscular regulados por motoneurônios da medula espinhal e do tronco cerebral, evidenciou uma certa relação com funções excitatórias (Barasi & Roberts, 1977; Parry & Roberts, 1980; Takahashi & Berger, 1990; Wang & Dun, 1990), e provavelmente modulatórias (Lucki, 1998). Estas evidências podem ser relacionadas com os percentuais altos, comparados ao grupo padrão de movimento (G2), das frequências (Tabela XX) e tempos de movimento (Tabela XXI), assim como pela sua intensidade (Tabela XXII).

Os resultados apresentados nesse estudo, nos diversos grupos experimentais, demonstraram que, durante a vida embrionária de *Gallus domesticus*, a natureza e a expressão do movimento corporal representam o resultado de um conjunto de fatores que interagem entre si. O embrião em desenvolvimento segue um regulamento intrínseco de maturação biológica, específica para cada espécie, como a sucessão das formas embrionárias, o crescimento do corpo, o aumento do peso corporal, a diferenciação tecidual e sistêmica, o estabelecimento das relações entre os diversos sistemas orgânicos, os padrões temporais e espaciais normais do sistema neuromuscular, as trocas energéticas do embrião com os componentes nutritivos do ovo (Witschi, 1956). Por outro lado, evidências nesse estudo confirmam a influência de fatores extrínsecos ao embrião de *Gallus domesticus* no desenvolvimento da atividade neuromuscular, como a disposição das estruturas extra-embriônicas dentro do ovo e a relação espacial com o embrião, o

procedimento de rotação do ovo, posição de incubação do ovo, variações na posição corporal do embrião, a alteração da temperatura de incubação, a aplicação de substâncias químicas no ambiente interno do ovo (Oppenheim et al., 1973; Cruz, 1993; Dias, 1996), demonstrando que o desenvolvimento é marcado por constantes interações entre o organismo e o ambiente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia de estudo e o período embrionário do 4º ao 10º dia podem ser considerados eficientes para a investigação do desenvolvimento da atividade neuromuscular em embriões de *Gallus domesticus*.

Os componentes do ambiente ovular e outros fatores extrínsecos ao embrião podem sujeitá-lo a alterações, de ordem transitória ou permanente, em nível de atividade neuromuscular.

No desenvolvimento embrionário da galinha doméstica, em condições normais de incubação, o embrião inicia seus movimentos corpóreos no 4º dia, com movimentos simples da musculatura axial, aumentando posteriormente a frequência, o tempo e a intensidade dos movimentos, num padrão sequencial de tronco, membros e cabeça.

A movimentação geral e de tronco nos embriões do grupo 2 é predominante até o 7º dia, diminuindo a partir daí para, no 10º dia, praticamente desaparecer. Do 8º dia em diante os movimentos segmentares aumentam e modificam a característica geral do padrão de atividade neuromuscular.

A análise da motricidade corpórea no presente estudo, permitiu registrar 8 padrões motores, através dos quais se manifesta a atividade

neuromuscular, estando cada padrão sujeito a alterações relacionadas a idade do embrião, a modificação da temperatura de incubação e aplicação de substâncias químicas no ambiente interno do ovo.

Modificando-se a temperatura de incubação dos embriões, pode-se acompanhar, nas idades estudadas, alterações morfológicas e também aos padrões espaço-temporais da atividade neuromuscular.

Embriões incubados em baixas temperaturas tiveram, tanto a nível morfológico como neuro-motor, um retardo acentuado em seu desenvolvimento. Por outro lado embriões incubados em temperaturas altas aceleraram o desenvolvimento geral até um certo período.

Incubados sob temperatura normal e expostos à ação da salina, os embriões de galinha apresentaram movimentos corpóreos próximos do padrão normal, enquanto os submetido à serotonina manifestaram alterações temporárias, em diversos padrões da atividade neuromuscular.

Três tipos de movimentos corpóreos foram registrados, já no 4º dia de incubação, em embriões sob o efeito da serotonina, sendo destes a alavanca peduncular o mais intenso, manifestando-se até o 10º dia embrionário. Em geral, os movimentos neste grupo foram moderados durante quase todo período de estudo.

A atividade neuromuscular dos embriões expostos a serotonina provocou também alterações marcantes na frequência, tempo e intensidade de movimentos, evidenciando sua provável função reguladora no desenvolvimento.

O desenvolvimento neuromuscular é pré-estabelecido pelo sistema nervoso central, possuindo diferentes padrões de organização, e manifestando-se durante a vida embrionária através dos movimentos corpóreos, observando-se em geral sua continuidade mesmo alterada sob a ação de fatores físicos e químicos.

Os movimentos corpóreos do embrião podem ser utilizados para diagnóstico e avaliação das condições de vida embrionária, como também a manifestação de padrões motores específicos pode indicar o nível de integridade de determinado órgão ou segmento corporal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADDEL, A.; CASANOVAS, J. M. & ARTIGAS, F. Comparative Study in the Rat of the Actions of Different Types of Stress on the Release of 5-HT in Raphe Nuclei and Forebrain Areas. Neuropharmacology, 36 (4/5), 1997, 735-741.
- AGHAJANIAN, G. K. & MAREK, G. J. Serotonin Induces Excitatory Postsynaptic Potentials in Apical Dendrites of Neocortical Pyramidal Cells. Neuropharmacology, 36 (4/5), 1997, 589-599.
- AL-GHAITH, L. K. & LEWIS, J. H. Pioneer Growth Cones in Virgin Mesenchyme: an Electron-microscope Study in the Developing Chick Wing. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 68, 1982, 149-160.
- ALTABA, A. R. I. Pattern Formation in the Vertebrate Neural Plate. Trends in Neuroscience, 17 (6), 1994, 233-243.
- ANG, S-L. The Brain Organization. Nature, 380 (7), 1996, 25-27.
- ANNUNCIATO, N. F. O Processo Plástico do Sistema Nervoso. Temas sobre Desenvolvimento, 3 (17), 1994, 4-12.
- ANNUNCIATO, N. F. & DA-SILVA, C. F. Participação dos Fatores Neurotróficos na Regeneração do Sistema Nervoso. Temas sobre Desenvolvimento, 4 (23), 1995, 30-38.
- AREY, L. B. Developmental Anatomy. London: Saunders, 1974, 695 p.
- BÄHR, M. & BONHOEFFER, F. Perspectives on Axonal Regeneration in the Mammalian CNS. Trends in Neuroscience, 17 (11), 1994, 473-479.

- BARASI, S. & ROBERTS, M. H. T. Responses of Motoneurons to Electrophoretically Applied Dopamine. Britain Journal of Pharmacology, 60, 1977, 29-34.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W. & PARADISO, M. A. Neuroscience. Exploring the Brain. Baltimore: Willians & Wilkins, 1996, p. 666.
- BEIG, D. & GARCIA, F. C. M. O Embrião de Galinha. Proed, 1987.
- BEKOFF, A. Embryonic Development of Chick Motor Behaviour. Trends in Neuroscience, 06,1981, 181 – 184.
- BENNETT, M. R. & LAVIDIS, N. A. Development of the Topographical Projection of Motor Neurons to Amphibian Muscle Accompanies Motor Neuron Death. Developmental Brain Research, 2, 1982, 448-452.
- BENTLEY, D. & KESHISHIAN, H. Pathfinding by Peripheral Pioneer Neurons in Grasshoppers. Science, 218, 1982, 1082-1088.
- BERESFORD, B. Brachial Muscles in the Chick Embryo: the Fate of Individual Somites. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 77, 1983, 99-116.
- BHAT, K. M. Cell-cell Signaling During Neurogenesis: some Answers and many Questions. International Journal Development Biology, 42, 1998, 127-139.
- BIRNHOLZ, JASON C. The Development of Human Fetal Eye Patterns. Science, 213, 1981, 679-681.
- BLACK, I. B.; ADLER, J. E.; DREYFUS, C. F.; JONAKAIT, G. M.; KATZ, D. M.; LaGAMA, E. F. & MARKEY, K. M. Neurotransmitter Plasticity at the Molecular Level. Science, 225, 1984, 1266-1270.
- BLANCHARD, R. J.; GRIEBLE, G.; HENRIE, J. A. & BLANCHARD, D. C. Differentiation of Anxiolytic and Panicolytic Drugs by Effects on Rat and Mouse Defense Test Batteries. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 21 (6), 1997, 783-789
- BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; RODGERS, R. J. & BLANCHARD, R. J. Benzodiazepine and Serotonergic Modulation of Antipredator and Conspecific Defense. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 22 (5), 1998, 597-612.

- BRADLEY, P. B.; ENGEL, G.; FENIUK, W.; FOZARD, J. R.; HUMPHREY, P. P. A.; MIDDLEMISS, D. N.; MYLECHARANE, E. J.; RICHARDSON, B. P. & SAXENA, P. R. Proposals for the Classification and Nomenclature of Functional Receptors for 5-Hydroxytryptamine. Neuropharmacology, 25 (6), 1986, 563-576.
- BROWN, M. C.; HOPKINS, W. G. & KEYNES, R. J. Essentials of Neural Development. 2 ed. Great Britain: Cambridge University Press, 1991, 176p.
- BUCKIOVÁ, D.; KUBÍNOVÁ, L.; SOUKUP, A.; JELÍNEK, R. & BROWN, N. A. Hyperthermia in the Chick Embryo: HSP and Possible Mechanisms of Developmental Defects. International Journal of Development of Biology, 42, 1998, 737-740.
- CALDERÓ, J.; PREVETTE, D.; MEI, X.; OAKLEY, R. A.; LI, L.; MILLIGAN, C.; HOUENOU, L.; BUREK, M. & OPPENHEIM, R. W. Peripheral Target Regulation of the Development and Survival of Spinal Sensory and Motor Neurons in the Chick Embryo. The Journal of Neuroscience, 18 (1), 1998, 356-370.
- CARLSON, B. M. Embriologia Humana e Biologia do Desenvolvimento. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, 408 p.
- CHRIST, B.; SCHMIDT, C.; HUANG, R.; WILTING, J. & BRAND-SABERI, B. Segmentation of the Vertebrate Body. Anatomy and Embryology, 197, 1998, 1-8.
- COLMAN, H. & LICHTMAN, J. W. 'Cartellian' Competition at the Neuromuscular Junction. Trends in Neuroscience, 15 (6), 1992, 197-199.
- CONNELL, L. A. & WALLIS, D. I. Responses to 5-Hydroxytryptamine Evoked in the Hemisected Spinal Cord of the Neonate Rat. Britain Journal of Pharmacology, 94, 1988, 1101-1114.
- CONNELL, L. A. & WALLIS, D. I. 5-Hydroxytryptamine Depolarizes Neonatal Rat Motoneurons Through a Receptor Unrelated to an Identified Binding Site. Neuropharmacology, 28 (6), 1989, 625-634.
- COOKE, J. Embryonic Origins of the Nervous System and its Pattern. Trends in Neuroscience, 8, 1985, 58-63.
- COSTA NETO, P. L. O. Estatística. São Paulo: Edgard Blücher, 1977, 265p.

- COWAN, W. M.; FAWCETT, J. W.; O'LEARY, D. D. M & STANFIELD, B. B. Regressive Events in Neurogenesis. Science, 225, 1984, 1258-1265.
- CRICK, H. & WALLIS, D. I. Inhibition of Reflex Responses of Neonate Rat Lumbar Spinal Cord by 5-Hydroxytryptamine. Britain Journal of Pharmacology, 103, 1991, 1769-1775.
- CRICK, H.; MANUEL, N. A. & WALLIS, D. I. A novel 5-HT Receptor or a Combination of 5-HT Receptor Subtypes May Mediate Depression of a Spinal Monosynaptic Reflex *In Vitro*. Neuropharmacology, 33 (7), 1994, 897-904.
- CRUZ, Y. P. Laboratory Exercises. 1993.
- DA-SILVA, C. Fatores Neurotróficos: Estrutura, Funções e Aplicações Clínicas . Atualização em Neurociências, 1, 1995, 1-20.
- DA-SILVA, C. Regeneração do Sistema Nervoso Central. Atualização em Neurociências, 2, 1995, 1-15.
- DAVIES, A. M. The Emerging Generality of the Neurotrophic Hypothesis. Trends in Neuroscience, 11, 1988, 243-244.
- DAVIES, A. M.; THOENEN, H. & BARDE, Y.-A. Different Factors from the Central Nervous System and Periphery Regulate the Survival of Sensory Neurones. Nature, 319, 1986, 497-499.
- DAVIES, M.; WILKINSON, L. S. & ROBERTS, M. H. T. Evidence for Excitatory 5-HT₂ - Receptors on Rat Brainstem Neurones. Britain Journal of Pharmacology, 94, 1988, 483-491.
- DAWES, G. S. The 1987 James A. F. Stevenson Memorial Lecture. The Development of Fetal Behavioural Patterns. Canadian Journal Physiology Pharmacology, 66, 1988, 541-548.
- DELASCIO, D. & GUARIENTO, A. Obstetrícia Normal Briquet. São Paulo: Sarvier, 1981.
- DELPRATO, D. J. Developmental Interactionism: an Intergrative Framework for Behavior Therapy. Advances Behavioural Research Therapy, 9, 1987, 173-205.
- 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. 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. Dissertação de Mestrado em Neurociências e Comportamento. Centro de Ciências Biológicas – UFSC, 1996.

DIPIETRO, JANET A.; COSTIGAN, KATHLEEN A.; SHUPE, ALYSON K. & PRESSMANN, EVA K. Fetal Neurobehavioral Development: Associations with Socioeconomic Class and Fetal Sex. Developmental Psychobiology, 33, 1998, 79-91.

DOE, C. Q.; FUERSTENBERG, S. & PENG, C.-Y. Neural Stem Cells: from Fly to Vertebrates. Journal Neurobiology, 36, 1998, 111-127.

DUXON, M. S.; KENNETT, G. A.; LIGHTOWLER, S.; BLACKBURN, T. P. & FONE, K. C. F. Activation of 5 HT-_{2B} Receptors in the Medial Amygdala Causes Anxiolysis in the Social Interaction Test in the Rat. Neuropharmacology, 36 (4/5), 1997, 601-608.

EDELMAN, G. Topobiology. An Introduction to Molecular Embryology. New York : Basic Books , 1987, 240p.

EYAL-GILADI, H. The Early Embryonic Development of the Chick, as an Epigenetic Process. Critical Review of Poultry Biology, 3, 1991, 143-166.

FLYNN, M. E.; PIKALOW, A. S.; KIMMELMAN, R. S. & SEARLS, R. L. The Mechanism of Cervical Flexure Formation in the Chick. Anatomy and Embryology, 184, 1991, 411-420.

FOZARD, J. R. Neuronal 5-HT Receptors in the Periphery. Neuropharmacology, 23 (12B), 1984, 1473-1486.

FREEMAN, W. H. & BRACEGIRDLE, B. An Atlas of Embryology. 3 ed. London: Heinemann, 1982, 110 p.

GERIN, C. & PRIVAT, A. Direct Evidence for the Link Between Monoaminergic Descending Pathways and Motor Activity: II. A Study With Microdialysis Probes Implanted in the Ventral Horn of the Spinal Cord. Brain Research, 794, 1998, 169-173.

- GIBSON-BROWN, J. J.; AGULNIK, S. I.; SILVER, L. M.; NISWANDER, L. & PAPAIOANNOU, V. E. Involvement of T-box Genes Tbx2-Tbx5 in Vertebrate Limb Specification and Development. Development, 125, 1998, 2499-2509.
- GILBERT, S. F. Biologia do Desenvolvimento. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994, 578 p.
- GLENNON, R. A. & DUKAT, M. Serotonin Receptor Subtypes. In: BLOOM, F. E. & KUPFER, D. J. Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress. New York: Raven Press, 1995, 415-430.
- GLOVER, J. C. Inductive Events in the Neural Tube. Trends in Neuroscience, 14 (10), 1991, 424-427.
- GOETZ, M. How are Neurons Specified: Master or Position Control? Trends in Neuroscience, 21,1998, 135-136.
- GOODRUM, G. R. & JACOBSON, A. G. Cephalic Flexure Formation in the Chick Embryo. The Journal of Experimental Zoology, 216, 1981, 399-408.
- GUTHRIE, S. Horizontal and Vertical Pathways in Neural Induction. Trends in Neuroscience, 14,1991, 123-126.
- GUTHRIE, S. The Status of the Neural Segment. Trends in Neuroscience, 18, 1995, 74-79.
- HAMBURGER, V. & HAMILTON, H. A Series of Normal Stages in the Development of the Chick Embryo. Journal of Morphology, 88, 1951, 49- 92.
- HAMBURGER, V. & HAMILTON, H. A Series of Normal Stages in the Development of the Chick Embryo. Developmental Dynamics, 195, 1992, 231-272 (Reimpressão).
- HARRIS, W. A. Neural Activity and Development. Annual Review Physiology, 43, 1981, 689-710.
- HAYASHI, K. & OZAWA, E. Myogenic Cell Migration from Somites is Induced by Tissue Contact with Medial Region of the Presumptive Limb Mesoderm in Chick Embryos. Development, 121, 1995, 661-669.
- HERRMANN, G. E.; BRESNAHAN, J. C.; HOLMES, G. M.; ROGERS, R. C. & BEATTIE, M. S. Descending Projections From the Nucleus Raphe Obscurus

- to Pudendal Motoneurons in the Male Rat. The Journal of Comparative Neurology, 397, 1998, 458-474.
- HERZOG, K-H. & VON BARTHELD, C. S. Contributions of the Optic Tectum and the Retina as Sources of Brain-Derived Neurotrophic Factor for Retinal Ganglion Cells in the Chick Embryo. The Journal of Neuroscience, 18 (8), 1998, 2891-2906.
- HOFER, M. M. & BARDE, Y.-A. Brain-derived Neurotrophic Factor Prevents Neuronal Death *in Vivo*. Nature, 331, 1988, 261-262.
- HOLLYDAY, M. Rules of Motor Innervation in Chick Embryos with Supernumerary Limbs. The Journal of Comparative Neurology, 202, 1981, 439-465.
- HORN, G.; ROSE, S. P. R. & BATESON, P. P. G. Experience and Plasticity in the Central Nervous System. Science, 181, 1973, 506-514.
- HOULLON, C. Embriologia. São Paulo: Edgard Blucher, 1972, 162 p.
- HOYER, D. & MARTIN, G. 5-HT Receptor Classification and Nomenclature: Towards a Harmonization with the Human Genome. Neuropharmacology, 36 (4/5), 1997, 419-428.
- HSU, L. NATYZAK, D. & TRUPIN, G. L. Neuronotrophic Effects of Skeletal Muscle Fractions on Spinal Cord Differentiation. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 1982, 83-95.
- HUNTINGFORD, F. The Study of Animal Behaviour. New York: Chapman & Hall, 1991, 411 p.
- IBÁÑEZ, C. F. Emerging Themes in Structural Biology of Neurotrophic Factors. Trends in Neuroscience, 21, 1998, 438-444.
- IIZUKA, M.; NISHIMARU, H. & KUDO, N. Development of the Spatial Pattern of 5-HT - Induced Locomotor Rhythm in the Lumbar Spinal Cord of Rat Fetuses *in Vitro*. Neuroscience Research, 31, 1998, 107-111.
- IJKEMA-PAASSEN, J. & GRAMSBERGEN, A. Polyneuronal Innervation in the Psoas Muscle of The Developing Rat. Muscle & Nerve, 21, 1998, 1058-1063.

- ISHIKAWA, Y. & SHIMIDA, Y. Acetylcholine Receptors and Cholinesterase in Developing Chick Skeletal Muscle Fibers. Developmental Brain Research, 5, 1982, 187-197.
- IZUMI, A. & KIDA, M. Y. Segmental Distribution of the Motoneurons Innervating Trunk Muscles in the Spinal Cord of the Cat and Rat. Neuroscience Research, 30, 1998, 247-255.
- JACOBSON, M. *Developmental Neurobiology*. 3 ed. New York: Plenum Press 1991. 776p.
- JACKSON, H. C. & KITCHEN, I. Behavioural Profiles of Putative 5-Hydroxytryptamine Receptor Agonists and Antagonists in Developing Rats. Neuropharmacology, 28 (6), 1989, 635-642.
- JANSEN, J. ET AL. Hyperinnervation of Skeletal Muscle Fibers: Dependence on Muscle Activity. Science, 181, 1973, 559-561.
- JANSEN, J. K. S. & LOMO, T. Development of Neuromuscular Connections. Trends in Neuroscience, jul., 1981, 178-181.
- JOLESZ, F. & SRETER, F. A. Development, Innervation, and Activity-Pattern Induced Changes in Skeletal Muscle. Annual Review Physiology. 43, 1981, 531-552.
- KANDA, K. & HASHIZUME, K. Effects of Long-term Physical Exercise on Age-related Changes of Spinal Motoneurons and Peripheral Nerves in Rats. Neuroscience Research, 31, 1998, 69-75.
- KELLY, J. The Neural Basis of Perception and Movement. In: KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H. & JESSELL, T. M. Principles of Neural Science. Connecticut: Appleton & Lange, 1991, 1135 p.
- KENTROTI, S.; RAMACCI, M. T. & VERNADAKIS, A. Acetyl-L-Carnitine has a Neuromodulatory Influence on Neuronal Phenotypes During Early Embryogenesis in the Chick Embryo. Developmental Brain Research, 70, 1992, 259-266.
- KEYNES, R. J. & STERN, C. D. Segmentation in the Vertebrate Nervous System. Nature, 310 (30), 1984, 786-789.

- KOVACH, J. K. Development and Mechanism of Behavior in the Chick Embryo During the Last Five Days of Incubation. Journal of Comparative and Physiological Psychology, 73(3), 1970, 392-406.
- KREUTZBERG, G. W.; ENGEL, A. K.; GRAEBER, M. B.; TETZLAFF, W. & TÓTH, L. Structural Plasticity in Lesioned Motoneurons. In: FLOHR, H. (Ed.) Post-lesion Neural Plasticity. Berlin, 1988, 57-64.
- KURATANI, S. & TANAKA, S. Peripheral Development of Avian Trigeminal Nerves. The American Journal of Anatomy, 187, 1990, 65-80.
- KURATANI, S.; TANAKA, S.; ISHIKAWA, Y. & ZUKERAN, C. Early Development of the Hypoglossal Nerve in the Chick Embryo as observed by the Whole-mount Nerve Staining Method. The American Journal of Anatomy, 182, 1988, 155-168.
- LAING, N. G. Motor Projection Patterns to the Hind Limb of Normal and Paralysed Chick Embryos. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 72, 1982, 269-286.
- LAING, N. G. & LAMB, A. H. Development and Motor Innervation of a Distal Pair of Fast and Slow Wing Muscles in the Chick Embryo. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 78, 1983, 53-66.
- LAING, N. G. & LAMB, A. H. The Distribution of Muscle Fibre Types in Chicks Embryo Wings Transplanted to the Pelvic Region is Normal. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 78, 1983, 67-82.
- LAMB, A. H. Axon Regeneration by Developing Limb motoneurons in *Xenopus Laevis*. Brain Research, 209, 1981, 315-323.
- LAMB, A. H. Selective Bilateral Motor Innervation in *Xenopus* Tadpoles with One Hind Limb. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 65, 1981, 149-163.
- LAMB, A. H. Target Dependency of Developing Motoneurons in *Xenopus Laevis*. The Journal of Comparative Neurology, 203, 1981, 157-171.
- LANCE-JONES, C. Motoneuron Cell Death in the Developing Lumbar Spinal Cord of the Mouse. Developmental Brain Research, 4, 1982, 473-479.
- LANDER, A. D. Understanding the Molecules of Neural Cell Contacts: Emerging Patterns of Structure and Function. Trends in Neuroscience, 12 1989, 189-195.

- LANDIS, S. C. Neuronal Growth Cones. Annual Review of Physiology, 45, 1983, 567-580.
- LANDMESSER, L. The Development of Specific Motor Pathways in the Chick Embryo. Trends in Neuroscience, 7, 1984, 336-339.
- LARKMAN, P. M. & KELLY, J. S. Modulation of I_H by 5-HT in Neonatal Rat Motoneurons *In Vitro*: Mediation through a Phosphorylation Independent Action of cAMP. Neuropharmacology, 36, 1997, 721-733.
- LE DOUARIN, N. M. Embryonic Neural Chimaeras in the Study of Brain Development. Trends in Neuroscience, 16, 1993, 64-72.
- LE DOUARIN, N. M.; SMITH, J. & LE LIÈVRE, C. S. From the Neural Crest to the Ganglia of the Peripheral Nervous System. Annual Review Physiology, 43, 1981, 653-671.
- LETORNEAU, P. C. Axonal Growth and Guidance. Trends in Neuroscience, 1983, 451-455.
- LEVI-MONTALCINI, L. The Nerve Growth Factor 35 Years Later. Science, 237, 1987, 1154-1162.
- LEVI-MONTALCINI, L. & ANGELETTI, P. U. Nerve Growth Factor. Physiological Reviews, 48 (3), 1968, 534-569.
- LEVI-MONTALCINI, R.; SKAPER, S. D.; DAL TOSO, R.; PETRELLI, L. & LEON, A. Nerve Growth Factor: from Neurotrophin to Neurokinin. Trends in Neuroscience, 19, 1996, 514-520.
- LEVIT, P. Prenatal Effects of Drugs of Abuse on Brain Development. Drug and Alcohol Dependence, 51, 1998, 109-125.
- LEVITT, P.; HARVEY, J. A.; FRIEDMAN, E.; SIMANSKY, K. & MURPHY, E. H. New Evidence for Neurotransmitter Influences on Brain Development. Trends in Neuroscience, 20, 1997, 269-274.
- LEWIS, J.; CHEVALLIER, A.; KIENY, M & WOLPERT, L. Muscle Nerve Branches do not Develop in Chick Wings Devoid of Muscle. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 64, 1981, 211-232 .

- LI, L.; HOUENOU, L. J.; WU, W.; LEI, M.; PREVETTE, D. M. & OPPENHEIM, R. W. Characterization of Spinal Motoneuron Degeneration Following Different Types of Peripheral Nerve Injury in Neonatal and Adult Mice. The Journal of Comparative Neurology, 396, 1998, 158-168.
- LÖRDAL, M.; WALLÉN, H.; HJEMDAHL, P.; BECK, O. & HELLSTRÖM, P. M. Concentration-dependent Stimulation of Intestinal Phase III of Migrating Motor Complex by Circulating Serotonin in Humans. Clinical Science, 94, 1998, 663-670.
- LUCKI, I. The Spectrum of Behaviors Influenced by Serotonin. Society of Biological Psychiatry, 44, 1998, 151-162.
- LUMSDEN, A. Multipotent Cells in the Avian Neural Crest. Trends in Neuroscience, 12 (3), 1989, 81-83.
- LUMSDEN, A. The Cellular Basis of Segmentation in the Developing Hindbrain. Trends in Neuroscience, 13, 1990, 329-335.
- LUMSDEN, A. G. S. & DAVIES, A. M. Earliest Sensory Nerve Fibres are Guided to Peripheral Targets by Attractants Other than Nerve Growth Factor. Nature, 306, 1983, 786-788.
- McGEER, P. L.; ECCLES, J. C., Sir & McGEER, E. G. Molecular Neurobiology of the Mammalian Brain. 2 ed. New York: Plenum Press, 1987, 478p.
- MAESHIMA, T.; ITO, R.; HAMADA, S.; SENZAKI, K.; HAMAGUCHI-AMADA, K.; SHUTOH, F. & OKADO, N. The Cellular Localization of 5-HT_{2A} Receptors in the Spinal Cord and Spinal Ganglia of the Adult Rat. Brain Research, 797, 1998, 118-124.
- MAGALDI, M. A. Incubacion. In: Produccion de Aves. Argentina: Cathebra, 1974, 259-278.
- MAGCHIELSE, T. & MEETER, E. Reduction of Polyneuronal Innervation of Muscle Cells in Tissue Culture After Long-term Indirect Stimulation. Developmental Brain Research, 3, 1982, 130-133.
- MAIER, A. Development and Regeneration of Muscle Spindles in Mammals and Birds. International Journal Development of Biology, 41, 1997, 1-17.

- MÄNNER, J.; SEIDL, W. & STEDING, G. Correlation Between the Embryonic Head Flexures and Cardiac Development. An Experimental Study in Chick Embryos. Anatomy and Embryology, 188, 1993, 269-285.
- MARTIN, P. & BATESON, P. Measuring Behaviour. Cambridge: University Press, 1991.
- MASON, C. How do Growth Cones Grow?. Trends in Neuroscience, 8, 1985, 304-306.
- MICHEL, G. F. & MOORE, C. L. Developmental Psychobiology. An Interdisciplinary Science. Cambridge: Bradford Book, 1995, 510 p.
- MILLIGAN, C. E. & SCHWARTZ, L. M. Programmed Cell Death During Animal Development. British Medical Bulletin, 52, 1997, 570-590.
- MOISEWITSCH, J. R. D. & LAUDER, J. M. Serotonin Regulates Mouse Cranial Neural Crest Migration. Proceedings National Academy Science USA, 92, 1995, 7182-7186.
- NARAYANAN, C. H. & NARAYANAN, Y. Neuronal Adjustments in Developing Nuclear Centers of the Chick Embryo Following Transplantation of an Additional Optic Primordium. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 44, 1978, 53-70.
- NODEN, D. M. The Embryonic Origins of Avian Cephalic and Cervical Muscles and Associated Connective Tissues. The American Journal of Anatomy, 168, 1983, 257-276.
- OKADO, N.; HOMMA, S.; ISHIARA, R.; SAKO, H. & KOHNO, K. Differential Innervation of Specific Motor Neuron Pools by Serotonergic Fibers in the Chick Spinal Cord. Neuroscience Letters, 94, 1988, 29-32.
- ONO, H.; AKIYAMA, R.; SAKAMOTO, Y.; PEARSON, J. T. & TAZAWA, H. Ballistocardiogram of Avian Eggs Determined by an Electromagnetic Induction Coil. Medical & Biological Engineering & Computing, 35, 1997, 431-435.
- OPPENHEIM, R. W. Naturally Occurring Cell Death During Neural Development. Trends in Neuroscience, 8, 1985, 487-493.
- OPPENHEIM, R. W. The Neurotrophic Theory and Naturally Occurring Motoneuron Death. Trends in Neuroscience, 12, 1989, 252-255.

- OPPENHEIM, R. W.; HAVERKAMP, L.J.; PREVETTE, D.; McMANAMAN & APPEL, S. H. Reduction of Naturally Occurring Motoneuron Death in Vivo by a Target-derived Neurotrophic Factor. Science, 240, 1988, 919-922.
- OPPENHEIM, R. W.; LEVIN, H. L. & HARTH, M. S. An Investigation of Various Egg-opening Techniques for Use in Avian Behavioural Embryology. Developmental Psychobiology, 6,1973, 53-68.
- OPPENHEIM, R. W., MADERDRUT, J. L. & WELLS, D. J. Cell Death of Motoneurons in the Chick Embryo Spinal Cord. VI. Reduction of Naturally Occurring Cell Death in the Thoracolumbar Column of Terni by Nerve Growth Factor. The Journal of Comparative Neurology, 210, 1982, 174- 189.
- OPPENHEIM, R. W. & NUNEZ, R. Electrical Stimulation of Hindlimb Increases Neuronal Cell Death in Chick Embryo. Nature, 295, 1982, 57 – 59.
- OPPENHEIM, R. W.; PREVETTE, D.; HOUENOU, L. J.; PINÇON-RAYMOND, M.; DIMITRIADOU, V.; DONEVAN, A.; O'DONOVAN, M.; WENNER, P.; MCKEMY, D. D. & ALLEN, P. D. Neuromuscular Development in the Avian Paralytic Mutant Crooked Neck Dwarf (*cn/cn*): Further Evidence for the Role of Neuromuscular Activity in Motoneuron Survival. The Journal of Comparative Neurology, 381, 1997, 353-372.
- PARRY, O. & ROBERTS, M. H. T. The Responses of Motoneurons to 5-Hydroxytryptamine. Neuropharmacology, 19, 1980, 515-518.
- PATTEN, B. M. Early Embryology of the Chick. 4 ed. Philadelphia: Blakiston, 1951, 244p.
- PEROUTKA, S. J. 5-Hydroxytryptamine Receptor Subtypes: Molecular, Biochemical and Physiological Characterization. Trends in Neuroscience, 11,1988, 496-500.
- PETRY, H. & WITTMANN, J. A New Method for Recording Spontaneous Activity of Chicken Embryos in Intact Eggs. Poultry Science, 57, 1978, 1466-1467.
- PETTIGREW, A. G.; LINDEMAN, R. & BENNETT, M. R. Development of the Segmental Innervation of the Chick Forelimb. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 49, 1979, 115 – 137.

- PLUNKETT, J. A.; BACCUS, S. A. & BIXBY, J. L. Differential Regulation of Synaptic Vesicle Protein Genes by Target and Synaptic Activity. The Journal of Neuroscience, 18,1998, 5832-5838.
- POCKETT, S. Elimination of Polyneuronal Innervation in Proximal and Distal Leg Muscles of Chick Embryos. Developmental Brain Research, 1, 1981, 299-302.
- POWIS, D. A.& BUNN, S. J. Neurotransmitter Release and its Modulation. Biochemical Mechanisms, Physiological Function and Clinical Relevance. Cambridge: Cambridge University Press, 1995, 356 p.
- PROSSER, C. L. & GREENOUGH (Editor). Neural and Integrative Animal Physiology. 4 ed. Wiley-Liss, 1991, 691p.
- PUELLES, L. & RUBENSTEIN, L. R. Expression Patterns of Homeobox and Other Putative Regulatory Genes in the Embryonic Mouse Forebrain Suggest a Neuromeric Organization. Trends in Neuroscience, 16 , 993, 472-479.
- PURVES, D. & LICHTMAN, J. W. Specific Connections Between Nerve Cells. Annual Review of Physiology, 45, 1983, 553-565.
- REESE, D. & DRAPEAU, P. Neurite Growth Patterns Leading to Functional Synapses in an Identified Embryonic Neuron. The Journal of Neuroscience, 18,1998, 5652-5662.
- RICHARDSON, B. P. & ENGEL, G. The pharmacology and Function of 5-HT₃ Receptors. Trends in Neuroscience, September, 1986, 424-428.
- RIES, L. G. K. Efeitos de Lesão no Sistema Nervoso Central de Embriões de Gallus Domesticus. Dissertação de Mestrado em Neurociências e Comportamento. Centro de Ciências Biológicas - UFSC. 1998.
- ROBERTS, M. H. T.; DAVIES, M.; GIRDLESTONE, D. & FOSTER, G. A. Effects of 5-Hydroxytryptamine Agonists and Antagonists on the Responses of Rat Spinal Motoneurons to Raphe Obscurus Simulation. Britains Journal of Pharmacology, 95, 1988, 437-448.
- ROLE, L. W. & KELLY, J. P. The Brain Stem: Cranial Nerve Nuclei and the Monoaminergic Systems. In: KANDELL, E. R.; SCHWARTZ, J. H. & JESSELL, T. M. Principles of Neural Science. Connecticut: Appleton & Lange, 1991, 1135 p.

- 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 Association, 1984, 218-219.
- SANDERS-BUSH, E. & CANTON, H. Serotonin Receptors. Signal Transduction Pathways. In: BLOOM, F. E. & KUPFER, D. J. Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress. New York: Raven Press, 1995, 431-441.
- SCHILDBERGER, K. & HUBER, F. Post-lesion Plasticity in the Auditory System of the Cricket. In: FLOHR, H. (Ed.) Post-lesion Neural Plasticity. Berlin, 1988, 565-575.
- SCHOENWOLF, G. C. Formation and Patterning of the Avian Neuraxis: One Dozen Hypotheses. Ciba Foundation Symposium, 181, 1994, 25-50.
- SEARLS, R. L. Development of the Embryonic Chick Wing Bud from Stage 24 to Stage 32. The American Journal of Anatomy, 188, 1990, 307-318.
- SHERRARD, R. M. & BOWER, A. J. Role of Afferents in the Development and Cell Survival of the Vertebrate Nervous System. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 25, 1998, 487-495.
- SIEGEL, S. Estatística Não-Paramétrica Para as Ciências do Comportamento. São Paulo: McGraw-Hill, 1975, 335p.
- SIEMIATKOWSKI, M.; BIDZINSKI, A.; CZLONKOWSKA, A & PLAZNIK, A. The Effect of Serotonin Depletion on Rat Adaptive Behavior in High and Low Responders to Novelty. Neuroscience Research Communications, 22 (3), 1998, 171-179.
- SMITH, J. L. & SCHOENWOLF, G. C. Neurulation: Coming to Closure. Trends in Neuroscience, 20, 1997, 510-517.
- SUMMERBELL, D. & STIRLING R. V. The Innervation of Dorsoventrally Reversed Chick Wings: Evidence that Motor Axons do not Actively Seek out their Appropriate Targets. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 61, 1981, 233-247.
- SVENDSEN, C. N. & ROSSER, A. E. Neurones from Stem Cells? Trends in Neuroscience, 18, 1995, 465-467.
- TAKAHASHI, T. & BERGER, A. J. Direct Excitation of Rat Spinal Motoneurons by Serotonin. Journal of Physiology, 423, 1990, 63-76.

- TESSIER-LAVIGNE, M. & PLACZEK, M. Target Attraction: are Developing Axons Guided by Chemotropism?. Trends in Neuroscience, 14,1991, 303-310.
- THOENEN, H. The Changing Scene of Neurotrophic Factors. Trends in Neuroscience, 14 1991, 165-170.
- THOMSON, A. M. Epigenesis and Plasticity in the Nervous System. Trends in Neuroscience, 13 ,990, 389-391.
- VON BARTHELD, C. S. Neurotrophins in the Developing and Regenerating Visual System. Histology and Histopathology, 13, 1998, 437-459.
- WAHL, C. M.; NODEN, D. M. & BAKER, R. Developmental Relations Between Sixth Nerve Motor Neurons and their Targets in the Chick Embryo. Developmental Dynamics, 201, 1994, 191-202.
- WALLIS, D. I.; WU, J. & WANG, X. Descending Inhibition in the Neonate Rat Spinal Cord is Mediated by 5-Hydroxytryptamine. Neuropharmacology, 32, 1993, 73-83.
- WANG, M. Y. & DUN, N. J. 5-Hydroxytryptamine Responses in Neonate Rat Motoneurons *in Vitro*. Journal of Physiology, 430, 1990, 87-103.
- WANG, Y.; RAMAGE, A. G. & JORDAN, D. *In Vivo* Effects of 5-Hydroxytryptamine Receptor Activation on Rat Nucleus Tractus Solitarius Neurones Excited by Vagal C-fibre Afferents. Neuropharmacology, 36 ,1997, 489-498.
- WETTS, R. & VAUGHN, J. E. Differences in Developmental Cell Death Between Somatic and Autonomic Motor Neurons of Rat Spinal Cord. The Journal of Comparative Neurology, 396, 1998, 483-492.
- WIDMER, C. G.; MORRIS-WIMAN, J. A. & CALHOUN, J. C. Development of Trigeminal Mesencephalic and Motor Nuclei in Relation to Masseter Muscle Innervation in Mice. Developmental Brain Research, 108, 1998, 1-11.
- WIGMORE, P. M. & DUNGLISON, G. F. The Generation of Fiber Diversity During Myogenesis. International Journal Development Biology, 42, 1998, 117-125.

WIGSTON, D. J. & SANES, J. R. Selective Reinnervation of Adult Mammalian muscle by Axons from Different Segmental Levels. Nature, 299, 1982, 464-467.

WITSCHI, E. Development of Vertebrates. London: Saunders Company, 1956.

YAMAZAKI, J.; ONO, H. & NAGAO, T. Stimulatory and Inhibitory Effects of Serotonergic Hallucinogenes on Spinal Mono- and Polysynaptic Reflex Pathways in the Rat. Neuropharmacology, 31, 1992, 635-642.

ZIPPEL, H. P.; MEYER, D. L. & KNAUST, M. Peripheral and Central Post-lesion Plasticity in the Olfactory System of the Goldfish: Behavior and Morphology. In: FLOHR, H. (Ed.) Post-lesion Neural Plasticity. Berlin, 1988, 577-591.