

AÇÃO DA INSULINA NA MORFOGÊNESE DE EMBRIÕES DE *Gallus gallus domesticus*

DIAS, P. F. e MÜLLER, Y. M. R.

Laboratório de Embriologia, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética,
Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina,
Campus Universitário Trindade, CEP 88040-900, Florianópolis, SC

Correspondência para: Paulo Fernando Dias, Laboratório de Embriologia, Departamento de Biologia Celular,
Embriologia e Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina,
Campus Universitário Trindade, CEP 88040-900, Florianópolis, SC

Recebido em 11/08/97 – Aceito em 23/06/98 – Distribuído em 30/06/99

(Com 2 figuras)

ABSTRACT

The action of insulin in the morphogenesis of chick embryos

Aspects concerned with morphogenesis of *Gallus gallus domesticus*, avail studies related to the action of the insulin in the topography and embryonic structures. At the temperature of 37.5°C, eggs were incubated during 24 h, injected with 5 ml of swine insulin in three concentrations and reincubated for more 72 h. The morphological characteristics of 80 embryos were evaluated and, according to the presented organization, classified in 5 morphogenetic levels. It was registered generalized dimorphism (4th level) in 21 embryos that went through the tests with insulin. Standard morphogenesis (1st level) and located dimorphism (3rd level) were verified among those from the control experiments. Those individuals concerned with the 4th level, showed reduced dimension of the body and were characterized by anterior-dorsal limits organized in a cephalic projection, and also presented alterations in the posterior-ventral region. These features evidence a pattern of abnormality in the determination of the cephalic-caudal axis and indicate a specific action of the insulin in the embryonic morphogenesis, in the period of 96 hours of incubation.

Key words: insulin, chick embryos, morphogenetic levels.

RESUMO

Aspectos concernentes à morfogênese de *Gallus gallus domesticus* viabilizam estudos relacionados à ação da insulina sobre estruturas e topografia embrionárias. Na temperatura de 37,5°C, ovos foram incubados por 24 h, injetados com 5 ml de insulina de suínos em 3 concentrações e reincubados por mais 72 h. As características morfológicas de 80 embriões foram avaliadas e, de acordo com a organização apresentada, classificados em 5 níveis de morfogênese. Em 21 embriões submetidos aos testes com a insulina registrou-se dimorfismo generalizado (4º nível), enquanto nos de experimento de controle foi verificado morfogênese-padrão (1º nível) e dimorfismo localizado (3º nível). Aqueles espécimes mostraram corpo com dimensões reduzidas, caracterizado por limites ântero-dorsal organizados em uma projeção cefálica e regiões posterior-ventral alteradas, evidenciando um padrão de anormalidades na determinação do eixo ântero-posterior, que indica a ação específica da insulina na morfogênese embrionária no período de 96 horas de incubação.

Palavras-chave: insulina, embriões de *Gallus gallus*, níveis morfogenéticos.

INTRODUÇÃO

A embriogênese envolve uma diversidade de comportamentos teciduais, processados por fatores intrínsecos e extrínsecos, em que sinais e receptores celulares participam dos eventos que modelam progressivamente o organismo, resultando, normalmente, na organização da forma-padrão (Eyal-Giladi *et al.*, 1992; Jacobson, 1993; Ekblom, 1995; Moury & Schoenwolf, 1995; Gumbiner, 1996; Fleming *et al.*, 1997).

A complexidade crescente dos processos e a relação tempo-espço no desenvolvimento possibilitam uma cronologia da ontogênese, na qual a partir da forma normal ou de seu comprometimento, torna-se viável o estabelecimento de níveis de morfogênese (Hamburger & Hamilton, 1951; Duboule, 1994; Schoenwolf, 1994).

Em *Gallus gallus domesticus*, até o final do 4º dia de incubação estão estabelecidos os primórdios da topografia embrionária, em que sinais reguladores se fazem presentes, constituindo um campo para a ação de substâncias que, a exemplo da insulina, compõem o sistema de indução evolutivamente conservado. Nessa espécie, a insulina está presente no 2º dia de incubação e age ligando-se a receptor específico na superfície celular, com subunidades de domínios extracelular, transmembranar e intracelular (Eyal-Giladi, 1991; Raw *et al.*, 1991; De Pablo *et al.*, 1982; Cheathan & Kahn, 1995; Christ & Ordahl, 1995; Schoenwolf & Yuan, 1995).

Os efeitos pleiotrópicos no metabolismo e no crescimento do organismo indicam que, a partir de sua ligação com o receptor, a insulina ativa inúmeras vias de transdução do sinal, na maioria das vezes transmitido por ativação seqüencial de proteínas quinases, as quais, a exemplo das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), formam complexos de ativação entre si ou com outras proteínas e enzimas (Pennington *et al.*, 1995; Tsakiridis *et al.*, 1995; Jonas *et al.*, 1997).

A amplificação do sinal, em cadeia de reações multidirecionais, é modulada por moléculas reguladoras citosólicas e nucleares que estimulam a fosforilação de fatores de transcrição, ativando inúmeras proteínas ligantes de DNA, estimulando o metabolismo e outras respostas celulares, com influência direta sobre o crescimento e a morfogênese (Cheathan & Kahn, 1995; León *et al.*, 1995; Rampalli & Zelenka, 1995; Shibley &

Pennington, 1995; Seger, 1996; Sadler, 1997). Segundo Jayanth *et al.* (1995), esses sinais mitogênicos e metabólicos regulam a expressão de pelo menos 30 genes.

Os efeitos da insulina reportados em embriões de galo de 2 a 4 dias de incubação indicaram ação estimulatória do crescimento, em doses reduzidas, e teratogênica, em altas doses. Os estudos que empregaram baixas concentrações de insulina (0,1 a 1,0 ng/ml) demonstram um aumento de até 50% no consumo de glicose na fase de discogástrula, tendo como conseqüência o estímulo no desenvolvimento (De Pablo *et al.*, 1990; Reusch *et al.*, 1995).

Experimentos realizados em tecidos embrionários e fetais de aves e mamíferos revelaram que a ação estimulatória em resposta à insulina é diversificada, induzindo processos de divisão celular e crescimento. Em concentrações intermediárias (100 ng/ml), a insulina estimulou, por diferentes mecanismos, a transcrição do gene para γ -crystallin, induziu a diferenciação de mioblastos e células gliais, provocou reorganização da actina e o transporte de glicose (De Pablo *et al.*, 1990; León *et al.*, 1995; Livnat *et al.*, 1995; Sena & Ferret-Sena, 1995; Tsakiridis *et al.*, 1995).

Segundo Rampalli & Zelenka (1995), a insulina atua também como fator de sobrevivência, na ausência da qual explantes de células epiteliais do cristalino, de embriões de 6 dias de incubação, desencadearam apoptose.

Dosagens elevadas de insulina, da ordem de μ g/embrião de galo, causaram desde a morte até o crescimento anormal, acompanhado da diminuição na concentração total de proteínas e ácidos nucléicos, bem como da redução da extremidade posterior nos embriões. Naquela condição, Pennington *et al.* (1995) reportaram que o tratamento com insulina exógena não estimulou o crescimento dos embriões e, quando administrado conjuntamente com álcool, produziu efeitos inibitórios.

Cole & Trasler (1980) já haviam demonstrado que a insulina, na dosagem elevada, altera significativamente o índice mitótico, o padrão de rotação e fechamento do tubo neural e o metabolismo de carboidratos em embriões de ratos, causando secundariamente uma redução no nível de glicose disponível.

O conhecimento sobre a ação de um fator só pode ser adequadamente estabelecido quando o sistema é inicialmente testado em diferentes

concentrações (Rodier *et al.*, 1994). Entretanto, após a identificação das concentrações em que ocorrem injúrias, torna-se necessário caracterizar a extensão desses efeitos. Os aspectos anteriormente abordados justificam a realização de trabalhos sobre a ação da insulina, em dosagens que elicitam uma resposta efetiva nos embriões, investigando-se níveis morfogenéticos no período de 24 a 96 horas de desenvolvimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Ovos fertilizados de *Gallus gallus domesticus* foram incubados a 37,5°C, de acordo com Magaldi (1974) e Guadagnin (1994), e após o período preliminar de 24 horas, foi efetuada abertura na casca (1,22 cm²). Os embriões foram, então, avaliados, submetidos aos testes e retornaram à estufa por um período complementar de 72 horas.

A metodologia demonstrou que os embriões viáveis apresentavam nível de desenvolvimento definido entre o estágio de gástrula tardia e nêurula inicial (Hamburger & Hamilton, 1951). Nos testes, por meio da abertura na casca e com auxílio de um aparato estereotáxico e agulha ($\rightarrow = 0,2$ mm), injetou-se no saco vitelínico subjacente ao neuroectoderma anterior um volume de 5 μ l de insulina de suínos (Neosulin/Biobrás) em uma das três concentrações: 0,5 U (I); 0,125 U (I1) ou 0,031 U (I2).

Estipularam-se três níveis de controle: (i) para a incubação na qual os ovos foram efetivamente mantidos intactos na incubadora por 96 horas; (m) para a manipulação em que se substituiu o procedimento de injeção por uma perfuração; e (v)

para o veículo, no qual se substituiu a insulina por água destilada. Concluído o período de incubação, no mínimo 10 embriões viáveis em cada uma das 6 modalidades de experimentos foram caracterizados quanto à morfologia externa. Realizou-se o levantamento da forma-padrão ou das categorias de anormalidades presentes por indivíduo e, através de um protocolo adaptado de Bowden *et al.* (1993), cada registro foi classificado em um dos 5 níveis morfogenéticos, cuja escala abrange desde a categoria normal até a condição em que não se evidencia a organização céfalo-caudal (Tabela 1).

O nível morfogenético máximo registrado por embrião foi sumariado estatisticamente, e as diferenças entre médias foram determinadas através da ANOVA ($p \leq 0,05$) e do método da menor diferença significativa (LSD), no sistema Statgraphics (Univ. of Illinois, EUA), versão 5,0.

RESULTADOS

A análise de 80 embriões após 96 horas de incubação apontou 24 indivíduos com características morfológicas normais (30%) – 1^a nível de morfogênese pertencente aos controles e, do total de 61 que apresentaram malformação, 42 (67%) correspondem a embriões injetados com insulina. Entre os indivíduos malformados foram levantadas 13 categorias de alterações na morfogênese, com possível multiplicidade num mesmo espécime, as quais foram caracterizadas entre o 2^a e o 5^a nível, de acordo com a intensidade crescente de comprometimento nos processos (Tabela 2).

TABELA 1
Protocolo de avaliação da forma embrionária.

Níveis	Categorias no desenvolvimento da forma
1	Morfogênese-padrão (de acordo com a literatura)
2	Alterações na forma, relacionadas à posição (ao longo do eixo do corpo)
3	Dismorfismo localizado (de campo morfogenético, região ou estrutura)
4	Dismorfismo generalizado (alteração complexa, de múltiplos campos)
5	Anormalidades de referência (anormalidades de centro ou de eixos do corpo)

A Tabela 2 mostra que 2 categorias de alteração da forma ocorreram uma única vez e, com excessão do controle (i), as demais modalidades de incubação revelaram mais de uma categoria de alteração por indivíduo. Registrou-se, respectivamente, 1/13, 5/12 e 8/13 de alterações na forma dos embriões nos controles (i), (m) e (v).

Nos testes não foram observados indivíduos com morfogênese normal, sendo que, entre as 10 categorias de malformações, 6 resultaram comuns também nos controles (m) e (v). Foram registrados, principalmente, casos de nanismo ou atraso no desenvolvimento e conjuntos de anormalidades particulares, destacando-se, entre estes, o padrão "Sphinx-shaped" (Figs. 1b e 1c), cuja frequência elevou-se à medida que aumentou a concentração de insulina.

Presente em 21 embriões injetados com insulina, o padrão "Sphinx-shaped" caracteriza-se por apresentar as dimensões do corpo reduzidas e a ausência de flexuras e de rotação, sendo possível reconhecer o eixo ântero-posterior pelo fato de a projeção cefálica estar organizada.

Na região posterior, há crescimento desorganizado, resultando em dismorfismo generalizado, em detrimento do eixo médio-caudal. A configuração tridimensional de uma esfinge visualizada nesses espécimes motivou a denominação utilizada para representar o padrão morfológico descrito.

As diferenças entre as médias das modalidades de incubação (i), (m), (v) e (I), (I1) e (I2),

evidenciadas pela ANOVA ($p \leq 0,05$) e o método de comparações múltiplas, resultaram significativas (Tabela 3).

Nossos resultados (Tabela 3) evidenciam diferentes tipos de alteração generalizada na morfogênese dos indivíduos tratados com a insulina nas 3 concentrações testadas caracterizada como de 4º nível.

Em embriões das modalidades de controle (m) e (v), o mesmo nível de morfogênese expressa apenas uma redução no ritmo de crescimento. A frequência intermediária das anormalidades relacionadas ao 3º nível referem-se a dismorfismo localizado, decorrente principalmente de assimetrias e malformações das regiões anterior e posterior, a exemplo da redução do botão caudal. Observaram-se espécimes com desenvolvimento padrão – 1º nível morfogenético apenas nas 3 modalidades de controle (Fig. 1a).

DISCUSSÃO

Os processos de desenvolvimento da forma, organizados em níveis morfogenéticos (Tabela 1), refletem a direção e o ritmo da diferenciação dos tecidos na embriogênese. As frequências relativamente altas de malformações nos controles (m) e (v) em relação ao controle (i) (Tabela 2) evidenciam que fatores físicos interferem na morfogênese embrionária.

Mas o seu nível de comprometimento estrutural é, em média, significativamente menor que

TABELA 2
Frequência de embriões normais e de categorias de malformação, e níveis morfogenéticos em todas as modalidades de incubação.

Mod	NOR	ROT	FLE	ASS	TNF	AOP	ACD	DAN	DPO	RBC	NAN	PAD (F/S)	TED
Nível	1º	2º			3º						4º	5º	
i	12	–	–	–	–	01	–	–	–	–	–	–	–
m	07	01	04	03	–	–	01	01	–	01	02	–	–
v	05	–	–	05	01	01	–	04	03	03	04	–	–
I	–	–	–	–	01	–	–	–	03	–	–	–/12	1/–
I1	–	–	01	04	01	–	01	02	02	01	06	1/05	1/–
I2	–	–	02	02	02	–	01	02	02	01	06	–/04	1/1
Totais:	19	01	07	09	04	01	03	05	07	03	14	1/21	3/1

1º nível = padrão normal (NOR); 2º nível = erros de rotação (ROT), flexuras (FLE) e assimetrias (ASS); 3º nível = tubo neural fendido (TNF), alterações ópticas (AOP), anormalidade cardíaca (ACD); dismorfismo anterior (DAN) e posterior (DPO), redução ou ausência do botão caudal (RBC); 4º nível = nanismo (NAN) e alteração particular (PAD) – padrões "Fish e Sphinx-shaped"; 5º nível = teratoma e duplicidades (TED).

o verificado nos testes, em que as frequências significativas de dismorfismos generalizados (4^o nível) demonstram que, nas concentrações administradas, a insulina compromete o desenvolvimento normal, desencadeando um padrão de malformações característico (Fig. 2).

A presença de um padrão de anomalia específico da insulina confere a possibilidade de que esta substância esteja potencializando efeitos causados pela manipulação ou inerentes à própria dinâmica do desenvolvimento.

Os casos de nanismo e o padrão “Sphinx-shaped” permitem inferir que a insulina, nas doses

utilizadas, retarda o ritmo do desenvolvimento e altera a forma do corpo dos embriões (Fig. 1), confirmando afirmações de De Pablo & Delarosa (1995) e Pennington *et al.* (1995) sobre a ação negativa desse agente no crescimento e na morfogênese, principalmente no segmento médio-posterior do neuroeixo. Este quadro de susceptibilidades à insulina decorre pelo fato de que, no período em que os testes foram realizados, excetuando-se as orientações cefálica e dorsal, os destinos das camadas celulares não estavam definitivamente determinados (Eyal-Giladi *et al.*, 1992; Moury & Schoenwolf, 1995; Khaner, 1998).

TABELA 3

Tamanho das amostras, mediana, moda e média \pm desvio-padrão, referentes ao nível morfogênético nas seis modalidades de incubação.

Modalidade de incubação	Tamanho da amostra	Mediana/Moda	Média \pm desvio-padrão
i	13	1	1,15 \pm 0,55
m	12	1	1,83 \pm 1,19
v	13	3/1	2,61 \pm 1,38
l2	15	4	3,86 \pm 0,74
I	14	4	4,00 \pm 0,39
l1	13	4	4,07 \pm 0,27

Uma vez que os testes impuseram condições críticas ao desenvolvimento, admite-se que modificações nos centros indutores embrionários resultem em processos de diferenciação de tendência regionalizada em relação aos eixos corporais, principalmente nos extremos cefálico e caudal do organismo.

Cole & Trasler (1980) verificaram que o tratamento com a insulina altera significativamente o índice mitótico, o padrão de neurulação e o metabolismo de carboidratos, contudo não influencia outros parâmetros do desenvolvimento. Nossos resultados referentes ao padrão “Sphinx-shaped” ratificam, em parte, estes dados e confirmam os reportados por De Pablo *et al.* (1990) e Reusch *et al.* (1995) quanto à dismorfogênese em embriões de aves e de ratos tratados com insulina.

De acordo com Reusch *et al.* (1995), a dosagem elevada de insulina exógena não causou mortes, embora tenha bloqueado movimentos e a proliferação celular no segmento posterior do neuroeixo. Para viabilizar sua atuação no sistema de

sinalização, a insulina e outros fatores de crescimento possuem receptores específicos na superfície celular. Segundo Raw *et al.* (1991), em altas concentrações a insulina e o fator-I, semelhante à insulina (IGF-I), podem incorrer em reação cruzada, o que levaria a erros na sinalização.

A partir de sua ligação ao receptor, a insulina produz mediadores secundários, através da “âncora” – constituída por fosfatidilinositol, glicana e etanolamina, ligada à proteínas, a qual é hidrolizada por fosfolipases (PL). Quando essa reação é catalisada por PLD solúvel, além das formas fosforiladas e não-fosforiladas de inositol glicanas translocadas intracelularmente como substrato para as enzimas metabólicas, uma proteína contendo glicosilinositol é liberada no meio extracelular, sugerindo esse tipo de interferência nos mecanismos de sinalização como causa de erros de coordenação posicional na organogênese (Saltiel & Cuatrecasas, 1986; Ishihara *et al.*, 1987; Romero *et al.*, 1988; Low & Saltiel, 1988; Spaventi *et al.*, 1990; Raw *et al.*, 1991; Seger, 1996; Kume *et al.*, 1997).

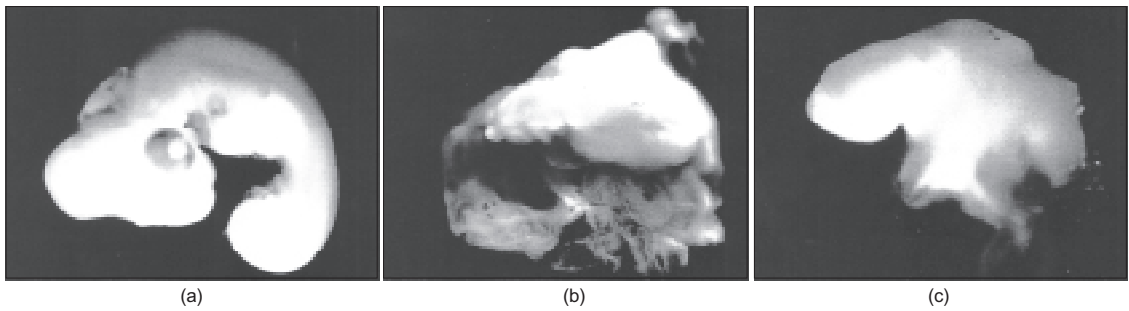


Fig. 1 — Embriões de *Gallus gallus domesticus* incubados a 37,5°C por 96 horas. (a) Embrião normal (estádio 23); controle [29 x] (b), (c). Padrão “Sphinx-Shaped”. Embriões em planos dorsal e lateral; testes com insulina (I) [86 x e 144 x].

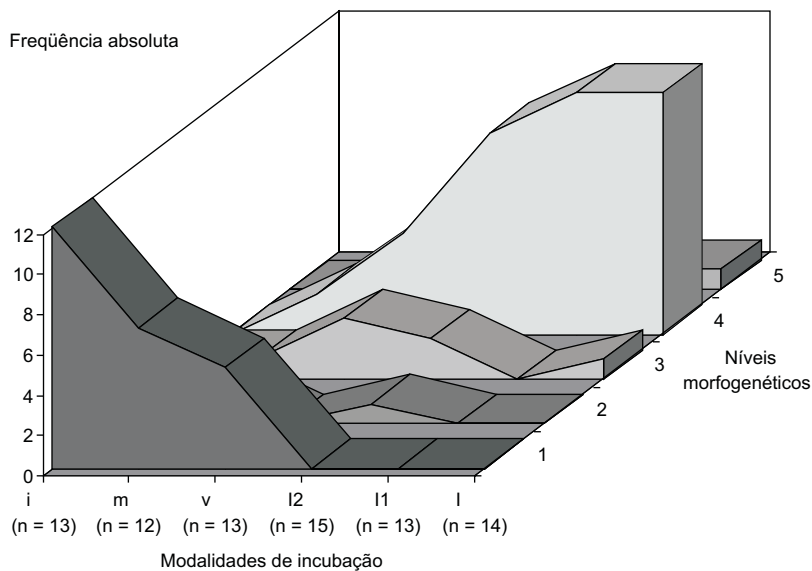


Fig. 2 — Frequência de embriões de acordo com o nível morfogênico máximo, nas modalidades de incubação (i), (m), (v), (I2), (I1) e (I).

No meio intracelular, o comprometimento do mecanismo normal de sinalização está, possivelmente, associado à exacerbação de um dos setores da rede de transdução do sinal da insulina, desequilibrando a modulação seqüencial de fosforilação e desfosforilação de proteínas.

Isso poderia explicar, nas formas “Sphinx-shaped”, a desorientação progressiva do eixo céfalo-caudal no segmento posterior em que a mobilização de glicose, requerida nessa etapa, produziria anormalidades no processo de crescimento.

A similaridade dos processos na topografia embrionária da ave sugere que a manutenção do

modelo utilizado proverá informação adicional sobre a ação da insulina e de fatores semelhantes nos mecanismos relacionados à organização dos campos morfogênicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOWDEN, H. C., TESH, J. M. & ROSS, F. W., 1993, Effects of female sex hormone in whole embryo culture. *Toxic in Vitro*, 7(6): 799-802.
- CHEATHAN, B. & KAHN, C. R., 1995, Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr. Rev.*, 16(2): 117-142.
- CHRIST, B. & ORDAHL, C. P., 1995, Early stages of chick somite development. *Anat. Embryol.*, 191: 381-396.

- COLE, W. A. & TRASLER, D. G., 1980, Gene-teratogen interaction in insulin-induced mouse exencephaly. *Teratology*, 22: 125-139.
- DE PABLO, F. & DELAROSA, E. J., 1995, The developing CNS: a scenario for the action of proinsulin, insulin and insulin-like growth factors. *Trends Neurosci.*, 18(3): 143-150.
- DE PABLO, F., ROTH, J., HERNANDEZ, E. & PRUSS, R. M., 1982, Insulin is present in chicken eggs and early chick embryos. *Endocrinology*, 111(6): 1909-1916.
- DE PABLO, F., SCOTT, L. A. & ROTH, J., 1990, Insulin and insulin-like growth factor I in early development: peptides, receptors and biological events. *Endocr. Rev.*, 11(4): 558-577.
- DUBOULE, D., 1994, Temporal colinearity and the phylotypic progression: a basis for the stability of a vertebrate bauplan and the evolution of morphologies through heterocrony. *Development*, supplement: 944-955.
- EKBLOM, P., 1995, Role of extracellular matrix in animal development – An introduction. *Experientia*, 5: 851-852.
- EYAL-GILADI, H., 1991, The early embryonic development of the chick, as an epigenetic process. *Crit. Rev. Poultry Biol.*, 3: 143-166.
- EYA-GILADI, H., DEBBY, H. & HAREL, N., 1992, The posterior section of the chick area pellucida and its involvement in hipoblast and primitive streak formation. *Development*, 116: 819-830.
- FLEMING, A., GERRELLI, D., GREENE, N. D. E. & COPP, A. J., 1997, Mechanisms of normal and abnormal neurulation: evidence from embryo culture studies. *Int. J. Dev. Biol.*, 41: 199-212.
- GUADAGNIN, C., 1994, Manejo da incubação, transferência e nascimento, pp. 95-107. In: M. R. Pinheiro (org.), *Manejo da Incubação*, FACTA, São Paulo, 291p.
- GUMBINER, B. M., 1996, Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, 84: 345-357.
- HAMBURGER, V. & HAMILTON, H., 1951, A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.*, 88: 49-92.
- ISHIHARA, M., FEDARKO, N. S. & CONRAD, H. E., 1987, Involvement of phosphatidylinositol and insulin in the coordinate regulation of the proteoglycan sulphate metabolism and hepatocyte growth. *J. Biol. Chem.*, 262(10): 4708-4716.
- JACOBSON, M., 1993, *Developmental Neurobiology*. 3ª ed., Plenum Press, New York, 782p.
- JAYANTH, V. R., BELFI, C. A., SWICK, A. R. & VARNES, M. E., 1995, Insulin and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inhibit repair of potentially lethal radiation damage and chromosome aberrations and alter DNA repair kinetics in plateau-phase A549 cells. *Radiat. Res.*, 143: 65-174.
- JONAS, E. A., KNOX, R. J., SMITH, T. C. M., WAYNE, N. L., CONNOR, J. A. & KACZMAREK, L. K., 1997, Regulation by insulin of a unique neuronal Ca²⁺ pool and of neuropeptide secretion. *Nature*, 385: 343-346.
- KHANER, O., 1998, The ability to initiate an axis in the avian blastula is concentrated mainly at a posterior site. *Dev. Biol.*, 194(2): 257-266.
- KUME, S., MUTO, A., IROUE, T., SUGA, K., OKANO, H. & MIKOSHIBA, P., 1997, Role of inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor in ventral signaling in *Xenopus* embryos. *Science*, 278(5345): 1940-1943.
- LEÓN, Y., VAZQUEZ, E., SANZ, C., VEGA, J. A., MATO, J. M., GIRALDEZ, F., REPRESA, J. & VARELANIETO, I., 1995, Insulin-like growth factor-I regulates cell proliferation in the developing inner ear, activating glycosyl-phosphatidylinositol hydrolysis and fos expression. *Endocrinology*, 136(8): 3494-3503.
- LIVNAT, T., CHEN-ZION, M., BRODIE, C. & BEITNER, R., 1995, Rapid stimulatory effect of insulin on binding of glycolytic enzymes to cytoskeleton of C-6 glial cells, and the antagonistic action of calmodulin inhibitors. *Endocrine*, 3: 319-322.
- LOW, M. G. & SALTIEL, A. R., 1988, Structural and functional roles of glycosyl-phosphatidylinositol in membranes. *Science*, 239: 268-275.
- MAGALDI, M. A., 1974, Incubacion, pp. 259-278. In: *Produccion de Aves*, Cathebra, Buenos Aires, 317p.
- MOURY, J. D. & SCHOENWOLF, G. C., 1995, Cooperative model of epithelial shaping and bending during avian neurulation: autonomous movements of the neural plate, autonomous movements of the epidermis and interactions in the neural plate/epidermis transition zone. *Dev. Dyn.*, 204: 323-337.
- PENNINGTON, S. N., SHIBLEY JR., I. A., KOOCHEK, K., GAVIGAN, M. D., MONAGHAN, J. M., SANDSTROM, L. P. & MORGAN, J. L., 1995, Insulin signaling in chick embryos exposed to alcohol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 19(3): 701-707.
- RAMPALLI, A. M. & ZELENKA, P. S., 1995, Insulin regulates expression of c-fos and c-jun and suppresses apoptosis of lens epithelial cells. *Cell Growth and Differentiation*, 6: 945-953.
- RAW, I., MENUCCI, L. & MIGLIORINI, R. H., 1991, *Bases Moleculares da Medicina, Diabetes e Outras Doenças Endócrinas e de Receptores*. Atheneu e EDUSP, v.2, São Paulo, 177p.
- REUSCH, J. E.-B., HSIEH, P., BHURIPANYO, P., CAREL, K., LEITNER, J. W., OLEFSKY, J. M. & DRAZNIN, B., 1995, Insulin inhibits nuclear phosphatase activity: requirement for the c-terminal domain of the insulin receptor. *Endocrinology*, 136(6): 2464-2469.
- RODIER, P. M., COHEN, I. R. & BUELKE-SAM, J., 1994, Neuroendocrine Manifestations of CNS Insult. In: *Developmental neurotoxicology*, 2ª ed., Raven Press, New York, pp. 65-92.
- ROMERO, G., LUTHELL, L., ROGOL, A., ZELLER, K., HEWLETT, E. & LARNER, J., 1988, Phosphatidylinositol-glycan anchors of membrane proteins: potential precursors of insulin mediators. *Reports*, 22: 509-511.
- SADLER, T. W., 1997, Mouse embryos in culture: models for understanding diabetes-induced embryopathies and gene function. *Int. J. Dev. Biol.*, 41: 291-297.

- SALTIEL, A. R. & CUATRECASAS, P., 1986, Insulin stimulates the generation from hepatic plasma membranes of modulators derived from an inositol glycolipid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 5793-5797.
- SEGER, R., 1996, The mitogen-activated protein kinase cascades. *Sigma ImmuNotes*, 14: 1-3.
- SENA, A. & FERRET-SENA, V., 1995, Insulin and brain development. *TINS*, 18(11): 485.
- SCHOENWOLF, G. C., 1994, Formation and patterning of the avian neuraxis: one dozen hypotheses. *Ciba Found. Symp.*, 181: 25-50.
- SCHOENWOLF, G. C. & YUAN, S., 1995, Experimental analyses of the rearrangement of ectoderm cells during gastrulation and neurulation in avian embryos. *Cell Tissue Res.*, 280: 243-251.
- SHIBLEY JR., I. A. & PENNINGTON, S. N., 1995, Signaling pathways regulating ornithine decarboxylase activity in the embryonic chicken. *Biol. Neonate*, 67: 441-449.
- SPAVENTI, R.; ANTICA, M. & PAVELIC, K., 1990, Insulin and insulin - like factor I (IGF-I) in early mouse embryogenesis. *Development*, 108: 491-495.
- TSAKIRIDIS, T., VRANIC, M. & KLIP, A., 1995, Phosphatidylinositol 3-kinase and the actin network are not required for the stimulation of glucose transport caused by mitochondrial uncoupling: comparison with insulin action. *Biochem. J.*, 309: 1-5.