

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**TÉCNICA DE MANIPULAÇÃO TÉRMICA PRÉ-NATAL: EFEITOS SOBRE AS  
CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS E O DESENVOLVIMENTO  
ÓSSEO DE EMBRIÕES E PINTOS DE CORTE**

**TAÍS PINHEIRO BORGES DA SILVA**

**SALVADOR - BAHIA  
SETEMBRO - 2024**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**TÉCNICA DE MANIPULAÇÃO TÉRMICA PRÉ-NATAL: EFEITOS SOBRE AS  
CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS E O DESENVOLVIMENTO  
ÓSSEO DE EMBRIÕES E PINTOS DE CORTE**

**TAÍS PINHEIRO BORGES DA SILVA**  
Zootecnista

**SALVADOR - BAHIA  
SETEMBRO - 2024**

**TAÍS PINHEIRO BORGES DA SILVA**

**TÉCNICA DE MANIPULAÇÃO TÉRMICA PRÉ-NATAL: EFEITOS  
SOBRE AS CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS E O  
DESENVOLVIMENTO ÓSSEO DE EMBRIÕES E PINTOS DE  
CORTE**

Tese apresentada ao Programa de  
Doutorado em Zootecnia da Universidade  
Federal da Bahia como requisito parcial  
para obtenção do título de Doutor em  
Zootecnia.

Área de Concentração: Produção Animal

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Michalsky Barbosa  
Coorientador: Prof. Dr. Marcos Barcellos Café

**SALVADOR - BA  
SETEMBRO – 2024**

Dados internacionais de catalogação-na-publicação  
(SIBI/UFBA/Biblioteca Universitária Reitor Macedo Costa)

Silva, Taís Pinheiro Borges da.

Técnica de manipulação térmica pré-natal: efeitos sobre as características morfofisiológicas e o desenvolvimento ósseo de embriões e pintos de corte / Taís Pinheiro Borges da Silva. - 2024.  
139 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Michalsky Barbosa.

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Barcellos Café.

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Salvador, 2024.

1. Zootecnia. 2. Ovos - Incubação. 3. Frango de corte - Criação. 4. Frango de corte - Efeito da Temperatura. I. Barbosa, Vanessa Michalsky. II. Universidade Federal da Bahia. Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

CDD - 636.5

CDU - 636.5

**TÉCNICA DE MANIPULAÇÃO TÉRMICA PRÉ-NATAL: EFEITOS SOBRE  
AS CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS E O DESENVOLVIMENTO  
ÓSSEO DE EMBRIÕES E PINTOS DE CORTE**

**Taís Pinheiro Borges da Silva**

**Tese defendida e aprovada para obtenção do grau de  
Doutor em Zootecnia**

**Salvador, 20 de setembro de 2024**

**Comissão examinadora:**



Documento assinado digitalmente  
**VANESSA MICHALSKY BARBOSA**  
Data: 23/09/2024 12:30:42-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Dra. Vanessa Michalsky Barbosa**  
**UFBA**  
**Orientadora / Presidente**



Documento assinado digitalmente  
**LIA MUNIZ BARRETTO FERNANDES**  
Data: 23/09/2024 13:45:43-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Dra. Lia Muniz Barretto Fernandes**  
**UFBA**

---

**Dra. Izabela Lorena Azevedo**  
**IFBaiano**



Documento assinado digitalmente  
**FABIANA FERREIRA**  
Data: 23/09/2024 16:28:08-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Dra. Fabiana Ferreira**  
**UFMG**



Documento assinado digitalmente  
**MARIANA ANDRÉ POMPEU**  
Data: 24/09/2024 13:34:19-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Dra. Mariana André Pompeu**  
**PUC**

**SALVADOR - BA**  
**SETEMBRO – 2024**

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei.  
Não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.  
As facilidades nos impedem de caminhar.  
Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”*

*Chico Xavier*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por todas as oportunidades que me foram concedidas, sempre me fortalecendo para enfrentar os desafios e me guiando rumo aos meus objetivos e sonhos.

A minha mãe, Marcela, minha maior fonte de apoio, amiga fiel e fã incondicional, que sempre fez tudo ao seu alcance para que eu pudesse realizar este grande sonho, a conclusão da minha graduação e mestrado. Ela me ensinou valores essenciais, mostrando que é possível alcançar nossos objetivos com integridade e respeito ao próximo.

Aos meus familiares, especialmente meu irmão, Felipe, tios e primos, que sempre estiveram ao meu lado, oferecendo suporte e incentivo durante toda a minha caminhada.

A Profa. Dra. Vanessa Michalsky, minha orientadora e inspiração, cuja paciência, incentivo e amizade foram essenciais ao longo da minha trajetória acadêmica. Sua confiança em mim nos momentos mais críticos foi decisiva para o meu crescimento profissional e pessoal.

As minhas colegas do NUPA – Izabela, Tayana, Larissa e Nayana, agradeço pela parceria e por cada contribuição que fizeram para as nossas conquistas. Cada uma de vocês foi peça fundamental nesse processo.

À minha querida amiga-irmã Pollyanna, por todos os momentos compartilhados ao longo dos 22 anos de amizade. Juntas, vivemos alegrias, desafios, brigas e reconciliações, e sou grata por seu amor e apoio incondicional, especialmente em tempos de provação.

Ao meu amigo Maurício Xavier, agradeço por todo o carinho, incentivo e confiança. Sua força, inteligência e resiliência são uma grande inspiração para mim, e sua amizade tem sido um alicerce valioso em minha vida.

Agradeço especialmente a Tayana Nery você foi fundamental tanto na minha vida pessoal quanto na acadêmica. É minha parceira de estudos desde a graduação até a pós-graduação.

Ao professor Luís Vitor Vidal pela contribuição nas análises estatísticas.

Ao Ron Meijerhof, Poultry Performance Plus e a Universidade de Wageningen, pela parceria científica.

Por fim, agradeço a todos os professores da Universidade Federal da Bahia por compartilharem conhecimento teórico, prático e por me mostrarem o verdadeiro significado de ser um profissional.

Técnica de manipulação térmica pré-natal: efeitos sobre as características morfofisiológicas e o desenvolvimento ósseo de embriões e pintos de corte

RESUMO

Foram avaliados os efeitos da técnica de manipulação térmica pré-natal, com controle da temperatura de casca do ovo, sobre o rendimento da incubação (perda de peso do ovo, fertilidade, eclodibilidade, mortalidade e refugagem), a qualidade de pinto (peso, comprimento, peso do corpo sem gema, peso de gema residual, peso relativo de órgãos e escore de umbigo); duração da incubação, morfologia embrionária, parâmetros da casca (peso, espessura, Ca, P, Mn e Mg), da gema (Ca, P, Mn e Mg), temperatura retal, parâmetros sanguíneos (Ca, P, GH, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, PTH, calcitonina, vitamina D<sub>3</sub>, fosfatase alcalina, glicose, ácido úrico, lactato, glicogênio hepático e hemogasometria) e análises ósseas (Ca, P, Mn, Mg, morfometria, biofísica e mecânica) de pintos de um dia. Um total de 2.408 ovos de matrizes pesadas da linhagem Cobb 500<sup>®</sup>, com idade de 52 semanas, foram distribuídos em quatro incubadoras de estágio único, com capacidade para 602 ovos. Cada incubadora foi regulada para manter a temperatura da casca do ovo (TCO) em 37,8°C durante o período de incubação. Entre o 8º e 18,5º dia de incubação, durante 6 horas por dia, uma máquina foi regulada para a TCO de 36,7°C (MT-L), uma máquina foi regulada para a TCO de 38,9°C (MT-H) e outra máquina foi regulada para a TCO de 39,4°C (MT-VH) diariamente. A máquina controle não sofreu alteração da programação inicial. A manipulação térmica com temperatura de casca de 36,7°C resultou em uma piora significativa na maioria das variáveis associadas ao rendimento de incubação, prolongou o tempo de incubação, aumentou a temperatura retal, piorou os parâmetros de qualidade de pinto, pesos relativos de órgãos (coração, fígado, intestino, pulmões, baço, pâncreas e bursa), prejudicou a desmineralização da casca e gema, os hormônios calciotrópicos e consequentemente o desenvolvimento ósseo embriões e pintos de um dia e, sendo assim, não é recomendada. Ao contrário, a manipulação térmica com controle de temperatura da casca, utilizando 38,9°C ou 39,4°C, promoveu menor temperatura retal, maior mobilização e utilização de minerais a partir dos componentes do ovo e consequentemente, melhor desenvolvimento dos ossos, sem prejudicar o rendimento de incubação e a qualidade dos pintos de um dia. Esta técnica demonstrou ser uma ferramenta viável e favorável, sendo importante mensurar a continuidade dos efeitos benéficos durante a criação das aves.

**Palavras-chave:** Fêmur, Frangos de corte, Hormônios, Mineralização óssea, Tíbia



Intermittent thermal manipulation technique: effects on morphophysiological characteristics and bone development of broiler embryos and chicks

ABSTRACT

The effects of the pre-natal thermal manipulation technique, with eggshell temperature control, were evaluated on incubation performance (egg weight loss, fertility, hatchability, mortality, and culling), chick quality (weight, length, yolk-free body weight, residual yolk weight, relative organ weights and navel score), incubation duration, embryonic morphology, shell parameters (weight, thickness, Ca, P, Mn, and Mg), yolk composition (Ca, P, Mn, and Mg), cloacal temperature, blood parameters (Ca, P, GH, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, PTH, calcitonin, vitamin D<sub>3</sub>, alkaline phosphatase, glucose, uric acid, lactate, liver glycogen, and blood gas analysis), and bone analysis (Ca, P, Mn, Mg, morphometry, biophysics, and mechanics) in one-day-old chicks. A total of 2,408 eggs from 52-week-old Cobb 500® heavy breeders were distributed into four single-stage incubators, each with a capacity of 602 eggs. The incubators were set to maintain the eggshell temperature (EST) at 37.8°C during the incubation period. Between the 8th and 18.5th days of incubation, for 6 hours per day, one incubator was adjusted to an EST of 36.7°C (MT-L), another to 38.9°C (MT-H), and a third to 39.4°C (MT-VH). The control incubator remained under the initial settings. Thermal manipulation at an EST of 36.7°C worsened most incubation performance variables, prolonged the incubation time, increased cloacal temperature, worsened chick quality parameters, relative organ weights (heart, liver, intestines, lungs, spleen, pancreas, and bursa), impaired the demineralization of the eggshell and yolk, disrupted calciotropic hormones, and consequently hindered bone development in embryos and one-day-old chicks. Therefore, this treatment is not recommended. Conversely, thermal manipulation with eggshell temperature control at 38.9°C or 39.4°C resulted in lower cloacal temperature, greater mobilization and utilization of minerals from the egg components, and consequently better bone development, without impairing incubation performance or chick quality. This technique proved to be a viable and beneficial tool, and further evaluation of the long-term positive effects during bird rearing is recommended.

**Keywords:** Femur, Broiler chickens, Hormones, Bone mineralization, Tibia

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Interação entre ambiente e comportamento do frango de corte.....	18
Figura 2.	Mecanismos de regulação do eixo-HPT e HPA do frango.....	22
Figura 3.	Duração da incubação (h) de pintos submetidos à incubação em TCO controle (C) ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO do 8° ao 18,5° dia.....	68
Figura 4.	Temperatura retal (°C) de pintos submetidos à incubação em TCO controle (C) ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO do 8° ao 18,5° dia.....	69
Figura 5.	Peso do pinto sem gema (YFBM g) ao longo da incubação em TCO controle (C) ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO do 8° ao 18,5° dia.....	74
Figura 6.	Comprimento do pinto (cm) ao longo da incubação em TCO controle (C) ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO do 8° ao 18,5° dia.....	75
Figura 7.	Peso da gema (g) ao longo da incubação em TCO controle (C) ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO do 8° ao 18,5° dia.....	76
Figura 8.	Peso da casca do ovo (g) ao longo da incubação em TCO controle (C) ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO do 8° ao 18,5° dia.....	78
Figura 9.	Espessura da casca do ovo (mm) ao longo da incubação em TCO controle (C) ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO do 8° ao 18,5° dia.....	79
Figura 10.	Teor de cálcio da casca do ovo (mg) ao longo da incubação em TCO controle (C) ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO do 8° ao 18,5° dia.....	80
Figura 11.	Teor de fósforo da casca do ovo (mg) ao longo da incubação em TCO controle (C) ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO do 8° ao 18,5° dia.....	81

Figura 12.	Teor de manganês da casca do ovo ( $\mu\text{g}$ ) ao longo da incubação em TCO controle (C) ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO do 8° ao 18,5° dia.....	82
Figura 13.	Teor de magnésio da casca do ovo (mg) ao longo da incubação em TCO controle (C) ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO do 8° ao 18,5° dia.....	83
Figura 14.	Teor de cálcio da gema (mg) ao longo da incubação em TCO controle (C) ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO do 8° ao 18,5° dia.....	86
Figura 15.	Teor de fósforo da gema (mg) ao longo da incubação em TCO controle (C) ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO do 8° ao 18,5° dia.....	87
Figura 16.	Teor de manganês da gema ( $\mu\text{g}$ ) ao longo da incubação em TCO controle (C) ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO do 8° ao 18,5° dia.....	88
Figura 17.	Teor de magnésio da gema (mg) ao longo da incubação em TCO controle (C) ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO do 8° ao 18,5° dia.....	89
Figura 18.	Teores sanguíneos de cálcio e fósforo (mmol/L) de pintos de um dia submetidos à incubação em TCO controle (C) ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO do 8° ao 18,5° dia.....	92
Figura 19.	Teores sanguíneos de GH, T3, T4, PTH, calcitonina e vitamina D3 (ng/mL) de pintos de um dia submetidos à incubação em TCO controle (C) ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO do 8° ao 18,5° dia.....	94
Figura 20.	Teor sanguíneo de fosfatase alcalina (U/L) de pintos de um dia submetidos à incubação em TCO controle (C) ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO do 8° ao 18,5° dia .....	98
Figura 21.	Teores sanguíneos de glicose (mg/dL), lactato (mmol/L), ácido úrico (mg/dL) e glicogênio hepático (mg/g) de pintos de um dia incubados em TCO controle (37,8°C), ou incubação com manipulação térmica baixa (36,7°C), alta (38,9°C) e muito alta (39,4°C) TCO, do 8° ao 18,5° dia.....	100

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Número de pintos retirados ao longo do nascimento.....	54
Tabela 2.	Rendimento da incubação e mortalidade embrionária de pintos submetidos à incubação em TCO controle (C), ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO, do 8° ao 18,5° dia.....	66
Tabela 3.	Peso do ovo antes da incubação, pesos dos pintos, peso relativo de órgãos e escore de umbigo no momento da eclosão de pintos submetidos à incubação em TCO controle (C), ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO, do 8° ao 18,5° dia.....	71
Tabela 4.	Parâmetros hemogasométricos de pintos de um dia submetidos à incubação em TCO controle (C), ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO, do 8° ao 18,5° dia.....	103
Tabela 5.	Composição mineral da tíbia aos 18,5 dias e no momento da eclosão de pintos submetidos à incubação em TCO controle (C), ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO, do 8° ao 18,5° dia.....	107
Tabela 6.	Características morfométricas, biofísicas e mecânicas da tíbia aos 18,5 dias de incubação e no momento da eclosão de pintos submetidos à incubação em TCO controle (C), ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO, do 8° ao 18,5° dia.....	111
Tabela 7.	Características morfométricas, biofísicas e mecânicas do fêmur aos 18,5 dias de incubação e no momento da eclosão de pintos submetidos à incubação em TCO controle (C), ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO, do 8° ao 18,5° dia.....	112

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina trifosfato
Ca	Cálcio
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono ou gás carbônico
Cu	Cobre
EST	Eggshell Temperature / Temperatura da casca do ovo
FA	Fosfatase Alcalina
Fe	Ferro
GH	Hormônio do crescimento
GR	Gema Residual
Hb	Hemoglobina
Hct	Hematócrito
HT	High Temperature / Temperatura alta
iCa	Cálcio ionizado
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
K	Potássio
MCA	Membrana corioalantóide
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
MSV	Membrana do saco vitelínico
MT	Manipulação Térmica
Na	Sódio
NPT2b	Cotransportador de sódio-fosfato
O <sub>2</sub>	Gás oxigênio
P	Fósforo

pCO <sub>2</sub>	Pressão parcial de dióxido de carbono
pO <sub>2</sub>	Pressão parcial de dióxido de oxigênio
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Fosfato
PTH	Paratormônio
SEM	Erro padrão da média
SO <sub>2</sub>	Saturação de oxigênio
T <sub>3</sub>	Triiodotironina
T <sub>4</sub>	Tiroxina
TCO	Temperatura da casca do ovo
TE	Temperatura do embrião
TM	Temperatura da máquina
UR	Umidade relativa do ar
YFBM	Peso do corpo sem o saco vitelínico residual
YFBM	Yolk Free Body Mass / Massa do corpo livre da gema
Zn	Zinco

## SUMÁRIO

	<b>RESUMO</b> .....	vii
	<b>ABSTRACT</b> .....	viii
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
	2.1 TEMPERATURA CORPORAL DAS AVES.....	17
	2.2 SISTEMA TERMORREGULADOR EM AVES.....	17
	2.2.1 Ontogenia da termorregulação das aves.....	19
	2.2.2 Mecanismos fisiológicos da termorregulação.....	20
	2.2.3 Flutuações de temperatura e desenvolvimento embrionário.....	23
	2.3 MANIPULAÇÃO TÉRMICA NA INCUBAÇÃO ARTIFICIAL DE OVOS.....	24
	2.3.1 Influência da manipulação térmica sobre os parâmetros de incubação	27
	2.3.2 Influência da manipulação térmica sobre pintos recém-eclodidos.....	30
	2.3.3 Influência da manipulação térmica sobre a fisiologia embrionária.....	35
	2.3.4 Temperatura x desenvolvimento ósseo.....	37
	2.4 FORMAÇÃO DO SISTEMA ÓSSEO DAS AVES.....	41
	2.4.1 Desenvolvimento ósseo do embrião de galinha.....	42
	2.4.2 Os minerais do ovo e sua utilização para o desenvolvimento ósseo embrionário.....	45
	2.4.3 Calcificação e mineralização óssea.....	46
	2.4.4 Controle hormonal do metabolismo ósseo durante do desenvolvimento.....	47
	a) <i>Hormônio do crescimento (GH)</i> .....	48
	b) <i>Hormônios tireoide triiodotironina (T<sub>3</sub>) e a tiroxina (T<sub>4</sub>)</i> .....	48
	c) <i>Calcitonina e paratormônio (PTH)</i> .....	50
	d) <i>Vitamina D<sub>3</sub></i> .....	50
	e) <i>Insulina, Hormônios sexuais e cortisol</i> .....	51
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	52
	3.1 Local.....	52
	3.2 Unidades experimentais.....	52
	3.3 Tratamentos.....	53
	3.4 Pré-aquecimento e incubação dos ovos.....	53
	3.5 Nascimento dos pintos.....	54
	3.6 Análises de rendimento de incubação.....	55
	3.6.1 Perda de peso dos ovos durante o período de incubação.....	55
	3.6.2 Mortalidade embrionária e fertilidade.....	55
	3.6.3 Taxa de eclosão total em relação ao número de ovos férteis.....	56
	3.7 Análises de casca.....	56
	3.7.1 Peso e espessura de casca.....	56
	3.7.2 Minerais da casca.....	56

3.8	Análises de minerais da gema e saco vitelino residual.....	57
3.9	Análises em embriões e pintos.....	58
3.9.1	Peso do corpo sem o saco vitelino (YFBM) .....	58
3.9.2	Peso dos pintos no momento da eclosão.....	58
3.9.3	Temperatura retal.....	58
3.9.4	Comprimento do pinto (cm) .....	58
3.9.5	Escore de umbigo.....	59
3.9.6	Parâmetros sanguíneos.....	59
3.9.6.1	<i>Hemogasometria</i> .....	59
3.9.6.2	<i>Glicose, Lactato, Ácido úrico</i> .....	59
3.9.6.3	<i>Hormônios: GH, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, calcitonina e vitamina D<sub>3</sub></i> .....	60
3.9.6.4	<i>Cálcio, Fósforo e Fosfatase Alcalina</i> .....	61
3.9.7	Peso dos órgãos e dos pintos recém-eclodidos.....	61
3.9.8	Glicogênio Hepático.....	61
3.10	Análises ósseas.....	62
3.10.1	Peso, comprimento e largura dos ossos.....	62
3.10.2	Teste biomecânico.....	62
3.10.3	Análises de cinzas e minerais dos ossos.....	63
3.10.4	Calcificação óssea.....	64
3.11	Análise Estatística.....	64
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	65
4.1	Rendimento de incubação e qualidade dos pintos.....	65
4.2	Parâmetros de casca e gema.....	78
4.2.1	Minerais da casca.....	78
4.2.2	Minerais da gema.....	86
4.3	Parâmetros sanguíneos.....	91
4.3.1	Cálcio e fósforo.....	91
4.3.2	Hormônios.....	93
4.3.3	Fosfatase Alcalina.....	97
4.3.4	Glicose, lactato, ácido úrico e glicogênio hepático.....	100
4.3.5	Hemogasometria.....	102
4.4	Análises ósseas.....	107
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	115
<b>6</b>	<b>IMPLICAÇÕES</b> .....	115
<b>7</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	117



## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o rápido desenvolvimento das características produtivas das aves não foi acompanhado por uma evolução proporcional dos sistemas viscerais, tornando-as mais vulneráveis às variações ambientais. Em climas tropicais, o estresse por calor é um dos principais fatores que afetam a saúde das aves, causando aumento da mortalidade, redução do consumo de ração e queda no ganho de peso. Assim, a busca por estratégias que minimizem os efeitos do estresse térmico tornou-se uma prioridade.

Nesse contexto, a manipulação térmica intermitente durante a incubação tem sido uma estratégia promissora para melhorar a termotolerância das aves (Piestun et al., 2008). Essa técnica consiste em submeter os embriões a variações controladas de temperatura, favorecendo a adaptação ao estresse térmico. Estudos indicam que o período ideal para essa manipulação corresponde ao intervalo em que ocorrem importantes mudanças no desenvolvimento dos eixos hormonais hipotálamo-hipófise-tireóide e hipotálamo-hipófise-adrenal, entre o 4º e o 19º dia de incubação (Thommes, 1985 ; Yahav et al., 2004). Durante essa fase, o embrião passa por intensas adaptações fisiológicas e metabólicas (Moraes et al., 2004; Yahav et al., 2004).

Entre as mudanças críticas nessa etapa, destaca-se o desenvolvimento ósseo, que é particularmente sensível às variações térmicas. O período do tratamento térmico coincide com o pico de utilização dos minerais da gema e da casca, essenciais para a formação esquelética (Yair; Uni, 2011; Torres; Korver, 2018). O controle adequado da temperatura de incubação é crucial, não apenas para garantir uma eclodibilidade garantida, mas também para promover uma deposição adequada de minerais como cálcio e fósforo nos ossos (Lourens et al., 2007; Molenaar et al., 2013).

Embora a literatura indique os benefícios da técnica, seus efeitos no desenvolvimento ósseo e hormonal das aves ainda são pouco explorados. Aspectos como a influência da temperatura nos hormônios calciotrópicos e na mobilização de minerais da casca e da gema para os ossos permanecem incertos (Morita et al., 2020). Este estudo visa preencher essas lacunas, avaliando o impacto de diferentes condições de manipulação térmica, com o controle da temperatura da casca, entre os dias 8 e 18 de incubação sobre o rendimento de incubação, morfofisiologia e o desenvolvimento ósseo de embriões de frangos de corte.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 TEMPERATURA CORPORAL DAS AVES**

A temperatura corporal das aves está relacionada à produção de calor e aos mecanismos de controle e manutenção da temperatura interna do organismo (termorregulação), os quais são essenciais para manter a homeostase (estabilidade fisiológica) sistêmica desses animais (Furlan; Macari, 2002).

O desenvolvimento embrionário das aves é um período crítico para a formação do sistema termorregulatório, pois define a capacidade futura do pintinho para regular sua temperatura corporal e responder adequadamente às variações ambientais. Uma compreensão aprofundada desse processo é essencial para o manejo adequado durante a incubação e para garantir o bem-estar e a saúde das aves ao longo de seu ciclo de vida.

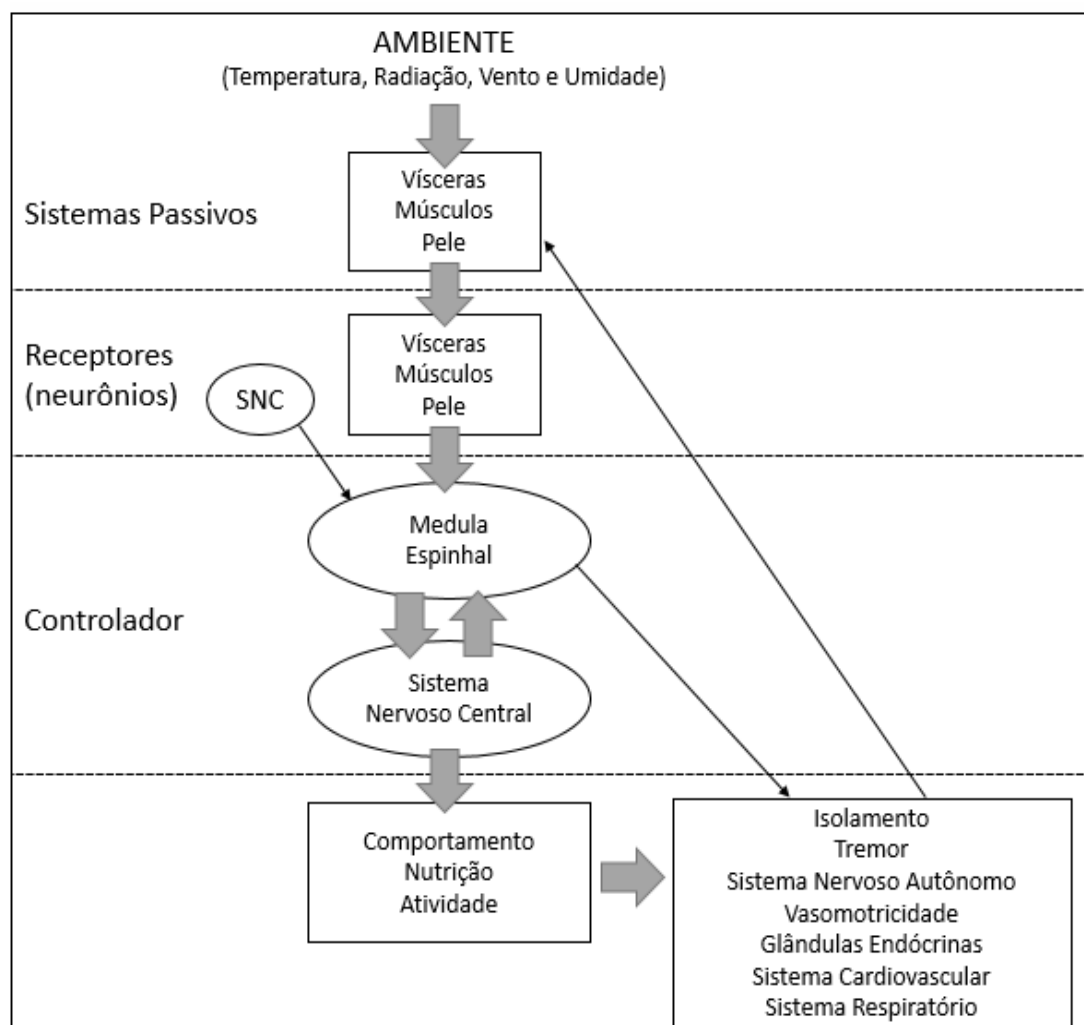
### **2.2 SISTEMA TERMORREGULADOR EM AVES**

O sistema termorregulatório é considerado um dos mais importantes e críticos sistemas para a homeostase do organismo das aves. Por serem animais homeotérmicos, as aves são capazes de gerar calor metabólico e manter sua temperatura corporal em torno de valores constantes. Essa aptidão termorregulatória, proporciona equilíbrio ao meio interno para o ideal funcionamento dos sistemas que compõem o organismo na maioria das condições ambientais (Furlan; Macari, 2002; Nichelmann; Tzschentke, 2002; 2003, Tzschentke, 2007).

O complexo termorregulatório das aves é formado pela integração dos sistemas receptor, controlador, efetor e sistema passivo do organismo. O seu desenvolvimento ocorre com a formação do sistema nervoso central e periférico, que são responsáveis por induzir a ativação dos mecanismos controladores da temperatura corporal, através da percepção dos estímulos externos ao organismo pelas unidades funcionais receptoras (Furlan; Macari, 2002) (Figura 1). O sistema receptor é constituído por neurônios responsivos que percebe os estímulos externos, e a sua integração com o sistema nervoso

induz a ativação de mecanismos controladores da temperatura corporal. Os sistemas efetores participam induzindo as respostas para a manutenção da homeotermia. Assim, a termorregulação é realizada por estruturas do sistema nervoso central, que controlam as interações hormonais em seu organismo, e por sua vez irão controlar o metabolismo e produção de calor corporal desses animais (Baarendse *et al.*, 2007).

Figura 1 – Interação entre ambiente e comportamento do frango de corte.



Fonte: adaptado de Furlan e Macari (2002).

### 2.2.1 Ontogenia da termorregulação das aves

O desenvolvimento pré-natal de mecanismos termorreguladores em aves é benéfico para a rápida maturação da regulação da temperatura corporal em fase inicial de pós-eclosão, o que é importante para o ideal funcionamento do organismo durante a vida (Tzschentke, 2007). Segundo Nichelmann e Tzschentke (2002), esse desenvolvimento ocorre nas aves em três fases, caracterizadas por diferentes eficiências de respostas termorregulatórias: fase pré-natal, fase pós-natal e fase de homeotermia completa.

A fase pré-natal refere-se a todo o período de incubação, período em que ainda existe uma baixa eficiência das reações endotérmicas e o embrião encontra-se com limitada capacidade de estabilizar sua temperatura corporal quando exposto à exposição térmica. Ao início da incubação, o embrião de ave é altamente sensível às variações de temperatura no ambiente externo ao ovo (Decuypere; Michels, 1992). Os primeiros sinais de diferenciação celular que contribuem para o desenvolvimento do sistema nervoso e dos órgãos sensoriais que são essenciais para a percepção e resposta às mudanças de temperatura no ambiente externo (Janke *et al.*, 2002; Nichelmann; Tzschentke, 2003). Conforme o desenvolvimento prossegue, as estruturas anatômicas específicas, como a medula espinhal, os nervos periféricos e os centros cerebrais relacionados à termorregulação, começam a se formar, permitindo que o embrião progressivamente adquira a capacidade de regular seu calor corporal (Nichelmann; Tzschentke, 2002, 2003; Tzschentke, 2007; Baarendse *et al.*, 2007).

Nichelmann e Tzschentke (2002) demonstram que as reações endotérmicas durante o período pré-natal exercem influência sobre a eficiência da termorregulação em longo prazo. Essas reações podem interferir positivamente na adaptação às condições ambientais esperadas e podem estar envolvidas em mecanismos de adaptação epigenéticas. Durante este período, as reações comportamentais que influenciam a regulação térmica, tais como a capacidade inata de preferência de temperatura ambiente é essencial para a manutenção da homeotermia porque os mecanismos autônomos de regulação da temperatura não estão totalmente desenvolvidos.

Mudanças na taxa de produção de calor em aves podem ocorrer até mesmo antes da eclosão, de acordo com a temperatura de incubação utilizada (Meijerhof; Van Beek, 1993; Loh *et al.*, 2004; Lourens *et al.*, 2007; Decuypere *et al.*, 2013). Em resposta, o

embrião desenvolve uma série de adaptações fisiológicas para otimizar sua capacidade de termorregulação (Nichelmann; Tzschentke, 2002; Tzschentke; Plagemann, 2006; Tzschentke, 2007). Isso também inclui o desenvolvimento de estruturas como o saco vitelino, responsável pela troca de gases e nutrientes com o ambiente (Lin *et al.*, 2017), podendo interferir na formação do tecido adiposo, que atua como isolante térmico (Hammond *et al.*, 2007).

A fase pós-natal se inicia no momento pós-eclosão e termina aproximadamente no 10º dia de vida. Nesse momento o pintinho irá apresentar uma maior capacidade de manter sua temperatura corporal, quando exposto às oscilações de temperatura ambientais frias. Segundo Tzschentke (2007), a termorregulação em animais homeotérmicos em fase de desenvolvimento pós-natal, tem como objetivo promover a manutenção de uma temperatura corporal estável sob a maioria das condições. Para que isso se aconteça, o sistema regulador da temperatura integra as atividades de todos os sistemas do corpo em reações adequadas e coordenadas.

A terceira fase é a da homeotermia completa, começando aproximadamente no 10º dia de vida. Este período é caracterizado por uma temperatura corporal mais ou menos constante, que é em grande parte independente da temperatura ambiente, como resultado da ativação de elementos de controle termorreguladores. Portanto, o sistema de termorregulação torna-se eficiente em sua totalidade (Nichelmann; Tzschentke, 2002).

Sendo assim, a fase de desenvolvimento embrionário é muito sensível e de grande importância para a adaptabilidade do organismo durante a vida adulta.

### **2.2.2 Mecanismos fisiológicos da termorregulação**

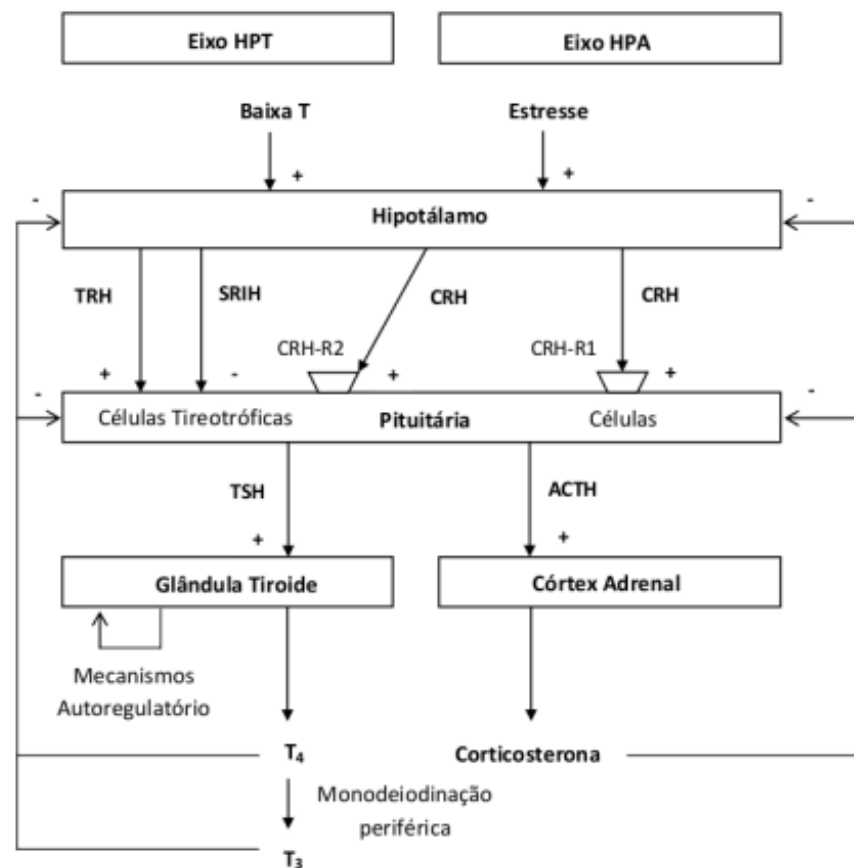
Pode-se dizer que o controle da temperatura das aves ocorre a partir de duas variáveis: uma associada às respostas promovidas pelo aumento da temperatura e outra pela redução da temperatura. Segundo Furlan e Macari (2002), é assumida a existência de duas populações de neurônios no hipotálamo (responsivos ao calor e ao frio). Os neurônios responsivos ao calor são ativados por meio do aumento da temperatura corporal, induzindo o animal a ter respostas de perda de calor; por outro lado, os neurônios responsivos ao frio induzem uma regulação. Essas células nervosas promovem mudanças

nos sistemas circulatório, respiratório e o metabolismo em geral, possuindo a capacidade de integrar suas atividades, participando de reações adequadas e coordenadas, resultando no controle da temperatura corporal das aves (Nichelmann *et al.*, 2001).

Dentre os meios que atuam na regulação da temperatura corporal, o metabolismo energético é o mais importante para a ocorrência dessa função. O sistema nervoso central controla as respostas hormonais, por meio dos eixos Hipotálamo – Pituitária – Tireoide e o eixo Hipotálamo – Pituitária – Adrenal. Esses eixos regulam hormônios que estão relacionados ao controle do metabolismo das aves, como as catecolaminas, corticosteroides e hormônios tireoidianos. Os hormônios citados aparecem muito cedo na circulação sanguínea e no líquido alantóico durante o desenvolvimento embrionário promovendo estímulo à produção de calor do sistema orgânico (Oviedo-Rondón; Murakami, 1998; Debonne *et al.*, 2008). Neurônios aferentes levam ao cérebro informações de natureza elétrica dos receptores, tanto externos quanto internos, espalhados pelo corpo, onde as informações são processadas (Furlan; Macari, 2002). Portanto, o hipotálamo é a estrutura cerebral mais importante no processamento das informações sensoriais e execução de respostas motoras, comportamentais, autonômicas e hormonais (Tzschentke; Basta, 2002).

Darras *et al.* (2000) relataram que os hormônios tireoidianos regulam a taxa de metabolismo basal e são essenciais para a manutenção da temperatura corporal constante em animais homeotérmicos. O hormônio liberador de tireotrofina (TRH) estimula a pituitária (hipófise) a sintetizar e liberar o hormônio tireoestimulante (TSH), que por sua vez estimula a glândula tireoide a produzir  $T_3$  e  $T_4$  (Debonne *et al.*, 2008). O hormônio  $T_3$  é o principal fator que estimula a termogênese por ser o principal agente controlador do metabolismo basal. A concentração circulante de  $T_3$  é reduzida em altas temperaturas, enquanto que em baixas temperaturas, a concentração aumenta (Yahav; Hurwitz, 1996; Yalçın *et al.*, 2009). Além disso, em resposta ao estresse, o hipotálamo produz o hormônio liberador de corticotrofina (CRH). O CRH é o regulador de estimulação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), produzido na hipófise anterior. O ACTH estimula o córtex adrenal, que por sua vez irá aumentar os níveis de corticosterona na corrente sanguínea. O aumento da corticosterona exerce feedback negativo sobre o hipotálamo, bem como sobre a hipófise, agindo então indiretamente sobre sua própria liberação (Carsia; Harvey, 2000) (Figura 2).

Figura 2 - Mecanismos de regulação do eixo-HPT e HPA do frango.



T: temperatura, TRH: hormônio liberador da tireotrófica, SRIH: Somatotrofina hormônio liberador de inibição, TSH: hormônio estimulante da tireoide, T<sub>4</sub>: tiroxina, T<sub>3</sub>: Triiodotironina, CRH: hormônio liberador da corticotrofina, ACTH: hormônio adrenocorticotrófico, CRH-R: receptor hormonal da liberação de corticotrofina, (+) = efeito estimulante e (-) = efeito inibitório. Fonte: Adaptado de Debonne *et al.* (2008).

O aumento da atividade dos neurônios hipotalâmicos sensíveis ao calor induz um aumento na atividade de mecanismos de perda de calor, seguida por uma diminuição na temperatura do corpo das aves (Simon *et al.*, 1986). A estimulação de neurônios sensíveis ao frio resulta no efeito oposto. Essas reações endotérmicas podem ser observadas muito cedo durante o desenvolvimento embrionário, como relatadas por Lourens *et al.* (2006), que demonstraram em embriões de galinha. A partir do 8º dia de incubação, os embriões de galinha reagiram com um aumento de curto prazo (<16 minutos) na produção de calor após uma diminuição de 0,3 °C na temperatura da incubadora. Além disso, uma redução de curto prazo na produção de calor foi encontrada após o aumento de 0,3°C na temperatura das máquinas.

### 2.2.3 Flutuações de temperatura e desenvolvimento embrionário

A sensibilidade dos embriões de frangos de corte às flutuações de temperatura durante o período de incubação é um aspecto crucial a ser considerado na produção avícola. Visto que o desenvolvimento embrionário é altamente dependente de um ambiente térmico estável para garantir a expressão adequada dos genes e a progressão correta dos processos biológicos, essa sensibilidade térmica reflete a importância de criar condições ideais durante o processo de incubação para garantir o desenvolvimento saudável e o sucesso da eclosão.

Como citado no tópico anterior, durante a incubação, os embriões de aves estão em um estágio extremamente delicado de desenvolvimento, onde são altamente sensíveis a qualquer alteração ambiental (Nichelmann; Tzschentke, 2002; Tzschentke; Plagemann, 2006; Lourens *et al.*, 2006; Tzschentke, 2007; Van Der Pol *et al.*, 2014).

As mudanças bruscas de temperatura podem afetar negativamente o desenvolvimento embrionário de aves (Barott, 1937). Pesquisas anteriores já demonstraram que uma ligeira mudança na temperatura de incubação atua como um estresse no embrião, levando a problemas como baixo desenvolvimento corporal, alteração na produção de calor do embrião, nos índices da incubação, má formação e qualidade do pinto (Yalçin *et al.*, 2003; Lourens *et al.*, 2007), desenvolvimento inadequado de órgãos (Shim; Pesti, 2011; Van Den Brand *et al.*, 2021), o crescimento do esqueleto (Van Den Brand *et al.*, 2019), alteração na eficiência de utilização dos componentes da gema (Oviedo-Rondón *et al.*, 2008; Dayan *et al.*, 2020) e nos hormônios da tireoide (Willemsen *et al.*, 2010; AL-Rukibat *et al.*, 2017), entre outros.

No entanto, trabalhos que abordaram manipulações térmicas durante a incubação demonstraram que tais consequências dependem do grau e tempo de exposição à temperatura não ideal.

Uma variação brusca na temperatura de incubação atua como um estresse no embrião em desenvolvimento. Todavia, uma variação térmica cuidadosa pode não promover impactos significativos ao desenvolvimento embrionário ou até mesmo ajudar a desenvolver tolerância ao estresse térmico durante o período de criação, preparando as aves para resistir a condições estressantes (Nichelmann; Tzschentke, 2003; Tzschentke; Plagemann, 2006; Tzschentke, 2007; Piestum *et al.*, 2011; Willemsen *et al.*,



2011; Al-zghoul *et al.*, 2013; Tzschentze; Tatge, 2013; Morita *et al.*, 2016; Vinoth *et al.*, 2018; Al-zghoul *et al.*, 2019; Goel *et al.*, 2022). Por exemplo, ovos incubados a 39,5°C, entre o 7º e 16º dia de incubação, e expostos continuamente ao calor por 24 horas apresentaram menor taxa de eclosão (50,6%) quando comparados aos ovos expostos ao calor por apenas 12 horas diárias (79,4%) durante o mesmo período (Piestun *et al.*, 2008).

Embriões expostos a temperaturas variáveis podem desenvolver mecanismos termorreguladores eficientes, o que os torna mais tolerantes a elevações das temperaturas ambientais ao longo da vida (Iqbal *et al.*, 1990; Nichelmann; Tzschentke, 2002, 2003; Tzschentke; Plagemann, 2006; Tzschentke, 2007; Piestun *et al.*, 2008, 2013; Tzschentze; Tatge, 2013; Morita *et al.*, 2016; Vinoth *et al.*, 2018; Al-zghoul *et al.*, 2019; Goel *et al.*, 2022). Esse processo sido estudado há décadas e é descrito como adaptação epigenética promovida pela técnica de manipulação térmica durante a embriogênese e será abordado a seguir.

A sensibilidade dos embriões de frangos de corte às flutuações de temperatura durante o período de incubação destaca a importância de garantir condições ambientais ideais ao longo desse processo. Isso envolve o controle preciso da temperatura e umidade na incubadora, bem como a monitorização constante para evitar variações indesejadas. Investir em tecnologias e práticas de manejo que promovam um ambiente de incubação adequado é essencial para maximizar o potencial de desenvolvimento das aves e garantir a sustentabilidade e eficiência da produção avícola.

## **2.3 MANIPULAÇÃO TÉRMICA NA INCUBAÇÃO ARTIFICIAL DE OVOS**

A manipulação térmica na incubação artificial de ovos é uma técnica utilizada para influenciar o desenvolvimento dos embriões visando avanço do desempenho dos pintinhos após a eclosão. Essa prática envolve a aplicação controlada de variações de temperatura em momentos específicos do período de incubação (críticos do desenvolvimento embrionário), com o objetivo de induzir respostas fisiológicas benéficas nos embriões.

A temperatura experimentada durante momentos críticos na embriogênese está intimamente relacionada com o mecanismo neural de termossensibilidade, e com o

critério de expressão dos genes, denominada de programação epigenética (Janke *et al.*, 2002; Moraes *et al.*, 2003; Tzschentke; Plagemann, 2006; Al-zghoul *et al.*, 2013, 2019; XU *et al.*, 2023). Entretanto, aumentar ou diminuir a temperatura de incubação por períodos prolongados ou inadequados, pode causar diminuição da eclodibilidade, má qualidade dos pintinhos recém-nascidos e até morte embrionária (Tzschentke, 2007). Assim, a intensidade e a duração da manipulação são fundamentais durante o treinamento térmico. Esses períodos são cuidadosamente escolhidos com base no estágio de desenvolvimento do embrião e nos objetivos específicos da manipulação térmica.

Estudos demonstram variações nos resultados da manipulação térmica. Iqbal *et al.* (1990) encontraram um aumento na resistência ao estresse térmico agudo durante a criação, a partir da elevação na temperatura de incubação entre os dias 11 e 20. Nichelmann; Tzschentke (1999) observaram que a exposição de embriões de pato (*Cairina moschata*) a temperaturas mais baixas (34,5 °C) durante a última semana de incubação (do 28º ao 35º dia) resultou em patos que produziam mais calor corporal durante a primeira semana de vida. Os autores relataram que a temperatura de incubação menor que a habitual, durante a última semana de desenvolvimento embrionário, pode induzir ajuste termorregulador e aumentar o potencial de tolerância ao frio, corroborando com a pesquisa de Nichelmann *et al.*, que em 1994, constataram que uma redução da temperatura ambiente durante os últimos sete dias de incubação aumentou a resistência de patos ao frio após a eclosão. Essas observações também foram demonstradas em estudos posteriores.

Em 1960, Romanoff já haviam afirmado que o desenvolvimento dos eixos do sistema nervoso central compreende o intervalo do dia 4,5 até 19,5 do desenvolvimento embrionário. Em 2011, Willemsen *et al.* alertaram que a manipulação térmica durante a embriogênese de frangos de corte pode influenciar o desenvolvimento embrionário, o processo de incubação e a criação; no entanto, esta influência depende, em grande parte, do período e frequência, duração e amplitude da temperatura utilizada durante a técnica. Assim, o período crítico para a prática da manipulação térmica intermitente durante a embriogênese deve ser determinado de acordo com o desenvolvimento dos eixos neurais que participam da função termorreguladora (Loyau *et al.*, 2014).

Sobre o período da prática da manipulação térmica, alguns autores aplicaram tratamentos de temperatura de incubação antes do 10º dia, sendo uma fase anterior ao

estabelecimento do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide/adrenal (Yalçın; Siegel, 2003; Collin *et al.*, 2007, Piestun *et al.*, 2008; Al-zghoul *et al.*, 2015), enquanto outros escolheram período que compreendem o 13º dia em diante de incubação (Janke *et al.*, 2002; Moraes *et al.*, 2003, 2004, Yahav *et al.*, 2004; Collin *et al.*, 2005; Collin *et al.*, 2007 Tzschentke; Halle, 2009), fase durante a qual a produção de hormônios tireoidianos aumenta significativamente.

Resultados variaram: na categoria de trabalhos que foi utilizada manipulação a partir dos 10 dias, Piestun *et al.* (2008) observaram que a MT do 7º ao 16º dia embrionário, momento em que os eixos tireoidiano e adrenal se desenvolvem e amadurecem, teve um efeito duradouro e melhorou a termotolerância de frangos de corte. Em seguida, em 2011, Piestun *et al.* encontraram melhorias na conversão alimentar e crescimento muscular em frangos submetidos a altas temperaturas no mesmo período de incubação. Al-Zghoul *et al.* (2015) reportaram aumento na termotolerância com manipulações térmicas entre o 12º e 18º dia. Em trabalhos foi utilizada manipulação a partir dos 12º ou 13º dia de incubação, Moraes *et al.* (2003) sugeriram que essa manipulação térmica intermitente entre o 13º e o 17º dia de incubação pode melhorar a capacidade de termorregulação na fase de produção. Os autores detectaram uma diminuição dos níveis de T<sub>3</sub> plasmáticos em frangos do tratamento MT após um desafio térmico. Yahav *et al.* (2004b) conseguiram resultados semelhantes aplicando manipulação térmica entre o 16º e o 18º dia de incubação. Os autores relataram uma redução da temperatura corporal e nas concentrações plasmática de T<sub>3</sub> e corticosterona em pintinhos de 3 dias de idade manipulados termicamente durante diferentes fases da embriogênese e expostos a diversas temperaturas de incubação.

Em 2005, Collin *et al.* demonstraram que pintos que foram tratados com diferentes protocolos de MT entre o 16º e 18º dia de incubação mantiveram a temperatura corporal significativamente menor que os pintos do controle durante o desafio térmico. Posteriormente, em 2007 Collin *et al.* não encontraram melhorias na termotolerância a longo prazo, no entanto o tratamento tardio favoreceu o crescimento muscular do peito sem afetar o pH final e a perda por gotejamento da carne do peito. Esta pesquisa corroborou com Tzschentke e Plagemann (2006), que concluíram que a manipulação térmica é mais eficiente nos últimos dias antes da eclosão. Al-Zghoul *et al.* (2015)

também reportaram aumento na termotolerância com manipulações térmicas entre o 12º e 18º dia.

Também houveram trabalhos que investigaram MT em diferentes momentos. Collin *et al.* (2007) conduziram um estudo avaliando o efeito de diferentes períodos de exposição à temperatura elevada (39,5°C por 3 horas diárias) durante a incubação (8º ao 10º e 16º ao 18º dia) sobre a eclodibilidade, crescimento e termotolerância de frangos de corte. Apesar de submeter os embriões a diferentes tratamentos térmicos, os resultados não indicaram um aumento na capacidade dos animais em lidar com ambientes quentes aos 42 dias de idade.

Al-Sardary e Mohammad (2016) trabalharam com diferentes períodos de MT. Os pesquisadores investigaram o efeito de um aumento de 1°C na temperatura acima do padrão de incubação durante um período de quatro h/d em diferentes estágios durante a incubação de ovos Ross 308® (1–5 d, 8–12 d, 14–18 d e 19–21 d) e um grupo controle com condições padrão em incubadora. Todos os grupos submetidos à manipulação térmica melhoraram a eclodibilidade e o desempenho dos frangos de corte. Este estudo encontrou melhoras em diferentes momentos do período de incubação, o que não sugere um único momento em que a manipulação térmica deva ser realizada.

Em resumo, a manipulação térmica na embriogênese pode influenciar a termotolerância e o desempenho das aves. Parece que o momento do desenvolvimento dos eixos hipotálamo-hipófise-tireoide e hipotálamo-hipófise-adrenal se mostra interessante para aplicação de tratamentos térmicos, mas a eficácia depende do período e das condições específicas de aplicação. Vários outros trabalhos que serão abordados a seguir relataram respostas com melhorias ou ausência de prejuízos aos parâmetros de incubação, características de qualidade e parâmetros fisiológicos de pintos de corte.

### **2.3.1 Influência da manipulação térmica sobre os parâmetros de incubação**

Estudos utilizando a técnica de manipulação térmica pré-natal, como uma estratégia de aquisição de termotolerância para a fase pós-natal, também demonstram os efeitos da técnica sobre os parâmetros zootécnicos de incubação.

Leandro *et al.* (2000) avaliaram o efeito de períodos de estresse térmico (40,0°C) durante a incubação sobre a eclodibilidade e qualidade dos pintos nascidos. Ovos de matrizes com 42 semanas de idade foram distribuídos em três incubadoras, reguladas para manter uma temperatura de 37,8°C e umidade relativa de 60%, do dia 1 ao 16 de incubação. No 16º dia de incubação, foi aplicada uma variação de temperatura 40,0°C (quente) ou 32,0°C (frio) durante cinco horas em duas máquinas. A terceira incubadora permaneceu com a temperatura de 37,8°C (controle). Os autores concluíram que a alteração da temperatura padrão de incubação, com resfriamento ou aquecimento por 5 horas diárias no 16º dia em diante, não foi suficiente para prejudicar a eclodibilidade.

Yildirim e Yetisir (2004) incubaram ovos de matrizes Ross 308® com 52 semanas de idade a uma temperatura de 37,6°C ( $\pm 0.5^\circ\text{C}$ ) e umidade de 58%, do dia 1 ao 17 de incubação, onde, ao 17º dia, os ovos foram distribuídos em tratamentos com temperatura baixa (36,1°C), controle (37,2°C), alta (38,3°C) e muito alta (39,9°C). Os autores observaram que melhores índices de eclodibilidade foram obtidos quando utilizadas temperaturas de incubação entre 37,2°C a 38,3°C nos últimos dias de incubação (80,7 e 82,3% para 37,2°C e 38,3°C vs. 64,4 e 75,8% para 36,1°C e 39,9°C). O grupo de temperatura baixa apresentou uma taxa de mortalidade significativamente maior que os demais tratamentos (8,0% para 36,1°C vs. 2,3%, 3,3% e 4,2% para controle, 38,3°C e 39,9°C) respectivamente. No mesmo ano, Yahav *et al.* (2004) publicaram um estudo que também avaliaram os efeitos da manipulação térmica durante diferentes períodos do desenvolvimento embrionário sobre a eclodibilidade pintos Ross®. Embriões do grupo controle foram incubados a 37,8°C, enquanto os embriões da manipulação térmica foram tratados durante 3 horas a 39,5°C (1) ou 41,0°C (2), durante os dias 8 a 10 de incubação ou durante os dias 16 a 18. Os pesquisadores observaram maior eclodibilidade significativa de embriões foram termicamente manipulados entre os dias 16 a 18 de incubação (manipulação tardia). Os autores sugeriram que a utilização de tratamento térmico com temperaturas de 39,5°C são benéficas para os resultados de incubação.

Trabalhando com aves da linhagem Ross®, Collin *et al.* (2005) testaram o efeito do tempo de exposição à manipulação térmica durante a embriogênese de frangos de corte sobre os resultados de incubação, peso corporal e temperatura cloacal do pintinho recém-eclodido. Os embriões do grupo controle foram incubados a 37,8°C durante toda incubação, enquanto que os embriões do tratamento de manipulação térmica foram

incubados a 37,8°C e tratados a 38,9°C por 3h/dia (D1), 6h/dia (D2), 12h/dia (D3) ou 24h/dia (D4) entre o 16° e 18° dia de incubação. Os pesquisadores relataram que as diferentes formas de manipulação térmica testadas durante a embriogênese não foram suficientes para prejudicar os índices de eclosão e peso do pintinho. Essa conclusão também foi observada por Yalçın *et al.* (2008). Esses autores trabalharam com aclimação ao calor durante a incubação, utilizando altas temperaturas de 39,6°C por 6 horas diárias, do 10° dia ao 18° dia e não encontraram diferença na taxa de eclosão.

Posteriormente, para avaliar os efeitos da manipulação térmica durante fases da embriogênese sobre a taxa de eclosão e mortalidade embrionária, Collin *et al.* (2007) utilizaram tratamentos de temperatura de incubação de 39,5°C, por 3 horas diárias durante fase inicial (FI: do 8° ao 10° dia), fase final (FF: do 16° ao 18° dia) ou em ambas as fases (FI + FF). Os pesquisadores encontraram taxas de eclodibilidade de ovos férteis mais elevadas no tratamento com manipulação térmica na fase inicial (FI), e a segunda maior taxa de eclosão em ovos do tratamento FF (96,3% e 92,0% respectivamente). O tratamento FI + FF resultou em um decréscimo significativo na eclodibilidade dos ovos (75,5%). Neste caso foi pontuado que a exposição repetida pode ter sido muito drástica para o desenvolvimento e sobrevivência do embrião do tratamento FI + FF.

Flores *et al.* (2017) investigaram o efeito da estimulação térmica em embriões da linhagem Cobb® (em idades de 33 a 53 semanas) durante a última semana de incubação (do dia 14 ao dia 18). Os pesquisadores aplicaram variações de temperatura MT ao calor 1,39°C (14° a 18° de incubação, 3 horas diárias), MT ao calor 1,0°C (16° a 18° de incubação, 3h/dia) e estímulos temperatura de 36 °C (14° a 18° de incubação, 3 horas diárias). Os resultados demonstraram que as variações de temperatura aplicadas não comprometeram a viabilidade embrionária, a taxa de eclosão ou a qualidade dos pintinhos recém-nascidos. Além disso, os parâmetros produtivos, como peso do pinto e consumo de gema, não foram significativamente afetados. Os autores concluíram que a manipulação térmica pode ser uma estratégia promissora para otimizar o processo de incubação.

Silva (2019) aplicaram manipulação térmica de 38,9°C por 6 horas diárias nos dias 8 a 18 de incubação de ovos de linhagem Cobb® e As taxas eclosão de ovos férteis, ovos bicados e mortalidade embrionária demonstram que os pintos tratados termicamente não

foram afetados pelas oscilações na temperatura na casca do ovo em todas as fases da incubação.

Amjadian e Shahir (2020) dividiram ovos férteis aleatoriamente entre 2 grupos: um grupo controle (37,8 °C e 56% UR) e um grupo submetido à MT (39,5°C e 65% UR). Os ovos do grupo MT foram expostos a uma temperatura de 39,5°C por 3 horas diárias entre o 11º e o 16º dia de incubação. Amostras dos pintos foram retiradas no dia 0 pós-eclosão. Os resultados indicaram que a MT não influenciou significativamente a eclodibilidade e mortalidade embrionária.

Assim, os resultados encontrados nesses estudos podem ser influenciados pela linhagem utilizada, pois cada uma possui características próprias. Observação também feitas em outros estudos com diferentes protocolos de manipulação térmica (Loyal *et al.*, 2013; Flores *et al.*, 2016; Al sardary; Mohammad, 2016; Zaboli *et al.*, 2017), podendo-se perceber que a técnica, quando feita de maneira controlada, não traz impactos significativamente negativos aos parâmetros zootécnicos da incubação.

O mesmo foi observado em trabalhos com manipulação térmica durante a embriogênese de codornas. Alkan *et al.* (2013) observaram que a técnica de manipulação térmica não apresentou impactos na eclodibilidade de ovos tratados com MT de 41°C (3 horas diárias) nos dias 6 a 8 de incubação ou nos dias 12 ao 14 de incubação. Esses resultados

concordam com o estudo de El-Shater *et al.* (2021) que também não observaram diferenças na eclodibilidade em grupos embriões tratados termicamente a 41°C (3 horas diárias) na primeira metade (MT nos dias 6 a 8) e na segunda metade (MT nos dias 12 a 14) da embriogênese, ou o grupo de embriogênese precoce e tardia em ambas as janelas de tempo.

### **2.3.2 Influência da manipulação térmica sobre pintos recém-eclodidos**

As condições de temperatura durante a incubação podem afetar o desenvolvimento de todos os tecidos (Decuypere; Michels, 1992). Alterações na temperatura de incubação podem afetar diretamente as taxas metabólicas dos embriões, influenciando o crescimento, a absorção do saco vitelino, a formação de tecidos epitelial,

conjuntivo (adiposo, cartilaginoso, ósseo e sanguíneo), muscular (liso, esquelético e cardíaco), nervoso, consequentemente alterando a qualidade do pintinho (Yalçin; Siegel, 2003; Black; Burggren, 2004; Lourens *et al.*, 2007; Oviedo-Rondón *et al.*, 2008a; Willemsen *et al.* 2010; Dayan *et al.*, 2020).

A qualidade geral dos pintinhos pode ser um indicativo de possíveis problemas durante a incubação, fator importante a ser abordado em pesquisas com manipulações embrionárias. Estes fatores indicam um potencial para manipular o desenvolvimento embrionário e pré-condicionar o metabolismo das aves às condições ambientais pós-eclosão por meio de alterações térmicas na fase pré-natal (Aksit *et al.*, 2010; Tzschentke; Rumpf, 2011).

Incubando ovos de um lote comercial de matrizes de corte com 42 semanas de idade, Yalçin e Siegel (2003) observaram que pintinhos nascidos a partir de ovos tratados com temperatura de 39,6°C durante 6 horas diariamente (dia 10 a 18 de incubação) apresentaram peso corporal e peso relativo do coração estatisticamente semelhante ao dos pintos do tratamento controle. Da mesma maneira, Yahav *et al.* (2004), utilizando tratamento térmico de 39,9°C (3h por dia, entre os dias 8 e 10 ou 16 e 18 de incubação) e Collin *et al.* (2005) utilizando temperatura de 38,9°C (3h/dia, 6h/dia, 12h/dia ou 24h/dia, nos dias 16 a 18 de incubação), também observaram que a manipulação térmica não afetou o peso do pinto recém-eclodido.

Yalçin *et al.* (2008a) incubaram ovos de matrizes Ross 308® de três diferentes idades (32, 42 e 65 semanas) onde, em uma incubadora (controle) foi mantida a temperatura de 37,5°C durante toda incubação e em outra incubadora os ovos foram aclimatados a 38,5°C (MT) por 6 horas diárias do 10° ao 18° dia de incubação. Os pesquisadores observaram menor peso relativo de fígado e coração no momento da eclosão para o grupo MT em comparação com o grupo controle, sem alterações no crescimento proporcional desses órgãos independentemente da idade da matriz. No entanto, durante os últimos 4 dias de aclimação (no dia 14 a 18 de incubação) o crescimento do embrião acelerou, indicando crescimento compensatório. Do 14° ao 18° dia de incubação, os pesos do fígado e dos pulmões aumentaram mais rapidamente do que o peso do embrião, resultando em um aumento significativo da porcentagem desses órgãos, sugerindo um crescimento proporcional diferencial. Foram registrados pintos mais pesados na eclosão para o grupo MT em comparação ao grupo controle,



demonstrando que os pintinhos de grupo MT ganharam mais peso desde o final da aclimação até o momento da eclosão. Assim, os autores concluíram que os embriões podem tolerar a temperatura mais alta sem reduzir o seu peso e qualidade geral do futuro pintinho. Esta observação está de acordo o trabalho anterior (Yalçin; Siegel, 2003), sugerindo que a manipulação térmica iniciada aos 10 dias de incubação não prejudica o desenvolvimento do embrião. Silva *et al.* (2019) trabalharam com tratamentos térmicos controlando a casca do ovo entre o 8º e 18º dia de incubação (38,9°C por 6 horas diárias) e constataram que o MT não afetou o peso dos órgãos ou a qualidade dos pintos recém-eclodidos. Essas pesquisas indicam que a manipulação térmica durante a incubação pode ser uma estratégia eficaz para melhorar o desempenho dos frangos de corte.

Com relação ao crescimento do músculo esquelético, a atividade proliferativa das fibras musculares se intensifica em um estágio mais avançado do desenvolvimento embrionário, especificamente entre os dias 15 e 19, atingindo seu pico no dia 17 de incubação (Halevy *et al.*, 2006; Piestun *et al.*, 2009). Durante esse período, ocorre a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Wise; Frye, 1975; Epple *et al.*, 1997). Isso sugere que essa fase pode ser interessante para a aplicação de tratamentos térmicos, tanto para aumentar a tolerância térmica quanto para promover o crescimento muscular pós-eclosão. No entanto, como a incubação de ovos em grande escala deve ser mantida sob controle rigoroso de temperatura e umidade, apenas ajustes mínimos na temperatura ou na duração dos tratamentos térmicos (MT) podem ser feitos para evitar respostas de estresse significativas (Epple *et al.*, 1997; Yahav *et al.*, 2004; Renaudeau *et al.*, 2012).

Diferentes intervalos e durações dos tratamentos térmicos (MT) parecem causar impactos variados na termotolerância a longo prazo e no crescimento do músculo peitoral. Entre os diversos regimes de temperatura e duração de MTs aplicados do 16º ao 18º dia de incubação, o aumento da temperatura para 39°C por 3 horas diárias se mostrou ideal tanto para a aquisição de termotolerância quanto para o desempenho (Yahav *et al.*, 2004; Tzschentke; Halle, 2009) e crescimento do músculo peitoral (Halevy *et al.*, 2006). Esse aumento no crescimento do músculo peitoral durante a embriogênese, induzido por MTs intermitentes entre o 8º e 16º dia de incubação, foi posteriormente refletido em uma maior hipertrofia das miofibras (Piestun *et al.*, 2011) e no crescimento do músculo peitoral (Piestun *et al.*, 2013; Loyau *et al.*, 2014) até 35 dias após o nascimento.

Esse protocolo foi reavaliado para outros períodos embrionários. Por exemplo, MTs aplicadas entre o 8º e 10º de incubação por 3 horas diárias não produziram efeito na indução de termotolerância (Collin *et al.*, 2007), enquanto MTs intermitentes por 12 horas diárias entre o 8º e 16º apresentaram um efeito duradouro na termorregulação, observável até 70 dias após o nascimento (Piestun *et al.*, 2013). Esses resultados corroboram que os estudos de Piestun *et al.* (2009), que aplicaram MT contínua a 39,5°C (24h) em contraste com MT intermitente a 39,5°C por 12 horas diárias, entre o 8º e 16º de incubação, demonstrando que o MT intermitente aumenta o peso corporal relativo dos embriões.

Contudo, houve uma diminuição na temperatura corporal e nos níveis de hormônios tireoidianos em todos os embriões, sugerindo que a temperatura durante a embriogênese pode afetar a capacidade dos pintinhos de regular a temperatura corporal após a eclosão. O fenômeno de um efeito de longo prazo do MT embrionário no crescimento muscular foi explicado por Piestun *et al.* (2015). Os pesquisadores afirmaram que a resposta imediata aos MTs foi o aumento no número de mioblastos, uma tendência que continuou após a eclosão, sugerindo uma expansão do reservatório de células progenitoras musculares durante a segunda e terceira onda de miogênese. Esses relatos sintetizam que os MTs aplicados durante os períodos de embriogênese, que coincidem com o desenvolvimento dos eixos tireoidiano e adrenal, bem como com as ondas miogênicas, resultam em alterações epigenéticas subjacentes, que promovem mudanças na expressão de genes específicos, culminando em efeitos duradouros na termotolerância e no crescimento muscular.

Outra descoberta interessante é que a temperatura de incubação pode afetar as características da pele e das penas de embriões de frango de corte (Morita *et al.*, 2016). Esses autores investigaram a influência da temperatura durante a incubação nas características morfométricas e no desenvolvimento vascular da pele, características das penas, relações com os níveis hormonais e a temperatura mais adequada para pintos de corte durante a recria. Ovos de matrizes de corte foram expostos a temperaturas de incubadora de 36°C (baixa), 37,5°C (controle) ou 39°C (alta), do 13º ao último dia de incubação (21 d). A umidade relativa do ar foi mantida em 60% durante a incubação.

Concentrações mais baixas dos hormônios T<sub>3</sub> e GH e baixa vascularização na pele do pescoço, costas e coxa foram encontradas para o grupo de tratamento de 36°C. O grupo incubado sob alta temperatura (39°C) apresentou pele mais fina, vascularização

aumentada e menos sinais de estresse térmico em comparação aos outros dois tratamentos.

Aplicando tratamento térmico de 39,5°C por 3 horas diárias entre o 11º e o 16º dia de incubação, Amjadian e Shahir (2020) observaram que o comprimento dos pintinhos foi consideravelmente menor no grupo MT, quando comparados ao grupo de incubação controle. Apesar desse achado, os autores relataram que a qualidade geral dos pintinhos não foi afetada pela MT, e não houve diferenças significativas no desempenho de crescimento pós-eclosão entre os dois grupos.

Trabalhando com codornas japonesas, El-Shater *et al.* (2021) visaram elucidar os efeitos a longo prazo das manipulações térmicas intermitentes durante duas janelas de tempo, precoce/tardia, na embriogênese em codornas (*Coturnix japonica*) sobre o desenvolvimento embrionário, eclodibilidade, histogênese muscular e desempenho de crescimento pós-eclosão. Foram definidos quatro grupos de tratamentos. No grupo controle, os ovos foram incubados a uma temperatura de 37,7°C e 55% UR. Nos outros três grupos, os ovos foram submetidos a uma temperatura de 41°C por 3 horas diárias.

Um grupo recebeu esse tratamento nos dias 6 a 8 da embriogênese (grupo de embriogênese precoce - EE), outro grupo nos dias 12 a 14 (grupo de embriogênese tardia - LE), e o terceiro grupo em ambas as fases (grupo de embriogênese precoce e tardia - EL). Os resultados revelaram que os embriões dos grupos EL e EE tinham pesos significativamente menores em comparação com os grupos LE e controle. Após a eclosão, os pintos foram criados em condições ideais de manejo (três repetições por tratamento) e foram realizadas análises histológicas e quantitativas das fibras musculares. Foi demonstrado se que o tratamento térmico causou um aumento significativo no músculo do peito das codornas no grupo de embriogênese precoce (EE). Assim, os autores concluíram que a manipulação térmica intermitente por 3 a 6 horas, com temperaturas entre 39°C e 40°C, durante os primeiros dias da embriogênese (6º ao 8º dia) pode parecer aumentar a massa muscular e o rendimento do músculo peitoral em codornas japonesas.

Diante do exposto, pode-se observar que um perfil de temperatura de incubação que inclua variações de temperatura de curto prazo é altamente relevante para a meta de melhorar o desempenho das aves e pode ser o futuro da incubação comercial.

### 2.3.3 Influência da manipulação térmica sobre a fisiologia embrionária

Como citado anteriormente, oscilações na temperatura do ambiente promovem mudanças fisiológicas nos frangos de corte, tanto em fase embrionária, quanto em sua vida pós-natal. A tentativa de manter ou dissipar o calor corporal incluem mudanças na taxa de respiração, nos íons plasmáticos e metabólitos sanguíneos, sendo que estas alterações podem resultar em efeitos sobre os índices zootécnicos (Moraes *et al.*, 2004; MORAN, 2007). A manipulação térmica durante a embriogênese também pode ter consequências sobre a composição corporal e metabolismo embrionário.

Lu *et al.* (2007) afirmaram que altos níveis de glicose plasmática durante a bicagem interna e a eclosão podem indicar que a glicose está sendo utilizada como uma fonte de energia, durante este período crítico, para que o embrião sobreviva. Os pesquisadores encontraram médias de glicose plasmática de pintos incubados a 37,8°C entre  $218.18 \pm 3.22$  para fêmeas e  $227.09 \pm 5.50$  mg/dL para machos. Yalçın *et al.* (2008a) observaram pintinhos nascidos de ovos tratados com manipulação térmica a 38,5°C por 6 horas diárias do dia 10 a 18 de incubação e obtiveram menores médias dos níveis de glicose sanguínea na eclosão, quando comparados a pintos controle (177mg/dL x 199mg/dL). Os autores explicaram que este fato foi ocasionado pelo aumento da taxa metabólica dos embriões tratados termicamente, refletido pelo aumento da concentração do hormônio T<sub>3</sub> circulante no sangue desses animais.

Molenaar *et al.* (2010) determinaram que em elevada temperatura contínua da casca do ovo (38,9°C), a oxidação da glicose é aumentada e a síntese de glicogênio diminuída. Maatjens *et al.* (2014b) afirmaram que, em altas temperaturas contínuas da casca, pode ocorrer aumento na utilização da glicose sanguínea para obtenção energia imediata desviando parte da glicose que seria enviada para a síntese de glicogênio.

No entanto, manipulando os embriões termicamente para o frio (34,6°C) e calor (40,6°C) continuamente entre os dias 16 a 18 de incubação, Willemsen *et al.* (2010) não observaram diferença significativa entre as médias de glicogênio no fígado dos pintinhos. Em 2011, trabalhando com manipulação térmica intermitente, os mesmos autores também não encontraram diferença significativa para os valores de glicogênio hepático na eclosão dos pintos termicamente tratados com calor (40,6°C por 4h/dia, do 16º ao 18º dia de incubação) quando comparado aos pintos do grupo controle (Willemsen *et al.*, 2011).

Moraes *et al.* (2004) relataram que o aquecimento de ovos a 39,0°C do dia 13 ao 17 de incubação, durante 2 horas diárias não afetou as concentrações plasmáticas de ácido úrico. Entretanto, Yalçın *et al.* (2008a) observaram que pintos oriundos de ovos aclimatados a 39,6°C por 6 horas diárias entre o 10º e 18º dia de incubação, tiveram menores níveis plasmáticos de glicose e ácido úrico em comparação com o grupo controle.

Avaliando os efeitos da técnica de manipulação térmica pré-natal com controle da temperatura de casca do ovo sobre o rendimento de incubação e características morfofisiológicas de pintos de corte, Silva (2018) aplicaram MT de 38,9°C por 6 horas diárias, dia nos dias 8 a 18 de incubação de ovos de linhagem Cobb®. O autor observou que pintos oriundos do grupo MT apresentaram menores níveis de glicemia e glicogênio hepático e maiores níveis de lactato no plasma, além de diminuição no índice hematócrito, quando comparados aos pintos do grupo controle. Em contrapartida, a MT não promoveu alterações em parâmetros hemogasométricos avaliados (como: pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, iCa, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, TCO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e hemoglobina), assim demonstrando que a MT, quando feita de maneira altamente controlada, altera o metabolismo energético dos embriões, mas não é suficiente para afetar o equilíbrio acidobásico dos pintos de corte. Assim, a técnica pode ser aplicada sem causar prejuízo no desempenho zootécnico de incubação.

É preconizado que a modificação das temperaturas padrão de incubação, por meio de “desafios térmicos”, pode ser uma forma de aumentar sua capacidade de lidar com estresses térmicos após a eclosão, bem como apresentar melhores taxas de crescimento, melhoria da eficiência alimentar e resistência a doenças. Todavia, pouco se sabe sobre sua influência no desenvolvimento do sistema locomotor dos frangos de corte. Compreender a fisiologia das estruturas extraembrionárias que sustentam o desenvolvimento ósseo embrionário é fundamental para otimizar a aplicação da técnica de manipulação térmica na incubação artificial.

### 2.3.4 Temperatura x desenvolvimento ósseo

Entre os fatores determinantes durante o processo de incubação, a temperatura se destaca como uma variável essencial, com impacto direto sobre o metabolismo do embrião e, conseqüentemente, sobre a formação e o crescimento ósseo (Sgavioli *et al.*, 2016; Morita *et al.*, 2020; Azevedo, 2022). O desenvolvimento do sistema esquelético, que inclui processos complexos como a diferenciação dos condrócitos, mineralização óssea e a formação da placa de crescimento, é sensível às variações térmicas (Yalçin *et al.*, 2007).

A literatura científica documenta amplamente os efeitos da temperatura de incubação sobre diferentes aspectos do desenvolvimento embrionário, mas o impacto específico sobre a ossificação e a morfologia óssea gerou resultados contrastantes. Os efeitos variam conforme o protocolo experimental utilizado.

Temperaturas superiores ao valor ideal de 37,8°C têm sido associadas a distúrbios no crescimento ósseo, na mineralização e na simetria esquelética. O aumento da temperatura pode induzir assimetria óssea, afetar a diferenciação dos condrócitos e reduzir a atividade da fosfatase alcalina, comprometendo assim a formação e o crescimento dos ossos (Yalçin; Siegel, 2003; Oviedo-Rondón *et al.*, 2008a; Yalçin *et al.*, 2007; Oznurlu *et al.*, 2016, Azevedo, 2022).

No estudo de Yalçin *et al.* (2007), a manipulação térmica (39°C) foi empregada entre 10 e 18 dias e reduziu peso da tíbia dos embriões. Os autores concluíram que a atividade na placa de crescimento e o desenvolvimento da tíbia tem estágios críticos diferentes. A diferenciação dos condrócitos é mais afetada pela temperatura no início da incubação, enquanto o crescimento da tíbia sofreu mais danos com o aumento ao final do período experimental.

Oviedo-Rondón *et al.* (2008a) também apontaram assimetria relativa aos ossos em resposta ao aumento da temperatura de incubação. Os pesquisadores encontraram diferenças nos ossos das pernas quando a temperatura foi aumentada para 38 e 39°C nos últimos quatro dias de incubação. Esse período é crítico, pois corresponde a uma fase de estabilidade no metabolismo, afetando o desenvolvimento do embrião, especialmente no que diz respeito ao esqueleto. Na continuação desse estudo, Oviedo-Rondón *et al.*, (2008b) destacaram que diferenciação dos condrócitos foi prejudicada, comprometendo

o desenvolvimento da tíbia e do fêmur, além de causar assimetria entre os membros inferiores. Além disso, o aumento da temperatura para 39°C na última semana de incubação resultou em redução no peso relativo ao fêmur de pintinhos recém-eclodidos. No entanto, o peso da tíbia só foi afetado quando os embriões foram expostos a uma combinação de temperatura elevada na última semana e baixa (36,7°C) na primeira.

Em relação ao teor de cinzas nos ossos após a eclosão, Van Der Pol *et al.* (2014) não identificaram alterações ao modificar a temperatura para 39,4°C. Os autores afirmaram que esse resultado pode ser explicado pelo período em que a variação de temperatura foi aplicada, com a fase inicial sendo uma etapa de preparação para o desenvolvimento ósseo posterior. Como a alta temperatura foi mantida durante toda a incubação, a mineralização inicial pode ter sido afetada, mas corrigida ao longo do desenvolvimento embrionário. No entanto, as características morfológicas dos ossos foram alteradas: houve diminuição no peso e comprimento dos ossos longos das pernas e aumento da largura da tíbia, possivelmente relacionado a uma curvatura maior, o que poderia resultar em problemas futuros nas pernas.

Diversos estudos indicam que o estresse por calor aumenta a produção de proteínas de choque térmico (Hammond *et al.*, 2007; Yalçin *et al.*, 2007; Oznurlu *et al.*, 2016). Essas proteínas, conhecidas como acompanhantes, desempenham um papel essencial na manutenção do dobramento, transporte e manipulação das proteínas durante o estresse térmico, ajudando a restaurar a homeostase (Mackei *et al.*, 2021). A presença dessas proteínas foi identificada em diferentes áreas de placa de crescimento, indicando que elas desempenham funções variadas durante as diferentes especificações de diferenciação dos condrócitos. Essas proteínas podem interferir nas interações de diferenciações celulares, o que pode explicar grande parte dos efeitos relacionados à alta temperatura sobre o desenvolvimento ósseo (Hammond *et al.*, 2007; Yalçin *et al.*, 2007; Groves; Muir, 2016)

Em uma pesquisa mais recente, Azevedo *et al.* (2022) avaliaram os efeitos de variações na temperatura da casca durante a fase intermediária (entre os dias 8 e 18,5 de incubação) da embriogênese sobre o rendimento de incubação, qualidade dos pintos, utilização de minerais e desenvolvimento ósseo de embriões e pintos. Foram incubados ovos de matrizes Cobb 500® em quatro diferentes temperaturas de casca: controle (37,8°C), baixa (36,7°C), alta (38,9°C) e muito alta (39,4°C). A temperatura de incubação

influenciou negativamente a maioria das variáveis, com as temperaturas muito alta e baixa piorando o rendimento de incubação, a qualidade dos pintos, a utilização de minerais e o desenvolvimento ósseo. A temperatura da casca do ovo muito alta foi a que causou os piores resultados, incluindo a mobilização de minerais do ovo e alterações nos hormônios calciotrópicos, resultando em desenvolvimento ósseo comprometido. Os autores concluíram que variações de temperatura da casca, tanto acima quanto abaixo da recomendada, prejudicam o rendimento de incubação e a qualidade dos pintos.

Por outro lado, pesquisas indicam que temperaturas elevadas durante a incubação podem favorecer o desenvolvimento ósseo dos embriões. Em um experimento que utilizou temperaturas baixas (35 e 36°C) e altas (39 e 40°C) até o 10º dia de incubação, Brookes e May (1972) verificaram que cada aumento de 1°C induziu um crescimento linear de 20% na quantidade de cálcio nos ossos e na fração ossificada. Em contrapartida, o desenvolvimento embrionário e o comprimento total dos ossos, incluindo a cartilagem, tiveram variaram apenas 12%. O descompasso observado demonstrou que o desenvolvimento ósseo foi mais sensível às mudanças de temperatura do que o crescimento geral do embrião. Esse efeito foi atribuído à maior dilatação dos vasos sanguíneos, que teria promovido um aumento no fluxo de sangue para os ossos.

Reduções da temperatura de incubação também causaram efeitos distintos no desenvolvimento ósseo. Temperaturas mais baixas no início da incubação podem atrasar a diferenciação dos condrócitos, resultando em ossos menos desenvolvidos e com simetria comprometida (Yalçin *et al.*, 2007; Oviedo-Rondón *et al.*, 2009). No entanto, temperaturas reduzidas podem aumentar o teor de cinzas ósseas na eclosão, sugerindo uma melhora na mineralização óssea (Groves; Muir, 2014; Muir; Groves, 2017). Porém, a eficiência desse efeito depende do grau de redução da temperatura, da fase específica do desenvolvimento embrionário em que é aplicada, e da linhagem das aves (Muir; Groves, 2019). Apesar desses possíveis benefícios, há evidências de que a redução da temperatura pode prolongar o período de incubação e, em certas linhagens, diminuir a taxa de eclodibilidade, prejudicando o desenvolvimento geral do embrião (Oviedo-Rondón *et al.*, 2009; Muir; Groves, 2017).

A melhoria na mineralização óssea durante a eclosão, em resposta à redução da temperatura inicial, também foi observada por Groves e Muir (2014) e Muir e Groves (2017). No primeiro estudo, que consistiu em uma meta-análise, os autores revisaram



pesquisas com variações de temperatura entre 35,5°C e 39,1°C nos primeiros 15 dias de incubação. Eles constataram um aumento na concentração de cinzas nos ossos quando a temperatura era reduzida, embora não tenham especificado se todas as reduções de temperatura avaliadas aqui

No estudo de Muir e Groves (2017), a incubação foi iniciada com 37,2°C, sendo gradualmente aumentada até atingir 37,8°C aos 13 dias. Os pesquisadores relataram que a redução na temperatura provocou um atraso na eclosão. Como consequência, os pintinhos que passaram por esse tratamento ficaram menos tempo no nascedouro, onde a temperatura não era adequada e não havia alimento disponível, o que favoreceu a deposição de minerais nos

Utilizando temperatura da casca de 36,7°C durante a fase intermediária (entre os dias 8 e 18,5 de incubação), Azevedo *et al.* (2022) também demonstrou que a baixa temperatura prejudicou a mobilização e utilização de minerais a partir dos componentes do ovo, os hormônios calciotrópicos e consequentemente o desenvolvimento ósseo durante a incubação.

Embora a literatura tenha explorado amplamente os efeitos da variação da temperatura de incubação sobre o desenvolvimento ósseo de embriões de aves, nenhum estudo até o momento avaliou a viabilidade da técnica de manipulação térmica intermitente. Essa técnica, empregada para aumentar a termotolerância dos pintos durante a fase de produção, ainda precisa ser melhor investigada quanto aos potenciais impactos no desenvolvimento ósseo. Para entender melhor como tais intervenções térmicas podem influenciar o desenvolvimento ósseo, é fundamental explorar os mecanismos da formação do sistema ósseo das aves. A seguir, serão abordados os processos envolvidos na formação e maturação dos ossos em aves, proporcionando uma base essencial para avaliar como manipulações térmicas podem afetar o crescimento e a robustez óssea. Ao analisar os aspectos sobre a formação do sistema ósseo com as técnicas de manipulação térmica, poderemos obter uma visão mais clara dos impactos dessas práticas na saúde e desempenho dos pintos durante a produção.

### 3.4 FORMAÇÃO DO SISTEMA ÓSSEO DAS AVES

O sistema locomotor das aves é composto pelo esqueleto, músculos, tendões e articulações, que juntos proporcionam suporte, movimento e estabilidade ao animal. Sua formação é caracterizada por um processo complexo e altamente coordenado que ocorre durante o desenvolvimento embrionário.

O osso é um tecido multifuncional, constituído por uma população heterogênea de células, em diferentes estágios de diferenciação celular. Está em equilíbrio dinâmico, sofrendo processo contínuo de mobilização e deposição mineral durante a vida do animal, sendo metabolicamente muito ativo. A osteogênese é um processo dinâmico que envolve a absorção e deposição dos minerais presentes nos compartimentos do ovo. Esse desenvolvimento é consequência, em sua maior parte, da atividade de dois tipos celulares principais, característicos do tecido ósseo: os osteoblastos e os osteoclastos. Um terceiro tipo celular, os osteócitos, derivados dos osteoblastos, são metabolicamente menos ativos, e sua função menos conhecida. Sua formação se inicia durante o desenvolvimento embrionário e seu desenvolvimento segue por boa parte da vida pós-eclosão do frango (Rath *et al.*, 2000). O conteúdo de albúmen, incluindo os minerais, é integrado à gema e ao líquido amniótico (Romnoff, 1967), permitindo que o embrião consuma os minerais desses compartimentos (Uni *et al.*, 2012). Um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento ósseo é a disponibilidade de Ca e P, que são depositados na forma de hidroxiapatita, e conferem rigidez ao tecido ósseo e traços de Mg, Zn, Se, Cu, Mn, Fe, Na e K, essenciais à atividade componentes estruturais ou catalíticos na formação de tecidos.

O objetivo desta revisão é descrever o processo do desenvolvimento ósseo do embrião de galinha, abordando os aspectos minerais da estrutura óssea, sua absorção e utilização para a osteogênese, bem como a dinâmica de regulação hormonal para o crescimento e manutenção da homeostase animal, mediante os processos de formação e de mobilização de minerais no esqueleto.

### 3.4.1 Desenvolvimento ósseo do embrião de galinha

A formação óssea das aves se assemelha aos outros animais vertebrados, onde os componentes celulares provêm de linhagens de células mesenquimais do osso (célula osteoprogenitora). Nos estágios iniciais de desenvolvimento, as células mesenquimais osteogênicas se multiplicam, diferenciam e migram para as regiões apropriadas à formação do esqueleto (Pechak *et al.*, 1986a; Roach, 1997), por dois modos de formação óssea, chamados de ossificação endocondral e ossificação intramembranosa. Todo o esqueleto apendicular (membros e pelve) e grande parte do esqueleto axial, incluindo as costelas, escápulas e base do crânio são formados por ossificação endocondral (Pechak *et al.*, 1986a, 1986b; Roach; Shearer, 1989; Roach, 1997; Yang *et al.*, 2014; Torres; Korver, 2018; Blumer, 2021). Nessa via osteogênica, o mesênquima se transforma em um intermediário cartilaginoso com a forma do futuro elemento esquelético que será gradualmente mineralizado e vascularizado, sendo substituído por tecido ósseo. O esqueleto axial é um produto de células do mesoderma paraxial (somitos) e do mesoderma da placa lateral (OLSEN *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2014; Spieker *et al.*, 2020; Blumer, 2021). Os ossos formados dessa maneira são conhecidos como ossos cartilaginosos.

Por outro lado, na ossificação intramembranosa, os ossos se desenvolvem diretamente a partir de condensações de células mesenquimais. Esse é o caso dos ossos chatos do crânio, as clavículas e o manguito ósseo pericondral (Hamburger; Hamilton, 1951). O crânio se desenvolve a partir de centros de crescimento baseada na diferenciação direta de dois tipos celulares em osteoblastos, também chamado de ossificação direta (Spieker *et al.*, 2020). O desenvolvimento das primeiras estruturas do futuro esqueleto embrionário começa no terceiro e quarto dia de incubação com a formação dos brotos dos membros posteriores e superiores (Hamburger; Hamilton, 1951; Barbosa, 2011). O broto do membro de um embrião consiste em uma massa completamente avascular de células mesênquimas indiferenciadas levemente condensadas na região proximal em torno de um núcleo pré-condrogênico e recobertas externamente pelo epitélio colunar da epiderme. Essa massa de células empilhadas produzem as células progenitoras osteogênicas que se diferenciam em osteoblastos. Concomitantemente, núcleo pré-condrogênico irá se diferenciar em uma haste formando um “molde” de cartilagem, como etapa preliminar do

processo de desenvolvimento ósseo (Caplan ; Pechak, 1987; Pechak, *et al.*, 1986a, 1986b; Olsen *et al.*, 2000; Eames; Helms, 2004).

No dia 6 de desenvolvimento, os osteoblastos produzem a matriz orgânica do osso (osteóide), rica em colágeno tipo I, que se mineralizam pela deposição de mineral ósseo, principalmente hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) (Torres; Korver, 2018), que confere resistência ao futuro tecido ósseo. Essa produção de matriz orgânica ocorre na diáfise média, como um colar circunferencial contínuo ao redor e fora da haste da cartilagem estabelecendo o limite físico entre o osteóide e o núcleo da cartilagem (Anderson; Reynolds 1973; Pechak *et al.*, 1986a, 1986b; Caplan, 1987, 1988). À medida que os osteoblastos se diferenciam em condrócitos, as células começam a produzir uma matriz extracelular, rica em colágeno tipo II (Col-II), agrecano (Spieker, *et al.*, 2020) e hialuronano (Blumer, 2021). Caplan (1988) relataram que o osteóide também atua como uma barreira para nutrientes e outras moléculas derivadas de vasos que estão se difundindo para as células do núcleo da cartilagem. Assim, este acesso restrito pode resultar no início da hipertrofia dos condrócitos centrais.

Ao 7º dia de incubação ocorre a expansão proximal e distal progressiva da camada de osteóide a partir da região médio-diafisária e início de sua mineralização. Uma remodelação da matriz está associada à diferenciação de condrócitos colunares proliferativos em condrócitos pré-hipertróficos e hipertróficos. Assim, a matriz de cartilagem hialina - incluindo Col-II - é trocada pelo colágeno marcador de cartilagem hipertrófica tipo-X (ColX) (Caplan, 1988; Spieker, 2020), que age diretamente na calcificação ou mineralização da matriz extracelular adjacente (Blumer, 2021). Esta zona também é caracterizada por seu alto nível de atividade de fosfatase alcalina, que está associada a deposição da primeira camada óssea. Os condrócitos na zona hipertrófica distal (a zona de calcificação provisória) também sintetizam colágeno tipo I, em comum com os osteoblastos (Dibner, 2007).

Segundo Pechak et al (1986a), no ambiente desprovido de nutrientes, os condrócitos se tornam hipertróficos e, eventualmente, morrem. Nesse sentido, a falta de viabilidade dos condrócitos resulta diretamente na interrupção da síntese de substâncias antiangiogênicas (Eisenstein *et al.*, 1973). Posteriormente, à medida que estas substâncias antiangiogênicas se dissipam, ocorre uma invasão vascular no colar mineralizado (Pechak *et al.*, 1986a, 1986b; Caplan, 1988). Essa rede vascular tem o papel de facilitar o

transporte dos constituintes necessários para a formação mineral óssea para o novo local de deposição óssea (Kerschnitzki, 2016) como células osteoprogenitoras (osteoblastos iniciais), condroclastos e células hematopoiéticas (Proff; Romer, 2009; Blumer, 2021). Nessa fase, os capilares que estão posicionados fora da região central do osso recém-formado invadem a camada osteoprogenitora para formar uma teia no topo da primeira camada mineralizada.

O processo de invasão envolve a remoção de uma porção do primeiro anel mineralizado e a subsequente dissolução da matriz cartilaginosa subjacente (Pechak *et al.*, 1986a, 1986b; Caplan, 1988). Entre capilares individuais e perpendiculares a esta primeira camada óssea, uma série de hastes osteóides é fabricada e depois mineralizada. Isto é seguido pela deposição de uma segunda camada de osso paralela à primeira camada, de modo que os capilares individuais estão agora completamente cercados formando lacunas, também chamadas trabéculas ósseas (Caplan, 1988). Após a invasão da cartilagem pela vasculatura e elementos perivasculares, por volta do 9º dia de incubação, a cartilagem hipertrófica é rapidamente substituída por células da medula. O elemento ósseo continua a se expandir de maneira proximal e distal, bem como radialmente ao redor do modelo de cartilagem. Ao mesmo tempo, nos locais de fixação, a membrana celular dos condroclastos é altamente dobrada cria um meio ácido (pH ~ 4,5) para desmineralizar e reabsorver a matriz da cartilagem (Pechak *et al.*, 1986a, 1986b; Caplan, 1988; Proff; Romer, 2009; Blumer, 2021).

Ao longo do tempo, o modelo do esqueleto do membro se expandirá para o tamanho total, à medida que os vasos sanguíneos fornecem cálcio e fósforo para a próxima mineralização da região do núcleo da cartilagem. O crescimento longitudinal, ocorre através da expansão das epífises proximais e distais e da diáfise. O crescimento da diáfise média é visto no 15º dia de incubação. Novo osso é depositado no perióstio, em direção radial, à medida que o osso aumenta de circunferência. Nesse estágio, há um grande número de trabéculas minerais e cada uma é separada por canais (cortical óssea altamente porosa). À medida que o embrião cresce, a expansão do diâmetro médio da diáfise ocorre através da síntese e deposição de osso trabecular no osso periosteal seguido pela reabsorção do endóstio por osteoclastos em sua superfície interna (Caplan, 1988; Roach, 1997; Kerschnitzki *et al.*, 2016a, 2016b; Torres; Korver, 2018). Como resultado, há a formação sequencial contínua de mais 12 camadas de osso trabecular (Caplan, 1988),

e os ossos crescem rapidamente durante a incubação, com a tíbia aumentando seu comprimento em cerca de 2,3 vezes entre 15 dias de incubação e eclosão (Torres; Korver, 2018). Assim, o desenvolvimento do esqueleto embrionário ocorre ao longo de toda a incubação, atingindo as maiores taxas de crescimento na última semana, resultando na expansão da cavidade medular entre o 19º de incubação e o 7º dia após a eclosão (Yair *et al.*, 2012). Após a eclosão, os ossos ainda crescerão, passarão por constante remodelação interna e eventualmente serão reparados em casos de fraturas (Dibner *et al.*, 2007).

### **3.4.2 Os minerais do ovo e sua utilização para o desenvolvimento ósseo embrionário**

Durante o desenvolvimento, o pintinho depende dos nutrientes que serão mobilizados a partir dos três principais compartimentos do ovo: gema, albúmen e casca (Romnoff, 1960; Romnoff; Romnoff, 1967; Freeman; Vince, 1974; Uni *et al.*, 2012; Bellairs; Osmond, 2014).

Esses nutrientes são dinamicamente mobilizados em diferentes estágios de crescimento par atender às necessidades embrionárias de lipídios, aminoácidos, carboidratos e minerais durante seu desenvolvimento (Halgrain *et al.*, 2022). Durante a incubação, o conteúdo de albúmen, incluindo os minerais, é integrado à gema e ao líquido amniótico (Romnoff, 1967), permitindo que o embrião consuma os minerais desses compartimentos (Uni *et al.*, 2012).

A gema é a principal fonte mineral para o embrião, fornecendo a maior parte do fósforo (P), zinco (Zn), cobre (Cu), manganês (Mn) e ferro (Fe), enquanto o albúmen é a principal fonte de sódio (Na) e potássio (K). Por sua vez, a casca do ovo é a principal fonte de cálcio (Ca) e magnésio (Mg) (Richards; Packard, 1996; Richards, 1997; Yair; Uni, 2011; Uni *et al.*, 2012; Hopcroft *et al.*, 2019; Halgrain *et al.*, 2022). Embora a casca funcione como um importante reservatório mineral, a maior parte das cinzas minerais presentes nela não está disponível para o embrião (Yair; Uni, 2011; Uni *et al.*, 2012). Durante o desenvolvimento embrionário, o embrião extrai grandes quantidades de cálcio, uma pequena porção de magnésio, e apenas traços de ferro, manganês e fósforo (Yair *et al.*, 2015).

### 3.4.3 Calcificação e mineralização óssea

O processo de mineralização do esqueleto consiste na deposição de minerais no osso em formação. Segundo Tuan e Ono (1986) durante o desenvolvimento, o embrião mobiliza grande quantidade de cálcio da casca e da gema para atender às necessidades metabólicas de crescimento esquelético, atividades neuromusculares e outras funções fisiológicas. A absorção de cálcio se inicia na primeira metade da incubação, especialmente ao 7º dia de incubação, quando a gema se configura como principal fonte de cálcio para o crescimento embrionário. Os embriões absorvem os minerais diretamente da gema através da membrana do saco vitelínico (MSV) e seu sistema vascular circundante (Romnoff, 1960; Richards; Packard, 1996; Yair; Uni, 2011; Halgrain *et al.*, 2022). No entanto, como há uma relativa falta de calcificação óssea nesta fase, ocorrem alterações mínimas no conteúdo de cálcio do embrião e a que será observada a partir do 11º dia de incubação (Johnston; Comar, 1955; Yair; Uni, 2011; Torres; Korver, 2018).

Yair e Uni (2011) observaram que o teor total de cálcio da gema diminui ao 1º dia de incubação de 30 mg para 20 mg no o 11º dia de desenvolvimento, atingindo um platô até a eclosão. Após o completo desenvolvimento da membrana cório-alantoide (MCA), na segunda semana de incubação, o cálcio passa a ser primordialmente absorvido da casca sendo incorporado tanto na gema quanto nos tecidos embrionários (Johnston; Comar, 1955; Romnoff, 1960; Freeman; Vince, 1974; Tuan; Ono, 1986; Tuan, 1986; Gabrielli, 2004; Torres; Korver, 2018). A membrana MCA faz contato com as membranas da casca entre o dia 9 ao 12 de incubação (Bell; Freeman, 1971; Kubota *et al.*, 1981; Makanya *et al.*, 2016), entretanto, a liberação de cálcio da casca e o transporte através do MCA começam alguns dias depois, quando a cavidade das vilosidades e as células de cobertura dos capilares coriônicos são totalmente diferenciadas (Narbaitz; Tolnai, 1978; Tuan, 1979, 1980; Tuan; Ono, 1986; Torres; Korver, 2018). Assim, durante a segunda metade da incubação, a casca do ovo torna-se a principal fonte de cálcio para apoiar a mineralização esquelética do embrião (Johnston; Comar, 1955; Kubota *et al.*, 1981; Chien *et al.*, 2009; Yair; Uni, 2011; Torres; Korver, 2018).

O cálcio da casca do ovo é liberado pelas células das vilosidades corioalantóicas, que expressam a enzima anidrase carbônica. A troca de CO<sub>2</sub> em conjunto com a enzima anidrase carbônica criam a acidificação local necessária para a dissolução da calcita

mineral da casca, tornando assim os íons de cálcio e fósforo disponíveis à circulação através da MCA. Com a absorção conjunta dos minerais da casca através da interface corioalantóide-casca, o esqueleto do embrião inicialmente constituído de cartilagem começa a ser mineralizado com o avanço da incubação (Tuan; Ono, 1986; Gabrielli *et al.*, 2001; Szeleszczuk *et al.*, 2016; Torres; Korver, 2018; Halgrain *et al.*, 2022).

O de cálcio através da membrana cório-alantóide aumenta cerca de 20 vezes desde o 12º dia até um pico no 19º dia de incubação. Assim, o teor de cálcio ósseo aumenta acentuadamente a partir do 14º dia embrionário e começa a estabilizar no 19º dia (Kubota *et al.*, 1981). À medida que o comprimento e a largura do osso aumentam, o conteúdo de cinzas ósseas aumenta acentuadamente, ocasionando a maturação do tecido ósseo do embrião (Johnston; Comar, 1955; Chen *et al.*, 2008; Yair *et al.*, 2012).

Durante o período de alongamento ósseo, que ocorre entre os dias 12 e 19 de incubação, o embrião mobiliza cerca de 90% dos minerais como P, Cu, Zn, Fe e Mn armazenados na gema entre os dias 11 e 17. Como resultado, o embrião eclode com quantidades mínimas desses minerais na gema residual, que são absorvidos nos primeiros dias de vida para sustentar o desenvolvimento ósseo contínuo (Yair; Uni, 2011; Yair *et al.*, 2015; Torres; Korver, 2018). Nesse mesmo período, cerca de 80% do cálcio que compõe o esqueleto embrionário é obtido através da reabsorção da casca do ovo (Johnston; Comar, 1955; Everaert; Decuypere, 2013).

Durante a última semana de incubação, o teor de cálcio no plasma embrionário aumenta a ponto de provocar a redução do peso e o enfraquecimento da casca, facilitando o processo de ruptura para a eclosão (Everaert *et al.*, 2008; Barbosa, 2011; Everaert; Decuypere, 2013; Halgrain *et al.*, 2022).

#### **3.4.4 Controle hormonal do metabolismo ósseo durante do desenvolvimento**

O desenvolvimento ósseo é um processo altamente complexo e regulado, em que múltiplos hormônios desempenham papéis cruciais na coordenação das atividades celulares e moleculares envolvidas. Os principais hormônios envolvidos no metabolismo do tecido ósseo são o GH (e indiretamente o fator IGF-I), insulina, os hormônios sexuais



(estrogênio e testosterona), hormônios tireoidianos ( $T_3$  e  $T_4$ ), calcitonina, glicocorticoides (especialmente o cortisol), PTH e vitamina  $D_3$  (que atua como hormônio).

#### **a) *Hormônio do crescimento (GH)***

O GH é fundamental para o crescimento ósseo, principalmente na fase de crescimento longitudinal dos ossos. Seu principal mecanismo de ação no metabolismo ósseo consiste em estimular a produção do fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) no fígado e nos condrócitos da placa de crescimento. O IGF-I atua estimulando a proliferação de condrócitos e osteoblastos, induzindo o crescimento longitudinal do osso. O GH também aumenta síntese das proteínas necessárias para formação da matriz óssea e aumenta o turnover de cálcio estimulando a condrogênese, desempenhando um papel crítico como moduladores da maturação do tecido (Hunziker *et al.*, 1994; Robson *et al.*, 2002; Kühn *et al.*, 2005; Güz *et al.*, 2020).

Os níveis plasmáticos do IGFs aumentam significativamente entre o 10 e 14º dia de incubação, posteriormente diminuem lentamente até a eclosão, aumentando novamente na vida pós eclosão (Lu *et al.*, 2007; De Goef *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2008; Givisiez *et al.*, 2020). Os receptores do hormônio do crescimento (GHRs) codificados por transcritos embrionários estão presentes durante estágios embrionários muito iniciais, entre o 2 e 4º dia de incubação. Esses receptores são totalmente capazes de se ligar ao GH extra hipofisário que está abundantemente presente durante a embriogênese inicial, e atua como um fator de crescimento local (Harvey *et al.*, 2000).

#### **b) *Hormônios tireoide triiodotironina ( $T_3$ ) e a tiroxina ( $T_4$ )***

Esses hormônios possuem grande importância na regulação do metabolismo embrionário. Estão envolvidos em vários processos fisiológicos, incluindo regulação da produção de calor, mobilização das reservas de glicogênio, crescimento muscular do embrião e estímulo para eclosão (Christensen *et al.*, 2003; Decuypere; Bruggeman, 2005; Oliveira *et al.*, 2008; Shokraneh *et al.*, 2020).

No tecido ósseo das aves, as tireotrofinas são conhecidas como potentes reguladores da maturação esquelética na placa de crescimento e maturação óssea longitudinal (Shao *et al.*, 2006). O aumento da tiroxina no meio extracelular estimula a liberação do GH (IGF-I), a síntese de mRNA e proteína de colágeno tipo X, a atividade

da fosfatase alcalina e a hipertrofia celular, consequentemente estimulando a diferenciação do condrócito da placa de crescimento e a invasão dos vasos sanguíneos para a formação da placa de crescimento e do osso trabecular da metáfise (Burch; Van Wyk, 1987; Ohlsson *et al.*, 1992; Ballock; Reddi, 1994; Shao *et al.*, 2007). Um excesso desses hormônios em embriões pode causar o aparecimento prematuro de centros de ossificação; em jovens ocorre o fechamento das epífises e; em adultos, o aumento do metabolismo das células ósseas (principalmente reabsorção) (Van Der Eerden *et al.*, 2003).

Os efeitos da temperatura sobre os hormônios da tireoide são bastante relatados na literatura (Oviedo-Rondón; Murakami, 1998; Yalçin *et al.*, 2012). Willemsen *et al.* (2010) utilizaram temperatura baixa (34,6°C) e alta (40,6°C) de forma contínua do dia 16 ao 18,5 e observaram redução na concentração de T<sub>3</sub> plasmática até o 18º dia, quando então os teores aumentaram até a eclosão. Os autores ponderaram que esse resultado está relacionado ao menor crescimento do embrião, atraso na eclosão e aumento na mortalidade que também ocorreram.

Outros autores encontraram aumento nos níveis de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> em alta temperatura. Shokrane *et al.* (2020) elevaram a temperatura da casca para 38,9°C do dia 18 a 21, o que causou maior liberação de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> ao final da incubação. Al-zhgoul *et al.* (2013) submeteram os ovos a uma temperatura de 38,8°C por 6h durante os dias 10 a 18 e perceberam aumento no T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> nos pintos aos 3 dias. Os autores justificaram que os hormônios da tireoide são indicativos da resposta ao estresse térmico, e seu aumento tem a função de manter a homeostase e suprir a elevada demanda energética que ocorre na alta temperatura.

Yalçin *et al.* (2012) reduziram a temperatura em 1° C do 10º ao 18º dia, durante 6 horas diárias. A temperatura baixa causou redução nos níveis de T<sub>3</sub> à eclosão, e esses autores não encontraram relação entre a concentração desse hormônio e o peso corporal. As diferenças nos resultados se devem ao fato de que cada trabalho utilizou temperaturas, duração e período de manipulação diversos (Shokrane *et al.*, 2020).

Por outro lado, quando os embriões são submetidos à manipulação térmica moderada durante a incubação, pode haver melhoria na resposta ao estresse pós eclosão, graças às modificações epigenéticas do eixo hipófise-tireoide (Decuypere; Bruggeman, 2005; Yalçin *et al.*, 2009).

### **c) Calcitonina e paratormônio (PTH)**

A calcitonina e paratormônio regulam a homeostase do cálcio e fosforo, garantindo adequados níveis plasmáticos para a mineralização óssea. Em aves, o órgão responsável pela produção é a glândula ultimobranquial, que é incorporada pela tireoide durante o desenvolvimento embrionário (Isler, 1973) e sua secreção começa somente no fim da incubação, aos 18 dias (Bellairs; Osmond, 2005). A calcitonina age na regulação do cálcio extracelular, reduzindo os níveis plasmáticos de cálcio, elevando sua deposição no tecido ósseo em paralelo à redução da absorção do mineral pelo intestino e aumento de sua excreção pelos rins (Malgaroli *et al.*, 1989; Proszdowiec-Weglarz; Angel, 2013; Pizauro Júnior *et al.*, 2017).

Por outro lado, o PTH é um hormônio produzido nas glândulas paratireoides e sua concentração no sangue é menor (Proszdowiec-Weglarz; Angel, 2013). A secreção de paratormônio se inicia aos 10 dias de incubação (Bellairs; Osmond, 2005). O PTH também estimula a expressão de genes importantes para a degradação da matriz, a produção de fatores de crescimento e a estimulação e recrutamento dos osteoclastos. Seus efeitos biológicos conhecidos se fazem através de um receptor de membrana acoplado à proteína G (Parsons; Potts Júnior, 1972; Luengo *et al.*, 1991; Gracitelli *et al.*, 2002; Moe, 2008; Pizauro Júnior *et al.*, 2017).

### **d) Vitamina D<sub>3</sub>**

A vitamina D é constituída por um grupo de moléculas semelhantes aos esteroides que atuam como hormônio no metabolismo do cálcio sendo secretadas a partir da ação do PTH. Seus representantes que participam do metabolismo do cálcio são o colecalciferol (vitamina D<sub>3</sub>) e o ergosterol (vitamina D<sub>2</sub>), sendo que em aves, atividade biológica da D<sub>3</sub> é 30 a 40 vezes mais potente que a D<sub>2</sub> (Chen *et al.*, 2020). Sua forma ativa regula induz a diferenciação das células osteogênicas, bem como regula o metabolismo e a homeostase do cálcio, por estimulação da absorção pelo intestino, e aumenta os níveis de cálcio no sangue (Giuliani; Boland, 1984; Chen *et al.*, 2021). Esses processos são regulados principalmente pelo PTH, mas a 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> parece ser necessária para que ocorram corretamente. No processo de regulação da homeostase do cálcio pelo PTH a vitamina D<sub>3</sub> atua como fator de transcrição e expressão de transportadores de cálcio, além de causar diretamente o aumento da sua absorção via

receptor. Também estimula aumento da reabsorção óssea e redução na excreção renal de cálcio (Wideman *et al.*, 2015; Adhikari *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020).

A Vitamina D, na forma de 25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> é depositada na gema pela matriz, para ser usada pelo embrião em desenvolvimento (Vieira, 2007; Fatemi *et al.*, 2020). Teoricamente os rins só produziram 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> aos 9 dias de incubação (Bishop; Norman, 1975). No entanto, Chen *et al.* (2021) demonstraram que quando fornecida in ovo no 3º dia de incubação, a vitamina D<sub>3</sub> ativa teve efeito sobre o desenvolvimento embrionário, indicando que o embrião aos 3 dias foi capaz de converter 25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> em 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> antes mesmo da formação completa dos rins.

#### ***e) Insulina, Hormônios sexuais e cortisol***

Hormônios como insulina, hormônios sexuais (estrogênio e testosterona) e cortisol também desempenham um papel significativo na regulação do desenvolvimento ósseo. A insulina promove a síntese de proteínas e o crescimento celular, contribuindo para o desenvolvimento ósseo (Thraillkill *et al.*, 2005). Os hormônios sexuais estimulam a atividade dos osteoblastos e são cruciais na regulação da remodelação óssea (Chen *et al.*, 2002; Karperien *et al.*, 2005), enquanto o cortisol, embora essencial em pequenas quantidades, pode inibir a formação óssea e aumentar a reabsorção óssea quando em níveis elevados (Robson *et al.*, 2002; Willemsen *et al.*, 2010).

Os sinais que desencadeiam mudanças no metabolismo e a liberação de hormônios durante o desenvolvimento ósseo ainda são pouco compreendidos. Obter mais informações sobre a dinâmica da regulação hormonal do desenvolvimento ósseo pode abrir inúmeras possibilidades para pesquisas que utilizem tecnologias para manipular condições fisiológicas embrionárias, como a manipulação técnica pré-natal, apoiando um desenvolvimento ósseo adequado e aumentando a sobrevivência e o vigor na vida pós-eclosão.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Os protocolos experimentais utilizados estão de acordo com as diretrizes da Universidade Federal da Bahia e do Comitê de Ética do Uso de Animais – CEUA, sob protocolo nº. 22/17.

#### **3.1 Local**

O estudo ocorreu no Núcleo Brasileiro de Pesquisas em Incubação Artificial de Ovos (NUPIA), integrado à Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (EMEVZ-UFBA), situado em Salvador, Bahia.

#### **3.2 Unidades experimentais**

Um total de 2.408 ovos de matrizes pesadas da linhagem Cobb 500® com idade de 52 semanas, adquiridos de um matrizeiro comercial foram utilizados no experimento. Os ovos pertenciam à segunda coleta do dia. Posteriormente à coleta, os ovos foram desinfetados pelo método de fumigação com paraformaldeído na concentração de 10g/m<sup>3</sup>, em seguida foram transportados para o incubatório em veículo climatizado, com temperatura programada para 20°C (abaixo do ponto zero fisiológico).

Após a chegada ao incubatório, os ovos foram selecionados e os considerados como não incubáveis (sujos, trincados, quebrados, pequenos e deformados) foram descartados. A seguir, os ovos considerados incubáveis, pesando em média 66 a 68,5 g, foram colocados em bandejas de incubação com capacidade para 86 ovos cada. Foram selecionadas e identificadas aleatoriamente 28 bandejas, sendo 7 bandejas para cada um dos 4 tratamentos. Os ovos permaneceram na sala de armazenamento por três dias, com médias de temperatura e umidade relativa do ar (UR) de 20,5°C e 79,5% respectivamente.

### 3.3 Tratamentos

Os tratamentos foram definidos pela realização de manipulação térmica em diferentes temperaturas, por 6 horas, entre os dias 8 e 18,5 de incubação, ou pela incubação controle:

- Tratamento C: Controle (temperatura de 37,8° durante toda a incubação – Control)
- Tratamento MT-L: Manipulação térmica a 36,7°C (temperatura baixa - LOW)
- Tratamento MT-H: Manipulação térmica a 38,9°C (temperatura alta - HIGH)
- Tratamento MT-VH: Manipulação térmica a 39,4°C (temperatura muito alta – VERY HIGH)

### 3.4 Pré-aquecimento e incubação dos ovos

Após o armazenamento, o pré-aquecimento dos ovos foi realizado durante 10 horas. A sala de pré-aquecimento foi mantida a uma temperatura média de 28°C e UR média de 55%. Após pré-aquecimento, os ovos foram transferidos do incubatório para o NUPIA. Imediatamente antes da entrada dos ovos na incubadora, cada bandeja com 86 ovos foi pesada conforme o tratamento.

A incubação foi realizada em quatro máquinas modelo Premium Ecológica® IP600 de estágio único, com capacidade para 602 ovos e controle digital de temperatura, umidade e viragem. Os ovos foram virados a cada hora em um ângulo de 45°, e a umidade relativa dentro das incubadoras foi mantida entre 45% e 60%.

No início da incubação, as quatro máquinas incubadoras foram reguladas para manter a temperatura da casca do ovo constante em 37,8°C (C) e o teor de UR de 55%. Entre o 8º e 18,5º dia de incubação, durante 6 horas por dia, uma máquina foi regulada para a temperatura da casca do ovo (TCO) de 36,7°C (MT-L), uma máquina foi regulada para a TCO de 38,9°C (MT-H) e outra máquina foi regulada para a TCO de 39,4°C (MT-VH) diariamente. A máquina controle não sofreu alteração da programação inicial.

Para monitorar a temperatura da casca, foram adicionados sete sensores de temperatura por máquina (TI-33Ri plus), um em cada bandeja. Esses sensores foram fixados na região equatorial das cascas de ovos usando fita adesiva (Scotch® Tough Duct

Tape - 3M). A temperatura da casca foi registrada três vezes ao dia através do programa (SITRAD<sup>®</sup> versão 4.13) e, quando necessário, ajustes nas máquinas de incubação foram realizados para manter as temperaturas da casca desejadas em cada tratamento. A ovoscopia foi realizada diariamente entre o 8º e o 18,5º dia de incubação para confirmação da viabilidade dos embriões em ovos que continham os sensores.

Ao 18,5º dia de incubação, os ovos foram transferidos para bandejas de nascimento e todas as máquinas foram reguladas para manter a temperatura da máquina em 37,8°C até o nascimento.

### 3.5 Nascimento dos pintos

Assim que os ovos foram colocados nas incubadoras, foi definido o momento inicial da incubação como hora zero. O momento em que os pintos começaram a eclodir até o nascimento dos últimos pintos em cada bandeja foi registrado. Os pintos dos tratamentos C, MT-H e MT-VH começaram a eclodir a partir de 480 horas, e a incubação foi finalizada às 516 horas. No tratamento MT-L, os pintos começaram a eclodir às 492 horas, e a incubação foi finalizada às 528 horas.

Após o nascimento, os pintos foram contados e alocados em caixas devidamente identificadas de acordo com os tratamentos e os horários de retirada. Em cada retirada, o número total de pintos mortos foi registrado, juntamente com a ocorrência de anormalidades, como pintos com canela vermelha, ponta do bico vermelha, crânio ou cavidade abdominal abertos, desidratação, edemas ou deficiências físicas.

Uma amostra representativa foi determinada conforme o início do nascimento de cada tratamento, conforme a tabela a seguir:

Tabela 1 – Número de pintos retirados ao longo do nascimento.

Tratamento	Pintos retirados do nascedouro					Total de pintos
	480H	492H	504H	516H	528H	
MT-L	-	3	3	4	4	14
Controle-C	3	3	4	4	-	14
MT-H	3	3	4	4	-	14
MT-VH	3	3	4	4	-	14

Todos os pintos retirados foram analisados 12 horas após a coleta.

### 3.6 Análises de rendimento de incubação

#### 3.6.1 Perda de peso dos ovos durante o período de incubação

A perda de peso dos ovos foi determinada pela pesagem individual de todas as bandejas de cada tratamento antes dos ovos serem colocados na incubadora e no momento em que foram transferidos para as bandejas de nascimento; quando foram calculados os pesos médios dos ovos. O percentual de perda de peso dos ovos foi obtido pela seguinte fórmula:

$$\text{Perda de peso} = \frac{(\text{Peso dos ovos na incubação} - \text{Peso dos ovos na transferência})}{\text{Peso dos ovos no início da incubação}} \times 100$$

#### 3.6.2 Mortalidade embrionária e fertilidade

Aos 18,5 dias de incubação e ao final do período de nascimento, o número de ovos inférteis de cada máquina foi registrado. Os ovos não eclodidos de cada tratamento foram examinados e classificados de acordo com o embriodiagnóstico realizado por Barbosa *et al.* (2013).

A caracterização dos ovos não eclodidos foi a seguinte:

- Ovos inférteis;
- Ovos com embriões mortos no início da incubação (0 a 7 dias);\*
- Ovos com embriões mortos entre o 8º e 18,5º dia de incubação;\*
- Ovos com embriões que morreram entre o 19º e 21º dia de incubação;\*
- Ovos bicados com embriões vivos ou mortos;\*

\*Incluindo mau posicionamento e anormalidades morfológicas e conformacionais.

O percentual total de mortalidade embrionária foi calculado sobre o número de ovos férteis. A fertilidade do lote foi obtida através da fórmula: 100% - % de ovos inférteis.



### **3.6.3 Taxa de eclosão total em relação ao número de ovos férteis**

Os ovos inférteis foram identificados no 18,5º dia de incubação (momento da transferência para a bandeja) e ao final do processo de eclosão. A taxa de eclosão total em relação ao número de ovos férteis foi determinada dividindo o número total de pintos nascidos pelo número de ovos férteis, e o resultado foi multiplicado por 100.

## **3.7 Análises em cascas**

### **3.7.1 Peso e espessura de casca**

As avaliações em cascas foram realizadas em 14 amostras por tratamento nos ovos incubáveis, nos dias 0 (antes da incubação), 8º, 18,5º dias de incubação e no momento da eclosão. Para este procedimento, os ovos foram quebrados, o albúmen foi separado da gema e as cascas foram lavadas em água corrente para remover resíduos de albúmen e membranas. Em seguida, foram secas à temperatura ambiente por 24 horas e pesadas individualmente em uma balança analítica digital (precisão de 0,001g) da marca Mater®, modelo AY200.

A espessura da casca dos ovos foi medida em duplicata utilizando um micrômetro digital (Digimess®) com resolução de 0,001mm (faixa de medição de 0 a 25mm). Foram retirados fragmentos das regiões apical, equatorial e basal para a medição, a partir dos quais se calculou a espessura média por ovo (mm). Após a aferição da espessura, as cascas resultantes foram armazenadas a 4°C até a realização das análises de minerais.

### **3.7.2 Minerais da casca**

As análises dos minerais nas cascas, incluindo cálcio (mg), fósforo (mg), manganês (µg) e magnésio (mg), foram conduzidas em duplicata seguindo a metodologia de Yair e Uni (2011). As cascas foram trituradas e incineradas em mufla (Solidsteel®) a 600°C por 10 horas. Em seguida, entre 100 e 150mg das cinzas de cada amostra foram

digeridas utilizando uma mistura de 2mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% e 4mL de HNO<sub>3</sub> a 70% em tubos plásticos de 50ml, mantidos em banho-maria a 95°C por 6 horas. As amostras digeridas foram analisadas por espectrofotometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) (Varian®, Mulgrave, Austrália), utilizando soluções padrão (Certipur Merck®, Darmstadt, Alemanha). Os resultados foram apresentados como a média do peso absoluto de cada mineral na casca, multiplicando-se a concentração de cada mineral na amostra pelo peso total da casca.

### **3.8 Análises de minerais da gema e saco vitelino residual**

Foram realizadas avaliações em 14 amostras por tratamento, na gema dos ovos incubáveis, no saco vitelino residual aos 8, 18,5 dias de incubação e no momento da eclosão.

Após a quebra dos ovos ou a eutanásia dos embriões/pintos recém-eclodidos, a separação das gemas/sacos vitelinos foi conduzida manualmente e os resíduos de albúmen aderidos foram removidos utilizando papel absorvente. Em seguida, as gemas/sacos vitelinos foram homogeneizadas, pesadas individualmente em uma balança analítica digital de alta precisão (0,001g) (modelo AY200 da Mater®) e armazenadas a -20°C para análises posteriores de minerais.

O conteúdo de gemas/sacos vitelinos de cada amostra foi separado da membrana vitelínica e aproximadamente 100 a 150g foram utilizados para as determinações de minerais: cálcio (mg), fósforo (mg), manganês (µg) e magnésio (mg). As análises foram realizadas em duplicata conforme a metodologia de Yair e Uni (2011), conforme descrito para as análises das cascas.

Os resultados foram expressos como a média do peso absoluto do mineral na gema/saco vitelino residual, calculada multiplicando-se a concentração de cada mineral na amostra pelo peso total da gema/saco vitelino residual.

### **3.9 Análises em embriões e pintos**

#### **3.9.1 Peso do corpo sem o saco vitelino (YFBM)**

Aos 8 e 18,5 dias de incubação, dois ovos por bandeja e por tratamento foram retirados da máquina para registrar o peso dos embriões sem o saco vitelino (YFBM - *yolk-free body mass*) individualmente em uma balança analítica com precisão de 0,001g. Durante os nascimentos, 14 pintinhos recém-eclodidos por tratamento foram selecionados aleatoriamente para esta medição, conforme definido no item 3.5.

#### **3.9.2 Peso dos pintos no momento da eclosão**

Foram selecionados aleatoriamente 14 pintos de cada tratamento, pesados individualmente em balança eletrônica, com sensibilidade de 0,0001kg (Master<sup>®</sup>AY220) para obtenção do peso médio.

#### **3.9.3 Temperatura retal**

Após a pesagem, a temperatura retal foi mensurada utilizando um termômetro digital (Medeqco Geratherm<sup>®</sup>) com precisão de  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ . O instrumento foi inserido na cloaca, aproximadamente 3 cm. A temperatura retal é usada para estimar a temperatura corporal em aves (Lin *et al.*, 2005).

#### **3.9.4 Comprimento do pinto (cm)**

Os pintos selecionados para análise de peso tiveram seu comprimento medido com um paquímetro digital (Digimess<sup>®</sup>) com resolução de 0,001mm, da ponta do bico até o dedo do membro inferior direito, seguindo o método descrito por Hill (2001), excluindo a unha.

### 3.9.5 Escore de umbigo

Após a mensuração do comprimento, os pintinhos foram classificados quanto à cicatrização do umbigo, onde receberam escores de acordo com Tona *et al.* (2003):

Escore 1- umbigo fechado e área do umbigo limpa;

Escore 2- botão negro até 2 mm no umbigo ou presença de fio negro;

Escore 3- botão negro maior que 2 mm ou umbigo aberto.

### 3.9.6 Parâmetros sanguíneos

#### 3.9.6.1 Hemogasometria

A avaliação dos níveis sanguíneos de potencial hidrogeniônico (pH), bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), pressão parcial de gás carbônico ( $\text{pCO}_2$ ), pressão parcial de oxigênio ( $\text{pO}_2$ ), cálcio ionizado (iCa), sódio ( $\text{Na}^+$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ), hematócrito (Hct) e hemoglobina (Hb) dos pintos, foi realizada utilizando o analisador clínico portátil i-STAT® e cartuchos modelo Cartridge CG8+ (Abott Laboratories, EUA). Nos mesmos pintos utilizados nas análises anteriores, foi coletado sangue por meio da veia jugular utilizando seringas heparinizadas (1mL e agulha 30G). Imediatamente após a coleta, cerca de 100  $\mu\text{L}$  de sangue de cada amostra foi inserido no cartucho, que automaticamente fez a leitura dos parâmetros mencionados.

#### 3.9.6.2 Glicose, Lactato, Ácido úrico

No momento da análise de hemogasometria, amostras de sangue foram coletadas em tubos tipo Vacutaner® contendo heparina. Em seguida, as amostras de sangue foram centrifugadas durante 10 minutos à velocidade de 3000 rpm. As alíquotas de plasma foram transferidas por meio de micropipetas para novos tubos *ependorff* devidamente identificados de acordo com as repetições e tratamentos. Os tubos foram conservados a uma temperatura de  $-20^\circ\text{C}$  até ser iniciado o processamento das amostras.

As determinações de glicose<sup>1</sup>, lactato<sup>2</sup> e ácido úrico<sup>3</sup> foram realizadas em espectrofotômetro modelo GT 7220 da marca Global Technology®, utilizando-se kits comerciais em comprimento de onda apropriados.

<sup>1</sup> Glicose K082. Bioclin®. Belo Horizonte, MG, BR. Metodologia: Enzimático colorimétrico.

<sup>2</sup> Lactato K084. Bioclin®. Belo Horizonte, MG, BR. Metodologia: UV enzimático.

<sup>3</sup> Ácido úrico K139. Bioclin®. Belo Horizonte, MG, BR. Metodologia: Enzimático colorimétrico.

### 3.9.6.3 Hormônios: GH, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, calcitonina e vitamina D<sub>3</sub>

Respeitando o esquema de coleta por horário de nascimento, novas amostras de 14 pintos por tratamento foram aleatoriamente coletadas. Os pintos foram eutanasiados por deslocamento cervical e amostras foram coletadas por meio da veia jugular e acondicionadas em tubos tipo Vacutainer®. Em seguida, as amostras de sangue foram centrifugadas durante 15 minutos à velocidade de 4500 rpm para obtenção do soro. As alíquotas de soro foram transferidas por meio de micropipetas para novos tubos *ependorff* devidamente identificados de acordo com os tratamentos e foram conservadas a -20°C até ser iniciado o processamento das amostras.

As determinações de hormônio do crescimento (GH)<sup>1</sup>, triiodotironina (T<sub>3</sub>)<sup>2</sup>, tiroxina (T<sub>4</sub>)<sup>3</sup> (Morita *et al.*, 2016), 1,25-dihidroxitamina (D<sub>3</sub>)<sup>4</sup>, paratormônio (PTH)<sup>5</sup> (GÜZ *et al.*, 2019) e calcitonina<sup>6</sup> (Azevedo *et al.*, 2023) foram determinadas por ELISA utilizando kits comerciais. Todas as concentrações foram determinadas em contador de radiação gama (Gamma-C12, Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA).

<sup>1</sup> Chicken growth hormone ELISA kit (Catalog N°. MBS266317, MyBioSource®, San Diego, CA).

<sup>2</sup> Total Triiodothyronine (Total T<sub>3</sub>) AccuBind® ELISA Kit (Product Code: 125-300, Monobind, Lake Forest, CA).

<sup>3</sup> Total Thyroxine (Total T<sub>4</sub>) AccuBind® ELISA Kit (Product Code: 225-300, Monobind, Lake Forest, CA).

<sup>4</sup> 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> ELISA Kit (Elabscience®, Houston, Texas, United States).

<sup>5</sup> Chicken PTH (Parathyroid Hormone) ELISA Kit (Catalog N°. E-EL-Ch0433, Elabscience®, Houston, Texas, USA).

<sup>6</sup> Kit chicken calcitonin (CT) ELISA Kit (Catalog N°. MBS739139, MyBioSource®, San Diego, CA, USA).

### 3.9.6.4 Cálcio, Fósforo e Fosfatase Alcalina

As determinações de cálcio<sup>1</sup>, fósforo<sup>2</sup> e fosfatase alcalina<sup>3</sup> foram feitas no soro por meio de um analisador bioquímico automático (BioSystems®) utilizando-se kits comerciais (Labtest Diagnóstica®. Lagoa Santa, MG, BR) (Azevedo *et al.*, 2023).

<sup>1</sup> Cálcio Liquiform 90. Labtest Diagnóstica®. Lagoa Santa, MG, BR. Metodologia: Colorimétrico.

<sup>2</sup> Fósforo 42. Labtest Diagnóstica®. Lagoa Santa, MG, BR. Metodologia: Colorimétrico.

<sup>3</sup> Fosfatase Alcalina 40. Labtest Diagnóstica®. Lagoa Santa, MG, BR. Metodologia: colorimétrico.

### 3.9.7 Peso dos órgãos e dos pintos recém-eclodidos

Os pintos amostrados anteriormente tiveram seus órgãos (coração, pulmão, fígado, estômago (proventrículo + moela), intestinos, bursa, baço, pâncreas e saco vitelino) coletados para serem pesados individualmente (balança analítica de 0,0001g, Master® AY220). A abertura da cavidade abdominal se iniciou pelo orifício umbilical, com exposição de todos os órgãos. Os valores dos órgãos foram expressos em relação ao peso do corpo sem o saco vitelino (YFBM – yolk free body mass).

### 3.9.8 Glicogênio Hepático

A quantificação do glicogênio hepático foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Bidinotto *et al.* (1998). Cada amostra de fígado, obtida de pintinhos identificados de acordo com cada tratamento (entre 100 e 110 ml) foi obtida. Em seguida, a amostra foi transferida para um tubo de ensaio, ao qual foi adicionado 1,0 ml de KOH 6,0N. A mistura foi incubada por 5 minutos em banho-maria a 100°C para garantir a dissolução completa dos tecidos. Após a dissolução, 125 µl do extrato foi transferido para um novo tubo identificado, ao qual foram adicionados 1,5 ml de etanol e 50 µl de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%, seguidos de agitação. A amostra foi então centrifugada a 3.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão, e o precipitado re-suspendido em 2 ml de água destilada. Após a mistura, 100 µl da amostra foi transferido para um novo tubo, onde foram adicionados 250 µl de fenol e 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para interromper a reação. A leitura

foi realizada em um espectrofotômetro modelo GT 7220 da marca Global Technology® a 480 nm. O conteúdo de glicogênio foi expresso em moles de glicose-glicosil/mg de tecido total.

### **3.10 Análises ósseas**

#### **3.10.1 Peso, comprimento e largura dos ossos**

Aos 18,5 dias de incubação e durante o nascimento, foram retirados a tíbia e o fêmur da perna esquerda de cada uma das 14 amostras selecionadas aleatoriamente para cada tratamento.

Os ossos foram limpos de todos os tecidos moles e cartilagens e pesados em uma balança analítica digital com precisão de 0,001g. Para obter o peso relativo dos ossos, o peso da tíbia ou do fêmur foi dividido pelo YFBM (mg/g). Após a pesagem, os ossos foram mensurados externamente duas vezes usando um paquímetro digital (Digimess® resolução 300 mm, 0-0,001 mm). O comprimento da tíbia foi determinado da extremidade proximal na eminência intercondilar até a extremidade da epífise distal. Para o comprimento do fêmur, foi mensurado da borda proximal do trocânter até a borda distal do côndilo. Para a largura dos ossos, foi considerado o diâmetro médio-lateral. Após esses procedimentos, os ossos foram envolvidos em gaze embebida em soro e armazenados em sacos plásticos a -20°C para análises posteriores.

#### **3.10.2 Teste biomecânico**

O teste biomecânico foi realizado nos ossos para analisar a força necessária para a fratura, utilizando o método descrito por Shim *et al.* (2012).

Antes da realização do teste de resistência, as tíbias e fêmures esquerdos foram descongelados à temperatura ambiente, permanecendo em seus respectivos sacos plásticos. No momento da análise, cada amostra óssea foi removida do saco e mantida úmida por meio de gaze embebida em água destilada, a fim de preservar suas propriedades mecânicas. Para garantir a reprodutibilidade dos resultados e evitar variações adicionais,

cada osso foi cuidadosamente colocado no equipamento de teste, de modo que a força de flexão fosse aplicada no ponto médio da face anteroposterior.

A análise foi quantificada por meio de um ensaio de flexão em três pontos, realizado em uma máquina universal de ensaios EMIC<sup>®</sup> DL 3000, controlada pelo software Blue Hill<sup>®</sup>. As amostras ósseas foram apoiadas em dois pontos distantes 5 mm um do outro. Uma sonda de base redonda, acoplada a uma célula de carga de 5 kg, aplicou uma força de compressão na região central da face anteroposterior do osso, à velocidade de 1 mm/min. A resistência à fratura foi definida como a carga máxima suportada pela amostra antes da ocorrência da fratura.

### **3.10.3 Análises de cinzas e minerais dos ossos**

Subsequente aos ensaios mecânicos, segmentos de aproximadamente 15% do comprimento da diáfise média de cada tíbia e fêmur foram coletados para a quantificação de cinzas. A determinação do conteúdo mineral foi realizada conforme protocolo descrito por Yair *et al.* (2012).

Para a análise de cinzas, as amostras ósseas foram imersas em acetona por 12 horas, a fim de remover completamente os lipídios. Em seguida, foram secas em estufa a 105°C por 6 horas para eliminar a umidade. Os ossos secos foram então pesados em balança analítica e transferidos para cadinhos de cerâmica, onde foram submetidos à calcinação em mufla a 600°C por 10 horas. Após a calcinação, as cinzas residuais foram pesadas, permitindo a determinação do percentual de minerais inorgânicos em cada amostra.

Cerca de 100 a 150 miligramas de cada amostra de cinzas de tíbia foram submetidas à análise por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) utilizando um equipamento Varian (Varian<sup>®</sup>, Mulgrave, Austrália). Para quantificar os elementos cálcio, fósforo, manganês e magnésio, soluções padrão certificadas da Merck (Certipur Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha) foram empregadas como referência.

Os resultados obtidos foram expressos como porcentagem em relação ao peso (mg) total das cinzas, permitindo uma comparação direta entre as amostras.



### 3.10.4 Calcificação óssea

14 tíbias e fêmures diretos de cada tratamento foram utilizados para a análise de calcificação óssea, tanto aos 18,5 dias de incubação quanto ao nascimento.

Os ossos foram submetidos à coloração diferencial com Alcian Blue e Alizarin Red (Kelly; Bryden, 1983; Blom; Lilja, 2004), permitindo a visualização do tecido cartilaginoso (não calcificado) e ósseo (calcificado), respectivamente. Imagens digitais dos ossos foram capturadas com uma câmera digital Nikon 5100, montada em uma estação de fotos. Os ossos foram posicionados em orientação semelhante ao longo de uma régua marcada em milímetros (barra de escala), e fotos foram tiradas da face anteroposterior de cada osso. As imagens obtidas de cada osso foram analisadas no software ImageJ® (National Institutes of Health, Bethesda, MD; disponível online em: <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>), onde o percentual de área calcificada em relação à área total do osso foi determinado. A barra de escala impressa nas imagens digitais foi utilizada para calibrar o programa.

### 3.11 Análises estatísticas

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. O modelo geral usado para todos os dados foi

$$Y_i = \mu + \text{Manipulação Térmica} + \varepsilon_i$$

Onde  $Y_i$  = a variável dependente,  $\mu$  é a média geral, Manipulação Térmica = MT ( $i$  = baixa, controle, alta ou muito alta), e  $\varepsilon_i$  = o erro.

A análise estatística foi feita usando o pacote de software SAS® 9.2 (Instituto SAS Inc., Cary, NC). Todos os dados foram analisados através da ANOVA de 1 fator e então o teste de Tukey foi usado para determinar as diferenças entre as médias, adotando-se o nível de significância de 5%.

Cada tratamento foi composto por 7 bandejas, totalizando 602 ovos. Cada bandeja foi considerada uma unidade experimental para análise. Para as avaliações de casca, gema, embrião e pinto, foram selecionadas aleatoriamente 14 amostras por tratamento,

sendo o ovo (ou embrião/pinto) a unidade experimental. As análises estatísticas foram precedidas da verificação das premissas do modelo.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Rendimento de incubação e qualidade dos pintos**

Os dados relativos ao rendimento da incubação e à mortalidade embrionária estão dispostos na Tabela 2. Entre os parâmetros zootécnicos avaliados durante a incubação (Tabela 2), apenas a perda de peso dos ovos, a mortalidade intermediária e a taxa de pintos refugos apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ( $p \leq 0,05$ ). A perda de peso dos ovos durante a incubação variou significativamente, com o grupo MT-L exibindo a menor perda (11,74%), enquanto o grupo MT-VH apresentou a maior (12,94%). A perda de peso dos ovos é influenciada por fatores como a pressão de vapor d'água e a condutância da casca (Meijerhof; Van Beek, 1993). Para melhores resultados de eclosão, recomenda-se que essa perda fique entre 11% e 13% do peso inicial dos ovos entre o início da incubação e a transferência para os nascedouros (Decuypere *et al.*, 2003). As variações nos nossos resultados podem estar relacionadas à evaporação de água, que foi influenciada pela manipulação térmica. No entanto, as flutuações diárias de temperatura na casca dos ovos não foram suficientes para desviar a perda de peso da faixa ideal durante o período de incubação.

Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) no índice de fertilidade, o que demonstra a homogeneidade das unidades experimentais. Todos os ovos foram coletados de um mesmo lote de matrizes, com pesos médios entre 66 e 68,5 g, padronizados e distribuídos aleatoriamente entre os tratamentos.

Com relação à eclodibilidade, embora o grupo MT-H tenha apresentado a maior taxa (88,13%) e o grupo MT-L a menor (81,96%), essas variações não foram estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ). Para a mortalidade embrionária por fase de incubação, houve diferenças significativas entre os tratamentos ( $P \leq 0,05$ ), somente na mortalidade intermediária, que foi maior no grupo MT-L (2,56%) em comparação aos demais.

Tabela 2 – Rendimento da incubação e mortalidade embrionária de pintos submetidos à incubação em TCO controle (C), ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO, do 8° ao 18,5° dia.

Temperatura	Perda de peso (%)	Fertilidade (%)	Eclodibilidade <sup>1</sup> (%)	Mortalidade (%)						Refugos (%)
				Inicial	Intermediária	Final	Bicados	Final + bicados	Total	
MT-L	11,74 <sup>b</sup>	94,82	81,96	5,10	2,56 <sup>a</sup>	8,14	2,24	10,38	18,04	1,84 <sup>a</sup>
C	12,15 <sup>ab</sup>	94,27	87,75	5,08	0,73 <sup>b</sup>	5,23	1,21	6,44	12,25	0,88 <sup>b</sup>
MT-H	12,68 <sup>ab</sup>	94,58	88,13	4,89	0,92 <sup>b</sup>	5,05	1,02	6,06	11,87	0,69 <sup>b</sup>
MT-VH	12,94 <sup>a</sup>	94,73	86,62	4,07	0,99 <sup>b</sup>	7,73	0,59	8,32	13,38	0,98 <sup>b</sup>
SEM	0,157	0,327	1,311	0,307	0,212	0,833	0,232	0,930	1,311	0,109
P-valor	0,0225	0,9466	0,3300	0,6176	0,0025	0,4343	0,0668	0,3471	0,3300	<0,0001

<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

<sup>1</sup>Taxa de eclodibilidade sobre o total de ovos férteis.

C= controle (37,8°C - sem manipulação térmica); MT-L= Manipulação térmica a 36,7°C; MT-H= Manipulação térmica a 38,9°C; MT-VH: Manipulação térmica a 39,4°C.

TCO = temperatura da casca do ovo; SEM: erro padrão da média. n=28.

A manipulação térmica durante a incubação é uma técnica utilizada para induzir termotolerância em aves, com efeitos variáveis sobre os parâmetros zootécnicos, como eclodibilidade e mortalidade embrionária.

Nossos resultados corroboram a literatura, mostrando que a manipulação térmica controlada não afeta as características zootécnicas da incubação, corroborando com estudos da literatura. Leandro *et al.* (2000) observaram que variações de temperatura no 16º dia (40°C ou 32°C por 5 horas diárias) não afetaram a eclodibilidade ou a mortalidade embrionária. De forma semelhante, Yildirim e Yetisir (2004) constataram que temperaturas moderadas (37,2°C a 38,3°C) nos últimos dias de incubação melhoraram os índices de eclosão, enquanto temperaturas extremas (36,1°C ou 39, 9°C) aumentou a mortalidade. Yahav *et al.* (2004) e Collin *et al.* (2005) também confirmaram que manipulações térmicas controladas em diferentes fases da embriogênese não prejudicaram os resultados de incubação. Estudos de Flores *et al.* (2017) e Silva (2019) indicaram que estímulos térmicos na última semana de incubação não comprometem as previsões embrionárias ou a taxa de eclosão. Amjadian e Shahir (2020) descobriram que a exposição a 39,5°C por 3 horas diárias, entre o 11º e o 16º dia de incubação, não influenciou significativamente esses parâmetros.

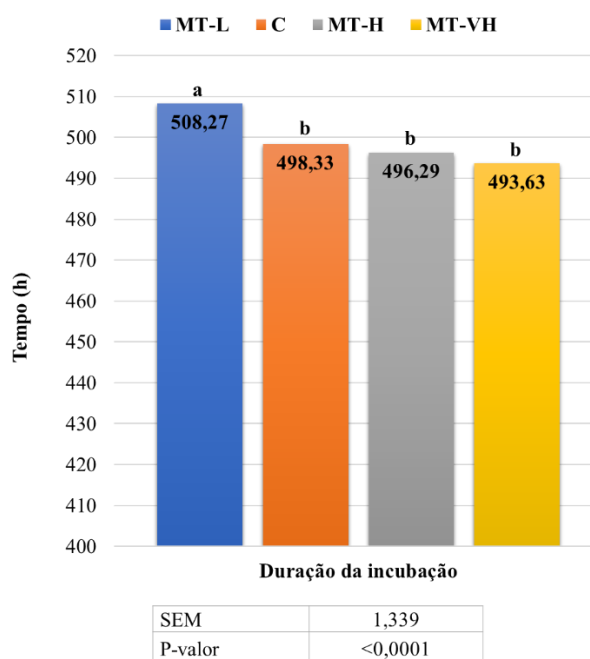
A manipulação térmica da casca a 36,7°C (MT-L) foi a condição que apresentou maior mortalidade, na fase intermediária ( $p \leq 0,05$ ). Embora os outros tratamentos térmicos tenham mostrado variações, as diferenças não foram significativas entre si ( $P > 0,05$ ). Esses resultados são relevantes para a escolha de condições de incubação que minimizem a mortalidade durante o processo. No nosso estudo, o aumento da mortalidade relacionado no grupo MT-L parece estar diretamente relacionado ao protocolo de manipulação térmica, visto que as diferenças na mortalidade surgiram assim que os tratamentos foram aplicados.

A ausência de diferença significativa na mortalidade total sugere que os embriões que sobreviveram conseguiram se adaptar às alterações térmicas, já que o tratamento foi intermitente. No entanto, essa adaptação parece ter exigido um custo metabólico, refletido na maior percentagem de pintos refugos no grupo MT-L. Yildirim e Yetisir (2004) afirmaram que baixas temperaturas de incubação aumentam a mortalidade embrionária, o que apoia parcialmente nossos achados. No estudo deles, ovos de matrizes Ross 308® incubados a 36,1°C apresentaram maior mortalidade embrionária (8,0%) em comparação a temperaturas mais altas. Temperaturas abaixo do ideal podem reduzir a atividade

metabólica dos embriões e comprometer o sucesso da incubação, como apontado pelos autores. A diferença entre os resultados pode ser explicada pela natureza constante do tratamento térmico no estudo deles, enquanto nosso protocolo envolve manipulação intermitente.

Como os embriões de aves que dependem de uma fonte externa de calor para manter as funções metabólicas normais, as variações de temperatura durante a incubação podem influenciar as taxas de desenvolvimento embrionário (Barott, 1937; Joseph *et al.*, 2006). No grupo MT-L, as temperaturas mais baixas do que o recomendado provavelmente reduziram a taxa metabólica dos embriões, prolongando o tempo de incubação e aumentando a exaustão das reservas energéticas, resultando em pintos de menor qualidade (Decuypere; Bruggeman, 2007; Muir; Bosques, 2019). Assim, os resultados de refugo complementam os de mortalidade, revelando que os embriões que sobreviveram tiveram um desenvolvimento mais lento e apresentaram maiores desafios para alcançar a adaptação às condições térmicas.

Figura 3 – Duração da incubação (h) de pintos submetidos à incubação em TCO controle (C), ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO, do 8º ao 18,5º dia.



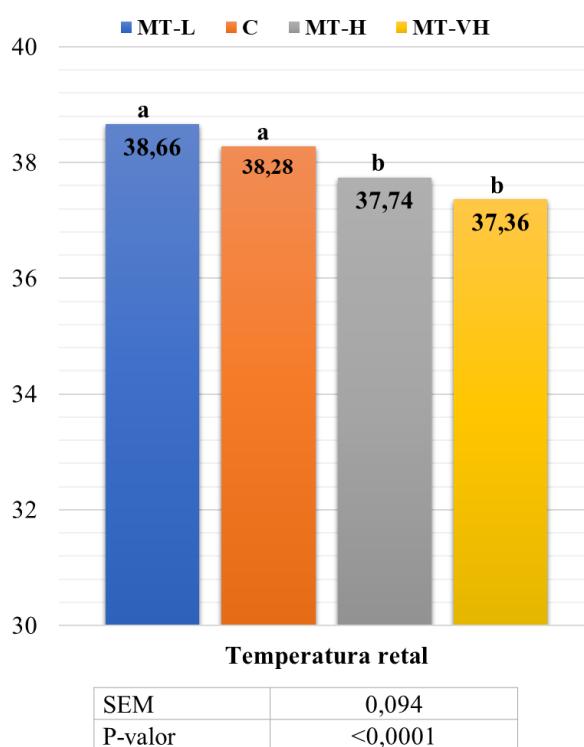
<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

C= controle (37,8°C - sem manipulação térmica); MT-L= Manipulação térmica a 36,7°C; MT-H= Manipulação térmica a 38,9°C; MT-VH: Manipulação térmica a 39,4°C.

TCO = temperatura da casca do ovo; SEM: erro padrão da média. n=28.

As temperaturas retais médias dos pintos recém-eclodidos também apresentaram variações significativas entre os tratamentos (Figura 4). Os pintos submetidos à manipulação com TCO alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) exibiram temperaturas retais significativamente mais baixas (37,74°C e 37,36°C, respectivamente) em comparação com os grupos controle e MT-L (38,27°C e 38,66°C, respectivamente).

Figura 4 – Temperatura retal (°C) de pintos submetidos à incubação em TCO controle (C), ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO, do 8º ao 18,5º dia.



<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

C= controle (37,8°C - sem manipulação térmica); MT-L= Manipulação térmica a 36,7°C; MT-H= Manipulação térmica a 38,9°C; MT-VH: Manipulação térmica a 39,4°C.

TCO = temperatura da casca do ovo; SEM: erro padrão da média. n=56.

Elevações na temperatura retal podem indicar estresse térmico, o que pode afetar negativamente o crescimento e desempenho das aves (Yalçın; Siegel, 2003; Morita *et al.*, 2016). Por outro lado, temperaturas retais mais baixas sugerem um melhor controle da temperatura corporal. Quando embriões são submetidos a manipulações térmicas

controladas durante o período de incubação, ocorre uma adaptação no sistema termorregulador, permitindo que esses embriões desenvolvam uma capacidade aprimorada de equilibrar a produção e dissipação de calor (Nichelmann *et al.*, 1994; Yahav, 2009). Por exemplo, a incubação a temperaturas ligeiramente mais altas ou mais baixas em certos períodos críticos pode sensibilizar o sistema nervoso central e o sistema endócrino das aves, resultando em um ajuste na sua capacidade de regular a temperatura corporal de maneira mais eficiente ao longo da vida (Nichelmann; Tzschentke, 1999).

No caso dos embriões submetidos à manipulação térmica, como observado nos grupos MT-H e MT-VH, a habilidade de manter uma temperatura corporal interna mais baixa mostra que esses animais desenvolveram uma resposta adaptativa. Isso reflete um aumento na eficiência dos mecanismos de troca de calor entre o corpo e o ambiente, como uma maior capacidade de vasodilatação periférica ou uma modulação na taxa metabólica, reduzindo a produção de calor excessivo em ambientes quentes (Tzschentke; Halle, 2009; Yahav; Mcmurtry, 2001).

Assim como em nossos resultados com pintos de corte, Nichelmann e Tzschentke (1999) relataram que manipulações térmicas em embriões de pato (*Cairina Moschata*) a 34,5°C, entre o 28º e 35º dia de incubação, induziram maior produção de calor pós-eclosão. Eles observaram que a incubação a temperaturas mais baixas durante a última semana de desenvolvimento embrionário pode aumentar o potencial de tolerância ao frio, corroborando com os achados de Nichelmann *et al.* (1994), que demonstraram maior resistência ao frio em patos submetidos a temperaturas reduzidas nos últimos 7 dias de incubação.

A Tabela 3 apresenta os dados sobre o peso do ovo antes da incubação, peso dos pintos, peso relativo dos órgãos e o escore de umbigo de pintos de um dia, para ambos os tratamentos térmicos aplicados durante a incubação.

Tabela 3 – Peso do ovo antes da incubação, pesos dos pintos, peso relativo de órgãos e escore de umbigo no momento da eclosão de pintos submetidos à incubação em TCO controle (C), ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO, do 8° ao 18,5° dia.

Temperatura	Peso do ovo (g)	Pinto de 1 dia (g)		Peso de órgãos relativo ao YFBM (%)								Qualidade de umbigo <sup>3</sup>
		Peso	YFBM	Coração	Fígado	Estômago <sup>1</sup>	Intestino <sup>2</sup>	Pulmões	Baço	Pâncreas	Bursa	
MT-L	67,21	46,34 <sup>c</sup>	38,87 <sup>b</sup>	0,66 <sup>c</sup>	2,30 <sup>b</sup>	5,85	3,48 <sup>b</sup>	0,84 <sup>b</sup>	0,020 <sup>d</sup>	0,13 <sup>b</sup>	0,07 <sup>c</sup>	2,36 <sup>a</sup>
C	67,21	48,68 <sup>a</sup>	43,15 <sup>a</sup>	0,75 <sup>ab</sup>	2,78 <sup>a</sup>	6,01	3,93 <sup>a</sup>	0,98 <sup>a</sup>	0,040 <sup>c</sup>	0,15 <sup>a</sup>	0,09 <sup>b</sup>	1,64 <sup>ab</sup>
MT-H	67,24	48,10 <sup>ab</sup>	43,12 <sup>a</sup>	0,77 <sup>a</sup>	2,82 <sup>a</sup>	6,07	3,90 <sup>a</sup>	0,95 <sup>a</sup>	0,050 <sup>a</sup>	0,15 <sup>a</sup>	0,10 <sup>a</sup>	1,57 <sup>b</sup>
MT-VH	67,23	47,89 <sup>b</sup>	43,03 <sup>a</sup>	0,71 <sup>bc</sup>	2,79 <sup>a</sup>	5,99	3,90 <sup>a</sup>	0,95 <sup>a</sup>	0,045 <sup>b</sup>	0,14 <sup>ab</sup>	0,09 <sup>b</sup>	2,00 <sup>ab</sup>
SEM	0,100	0,142	0,305	0,009	0,038	0,054	0,048	0,010	0,002	0,002	0,002	0,104
P-valor	0,9994	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,5505	0,0008	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0238

<sup>la,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

<sup>1</sup> Pró-ventrículo + moela.

<sup>2</sup> Intestino delgado + intestino grosso.

C= controle (37,8°C - sem manipulação térmica); MT-L= Manipulação térmica a 36,7°C; MT-H= Manipulação térmica a 38,9°C; MT-VH: Manipulação térmica a 39,4°C.

TCO = temperatura da casca do ovo; YFBM = Yolk Free Body Mass; SEM: erro padrão da média.

<sup>3</sup> Condição de umbigo, onde: 1= boa, 2= moderada, 3= ruim.

n=56.



Não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) no peso dos ovos entre os grupos experimentais, indicando condições homogêneas no início dos testes. O grupo controle apresentou o maior peso corporal dos pintos (48,68 g), em comparação aos grupos MT-VH e MT-L (47,89 g e 46,34 g, respectivamente).

O peso do pinto recém-eclodido está intimamente relacionado ao peso do ovo, mas não reflete necessariamente o desenvolvimento corporal. O peso inclui tanto o pinto quanto o saco vitelino residual. Se uma quantidade substancial de saco vitelino permanece ao final da incubação, isso indica que menos energia foi utilizada durante o desenvolvimento embrionário (Ipek *et al.*, 2014). Para avaliar melhor a qualidade do pinto, o peso do corpo sem o saco vitelino (YFBM - Yolk Free Body Mass) é um parâmetro mais preciso, pois reflete o quanto do conteúdo do ovo foi convertido em massa corporal (Meijerhof, 2009). Ao analisar o YFBM, observamos que apenas o grupo MT-L foi afetado negativamente ( $P\leq 0,05$ ).

A manipulação térmica também teve efeito significativo ( $P\leq 0,05$ ) no peso relativo de diversos órgãos, conforme apresentado na Tabela 3. Destacamos que o tratamento térmico com TCO mais baixa (MT-L) resultou em uma redução significativa ( $P\leq 0,05$ ) no peso relativo de órgãos como fígado, intestino, pulmões, baço e bursa, em comparação aos outros grupos. Esses resultados, aliado aos resultados de mortalidade intermediária e refugos, estão de acordo com a literatura, que indica que alterações na temperatura de incubação podem afetar o desenvolvimento embrionário (Lourens *et al.*, 2007; Molenaar *et al.*, 2010; Maatjens *et al.*, 2014a; Van Den Brand *et al.*, 2021). Não foram encontradas diferenças significativas ( $P>0,05$ ) no peso relativo do estômago entre os tratamentos.

Por outro lado, os pesos relativos do coração e pâncreas nos grupos MT-H e MT-VH foram semelhantes aos do grupo controle ( $P>0,05$ ). Isso sugere que esses órgãos não foram afetados pelas manipulações térmicas, corroborando com estudos anteriores que indicam que temperaturas elevadas podem impactar negativamente a proliferação celular no coração, mas que a intensidade e a duração do calor desempenham um papel crucial na intensidade desses efeitos (Lourens *et al.*, 2007; Molenaar *et al.*, 2010; Maatjens *et al.*, 2014a; Van Den Brand *et al.*, 2021).

O peso relativo do baço variou significativamente ( $P\leq 0,05$ ) entre os tratamentos, com o grupo MT-H apresentando o maior peso (0,050 g), seguido por MT-VH (0,045 g), Controle (0,040 g) e MT-L (0,020 g). Já o peso relativo da bursa foi maior no grupo MT-

H (0,10 g), seguido pelos grupos controle e MT-VH, que não diferiram entre si (0,09 g), enquanto o menor peso foi observado no grupo MT-L (0,07 g). A literatura sugere que a redução no desenvolvimento da bursa pode comprometer a resposta imunológica das aves pós-eclosão (Oznurlu *et al.*, 2010). Existe uma relação entre temperaturas mais elevadas e o aumento no peso dos órgãos baço e bursa, o que pode estar relacionado à resposta imunológica do embrião, visto que tem papel na produção e maturação de células imunes (Yalçin; Siegel, 2003).

A técnica de manipulação térmica, utilizando o controle da temperatura da casca do ovo, pode ter influenciado esses resultados. Estudos indicam que variações na temperatura da casca podem impactar significativamente o desenvolvimento embrionário, causando superaquecimento quando o controle de temperatura é feito exclusivamente pela incubadora (Lourens *et al.*, 2011). O controle preciso da temperatura da casca é ideal para evitar os efeitos negativos do superaquecimento embrionário.

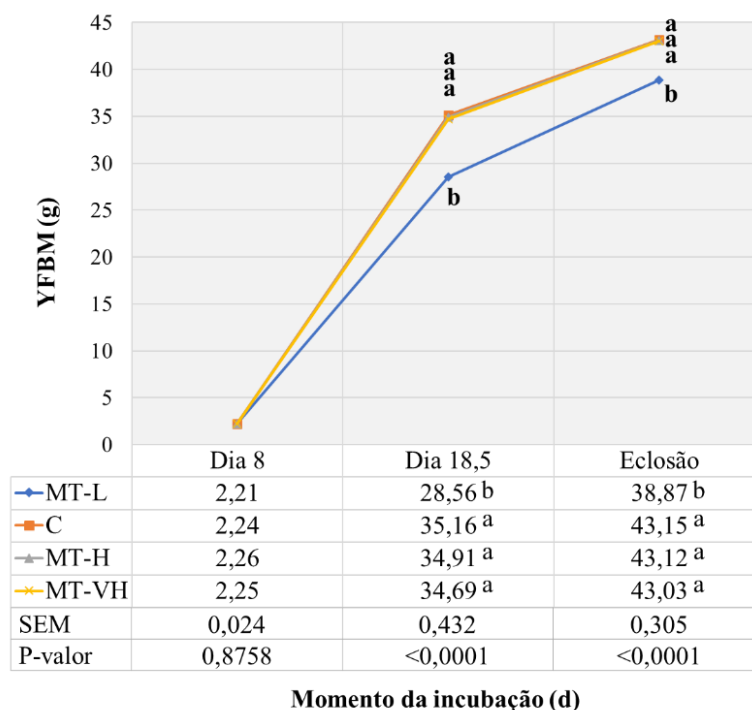
Fatores como estágio de desenvolvimento, duração e intensidade do tratamento térmico, além do método de controle de temperatura, são determinantes cruciais que explicam as diferenças observadas na literatura (Lin *et al.*, 2017). Yalçin e Siegel (2003) relataram que pintinhos incubados a 39,6°C durante 6 horas diárias (entre os dias 10 e 18 de incubação) apresentaram peso corporal e peso relativo do coração semelhantes ao controle. Yahav *et al.* (2004), ao utilizar 39,9°C por 3 horas diárias, observaram resultados semelhantes. Em estudo anterior, também observamos que a manipulação da TCO a 38,9°C (por 6 horas diárias) entre os dias 8 e 18 de incubação não prejudicou o desenvolvimento dos órgãos (Silva *et al.*, 2019). Isso indica que a aclimação térmica ao calor, quando feita de maneira controlada, é uma estratégia viável sem prejudicar a qualidade dos pintinhos.

A qualidade do umbigo, foi influenciada pelos diferentes tratamentos térmicos. A qualidade do umbigo em pintinhos recém-eclodidos é um indicador do desenvolvimento embrionário e pode influenciar diretamente sua saúde e desempenho pós-eclosão (Decuypere; Bruggeman, 2007). Um umbigo limpo e cicatrizado é esperado em pintos bem desenvolvidos, sinalizando o fechamento adequado do cordão umbilical durante os estágios finais da incubação, fundamental para evitar infecções (Tona *et al.*, 2003; Yalçin *et al.*, 2007).

Nossos resultados apontam que a manipulação térmica pode influenciar a cicatrização do umbigo dos pintinhos recém-eclodidos, com a manipulação em temperatura de 38,9°C (MT-H) sendo a mais benéfica. No entanto, nenhum protocolo térmico comprometeu a cicatrização do umbigo, já que todos os grupos tratados foram semelhantes ao controle.

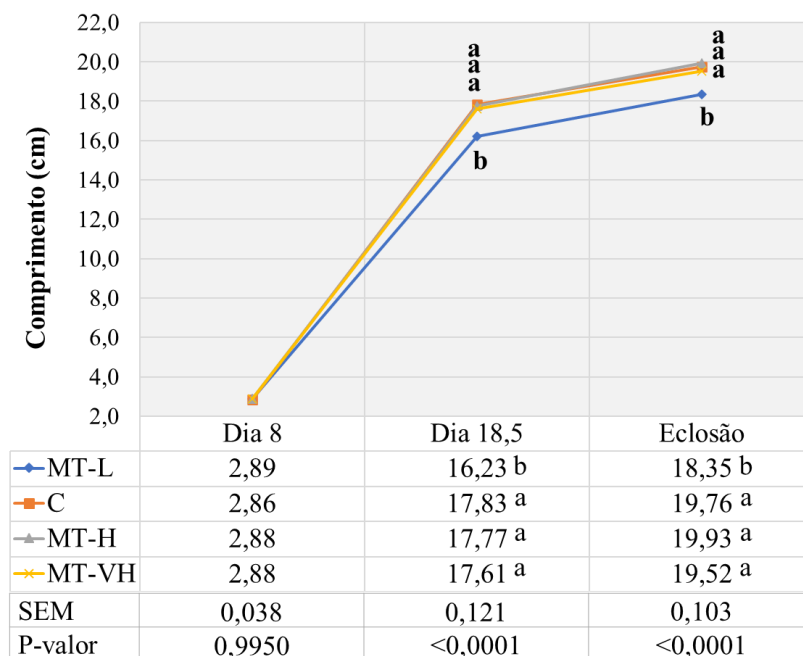
O YFBM (Figura 5) e o comprimento do pinto (Figura 6) foram influenciados de maneira semelhante pelos tratamentos de manipulação térmica durante a incubação. Tanto aos 18,5 dias quanto no momento da eclosão, o tratamento MT-L resultou em uma redução significativa no YFBM e no comprimento do pinto em comparação ao controle ( $p \leq 0,05$ ). Por outro lado, os tratamentos MT-H e MT-VH não apresentaram impacto significativo nessas variáveis, com médias estatisticamente semelhantes ao grupo controle ( $p > 0,05$ ), o que reforça nesse estudo que a manipulação térmica intermitente em temperatura alta não influenciou o rendimento de incubação.

Figura 5 – Peso do pinto sem gema (YFBM, g) ao longo da incubação em TCO controle (C), ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO, do 8º ao 18,5º dia.



<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). C= controle (37,8°C - sem manipulação térmica); MT-L= Manipulação térmica a 36,7°C; MT-H= Manipulação térmica a 38,9°C; MT-VH: Manipulação térmica a 39,4°C. TCO = temperatura da casca do ovo; SEM: erro padrão da média. n=56.

Figura 6 – Comprimento do pinto (cm) ao longo da incubação em TCO controle (C), ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO, do 8° ao 18,5° dia.



#### Momento da incubação (d)

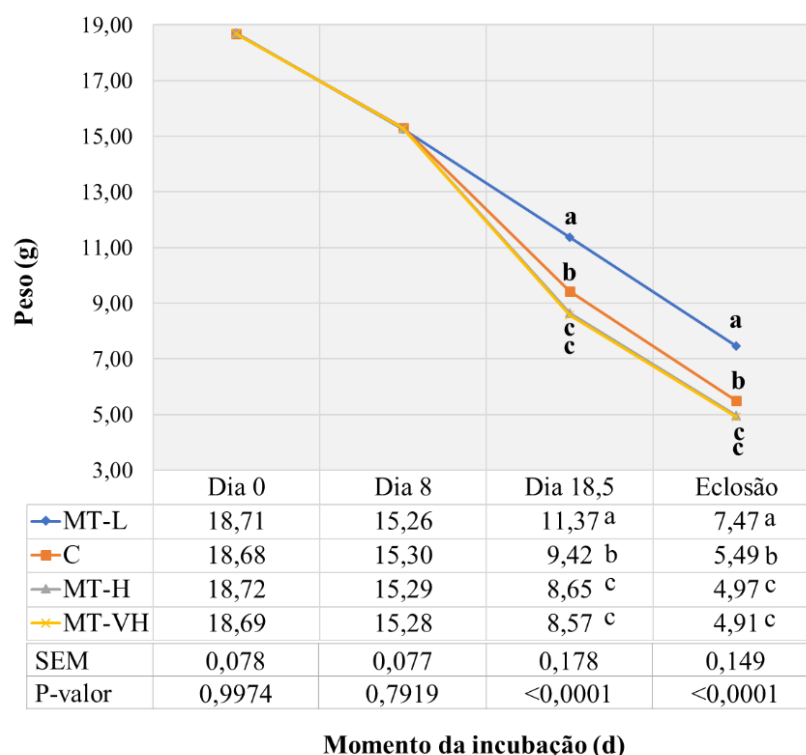
<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). C= controle (37,8°C - sem manipulação térmica); MT-L= Manipulação térmica a 36,7°C; MT-H= Manipulação térmica a 38,9°C; MT-VH: Manipulação térmica a 39,4°C. TCO = temperatura da casca do ovo; SEM: erro padrão da média. n=56

O desenvolvimento de todos os tecidos pode ser influenciado pelas condições de temperatura durante a incubação (Barott, 1937; Joseph *et al.*, 2006). O YFBM é uma métrica essencial para entender esses efeitos, pois reflete o crescimento e desenvolvimento do embrião ao longo da incubação. Em condições ideais, os embriões utilizam a gema de forma eficiente como fonte de nutrientes, convertendo-a em massa corporal (Lourens *et al.*, 2007; Molenaar *et al.*, 2011; Yalçin *et al.*, 2012).

Tzschentke e Halle (2009) observaram que pintos com maior YFBM tendem a ter melhores taxas de crescimento e eficiência alimentar. A Figura 7 ilustra o peso da gema ao longo da incubação para ovos submetidos a diferentes tratamentos. Observamos que o peso da gema e do saco vitelínico residual diminuiu ao longo da incubação, com influência dos tratamentos a partir do 18,5° dia. O tratamento MT-L apresentou um peso

de gema significativamente maior ( $p \leq 0,05$ ) em comparação aos outros tratamentos nos dias 18,5 e ao nascimento. Já os tratamentos MT-H e MT-VH apresentaram pesos significativamente menores ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao controle e MT-L nesses mesmos períodos.

Figura 7 – Peso da gema (g) ao longo da incubação em TCO controle (C), ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO, do 8º ao 18,5º dia.



<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). C= controle (37,8°C - sem manipulação térmica); MT-L= Manipulação térmica a 36,7°C; MT-H= Manipulação térmica a 38,9°C; MT-VH: Manipulação térmica a 39,4°C. TCO = temperatura da casca do ovo; SEM: erro padrão da média. n=56.

Estudos como o de Yahav *et al.* (2004) indicam que exposições curtas a temperaturas elevadas (39–39,5°C, 3 a 6 horas diárias entre os dias 10 e 18 de incubação) podem aumentar a termotolerância e melhorar a eficiência alimentar sem reduzir o YFBM. Isso indica que manipulações térmicas controladas podem beneficiar o desenvolvimento muscular sem prejudicar o crescimento geral. Por outro lado,

temperaturas muito elevadas ou exposições prolongadas podem reduzir o YFBM. Amjadian e Shahir (2020), ao investigarem a manipulação térmica (39,5°C por 3 horas diárias entre os dias 11 e 16 de incubação), não encontraram efeitos negativos no YFBM ou na qualidade geral dos pintos, sugerindo que esse tipo de intervenção pode melhorar o desempenho térmico sem prejudicar o desenvolvimento. Piestun *et al.* (2009) demonstraram que temperaturas levemente elevadas entre os dias 15 e 19 de incubação (período crítico para a proliferação de fibras musculares) podem otimizar o crescimento muscular e aumentar o YFBM. Em contraste, manipulações térmicas com temperaturas muito altas ou prolongadas podem reduzir o YFBM.

Yalçın *et al.* (2008a) observaram que uma temperatura de incubação elevada (40,0°C por 6 horas diárias, do dia 10 ao 18 de incubação) não afetou o YFBM, mas os pintos desse tratamento apresentaram maior peso significativo do saco vitelínico residual e menor peso do fígado ( $P \leq 0,05$ ) em comparação ao grupo controle. Esses resultados podem refletir diferenças fisiológicas na mobilização da gema. De maneira similar, Willemsen *et al.* (2011) não encontraram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) no YFBM ou no peso da gema residual entre pintos nascidos de tratamentos com manipulação térmica em temperaturas baixas (34,6°C) ou altas (40,6°C), por 4 horas diárias entre os dias 16 e 18 de incubação, em comparação ao grupo controle.

Em um estudo anterior (Silva *et al.*, 2019), em que foi aplicada manipulação térmica da TCO a 38,9°C por 6 horas diárias, entre os dias 8 e 18 de incubação, também não foram observados impactos negativos nos parâmetros de rendimento de incubação ou na qualidade dos pintinhos recém-eclodidos. Esses achados são importantes, pois mostram que a manipulação térmica, quando realizada de forma controlada, é uma técnica segura e potencialmente benéfica durante a incubação.

Em contraste, temperaturas mais baixas, como as utilizadas no tratamento MT-L, podem reduzir a taxa metabólica dos embriões, prolongando a incubação e aumentando o risco de esgotamento das reservas energéticas, resultando em pintos de qualidade inferior (Decuypere; Bruggeman, 2007; Muir; Groves, 2019). Yalçın e Siegel (2003) também observaram que o resfriamento dos ovos durante a incubação (36,9°C por 6 horas diárias) afetou negativamente o desenvolvimento dos embriões. Esse efeito é evidenciado pela maior duração da incubação no grupo MT-L (Figura 3), que retardou o desenvolvimento embrionário, levando a uma menor YFBM, maior quantidade de gema

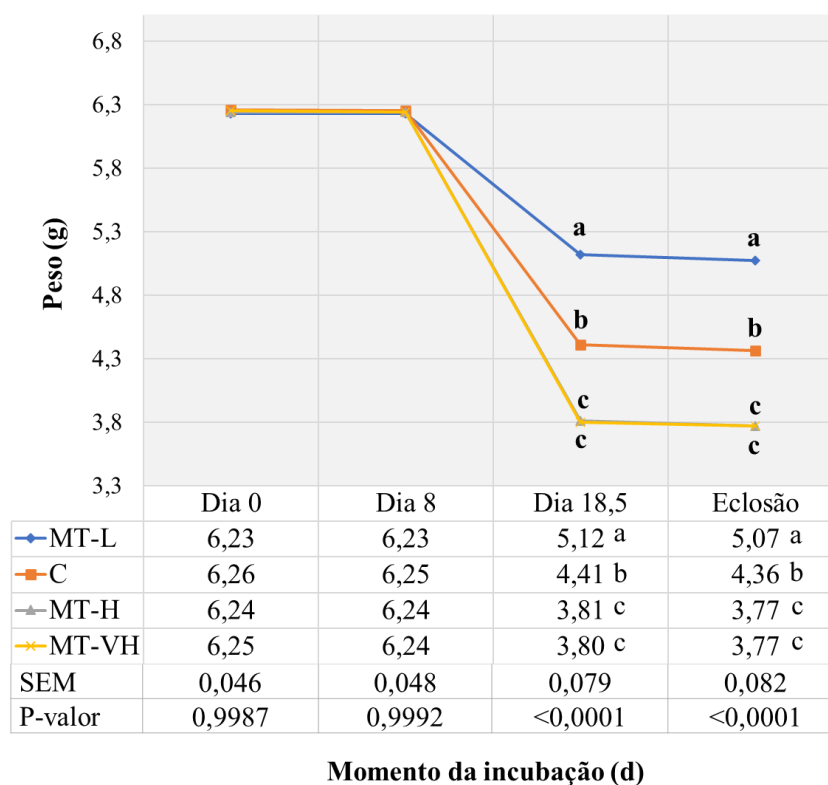
residual ao nascimento e impactos negativos em órgãos como coração, fígado, intestino, baço e bursa. Esses resultados podem ser atribuídos à menor atividade metabólica dos embriões, causada pela redução de temperatura durante os tratamentos.

## 4.2 Parâmetros de casca e gema

### 4.2.1 Minerais da casca

Os resultados relacionados à casca do ovo estão ilustrados nas Figuras 8 a 13.

Figura 8 – Peso da casca do ovo (g) ao longo da incubação em TCO controle (C), ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO, do 8° ao 18,5° dia.

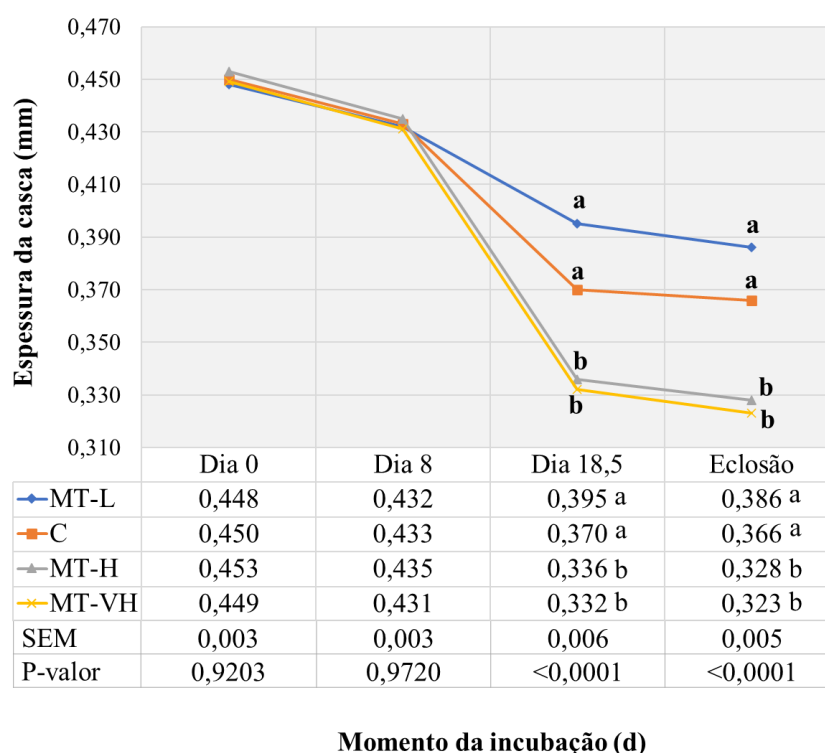


<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).  
 C= controle (37,8°C - sem manipulação térmica); MT-L= Manipulação térmica a 36,7°C; MT-H= Manipulação térmica a 38,9°C; MT-VH: Manipulação térmica a 39,4°C.  
 TCO = temperatura da casca do ovo; SEM: erro padrão da média. n=56.

A perda de peso da casca durante a incubação variou entre os tratamentos, com perdas de 18,62% no grupo MT-L, 30,35% no controle, 39,58% no MT-H e 39,68% no MT-VH. A manipulação da TCO influenciou significativamente ( $p \leq 0,05$ ) o peso da casca a partir do 18,5º dia até a eclosão. Nesses períodos, o grupo MT-L manteve pesos de casca significativamente maiores ( $p \leq 0,05$ ), com valores de 5,12 g e 5,07 g, em comparação com os outros tratamentos. Por outro lado, os grupos MT-H e MT-VH, embora semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ), mostraram uma redução mais acentuada no peso da casca em comparação com os grupos MT-L e controle, indicando maior utilização da casca ao longo do processo de incubação.

A Figura 9 mostra as variações na espessura da casca do ovo ao longo da incubação para os diferentes tratamentos térmicos.

Figura 9 – Espessura da casca do ovo (mm) ao longo da incubação em TCO controle (C), ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO, do 8º ao 18,5º dia.



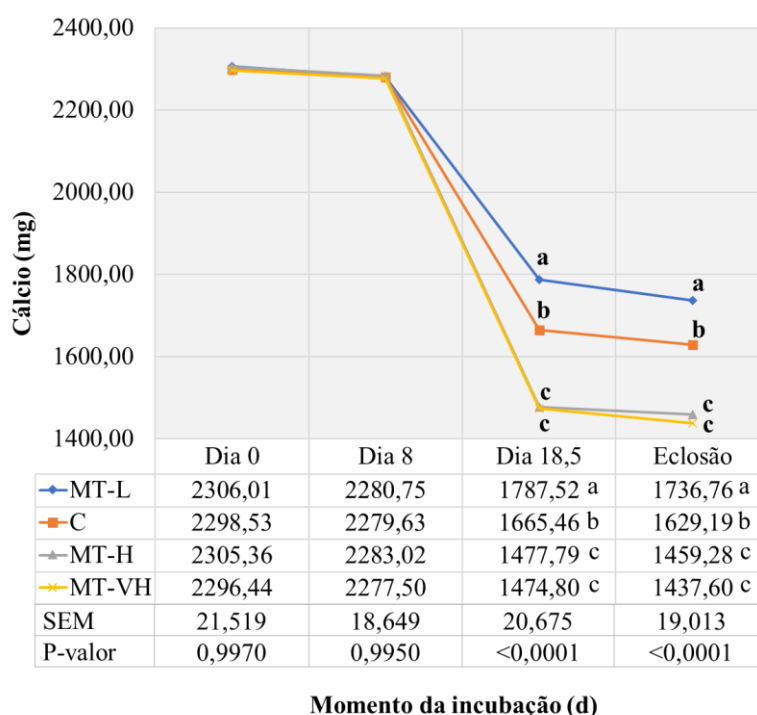
<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). C= controle (37,8°C - sem manipulação térmica); MT-L= Manipulação térmica a 36,7°C; MT-H= Manipulação térmica a 38,9°C; MT-VH: Manipulação térmica a 39,4°C. TCO = temperatura da casca do ovo; SEM: erro padrão da média. n=56.



As reduções percentuais na espessura da casca também variaram: 13,84% no grupo MT-L, 18,67% no controle, 27,59% no MT-H e 28,06% no MT-VH. A manipulação térmica impactou significativamente ( $p \leq 0,05$ ) a espessura da casca entre os tratamentos a partir do 18,5º dia até a eclosão. Nos dias 18,5 e na eclosão, o grupo MT-L apresentou uma espessura de casca significativamente maior ( $p \leq 0,05$ ), com valores de 0,395 mm e 0,386 mm, em comparação com os outros tratamentos. Os grupos MT-H e MT-VH, embora semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ), exibiram uma redução na espessura da casca em comparação aos grupos MT-L e controle ( $p \leq 0,05$ ). Isso mostra que as temperaturas mais altas (MT-H e MT-VH) resultam em aumento na mobilização de minerais e consequentemente, redução expressiva na espessura.

Seguindo o mesmo padrão, o teor de cálcio da casca também diminuiu ao longo da incubação (Figura 10).

Figura 10 – Teor de cálcio da casca do ovo (mg) ao longo da incubação em TCO controle (C), ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO, do 8º ao 18,5º dia.

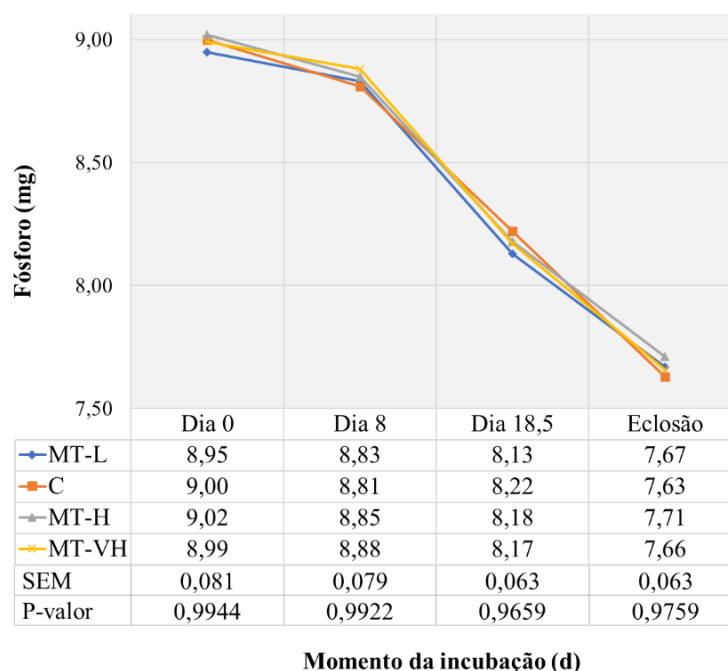


<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). C= controle (37,8°C - sem manipulação térmica); MT-L= Manipulação térmica a 36,7°C; MT-H= Manipulação térmica a 38,9°C; MT-VH: Manipulação térmica a 39,4°C. TCO = temperatura da casca do ovo; SEM: erro padrão da média. n=56.

A manipulação térmica afetou significativamente ( $p \leq 0,05$ ) o teor de cálcio a partir do 18,5º dia até a eclosão. Nos dias 18,5 e na eclosão, o grupo MT-L apresentou teores de cálcio significativamente maiores ( $p \leq 0,05$ ), com valores de 1787,52 mg e 1736,76 mg, respectivamente, em comparação aos outros tratamentos. Os grupos MT-H e MT-VH foram semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ) e apresentaram uma redução significativamente maior ( $p \leq 0,05$ ) no teor de cálcio da casca. Isso indica que temperaturas mais altas intensificaram a mobilização de cálcio da casca, enquanto temperaturas mais baixas preservaram melhor seu conteúdo.

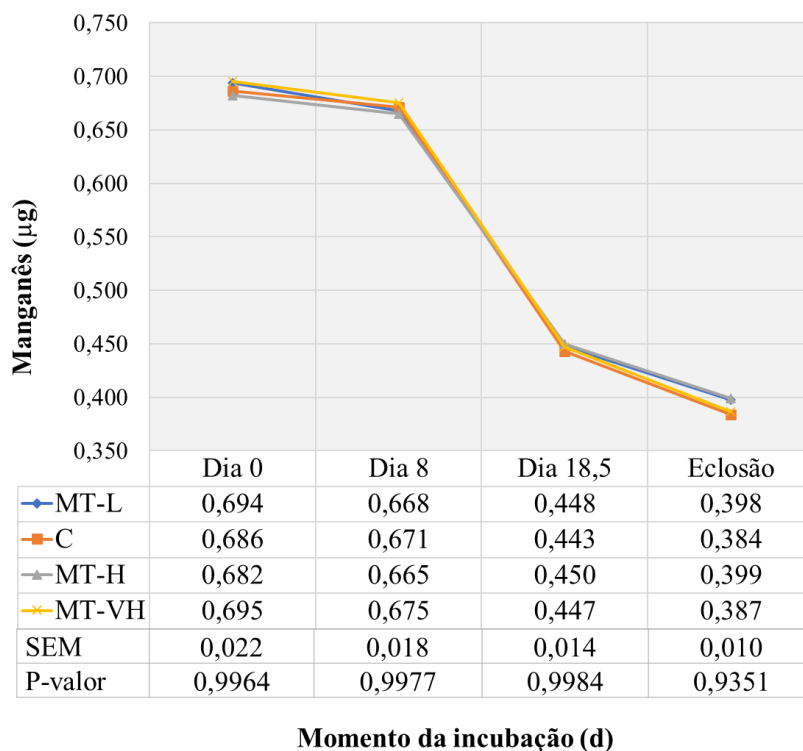
A redução nos teores de fósforo (com perdas de 14,30% no MT-L, 15,22% no controle, 14,52% no MT-H e 14,79% no MT-VH) e manganês (com perdas de 42,65% no MT-L, 44,02% no controle, 41,50% no MT-H e 44,32% no MT-VH) ao longo da incubação foi observada nas Figuras 11 e 12. No entanto, nenhum dos tratamentos de manipulação da TCO teve um efeito significativo sobre a mobilização desses minerais ( $p > 0,05$ ).

Figura 11 – Teor de fósforo da casca do ovo (mg) ao longo da incubação em TCO controle (C), ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO, do 8º ao 18,5º dia.



C= controle (37,8°C - sem manipulação térmica); MT-L= Manipulação térmica a 36,7°C; MT-H= Manipulação térmica a 38,9°C; MT-VH: Manipulação térmica a 39,4°C.  
TCO = temperatura da casca do ovo; SEM: erro padrão da média. n=56.

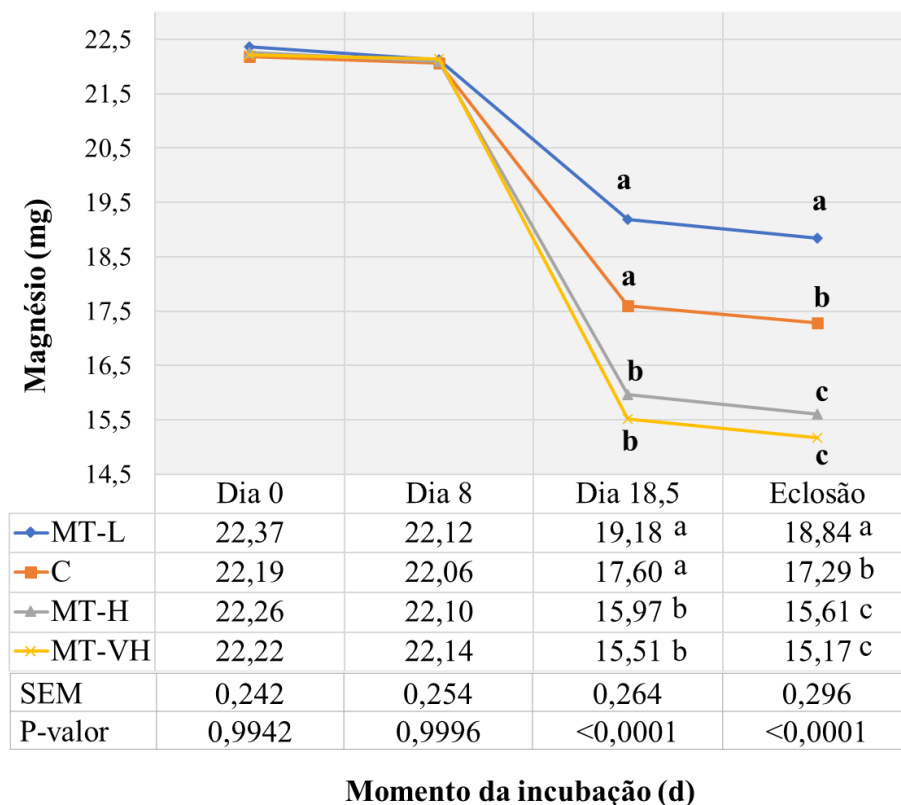
Figura 12 – Teor de manganês da casca do ovo ( $\mu\text{g}$ ) ao longo da incubação em TCO controle (C), ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO, do 8° ao 18,5° dia.



C= controle (37,8°C - sem manipulação térmica); MT-L= Manipulação térmica a 36,7°C; MT-H= Manipulação térmica a 38,9°C; MT-VH: Manipulação térmica a 39,4°C.  
TCO = temperatura da casca do ovo; SEM: erro padrão da média. n=56.

Aos 18,5 dias de incubação, o teor de magnésio no grupo MT-L foi semelhante ao controle ( $p>0,05$ ), com valores de 19,18 mg e 17,60 mg, respectivamente (Figura 13).

Figura 13 – Teor de magnésio da casca do ovo (mg) ao longo da incubação em TCO controle (C), ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO, do 8º ao 18,5º dia.



<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). C= controle (37,8°C - sem manipulação térmica); MT-L= Manipulação térmica a 36,7°C; MT-H= Manipulação térmica a 38,9°C; MT-VH: Manipulação térmica a 39,4°C. TCO = temperatura da casca do ovo; SEM: erro padrão da média. n=56.

Esses resultados demonstram que a manipulação da TCO durante a incubação influenciou significativamente o peso, a espessura e o teor mineral da casca, especialmente em relação ao cálcio, fósforo e magnésio. A calcificação do esqueleto embrionário depende dos minerais da casca, que são gradualmente solubilizados e transportados para o embrião por meio de estruturas extraembrionárias, como o saco vitelínico e a membrana corioalantóide (MCA) (Simkiss, 1961; Allcroft, 1964; Everaert; Decuyper, 2013; Halgrain *et al.*, 2022).

A mobilização do cálcio da casca começa por volta do sétimo ou oitavo dia de incubação, através da maturação da membrana cório-alantóide (MCA), e continua até a eclosão, no 21º dia. A MCA desempenha papel na transferência de cálcio da casca para o embrião, facilitando a absorção eficiente dos minerais necessários para o desenvolvimento esquelético (Tuan, 1987; Uni *et al.*, 2012). Assim, o cálcio da casca é transportado de forma ativa e unidirecional pelas células ectodérmicas da MCA (Terepka *et al.*, 1976; Tuan; Ono, 1986; Uni *et al.*, 2012). Proteínas e enzimas, como as proteínas de ligação ao cálcio (CaBP), ATPase ativada por  $\text{Ca}^{2+}$  e anidrase carbônica, desempenham papéis essenciais nesse processo (Gay *et al.*, 1981; Tuan *et al.*, 1986b).

Observamos que a perda de peso da casca está associada à transferência de cálcio para os ossos do embrião. Contudo, as manipulações térmicas influenciaram significativamente essa perda. O grupo MT-L apresentou a menor perda de peso (18,62%), enquanto os grupos MT-H e MT-VH exibiram perdas superiores a 39%. Esse padrão também foi observado na espessura da casca, onde o grupo MT-L manteve a espessura significativamente maior.

Os resultados também indicam que a manipulação térmica interferiu no teor de cálcio da casca, com os grupos submetidos a temperaturas mais altas mostrando as maiores mobilizações. A casca do ovo é a principal fonte de cálcio para a mineralização óssea do embrião (Yair; Uni, 2011; Oliveira *et al.*, 2015; Torres; Korver, 2018; Halgrain *et al.*, 2022). Embora a redução de fósforo e manganês tenha sido observada ao longo da incubação, esses minerais são mobilizados principalmente da gema, e não da casca, o que explica a ausência de efeito significativo da manipulação térmica sobre eles (Yair *et al.*, 2015).

No estudo de Azevedo (2022), aumentos na temperatura da casca para 38,9°C e 39,4°C, aplicados entre o 8º e 18,5º dia de incubação, afetaram significativamente a mobilização de minerais da casca. Observou-se uma menor redução no peso e na espessura da casca, além de uma diminuição na mobilização de cálcio e magnésio, enquanto a temperatura não teve efeito significativo sobre os teores de fósforo e manganês. A autora sugeriu que as temperaturas elevadas reduziram a eficiência dos mecanismos envolvidos na utilização desses minerais. Esse impacto pode estar relacionado ao comprometimento da função da membrana cório-alantóide (MCA), responsável pelo transporte de cálcio e magnésio da casca para o embrião. Além disso, as

altas temperaturas possivelmente interferiram na circulação de vitamina D<sub>3</sub>, essencial para a regulação da expressão de transportadores de cálcio e para a sua adequada utilização pelo embrião. Não obstante, vale destacar que os tratamentos de Azevedo (2022) foram realizados com temperaturas constantes ao longo do período testado.

A MCA é essencial para o transporte de minerais durante o desenvolvimento embrionário (Halgrain *et al.*, 2022), e é possível que as variações térmicas tenham afetado sua função. O sistema vascular da MCA, relacionado ao crescimento ósseo, pode ter sido influenciado pela temperatura, como sugerido por estudos que mostraram que a elevação térmica inicial pode aumentar a vascularização da MCA e da membrana serosa vitelínica (MSV) (Lin *et al.*, 2017). A temperatura constante, como a aplicada de Azevedo (2022), mostrou uma possível sobrecarga no mecanismo de transporte de cálcio e magnésio ao longo de todo o período de incubação. O padrão intermitente de 6 horas diárias pode ter influenciado a função MCA de forma diferente da temperatura constante, aumentando a capacidade do embrião de utilizar os nutrientes da casca sem comprometer sua integridade.

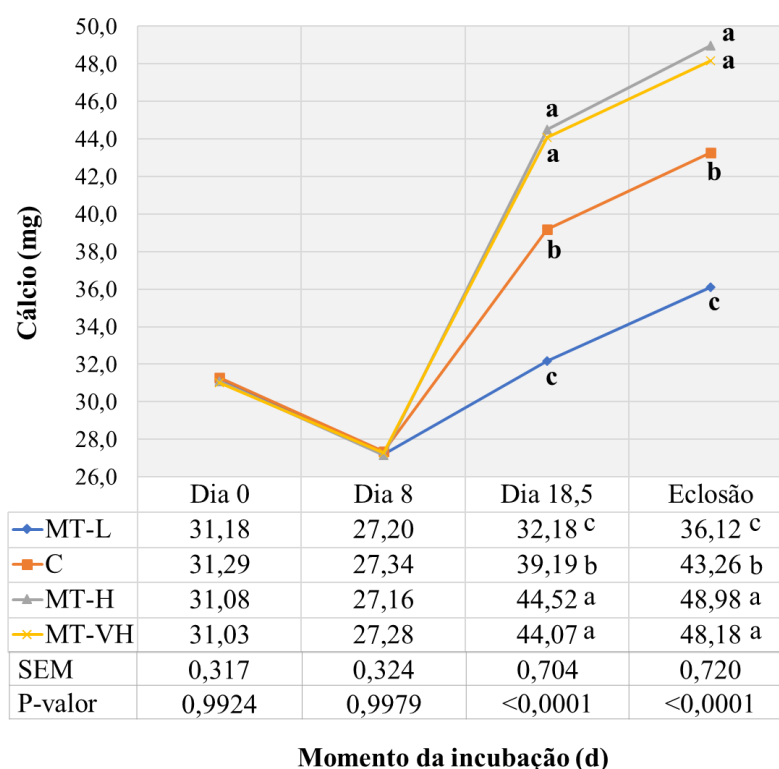
Estudos, como o de Lin *et al.* (2017), demonstraram que a elevação da temperatura no início da incubação (38,1°C até o 5º dia) pode aumentar a vascularização da MCA e da Membrana Serosa Vitelínica (MSV). Embora a temperatura utilizada nesse estudo tenha sido ligeiramente superior ao padrão e aplicada no início da incubação, os resultados indicam que a temperatura tem um impacto significativo sobre esses anexos embrionários. Adicionalmente, Barri *et al.* (2011) identificaram uma redução na expressão de mRNA de transportadores de nutrientes na primeira semana pós-eclosão, após incubar ovos a 39,6°C a partir do 13º dia. Considerando que a MSV também expressa transportadores de nutrientes e enzimas digestivas (Yair; Uni, 2011; Yadgary *et al.*, 2014), é possível que a elevação da temperatura afete a expressão genética dessas membranas, comprometendo sua capacidade de utilizar os nutrientes da casca e da gema. No entanto, essa hipótese ainda carece de maior investigação, uma vez que nem todos os genes envolvidos foram identificados (Gabrielli; Accili, 2010).

#### 4.2.2 Minerais da gema

As Figuras 14 a 17 apresentam os resultados dos minerais na gema do ovo ao longo da incubação, evidenciando padrões distintos de alteração entre os tratamentos.

O cálcio mostrou variações significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos, com MT-L apresentando os menores teores nos dias 18,5 e na eclosão, enquanto os grupos MT-H e MT-VH apresentaram os maiores teores em comparação ao controle e MT-L (Figura 14). Esse padrão indica que o cálcio foi mais mobilizado da casca para a gema nos tratamentos de altas temperaturas (MT-H e MT-VH), refletindo maior eficiência no transporte de Ca da casca para o embrião.

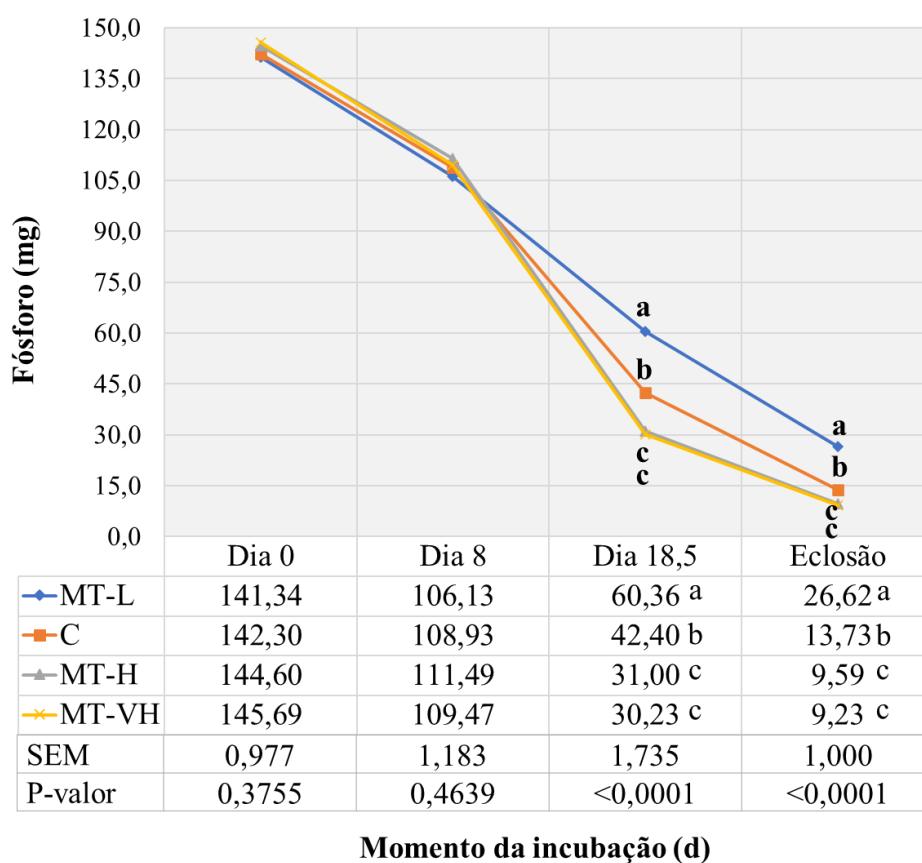
Figura 14 – Teor de cálcio da gema (mg) ao longo da incubação em TCO controle (C), ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO, do 8º ao 18,5º dia.



<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). C= controle (37,8°C - sem manipulação térmica); MT-L= Manipulação térmica a 36,7°C; MT-H= Manipulação térmica a 38,9°C; MT-VH: Manipulação térmica a 39,4°C. TCO = temperatura da casca do ovo; SEM: erro padrão da média. n=56.

A análise do teor de fósforo revelou variações significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos térmicos e o grupo controle (Figura 15). Observamos uma maior mobilização nos tratamentos de manipulação da TCO alta e muito alta (MT-H e MT-VH) mostrando as maiores reduções do fósforo na gema, evidenciando maior absorção desse mineral pelo embrião. Já o grupo MT-L teve a menor redução de fósforo, sugerindo que temperaturas mais baixas podem retardar a mobilização de P.

Figura 15 – Teor de fósforo da gema (mg) ao longo da incubação em TCO controle (C), ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO, do 8º ao 18,5º dia.

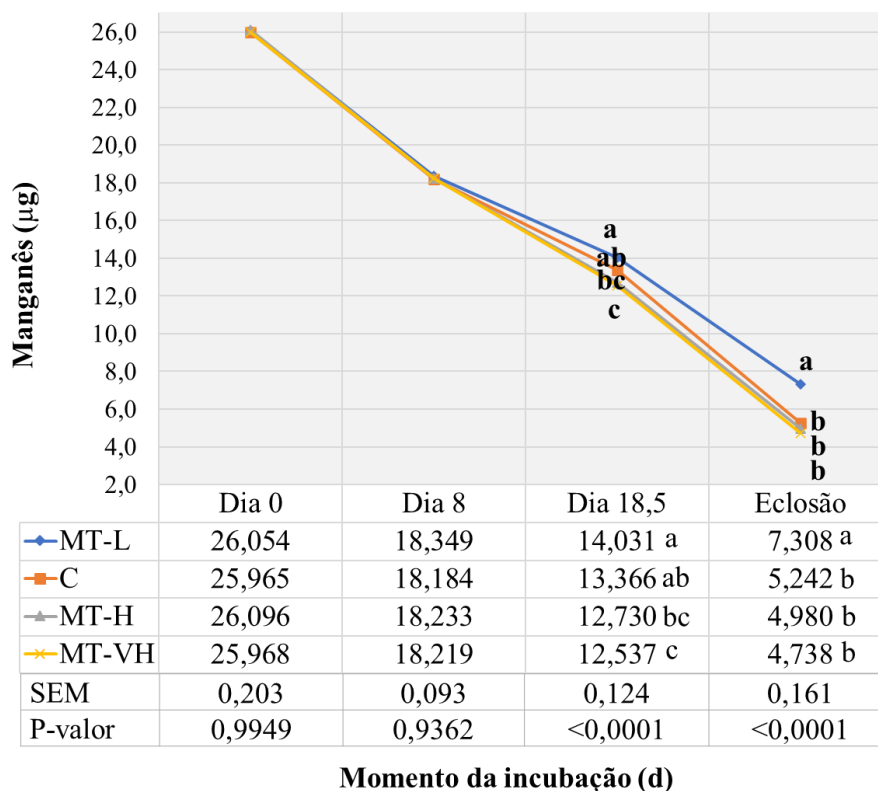


<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).  
 C= controle (37,8°C - sem manipulação térmica); MT-L= Manipulação térmica a 36,7°C; MT-H= Manipulação térmica a 38,9°C; MT-VH: Manipulação térmica a 39,4°C.  
 TCO = temperatura da casca do ovo; SEM: erro padrão da média. n=56.



O manganês (Mn) seguiu um padrão semelhante fósforo, com MT-H e MT-VH resultando em maiores reduções de Mn na gema, enquanto MT-L manteve os teores mais elevados até a eclosão.

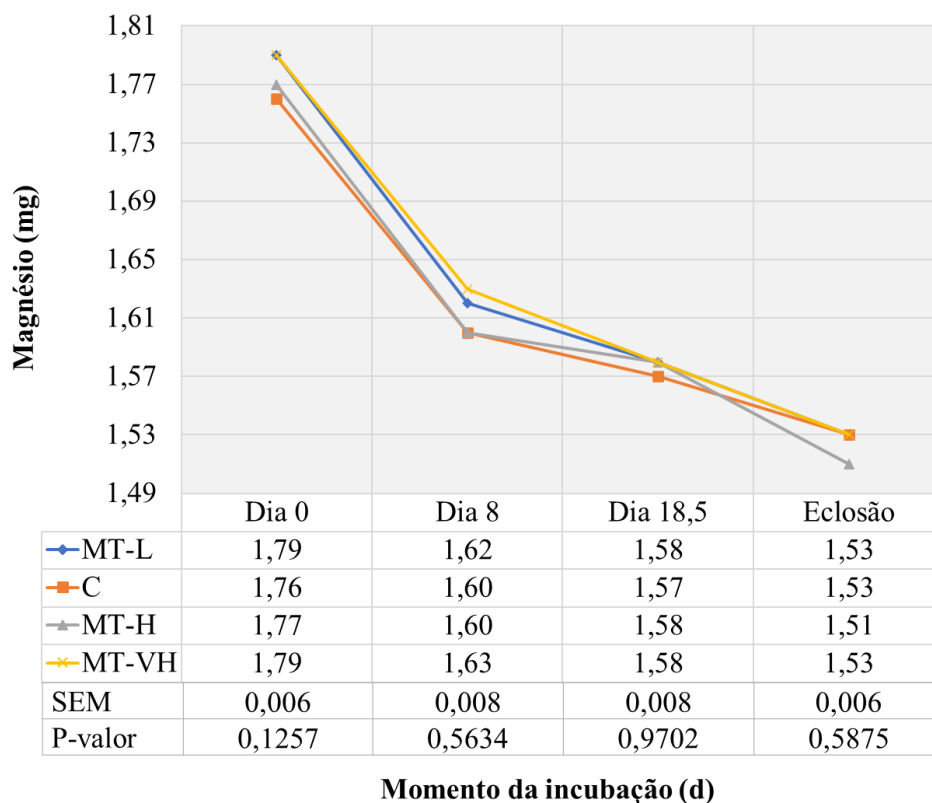
Figura 16 – Teor de manganês da gema ( $\mu\text{g}$ ) ao longo da incubação em TCO controle (C), ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO, do 8° ao 18,5° dia.



<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). C= controle (37,8°C - sem manipulação térmica); MT-L= Manipulação térmica a 36,7°C; MT-H= Manipulação térmica a 38,9°C; MT-VH: Manipulação térmica a 39,4°C. TCO = temperatura da casca do ovo; SEM: erro padrão da média. n=56

No caso do magnésio (Figura 17), os resultados mostraram uma redução ao longo da incubação em todos os grupos, mas sem diferenças significativas entre os tratamentos. Isso indica que a manipulação da TCO teve um impacto menor na mobilização deste mineral. O magnésio, diferentemente de cálcio, fósforo e manganês, é mobilizado principalmente a partir casca posteriormente ficando disponível para o embrião (Richards; Steele, 1987).

Figura 17 – Teor de magnésio da gema (mg) ao longo da incubação em TCO controle (C), ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO, do 8° ao 18,5° dia.



C= controle (37,8°C - sem manipulação térmica); MT-L= Manipulação térmica a 36,7°C; MT-H= Manipulação térmica a 38,9°C; MT-VH: Manipulação térmica a 39,4°C. TCO = temperatura da casca do ovo; SEM: erro padrão da média. n=56.

Esses resultados se alinham parcialmente com a literatura. Enquanto Oliveira *et al.* (2015) e Halgrain *et al.* (2022) descrevem o aumento do cálcio na gema após o início da mobilização da casca via membrana cório-alantóide, nossos achados indicam que temperaturas mais altas intermitentes intensificam essa mobilização. Por outro lado, a maior eficiência na mobilização de fósforo e manganês em temperaturas mais altas também é consistente com estudos que mostram uma maior demanda metabólica sob essas condições (Yair *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2014).

A manipulação térmica durante a incubação exerce influência significativa sobre o teor de minerais na gema e, conseqüentemente, sobre o desenvolvimento embrionário dos pintos. Durante a incubação, o embrião depende dos minerais da gema para seu

crescimento, sendo que cálcio, fósforo, manganês e magnésio são cruciais para o desenvolvimento ósseo e outras funções fisiológicas (Richards, 1997; Tona *et al.*, 2004; Uni *et al.*, 2005; Yair; Uni, 2011).

Os resultados indicam que o cálcio na gema segue um padrão bifásico: uma redução inicial até o 8º dia de incubação, seguida de aumento a partir daí, especialmente no controle e nos tratamentos de altas temperaturas (MT-H e MT-VH). Assim, no início, o embrião utiliza o cálcio da gema, enquanto o cálcio da casca é mobilizado posteriormente, após o desenvolvimento da membrana cório-alantóide (MCA). Nos tratamentos de altas temperaturas, o aumento do cálcio na gema ao final da incubação demonstra aumento na eficiência da extração de cálcio da casca e deposição na gema, o que eleva sua disponibilidade para a mineralização óssea (Oliveira *et al.*, 2015; Hopcroft *et al.*, 2019; Halgrain *et al.*, 2022).

O fósforo e o manganês, minerais fornecidos quase exclusivamente pela gema (Yair; Uni, 2011; Yair *et al.*, 2015), diminuíram significativamente ao longo da incubação em todos os tratamentos. A redução no controle está de acordo com a mobilização desses minerais para o embrião. Contudo, as altas temperaturas (MT-H e MT-VH) aceleraram essa mobilização, sugerindo maior demanda ou alterações no metabolismo mineral sob temperaturas elevadas (Li *et al.*, 2014; Yair *et al.*, 2015).

Por outro lado, o magnésio também diminuiu, mas não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, mostrando que a manipulação térmica teve um impacto menor na mobilização deste mineral em comparação aos outros analisados. O magnésio presente na casca do ovo, embora em menores quantidades quando comparado ao cálcio, é mobilizado para o embrião durante a incubação. Isso ocorre principalmente a partir do 8º dia de incubação, quando a membrana córioalantóide amadurece e começa a absorver os minerais da casca (Richards; Steele, 1987).

As variações observadas em diferentes estudos reforçam o impacto da temperatura de incubação sobre a eficiência de uso dos nutrientes da gema pelo embrião, o que, por sua vez, influencia diretamente o crescimento e desenvolvimento dos pintos (Moraes *et al.*, 2004; Vieira; Moran, 1998; Uni; Ferket, 2004; Oviedo-Rondón *et al.*, 2008; Yalçın *et al.*, 2012; Azevedo, 2022).

Em nosso estudo, a utilização dos nutrientes da gema está estreitamente relacionada à taxa metabólica do embrião e à composição da gema residual na eclosão

(Nangsuay *et al.*, 2013). A maior mobilização de minerais da gema observada nos grupos submetidos a temperaturas elevadas (MT-H e MT-VH), e em menor grau no grupo de temperatura baixa (MT-L), pode ser explicada pelos mesmos mecanismos que influenciaram os valores de YFBM (Figura 5) e a quantidade de gema residual (Figura 7). Os grupos MT-H e MT-VH demonstraram eficiência na conversão dos nutrientes da gema em YFBM, com pintos apresentando menores valores de gema residual na eclosão, em comparação com o grupo MT-L.

Azevedo (2022) observou que, sob temperaturas de incubação elevadas (TCO acima de 38,9°C, entre o 8º e o 18,5º dia de incubação), houve uma menor extração de cálcio da casca, resultando em menores níveis de cálcio na gema, o que contrasta com os resultados deste estudo. Além disso, Azevedo relatou uma maior retenção de fósforo e manganês na gema residual, indicando menor absorção desses minerais pelo embrião. No entanto, em nossos resultados, as temperaturas mais altas favoreceram a mobilização de fósforo e manganês para o embrião.

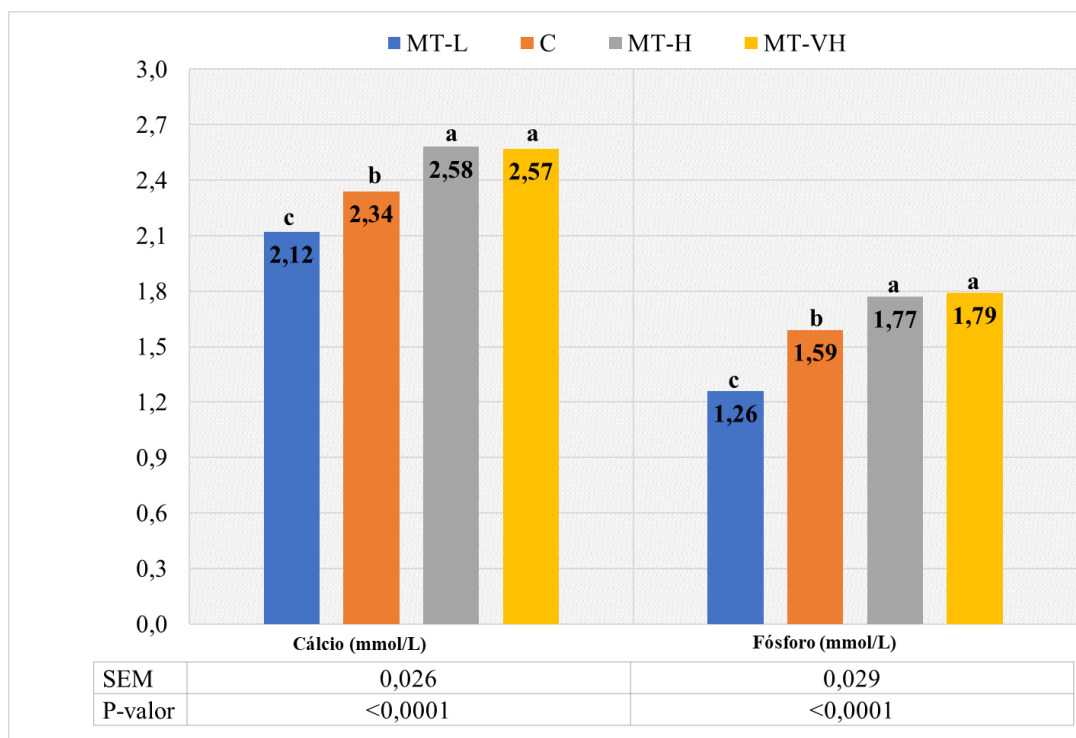
Essas diferenças podem ser atribuídas às variações na taxa metabólica do embrião e na eficiência de utilização dos nutrientes da gema, que são diretamente influenciadas pelo tempo e tipo de tratamento térmico aplicado. Enquanto Azevedo utilizou um regime de TCO constante, neste estudo foi aplicada uma manipulação térmica intermitente, o que pode ter contribuído para uma maior eficiência na mobilização de minerais.

### **4.3 Parâmetros sanguíneos**

#### **4.3.1 Cálcio e fósforo**

As Figuras 18 a 21 mostram os resultados das análises sanguíneas realizadas em embriões e pintos. A concentração de minerais no sangue (Figura 18) foi significativamente alterada pelos tratamentos térmicos.

Figura 18 – Teores sanguíneos de cálcio e fósforo (mmol/L) de pintos de um dia submetidos à incubação em TCO controle (C), ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO, do 8º ao 18,5º dia.



<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

C= controle (37,8°C - sem manipulação térmica); MT-L= Manipulação térmica a 36,7°C; MT-H= Manipulação térmica a 38,9°C; MT-VH: Manipulação térmica a 39,4°C.

TCO = temperatura da casca do ovo; SEM: erro padrão da média. n=56.

Tanto os níveis de cálcio quanto de fósforo foram menores ( $p \leq 0,05$ ) nos pintos de um dia que passaram pela manipulação da TCO com temperatura baixa (MT-L). Em contraste, os níveis de cálcio e fósforo foram significativamente maiores ( $p \leq 0,05$ ) nos grupos submetidos às temperaturas elevadas (MT-H e MT-VH).

O tratamento MT-L apresentou uma redução de 9,4% no teor de cálcio em comparação ao controle, enquanto os tratamentos MT-H e MT-VH resultaram em aumentos de 10,26% e 9,83%, respectivamente. Quanto ao fósforo, o tratamento MT-L apresentou uma queda de 20,75% em relação ao controle, enquanto os tratamentos MT-

H e MT-VH resultaram em aumentos de 11,32% e 12,58%, respectivamente, em comparação ao grupo controle.

Esses resultados indicam que a manipulação térmica durante a incubação exerce um impacto significativo sobre os níveis de cálcio e fósforo no sangue dos pintos de um dia. Isso pode estar associado ao efeito da temperatura na mobilização de minerais da casca do ovo, onde a manipulação intermitente com temperaturas mais altas aumentaram a atividade metabólica do embrião, facilitando a transferência de cálcio e fósforo para o mesmo, resultando em maior teor desses minerais no sangue. Enquanto que o tratamento MT-L manteve o conteúdo de cálcio e na gema e diminuiu o YFBM.

No caso do tratamento MT-L, a menor mobilização de cálcio e fósforo pode ser explicada da mesma forma pela redução da taxa metabólica dos embriões, levando a uma menor demanda por esses minerais, o que resulta em teores mais baixos no sangue. Essa hipótese é apoiada por estudos que relataram que a diminuição da temperatura durante a incubação pode retardar o desenvolvimento embrionário e a mobilização de minerais essenciais (Muir; Groves, 2019; Yahav *et al.*, 2004).

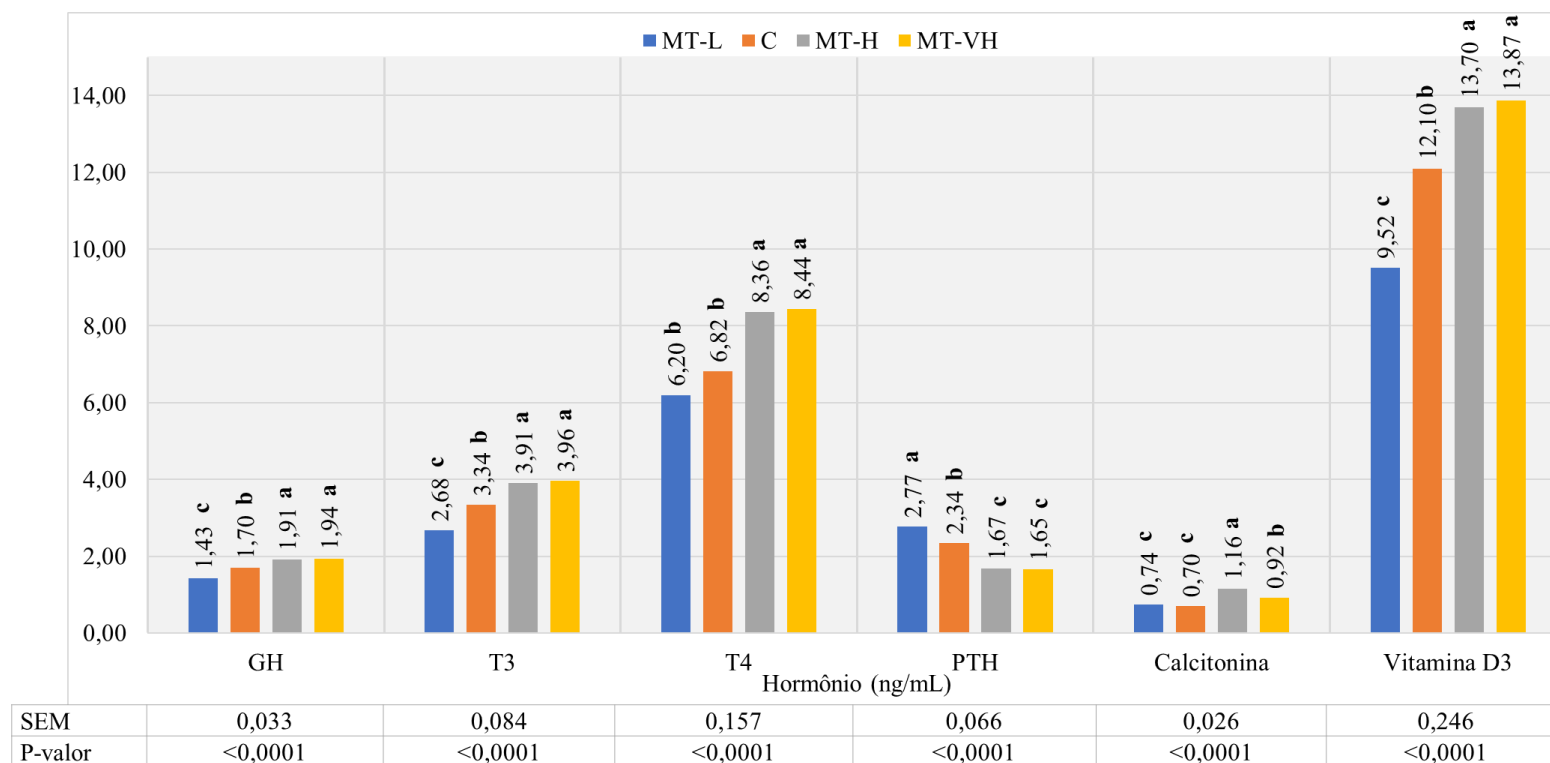
Em contraste, utilizando manipulação da TCO constante, Azevedo (2022) observaram uma reação em cadeia, onde em TCO alta e muito alta (38,9° e 39,4°C, entre o 8° e 18,5° dia de incubação) a mobilização de cálcio da casca foi menor, fazendo com que menor quantidade chegasse à gema e, conseqüentemente, teores mais baixos chegaram ao sangue.

Esses achados estão em consonância com a literatura, que destaca a importância desses minerais na mineralização óssea e na formação do esqueleto durante a incubação (Uni; Ferket, 2004; Oliveira *et al.*, 2015).

#### **4.3.2 Hormônios**

Os protocolos de manipulação da TCO, aplicados entre os dias 8 e 18 de incubação, impactaram significativamente todos os hormônios sanguíneos avaliados em pintos de um dia (Figura 19).

Figura 19 – Teores sanguíneos de GH, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, PTH calcitonina e vitamina D<sub>3</sub> (ng/mL) de pintos de um dia submetidos à incubação em TCO controle (C), ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO, do 8° ao 18,5° dia.



<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

C= controle (37,8°C - sem manipulação térmica); MT-L= Manipulação térmica a 36,7°C; MT-H= Manipulação térmica a 38,9°C; MT-VH: Manipulação térmica a 39,4°C. TCO = temperatura da casca do ovo; SEM: erro padrão da média. n=56.

Em relação ao hormônio de crescimento (GH), o grupo controle apresentou um nível de 1,70 ng/mL. O tratamento MT-L resultou em uma redução significativa ( $p \leq 0,05$ ), atingindo 1,43 ng/mL, representando uma queda de 15,88% em comparação aos demais tratamentos. Em contrapartida, os tratamentos MT-H e MT-VH apresentaram níveis significativamente superior de GH, com valores de 1,91 ng/mL e 1,94 ng/mL, respectivamente, que foram semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ).

Para o hormônio  $T_3$ , o tratamento MT-L também resultou em uma redução significativa ( $p \leq 0,05$ ), com uma queda de 19,76% em relação aos outros tratamentos. Em contraste, os tratamentos MT-H e MT-VH exibiram aumentos significativos ( $p \leq 0,05$ ), alcançando valores de 3,91 ng/mL e 3,96 ng/mL, respectivamente, sendo ambos semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ).

Os níveis de  $T_4$  foram influenciados apenas pelos tratamentos térmicos com calor (MT-H e MT-VH), que apresentaram valores significativamente maiores ( $p \leq 0,05$ ) em comparação ao controle e ao MT-L, que foram semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ).

O paratormônio (PTH) apresentou uma redução significativa ( $p \leq 0,05$ ) nos tratamentos MT-H e MT-VH. Em contraste, o tratamento MT-L resultou em um aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) de 18,38% nos níveis de PTH em relação aos demais tratamentos.

A calcitonina teve aumentos significativos ( $p \leq 0,05$ ) nos tratamentos MT-H e MT-VH, enquanto que o tratamento MT-L, não mostrou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação ao controle.

Por fim, os níveis de vitamina  $D_3$  no grupo MT-L foram significativamente menores ( $p \leq 0,05$ ) que no controle. Já os tratamentos MT-H e MT-VH apresentaram aumentos significativos ( $p \leq 0,05$ ), sendo semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ).

A manipulação térmica durante a incubação impactou diretamente os níveis hormonais dos pintos de um dia. A redução observada no tratamento MT-L pode estar associada à diminuição da atividade metabólica, resultado de uma temperatura mais baixa, o que está de acordo com a literatura que propõem que a temperatura influencia a secreção de GH e o crescimento das aves (Yahav; Hurwitz, 1996; Tzschentke; Plagemann, 2006). Em contrapartida, os aumentos nos níveis de GH nos tratamentos MT-H e MT-VH indicam que temperaturas mais elevadas estimulam a produção de GH, promovendo um ambiente metabólico mais ativo, essencial para o crescimento e desenvolvimento embrionário. Esse hormônio, ao ser estimulado pelo  $T_3$ , também induz



a síntese de IGF-I, crucial para a proliferação de condrócitos e osteoblastos, reforçando seu papel no crescimento ósseo (Robson *et al.*, 2002; Willemsen *et al.*, 2011).

O T<sub>3</sub>, fundamental para a termogênese e o metabolismo basal, apresentou níveis reduzidos no tratamento MT-L, refletindo uma menor demanda metabólica em temperaturas mais baixas (Nichelmann; Tzschentke, 2003; Yahav *et al.*, 2004). Esses hormônios são essenciais para o desenvolvimento ósseo, particularmente na hipertrofia de condrócitos e na formação da placa de crescimento (Hunziker *et al.*, 1994; Güz *et al.*, 2020). Os aumentos de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> nos tratamentos MT-H e MT-VH estão alinhados com estudos que demonstram que temperaturas mais altas durante a incubação aceleram o metabolismo embrionário, aumentando a demanda por hormônios tireoidianos (Molenaar *et al.*, 2010; Yalçın *et al.*, 2008a).

No entanto, há divergências na literatura sobre os níveis de T<sub>3</sub> plasmático em embriões aclimatados ao calor. Enquanto Moraes *et al.* (2004) não observaram mudanças nos níveis de T<sub>3</sub> após a aclimação ao calor, Yahav *et al.* (2004a) relataram níveis mais baixos de T<sub>3</sub> em ovos incubados a 38,5°C por 3 horas diárias. No presente estudo, os níveis elevados de T<sub>3</sub> nos tratamentos MT-H e MT-VH indicam uma menor captação celular desse hormônio, resultando em maiores concentrações plasmáticas, possivelmente devido à inibição da expressão da enzima desidrase tipo 3 (D<sub>3</sub>), que regula os níveis de T<sub>3</sub> no plasma (Darras *et al.*, 2000).

Em contraste, Yalçın *et al.* (2008) não observaram diferenças significativas nos níveis de T<sub>4</sub> em pintos submetidos à manipulação térmica, sugerindo que a conversão de T<sub>4</sub> em T<sub>3</sub> pode ter ocorrido mais rapidamente nos embriões aclimatados ao calor, o que explicaria a ausência de diferenças entre os tratamentos. Estudos adicionais, como o de Yalçın *et al.* (2012), indicam que temperaturas mais baixas resultam em reduções nos hormônios tireoidianos, o que é atribuído à diminuição proporcional da taxa metabólica.

A resposta dos níveis de PTH e calcitonina às variações térmicas foi inversa. O aumento do PTH no tratamento MT-L está relacionado à menor mobilização de cálcio, causada pela menor atividade metabólica em baixas temperaturas (Moe, 2008; Chen *et al.*, 2021). Nos tratamentos MT-H e MT-VH, a redução do PTH e o aumento da calcitonina indicam uma maior eficiência no uso do cálcio, reduzindo a necessidade de regulação hormonal (Furlan; Macari, 2002; Decuyper; Michels, 1992).

A vitamina D<sub>3</sub>, fundamental para a regulação do cálcio e fósforo, apresentou redução significativa no tratamento MT-L, possivelmente devido à menor absorção de cálcio em condições de baixa temperatura (Muir; Groves, 2019). Já os aumentos observados nos tratamentos MT-H e MT-VH mostram que temperaturas mais elevadas favorecem a conversão da vitamina D<sub>3</sub> para sua forma ativa, otimizando a absorção de cálcio e promovendo o desenvolvimento ósseo (Uni; Ferket, 2004).

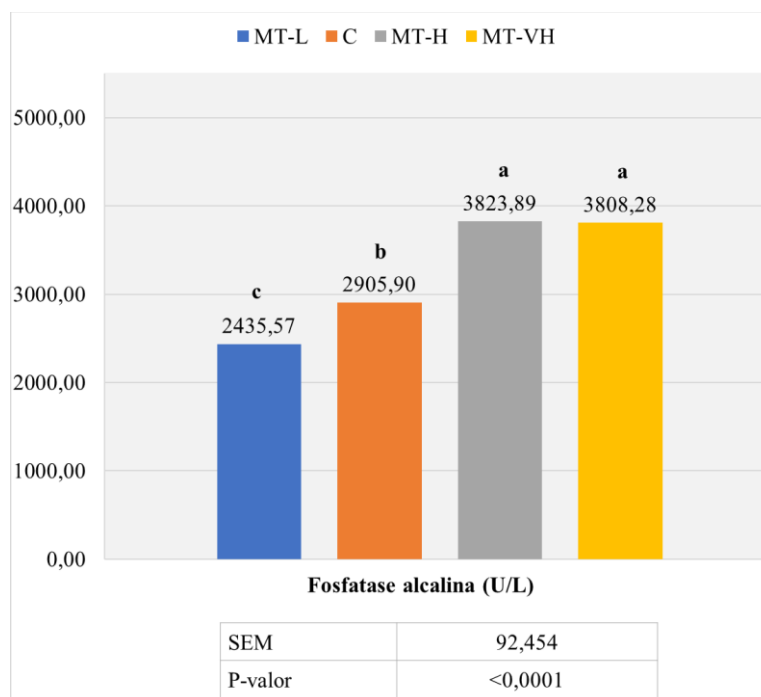
Esses achados indicam que a manipulação térmica durante a incubação afeta significativamente os níveis hormonais, influenciando o desenvolvimento embrionário e a capacidade dos pintos de lidar com o estresse térmico e com o ambiente após a eclosão. A literatura reforça o potencial da manipulação térmica como uma ferramenta eficaz para otimizar o desenvolvimento fisiológico e o desempenho dos frangos de corte, desde que aplicada de maneira controlada (Tzschentke; Halle, 2009; Piestun *et al.*, 2009; Azevedo *et al.*, 2022)

#### **4.3.3 Fosfatase Alcalina**

Os resultados da Figura 20 indicam que a manipulação térmica durante a incubação teve um impacto significativo nos níveis de fosfatase alcalina (FA) no sangue dos pintos ao nascimento.

O grupo submetido à manipulação térmica em baixa temperatura (MT-L) apresentou níveis de FA significativamente menores (2435,57 U/L) ( $p \leq 0,05$ ) em comparação aos outros tratamentos. Por outro lado, os tratamentos com temperaturas mais elevadas (MT-H e MT-VH) resultaram em aumentos significativos ( $p \leq 0,05$ ) nos níveis de FA em relação ao controle e ao MT-L, sendo esses dois tratamentos estatisticamente semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ).

Figura 20 – Teor sanguíneo de fosfatase alcalina (U/L) de pintos de um dia submetidos à incubação em TCO controle (C), ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO, do 8° ao 18,5° dia.



<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

C= controle (37,8°C - sem manipulação térmica); MT-L= Manipulação térmica a 36,7°C; MT-H= Manipulação térmica a 38,9°C; MT-VH: Manipulação térmica a 39,4°C.

TCO = temperatura da casca do ovo; SEM: erro padrão da média. n=56.

A FA é uma enzima fundamental no metabolismo ósseo, desempenhando um papel crucial na mineralização, facilitando a deposição de cálcio e fósforo nos ossos (Pizauro Júnior *et al.*, 2002; Moraes *et al.*, 2004). Nos pintos expostos à manipulação térmica em baixa temperatura (MT-L), observou-se uma redução significativa nos níveis de FA, o que pode estar associado a uma menor atividade osteogênica e à mobilização de minerais, resultando em uma mineralização óssea menos eficiente. A redução de 16,19% em relação ao controle evidencia que ambientes térmicos mais frios retardam o desenvolvimento esquelético e a deposição de cálcio e fósforo nos ossos (Tzschentke; Plagemann, 2006; Yahav *et al.*, 2004), como será visto a seguir.

Em contraste, os tratamentos com manipulações em temperaturas elevadas (MT-H e MT-VH) apresentaram aumentos expressivos nos níveis de FA, com elevações de

31,59% e 31,05%, respectivamente, em comparação ao controle. Esses resultados apontam que a manipulação térmica com calor estimulou uma maior atividade osteogênica, acelerando a mineralização óssea e o desenvolvimento do sistema esquelético dos pintos. O aumento da FA nesses tratamentos está de acordo com estudos que indicam que temperaturas mais altas durante a incubação aumentam a taxa metabólica embrionária e, conseqüentemente, a demanda por minerais como cálcio e fósforo, essenciais para o crescimento ósseo (Molenaar *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2015).

A FA também é um biomarcador da diferenciação de células osteoblásticas e do processo de mineralização óssea (Vasconcelos *et al.*, 2011). Portanto, os níveis elevados de FA nos tratamentos térmicos de alta temperatura (MT-H e MT-VH) podem refletir uma maior proliferação e diferenciação de células osteoblásticas, acarretando um ambiente mais favorável ao desenvolvimento ósseo. Isso pode beneficiar a resistência óssea dos pintos nos primeiros dias de vida, como observado em estudos que relacionam o aumento da temperatura de incubação com a aceleração da maturação esquelética (Tona *et al.*, 2003).

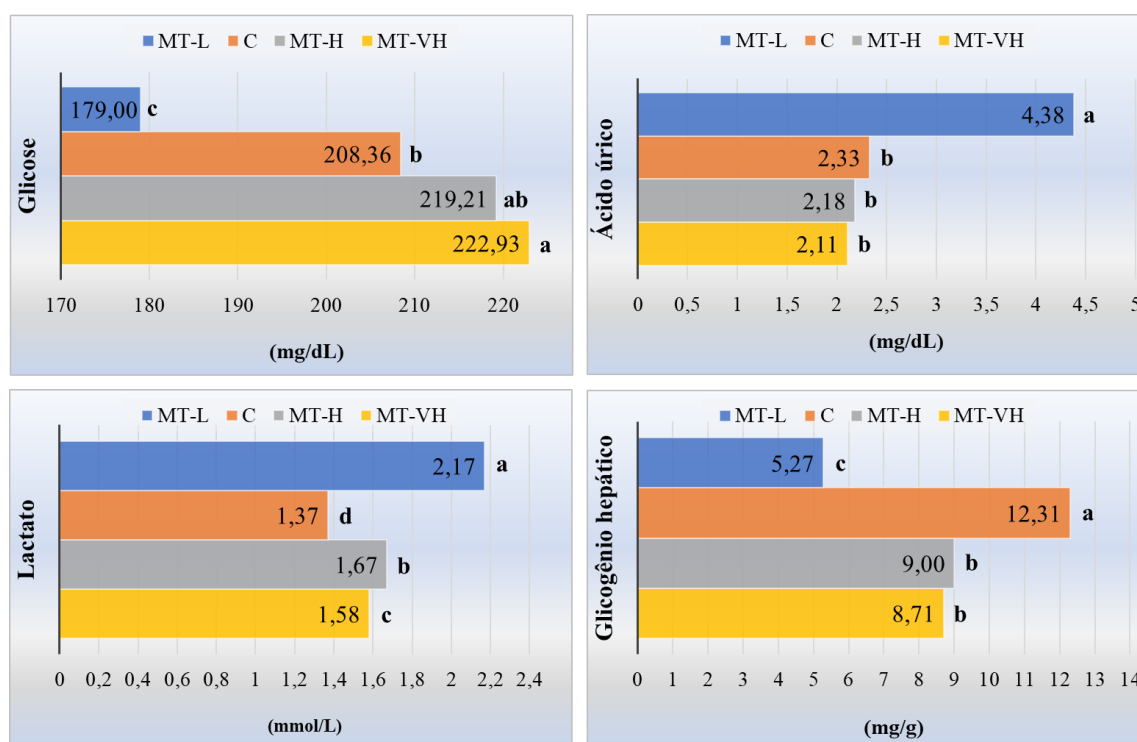
No estudo de Azevedo (2022), somente a temperatura constante de 39,4°C (entre o 8º e o 18º dia de incubação) resultou em um aumento na atividade da fosfatase alcalina (FA) no sangue de pintos recém-eclodidos, enquanto as temperaturas de 38,9°C e 36,7°C não diferiram significativamente do controle. Porém, esse aumento da FA não se traduziu em uma melhora na mineralização óssea. A autora sugeriu que, em temperaturas muito elevadas (39,4°C), algum fator ainda não esclarecido pode ter impedido a ação adequada da enzima. O aumento da atividade de FA no sangue pode ser um indicativo de possível dano hepático, permitindo a liberação da enzima no sangue (Basuony *et al.*, 2020), embora Azevedo não tenha encontrado evidências de danos significativos ao fígado. Medir a atividade da FA diretamente no osso ou na placa de crescimento (Yalçın *et al.*, 2007; Oznurlu *et al.*, 2016) seria uma abordagem pertinente, mas essa análise não foi realizada no estudo.

Em nosso estudo, o aumento da atividade de FA em pintos de um dia tratados com manipulações térmicas de calor (MT-H e MT-VH) está de acordo com a maior mineralização da tíbia e fêmur observados nas Tabelas 5 e 6. Neste caso, a elevação da FA reflete uma maior atividade osteogênica, acompanhada por melhor mineralização óssea.

#### 4.3.4 Glicose, lactato, ácido úrico e glicogênio hepático

A Figura 21 apresenta os níveis sanguíneos de glicose (mg/dL), lactato (mmol/L), ácido úrico (mg/dL) e glicogênio hepático (mg/g) em pintos de um dia, submetidos a diferentes protocolos de manipulação térmica entre o 8º e o 18,5º dia de incubação.

Figura 21 – Teores sanguíneos de glicose (mg/dL), lactato (mmol/L), ácido úrico (mg/dL) e glicogênio hepático (mg/g) de pintos de um dia incubados em TCO controle (37,8°C), ou incubação com manipulação térmica baixa (36,7°C), alta (38,9°C) e muito alta (39,4°C) TCO, do 8º ao 18,5º dia.



	Glicose	Lactato	Ácido úrico	Glicogênio hepático
SEM	2,730	0,041	0,149	0,349
P-valor	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

<sup>a,b</sup> Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

C= controle (37,8°C - sem manipulação térmica); MT-L= Manipulação térmica a 36,7°C; MT-H= Manipulação térmica a 38,9°C; MT-VH: Manipulação térmica a 39,4°C.

TCO = temperatura da casca do ovo; SEM: erro padrão da média. n=56

O grupo controle apresentou um nível de glicose de 208,36 mg/dL, enquanto o grupo MT-L exibiu o menor nível, com 179,00 mg/dL, uma redução de 14,09% em relação ao controle, sendo significativamente inferior aos demais grupos ( $p \leq 0,05$ ). O grupo MT-H teve níveis de glicose semelhantes ao controle ( $p > 0,05$ ), enquanto o MT-VH apresentou um aumento de 6,99% em relação ao controle, com níveis significativamente superior ao grupo MT-L e ao controle ( $p \leq 0,05$ ).

Os níveis de lactato sanguíneo também variaram entre os tratamentos. O grupo MT-L exibiu o maior nível, com 2,17 mmol/L, um aumento de 58,39% em relação ao controle ( $p \leq 0,05$ ). O grupo MT-H teve o segundo maior nível, com 1,67 mmol/L, representando um aumento de 21,90% ( $p \leq 0,05$ ). O grupo MT-VH apresentou um aumento de 15,33% em relação ao controle, com 1,58 mmol/L ( $p \leq 0,05$ ), enquanto o menor nível foi observado no grupo controle, com 1,37 mmol/L.

Esses resultados contrastam com os achados de Silva *et al.* (2019), que observaram maiores concentrações de lactato e menores concentrações de glicose em pintos submetidos à manipulação térmica com TCO a 38,9°C, sugerindo que a elevação da taxa metabólica induzida pela temperatura elevada leva a uma maior mobilização de glicose para energia imediata. Anos antes, Yalçın *et al.* (2008a) observaram menores níveis de glicose em pintos submetidos a manipulação térmica a 38,5°C por 6 horas diárias entre o 10º e 18,5º dia de incubação. Eles explicaram que o aumento da taxa metabólica refletiu em maiores concentrações do hormônio T<sub>3</sub> no sangue desses animais.

A concentração de ácido úrico foi significativamente maior no tratamento MT-L, com 4,38 mg/dL, representando um aumento de 87,98% em relação ao controle. Os tratamentos MT-H, MT-VH e o controle não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ), com valores de 2,18 mg/dL, 2,11 mg/dL e 2,33 mg/dL, respectivamente.

O glicogênio hepático também foi impactado pelos tratamentos térmicos. O grupo controle apresentou o nível mais alto, com 12,31 mg/g, enquanto o grupo MT-L teve o menor nível, com 5,27 mg/g, uma redução de 57,19% em relação ao controle ( $p \leq 0,05$ ). Os grupos MT-H e MT-VH apresentaram níveis de 9,00 mg/g e 8,71 mg/g, respectivamente, correspondendo a reduções de 26,89% e 29,24% em relação ao controle. Embora os dois grupos tenham sido estatisticamente semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ), ambos foram significativamente superiores ao grupo MT-L ( $p \leq 0,05$ ).

A redução nos níveis de  $T_3$  e  $T_4$  no grupo MT-L (Figura 19) pode ter reduzido a taxa de oxidação de oxigênio, aumentando a glicólise anaeróbica. Oliveira *et al.* (2013) destacam que a intensificação da glicólise anaeróbica durante a eclosão gera um acúmulo de lactato, que persiste até que o embrião tenha oxigênio suficiente para retomar o metabolismo aeróbico.

O comportamento metabólico em relação à glicose também sustenta essa hipótese. O grupo MT-L apresentou o menor nível de glicose plasmática, sugerindo que a baixa temperatura restringiu a oxidação de glicose, forçando os embriões a recorrer à glicólise anaeróbica para suprir as necessidades energéticas (Moran, 2007).

Nos grupos submetidos a temperaturas mais elevadas (MT-H e MT-VH), os níveis de glicogênio hepático foram menores que os do controle, mas significativamente maiores que os do grupo MT-L. Isso está de acordo com Maatjens *et al.* (2014b), que concluíram que altas temperaturas da casca aumentam a utilização de glicose para obtenção de energia imediata, desviando parte da glicose que seria destinada à síntese de glicogênio. Molenaar *et al.* (2010) e Silva *et al.* (2018) também relataram que a exposição a altas temperaturas acelera a oxidação de glicose, levando a um menor acúmulo de glicogênio hepático.

Esses achados reforçam a importância de uma manipulação térmica adequada durante a incubação para otimizar o metabolismo energético dos pintos. Enquanto a baixa temperatura (MT-L) promove o metabolismo anaeróbico e o catabolismo proteico devido à limitação de oxigênio, as temperaturas mais elevadas (MT-H e MT-VH) favorecem a utilização eficiente da glicose e a preservação do glicogênio hepático, resultando em pintos com maior estabilidade energética durante a eclosão.

#### **4.3.5 Hemogasometria**

Os resultados da Tabela 4 mostram que as diferentes manipulações térmicas durante a incubação tiveram um impacto significativo nos parâmetros hemogasométricos dos pintos de um dia.

Tabela 4 - Parâmetros hemogasométricos de pintos de um dia submetidos à incubação em TCO controle (C), ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO, do 8º ao 18,5º dia.

Temperatura	pH	pCO <sub>2</sub>	pO <sub>2</sub>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	iCa	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>2</sub>	Hct	Hb
MT-L	7,36 <sup>a</sup>	42,24	28,93	131,79 <sup>b</sup>	4,39	1,18 <sup>b</sup>	23,77 <sup>a</sup>	37,64	16,93	5,43 <sup>b</sup>
C	7,17 <sup>b</sup>	45,39	24,71	137,64 <sup>a</sup>	4,04	1,36 <sup>a</sup>	20,91 <sup>b</sup>	45,93	17,86	6,07 <sup>ab</sup>
MT-H	7,21 <sup>b</sup>	46,81	26,21	137,57 <sup>a</sup>	4,09	1,36 <sup>a</sup>	21,66 <sup>ab</sup>	47,93	18,79	6,19 <sup>a</sup>
MT-VH	7,23 <sup>b</sup>	46,96	26,14	137,79 <sup>a</sup>	4,16	1,36 <sup>a</sup>	21,98 <sup>ab</sup>	48,07	18,57	6,29 <sup>a</sup>
SEM	0,014	0,770	0,732	0,505	0,063	0,014	0,313	1,862	0,304	0,107
P-valor	<0,0001	0,1049	0,2301	<0,0001	0,2142	<0,0001	0,0073	0,1526	0,1240	0,0162

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças estatísticas  $p \leq 0,05$ .

pH= potencial hidrogeniônico; pCO<sub>2</sub> = pressão parcial de CO<sub>2</sub>; pO<sub>2</sub> = pressão parcial de O<sub>2</sub>; Na<sup>+</sup>= sódio ionizado; K<sup>+</sup>= potássio ionizado; iCa= cálcio ionizado; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>= bicarbonato; SO<sub>2</sub> = saturação de oxigênio; Hct = hematócrito; Hb = hemoglobina.

C= controle (37,8°C - sem manipulação térmica); MT-L= Manipulação térmica a 36,7°C; MT-H= Manipulação térmica a 38,9°C; MT-VH: Manipulação térmica a 39,4°C.

TCO = temperatura da casca do ovo; SEM: erro padrão da média.

n=56.



Observamos diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos nos parâmetros pH,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{iCa}$ ,  $\text{HCO}_3^-$  e hemoglobina (Hb). Em contrapartida, os valores médios de  $\text{pCO}_2$ ,  $\text{pO}_2$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{SO}_2$  e hematócrito (Hct) não apresentaram diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos.

O pH foi significativamente maior ( $p \leq 0,05$ ) no grupo MT-L (7,36), enquanto os grupos controle, MT-H e MT-VH mostraram valores semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ), com pH de 7,17, 7,21 e 7,23, respectivamente. Os níveis de sódio ionizado ( $\text{Na}^+$ ) e cálcio ionizado ( $\text{iCa}$ ) foram significativamente menores no grupo MT-L em comparação aos demais tratamentos, que mantiveram valores semelhantes entre si.

O bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) apresentou valores significativamente maiores no grupo MT-L (23,77 mEq/L) em comparação ao controle (20,91 mEq/L). Já os grupos MT-H e MT-VH não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ), e também foram semelhantes ( $p > 0,05$ ) ao controle e ao MT-L.

A concentração de hemoglobina (Hb) foi estatisticamente semelhante entre o grupo MT-L (5,43 g/dL) e o controle (6,07 g/dL) ( $p > 0,05$ ). No entanto, os grupos MT-H e MT-VH apresentaram valores mais elevados de hemoglobina (6,19 g/dL e 6,29 g/dL, respectivamente), que, embora mais altos, foram estatisticamente semelhantes ao controle ( $p > 0,05$ ).

A hemogasometria reflete diretamente o estado fisiológico das aves e impacta o equilíbrio ácido-base do sangue, essencial para a manutenção das funções celulares (Yalçin *et al.*, 2008a; Lake *et al.*, 2020). Pequenas variações no pH sanguíneo podem desencadear mudanças drásticas nos processos orgânicos vitais, influenciando o metabolismo embrionário e a saúde dos pintos ao nascimento (Yalçin *et al.*, 2008a; Molenaar *et al.*, 2010).

No grupo MT-L, o aumento do pH demonstra uma possível alcalose metabólica ou respiratória, provavelmente resultante de uma menor produção de  $\text{CO}_2$ , já que a atividade metabólica dos embriões expostos a temperaturas mais baixas tende a ser reduzida (Furlan; Macari, 2002). A manutenção de um pH adequado é fundamental, uma vez que o desequilíbrio ácido-base pode comprometer a conformação das proteínas e a atividade enzimática (Burggren; Bautista, 2019). A variação de pH entre 7,17 e 7,36 observada nos diferentes tratamentos está dentro das faixas fisiológicas esperadas para aves (Furlan; Macari, 2002; Barbosa *et al.*, 2014), refletindo a capacidade do organismo

de tamponar essas alterações por meio dos sistemas de bicarbonato e hemoglobina (Everaert *et al.*, 2008).

O cálcio ionizado (iCa) no sangue, que representa a concentração de íons de cálcio livres no plasma, é uma forma fundamental desse mineral para várias funções fisiológicas. Nas aves, o cálcio no sangue circula em três formas: ligado a proteínas, complexado com ácidos orgânicos como o ácido láctico e pirúvico, ou em sua forma livre, ionizada. Este mineral é vital para a mineralização óssea e para o controle de várias funções celulares, como contração muscular, transmissão nervosa, atividades hormonais e coagulação sanguínea (Furlan; Macari, 2002).

Alterações no pH sanguíneo afetam diretamente a disponibilidade de cálcio ionizado. Um pH mais baixo (acidose) aumenta o cálcio difusível ao liberar o cálcio ligado a proteínas, enquanto um pH mais elevado (alcalose) reduz a quantidade de cálcio disponível. Além disso, a presença de lactato no sangue pode comprometer os níveis de cálcio ionizado, uma vez que o lactato pode se complexar com o cálcio, tornando-o indisponível para funções essenciais no organismo (Furlan ; Macari, 2002).

Em nosso estudo, foi observada uma redução no iCa no grupo MT-L, acompanhada por um aumento no pH sanguíneo e níveis elevados de lactato plasmático. A redução no iCa no grupo MT-L evidencia menor absorção de cálcio da casca, o que pode prejudicar a mineralização óssea (Uni *et al.*, 2004).

O sódio ( $\text{Na}^+$ ), também foi menor no grupo MT-L. O  $\text{Na}^+$  desempenha papel na manutenção da osmolaridade e no equilíbrio hídrico das células, e sua diminuição pode refletir uma menor capacidade de absorção de nutrientes, o que pode impactar o desenvolvimento embrionário (Furlan; Macari, 2002).

O aumento do bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) no grupo MT-L parece ser uma resposta compensatória ao pH elevado, sugerindo que o sistema tampão bicarbonato-ácido carbônico está atuando para minimizar a alcalose (Everaert *et al.*, 2008; Dibartola, 2000). Esse sistema tampão é essencial para minimizar as variações de pH no sangue, já que o  $\text{HCO}_3^-$  se liga aos íons  $\text{H}^+$  para formar  $\text{CO}_2$  e água, facilitando sua eliminação pelo sistema respiratório (Furlan; Macari, 2002).

A hemoglobina não só transporta oxigênio, como também atua como um tampão intracelular, ajudando a estabilizar o pH sanguíneo (Furlan; Macari, 2002). Essa variável,

nenhuma das manipulações térmicas diferiram do controle, mas o MT-H e MT-VH foram maiores que o MT-L.

A saturação de oxigênio ( $sO_2$ ), que reflete a quantidade de hemoglobina ligada ao oxigênio, é uma medida notável da eficiência da oxigenação dos tecidos (Wilson, 2013). Apesar dos valores de  $sO_2$  não terem apresentado diferenças significativas entre os grupos, o aumento da Hb sugere que os pintos submetidos a temperaturas mais altas podem ter uma maior capacidade de oxigenação do que os pintos do grupo MT-L, o que é essencial para sustentar o metabolismo elevado durante o desenvolvimento final do embrião (Tazawa; Whittow, 2000).

Embora a  $pCO_2$  e  $pO_2$  não tenham mostrado variações significativas, é interessante lembrar que essas variáveis são fortemente influenciadas pelas trocas gasosas durante a incubação. Aumentos no metabolismo embrionário, como ocorre nos estágios finais da incubação, elevam a produção de  $CO_2$ , podendo acidificar o sangue se o sistema tampão não atuar eficientemente (Tazawa; Whittow, 2000; Deeming, 2002). O sistema bicarbonato e a hemoglobina atuam conjuntamente para evitar quedas drásticas no pH, mantendo a homeostase (Everaert; Decuypere, 2013).

Estudos de Yalçın *et al.* (2008a) também identificaram diferenças significativas nos parâmetros hemogasométricos (pH,  $pO_2$ ,  $pCO_2$ ) entre pintos controle e aqueles manipulados termicamente ( $38,5^\circ C$  por 6 horas diárias de 10 a 18 dias). Embora o pH tenha sido mais elevado nos pintos manipulados, com menores  $pCO_2$  e  $pO_2$ , os autores não exploraram a relação entre esses dados e outros parâmetros analisados. Em trabalhos com temperaturas constantes altas e baixas ( $36,7^\circ C$  e  $38,9^\circ C$  do 19º dia até a eclosão) (Maatjens *et al.*, 2014b) e manipulação térmica da TCO ( $38,9^\circ C$  por 6 horas diárias do 8º ao 18,5º dia) (Silva *et al.*, 2019), não foram encontradas diferenças significativas no pH sanguíneo entre os pintos tratados e o controle.

As alterações nos níveis de pH,  $Na^+$ ,  $iCa$ ,  $HCO_3^-$  e Hb indicam que a manipulação térmica com baixa temperatura afetou significativamente a fisiologia dos pintos, possivelmente prejudicando a homeostase. Por outro lado, temperaturas mais elevadas não prejudicaram o equilíbrio ácido-base e capacidade de oxigenação sanguínea.

#### 4.4 Análises ósseas

As Tabelas 5, 6 e 7 mostram os resultados das análises ósseas, destacando o impacto dos diferentes protocolos de manipulação térmica durante a incubação sobre a composição mineral da tíbia de embriões e pintos.

Tabela 5 – Composição mineral da tíbia aos 18,5 dias e no momento da eclosão de pintos submetidos à incubação em TCO controle (C), ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO, do 8º ao 18,5º dia.

Temperatura	Cálcio (%) <sup>1</sup>		Fósforo (%) <sup>1</sup>		Manganês (%) <sup>1</sup>		Magnésio (%) <sup>1</sup>	
	18,5 dias	Eclosão	18,5 dias	Eclosão	18,5 dias	Eclosão	18,5 dias	Eclosão
MT-L	26,79 <sup>c</sup>	30,04 <sup>b</sup>	13,32 <sup>c</sup>	15,01 <sup>b</sup>	0,013 <sup>b</sup>	0,015 <sup>b</sup>	0,67 <sup>b</sup>	0,75 <sup>b</sup>
C	29,26 <sup>b</sup>	33,51 <sup>a</sup>	14,69 <sup>b</sup>	16,63 <sup>a</sup>	0,015 <sup>ab</sup>	0,019 <sup>a</sup>	0,79 <sup>ab</sup>	0,84 <sup>ab</sup>
MT-H	31,78 <sup>a</sup>	34,96 <sup>a</sup>	15,80 <sup>a</sup>	17,44 <sup>a</sup>	0,016 <sup>a</sup>	0,021 <sup>a</sup>	0,85 <sup>a</sup>	0,90 <sup>a</sup>
MT-VH	32,20 <sup>a</sup>	35,03 <sup>a</sup>	16,18 <sup>a</sup>	17,58 <sup>a</sup>	0,016 <sup>a</sup>	0,022 <sup>a</sup>	0,85 <sup>a</sup>	0,89 <sup>a</sup>
SEM	0,406	0,345	0,207	0,194	0,000	0,001	0,020	0,016
P-valor	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0210	<0,0001	<0035	0,0013

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças estatísticas  $p \leq 0,05$ .

C= controle (37,8°C - sem manipulação térmica); MT-L= Manipulação térmica a 36,7°C; MT-H= Manipulação térmica a 38,9°C; MT-VH: Manipulação térmica a 39,4°C.

TCO = temperatura da casca do ovo; SEM: erro padrão da média. n=56.

Aos 18,5 dias de incubação, o teor de cálcio na tíbia foi significativamente menor ( $p \leq 0,05$ ) no tratamento MT-L em comparação aos demais grupos (Tabela 5). O grupo controle apresentou valores intermediários, enquanto os grupos MT-H e MT-VH registraram os maiores teores de cálcio, sendo superiores tanto ao controle quanto ao grupo MT-L ( $p \leq 0,05$ ). Na eclosão, houve um aumento nos teores de cálcio em todos os grupos em relação ao 18,5º dia. Embora os grupos MT-H e MT-VH não tenham diferido estatisticamente do controle, o teor de cálcio no grupo MT-L permaneceu significativamente menor ( $p \leq 0,05$ ).

O comportamento do fósforo seguiu um padrão semelhante ao do cálcio. Aos 18,5 dias, o grupo MT-L apresentou o menor teor de fósforo, significativamente inferior ( $p \leq 0,05$ ) aos demais grupos. Os grupos MT-H e MT-VH registraram os maiores teores, sendo estatisticamente superiores ao controle e MT-L ( $p \leq 0,05$ ). Na eclosão, o teor de fósforo aumentou em todos os grupos. No entanto, enquanto os grupos MT-H e MT-VH não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle, o grupo MT-L continuou com níveis de fósforo significativamente menores ( $p \leq 0,05$ ).

No caso do manganês, aos 18,5 dias, o grupo MT-L exibiu os menores níveis, semelhantes ao controle, mas inferiores aos grupos MT-H e MT-VH ( $p \leq 0,05$ ). Na eclosão, os níveis de manganês aumentaram em todos os grupos. Os grupos MT-H e MT-VH apresentaram teores significativamente maiores que o grupo MT-L ( $p \leq 0,05$ ), porém semelhantes ao controle.

O teor de magnésio seguiu o mesmo padrão nos dois momentos avaliados. Aos 18,5 dias e na eclosão, o grupo MT-L apresentou teores de magnésio semelhantes ( $p > 0,05$ ) ao controle, mas significativamente menores ( $p \leq 0,05$ ) que MT-H e MT-VH. No entanto, MT-H e MT-VH não diferiram do controle.

Os resultados da deposição mineral nos diferentes tratamentos térmicos durante a incubação revelam a influência significativa das variações de temperatura sobre a mineralização óssea. Os dados revelam que a manipulação térmica com baixas temperaturas (MT-L) prejudicou a deposição de minerais na tíbia aos 18,5 dias de incubação, com efeitos persistentes até a eclosão. Por outro lado, os tratamentos com temperaturas mais elevadas (MT-H e MT-VH) resultaram em maior eficiência na incorporação de minerais.

A redução significativa nos teores de cálcio e fósforo observada no tratamento MT-L está alinhada com a literatura, que discutem que temperaturas mais baixas, prejudica a absorção e transporte de minerais (Yalçin *et al.*, 2007). Mesmo na eclosão, o teor de cálcio e fósforo no grupo MT-L permaneceu inferior, indicando que a baixa temperatura comprometeu a recuperação mineral durante os estágios finais da incubação.

Os resultados da deposição mineral nos diferentes tratamentos térmicos durante a incubação revelam a influência significativa das variações de temperatura sobre a mineralização óssea. Os dados obtidos mostram que o tratamento térmico MT-L, caracterizado por baixas temperaturas, prejudicou de forma notável a deposição desses minerais na tíbia dos embriões aos 18,5 dias de incubação, com efeitos persistentes até a eclosão. Em contraste, os tratamentos com temperaturas mais elevadas (MT-H e MT-VH) demonstraram uma maior eficiência na incorporação de minerais, sem prejudicar a mobilização e incorporação desses elementos essenciais ao desenvolvimento ósseo.

Em contrapartida, os grupos submetidos a temperaturas mais elevadas (MT-H e MT-VH) demonstraram maior retenção de cálcio e fósforo. Essas temperaturas promovem um ambiente metabólico mais ativo, facilitando a mobilização de minerais da gema para os tecidos em desenvolvimento (Molenaar *et al.*, 2010).

O comportamento do manganês também merece destaque, uma vez que o tratamento MT-L apresentou teores significativamente menores desse mineral na tíbia, especialmente aos 18,5 dias de incubação. A menor utilização do manganês pode ser explicada pela menor mobilização da gema nas condições de manipulação com baixa temperatura, o que sugere que o transporte de Mn para o tecido ósseo pode ter sido comprometido pela redução na atividade metabólica (Bhagavan, 2002). O papel do manganês como cofator de enzimas essenciais para a síntese da condroitina sulfato, um componente fundamental da matriz cartilaginosa, reforça a hipótese de que sua deficiência pode impactar negativamente a formação da matriz orgânica do osso, o que por sua vez afeta a mineralização (Bhagavan, 2002). A redução nos níveis de Mn também pode ser associada a uma diminuição da atividade das vesículas extracelulares, essenciais para o transporte e deposição de minerais no tecido ósseo (Pizauro Júnior *et al.*, 2017b).

No que se refere ao magnésio, os resultados indicam que esse mineral apresentou padrões semelhantes aos de cálcio e fósforo, com os embriões submetidos ao tratamento MT-L apresentando teores significativamente menores na tíbia. Esse achado é coerente

com a literatura que aponta para o papel do magnésio na estabilização da estrutura mineral óssea e na regulação do crescimento ósseo (Wuthier; Lipscomb, 2011). Assim como no caso do manganês, a menor mobilização do magnésio da gema para os tecidos pode ter sido influenciada pela baixa temperatura, afetando diretamente a disponibilidade desse mineral para os processos de mineralização óssea.

Nossos resultados estão alinhados com a literatura mostrando que as variações térmicas afetam diretamente os hormônios calciotrópicos, como PTH e calcitonina, que regulam a homeostase do cálcio (Decuypere; Michels, 1992; Furlan; Macari, 2002). Evidenciamos que a manipulação térmica intermitente, principalmente com baixa temperatura, durante a incubação não apenas afeta a disponibilidade de minerais essenciais, mas também interfere nos mecanismos hormonais que regulam a deposição mineral. A interação entre a temperatura corporal e a atividade hormonal pode ter contribuído para as diferenças observadas nos teores de cálcio, fósforo, manganês e magnésio, especialmente nos tratamentos com variação térmica abaixo do recomendado.

Os resultados demonstram que a variação térmica durante a incubação afeta diretamente o desenvolvimento ósseo em embriões de aves. O tratamento com baixas temperaturas comprometeu significativamente a deposição de minerais e a resistência óssea, enquanto as altas temperaturas promoveram uma melhor mineralização, favorecendo a qualidade óssea.

As variáveis relacionadas à tíbia (Tabela 6) e ao fêmur (tabela 7) indicaram que o peso absoluto foi significativamente afetado pelos tratamentos.

Tabela 6 – Características morfométricas, biofísicas e mecânicas da tíbia aos 18,5 dias de incubação e no momento da eclosão de pintos submetidos à incubação em TCO controle (C), ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO, do 8º ao 18,5º dia.

Temperatura	Morfometria								Biofísica				Mecânica	
	Peso (mg)		Peso relativo (mg/g) <sup>1</sup>		Comprimento (mm)		Largura (mm)		Cinzas (%)		Calcificação (%)		Força para quebra (Kg)	
	18,5 dias	Eclosão	18,5 dias	Eclosão	18,5 dias	Eclosão	18,5 dias	Eclosão	18,5 dias	Eclosão	18,5 dias	Eclosão	18,5 dias	Eclosão
MT-L	223,80 <sup>c</sup>	281,72 <sup>c</sup>	7,84	7,25	26,54 <sup>c</sup>	29,66 <sup>c</sup>	1,92 <sup>d</sup>	2,15 <sup>d</sup>	42,14 <sup>c</sup>	46,75 <sup>c</sup>	55,18 <sup>c</sup>	62,06 <sup>c</sup>	0,72 <sup>c</sup>	0,80 <sup>c</sup>
C	262,64 <sup>b</sup>	322,44 <sup>b</sup>	7,47	7,47	29,28 <sup>b</sup>	32,12 <sup>b</sup>	2,16 <sup>c</sup>	2,36 <sup>c</sup>	45,01 <sup>b</sup>	50,06 <sup>b</sup>	57,33 <sup>b</sup>	64,86 <sup>b</sup>	0,83 <sup>b</sup>	0,94 <sup>b</sup>
MT-H	284,06 <sup>a</sup>	347,42 <sup>a</sup>	8,14	8,05	30,50 <sup>a</sup>	33,86 <sup>a</sup>	2,25 <sup>b</sup>	2,54 <sup>b</sup>	47,54 <sup>a</sup>	51,98 <sup>a</sup>	59,86 <sup>a</sup>	66,73 <sup>a</sup>	0,91 <sup>a</sup>	1,07 <sup>a</sup>
MT-VH	286,36 <sup>a</sup>	353,55 <sup>a</sup>	8,26	8,23	30,93 <sup>a</sup>	33,97 <sup>a</sup>	2,27 <sup>a</sup>	2,69 <sup>a</sup>	47,38 <sup>a</sup>	51,93 <sup>a</sup>	59,55 <sup>a</sup>	66,51 <sup>a</sup>	0,89 <sup>ab</sup>	1,06 <sup>ab</sup>
SEM	3,850	4,047	0,156	0,156	0,246	0,251	0,019	0,027	0,320	0,317	0,335	0,296	0,013	0,021
P-valor	<0,0001	<0,0001	0,2924	0,0541	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças estatísticas  $p \leq 0,05$ .

C= controle (37,8°C - sem manipulação térmica); MT-L= Manipulação térmica a 36,7°C; MT-H= Manipulação térmica a 38,9°C; MT-VH: Manipulação térmica a 39,4°C.

TCO = temperatura da casca do ovo; SEM: erro padrão da média.

n=56.



Tabela 7 – Características morfométricas, biofísicas e mecânicas do fêmur aos 18,5 dias de incubação e no momento da eclosão de pintos submetidos à incubação em TCO controle (C), ou a incubação com manipulação térmica em baixa (MT-L), alta (MT-H) e muito alta (MT-VH) TCO, do 8º ao 18,5º dia.

Temperatura	Morfometria								Biofísica				Mecânica	
	Peso (mg)		Peso relativo (mg/g) <sup>1</sup>		Comprimento (mm)		Largura (mm)		Cinzas (%)		Calcificação (%)		Força para quebra (Kg)	
	18,5 dias	Eclosão	18,5 dias	Eclosão	18,5 dias	Eclosão	18,5 dias	Eclosão	18,5 dias	Eclosão	18,5 dias	Eclosão	18,5 dias	Eclosão
MT-L	133,13 <sup>c</sup>	180,27 <sup>c</sup>	4,66 <sup>ab</sup>	4,64 <sup>b</sup>	19,73 <sup>c</sup>	21,35 <sup>c</sup>	2,02 <sup>d</sup>	2,20 <sup>d</sup>	44,28 <sup>c</sup>	48,45 <sup>c</sup>	58,13 <sup>c</sup>	65,11 <sup>c</sup>	0,73 <sup>c</sup>	0,91 <sup>c</sup>
C	160,38 <sup>b</sup>	218,39 <sup>b</sup>	4,56 <sup>b</sup>	5,06 <sup>ab</sup>	21,10 <sup>b</sup>	23,58 <sup>b</sup>	2,24 <sup>c</sup>	2,58 <sup>c</sup>	47,53 <sup>b</sup>	52,06 <sup>b</sup>	60,66 <sup>b</sup>	66,98 <sup>b</sup>	0,81 <sup>b</sup>	1,01 <sup>b</sup>
MT-H	178,45 <sup>a</sup>	244,12 <sup>a</sup>	5,11 <sup>a</sup>	5,66 <sup>a</sup>	22,67 <sup>a</sup>	26,12 <sup>a</sup>	2,46 <sup>b</sup>	2,76 <sup>b</sup>	49,94 <sup>a</sup>	53,72 <sup>a</sup>	63,20 <sup>a</sup>	69,12 <sup>a</sup>	0,89 <sup>a</sup>	1,10 <sup>a</sup>
MT-VH	176,26 <sup>a</sup>	245,17 <sup>a</sup>	5,08 <sup>a</sup>	5,70 <sup>a</sup>	22,92 <sup>a</sup>	26,53 <sup>a</sup>	2,41 <sup>a</sup>	2,78 <sup>a</sup>	49,87 <sup>a</sup>	53,99 <sup>a</sup>	63,52 <sup>a</sup>	69,43 <sup>a</sup>	0,90 <sup>a</sup>	1,14 <sup>a</sup>
SEM	2,776	4,861	0,069	0,109	0,187	0,286	0,023	0,031	0,328	0,329	0,322	0,280	0,014	0,020
P-valor	<0,0001	<0,0001	0,0030	0,0030	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0003

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças estatísticas  $p \leq 0,05$ .

C= controle (37,8°C - sem manipulação térmica); MT-L= Manipulação térmica a 36,7°C; MT-H= Manipulação térmica a 38,9°C; MT-VH: Manipulação térmica a 39,4°C.

TCO = temperatura da casca do ovo; SEM: erro padrão da média.

n=56.

A manipulação térmica com temperaturas mais baixas (MT-L) resultou nos menores valores de peso absoluto, comprimento, largura, percentual de cinzas, calcificação e força para a quebra dos ossos. Em contraste, os tratamentos com temperaturas elevadas (MT-H e MT-VH) apresentaram valores significativamente superior, sugerindo que as temperaturas mais altas favoreceram a mineralização óssea e a qualidade estrutural do esqueleto.

O peso relativo da tíbia não foi significativamente afetado pelas manipulações térmicas, indicando que, embora a mineralização e o crescimento absoluto tenham sido comprometidos, a relação entre o peso do osso e o peso corporal foi preservada.

A largura e a força necessária para a ruptura dos ossos também foram impactadas. O grupo MT-L apresentou menor largura e resistência óssea, o que pode ser explicado pela menor deposição de minerais essenciais, como cálcio e fósforo. Temperaturas mais baixas podem comprometer a ossificação endocondral e intramembranosa, processos que fazem parte do crescimento longitudinal e espessura óssea (Applegate; Lilburn, 2002; Wu *et al.*, 2016). Em contraste, os grupos MT-H e MT-VH demonstraram maior largura e resistência óssea, sugerindo que temperaturas elevadas, dentro de certos limites, favorecem a deposição mineral e a robustez estrutural dos ossos.

Os valores de cinzas e calcificação refletem diretamente a deposição de minerais nos ossos, sendo que os tratamentos com temperaturas mais altas apresentaram os maiores valores para essas variáveis. Em contrapartida, o grupo MT-L apresentou os menores valores de cinzas e calcificação, reforçando a ideia de que baixas temperaturas prejudicam a mineralização óssea.

Estudos como o de Yalçın *et al.* (2007) e Van der Pol *et al.* (2014) demonstram que a mineralização óssea pode ser significativamente afetada por variações na temperatura de incubação. No presente estudo, os resultados observados nas variáveis relacionadas à tíbia e ao fêmur são consistentes com a literatura, onde as temperaturas elevadas durante o estágio final da incubação podem favorecer a deposição de minerais e melhoram a qualidade estrutural dos ossos. Por outro lado, a exposição a temperaturas mais baixas pode reduzir a taxa de crescimento e a mineralização, o que foi evidenciado pela menor largura e resistência dos ossos no grupo MT-

Além dos efeitos sobre a morfologia óssea, as variações térmicas durante a incubação podem ter afetado a homeostase mineral, influenciando os níveis de hormônios calciotrópicos, como o PTH e a vitamina D<sub>3</sub>, que regulam a absorção e deposição de minerais no osso (Wideman *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2021;). A manipulação térmica também pode ter alterado a dinâmica de liberação de vesículas extracelulares, responsáveis pelo transporte de minerais e pelo processo de mineralização óssea (Adhikari *et al.*, 2020).

Os resultados indicam que a manipulação da TCO intermitente durante a incubação exerce uma influência sobre o desenvolvimento ósseo de embriões de aves, afetando a mineralização e a resistência dos ossos. As manipulações térmicas com temperaturas elevadas promoveram uma maior deposição mineral e melhor qualidade óssea, enquanto que a temperatura baixa (MT-L) resultou em ossos mais frágeis e menos mineralizados. Esses achados reforçam a importância de um controle rigoroso da TCO durante a incubação para garantir o desenvolvimento ósseo adequado e a qualidade dos pintos após a eclosão.

## 5 CONCLUSÕES

O uso de manipulação térmica em temperatura de casca de 36,7°C por seis horas diárias, entre os dias 8 e 18,5 de incubação, não é recomendado por afetar negativamente o desenvolvimento embrionário e os pintos recém-eclodidos.

Ao contrário, a manipulação térmica com controle de temperatura da casca, utilizando 38,9°C ou 39,4°C por seis horas diárias entre os dias 8 e 18,5 de incubação, promoveu menor temperatura retal, maior mobilização e utilização de minerais a partir dos componentes do ovo e conseqüentemente, melhor desenvolvimento dos ossos, sem prejudicar o rendimento de incubação e a qualidade dos pintos de um dia.

Desta forma, esta técnica é uma ferramenta viável e favorável, sendo importante mensurar a continuidade dos efeitos benéficos durante a criação das aves.

## 6 IMPLICAÇÕES

A técnica de manipulação térmica com controle da temperatura da casca, utilizando temperaturas de 38,9°C e 39,4°C por seis horas diárias entre os dias 8 e 18,5 de incubação, demonstrou não prejudicar o rendimento da incubação nem a qualidade dos pintos recém-eclodidos. Além disso, as elevações cíclicas da TCO resultaram na redução da temperatura retal de pintos de um dia que é um indicador do estado térmico do animal e reflete a eficiência das trocas de calor com o ambiente. Essa redução indica melhor controle da temperatura corporal, favorecendo a termorregulação e permitindo que os pintos lidem melhor com variações térmicas no ambiente.

A manipulação térmica intermitente MT-H e MT-VH mostrou-se benéfica, promovendo uma melhor cicatrização do umbigo e melhor desenvolvimento do baço e da bursa, órgãos fundamentais para a imunidade das aves, o que é bom para a saúde dos pintos após a eclosão.

O ineditismo deste estudo está no fato de que, pela primeira vez, a manipulação térmica intermitente demonstrou influenciar diretamente os hormônios calcitropicos em pintos recém-eclodidos. O PTH foi reduzido de maneira semelhante nos grupos MT-H e MT-VH, enquanto aumentou no grupo MT-L. A vitamina D<sub>3</sub> apresentou níveis reduzidos

no MT-L, mas aumentados nos tratamentos com temperaturas mais elevadas (MT-H e MT-VH), sugerindo uma regulação mineral mais eficiente. A calcitonina também se elevou com os tratamentos em temperaturas mais altas, sendo o grupo MT-H o que mais elevou esse hormônio. Esses achados indicam que a manipulação térmica com temperaturas elevadas favorece a dinâmica hormonal, e aumenta a atividade da fosfatase alcalina nesses grupos. Em consequência, houve um aumento da desmineralização da casca e da gema nos grupos MT-H e MT-VH, que intensificaram a mobilização de cálcio e outros minerais essenciais, favorecendo a mineralização óssea do embrião. Esse processo foi evidenciado pela maior perda de peso da casca e pela redução no teor de cálcio na casca e gema, demonstrando influência da manipulação térmica sobre o uso eficiente dos nutrientes durante a incubação.

Por outro lado, o tratamento com manipulação térmica a 36,7°C (MT-L) resultou em efeitos negativos, como piora na qualidade dos pintos, alterações no peso dos órgãos e redução na mobilização de minerais da casca e da gema. Isso levou a menores níveis de minerais no sangue, prejudicando a mineralização e resistência óssea. Esses efeitos são atribuídos à diminuição da atividade metabólica dos embriões sob temperatura baixa, o que reduziu a mobilização de nutrientes essenciais para o desenvolvimento ósseo, comprometendo a qualidade dos pintos e a formação do esqueleto.

Dessa forma, o estudo demonstra que a manipulação térmica intermitente com temperaturas elevadas é uma ferramenta eficaz para otimizar o desenvolvimento embrionário e ósseo, sem comprometer parâmetros zootécnicos. No entanto, mais estudos são necessários para explorar de forma mais detalhada os efeitos da manipulação térmica intermitente, sobre o desenvolvimento fisiológico e ósseo dos frangos durante a fase de crescimento.

## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHIKARI, R.; WHITE, D.; HOUSE, J. D.; KIM, W. K. Effects of additional dosage of vitamin D<sub>3</sub>, vitamin D<sub>2</sub>, and 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> on calcium and phosphorus utilization, egg quality and bone mineralization in laying hens. **Poultry Science**, v. 99, p. 364–373, 2020.

AKŞIT, M.; YALÇIN, S.; YENISEY, C.; OZDEMIR, D. Brooding temperatures for chicks acclimated to heat during incubation: effects on post-hatch intestinal development and body weight under heat stress. **British Poultry Science**, v. 51, n. 3, p. 444-452, 2010.

ALKAN, S.; KARSLI, T.; KARABAG, K.; GALIC, A.; BALCIOGLU, M. S. The effects of thermal manipulation during early and late embryogenesis on hatchability, hatching weight and body weight in Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). **Archives Animal Breeding**, v. 56, n. 1, p. 789-796, 2013.

ALLCROFT, R. The physiology of eggshell calcification in birds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 15, n. 7, p. 513-522, 1964.

AL-MUSAWI, S.; STICKLAND, N. C.; BAYOL, S. A. M. *In ovo* temperature manipulation differentially influences limb musculoskeletal development in two lines of chick embryos selected for divergent growth rates. **The Journal of Experimental Biology**, v. 215, p. 1594-1604, 2012.

AL-RUKIBAT, R. K.; *et al.* Thermal manipulation during late embryogenesis: Effect on body weight and temperature, thyroid hormones, and differential white blood cell counts in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 96, n. 1, p. 234-240, 2017.

AL-SARDARY, S.; MOHAMMAD, Sh. Effect of thermal manipulation during embryogenesis on hatching traits. **International Journal of Agricultural Science**, v. 1, p. 1-6, 2016.

AL-ZGHOUL, M. B.; SUKKER, H.; ABABNEH, M. M. Effect of thermal manipulation of broilers embryos on the response to heat-induced oxidative stress. **Poultry Science**, v. 98, n. 2, p. 991-1001, 2019.

AL-ZHGOUL, M.-B.; DALAB, A. E. S.; ABABNEH, M. M.; JAWASREH, K. I.; AL BUSADAH, K. A.; ISMAIL, Z. B. Thermal manipulation during chicken embryogenesis results in enhanced Hsp70 gene expression and the acquisition of thermotolerance. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 2, p. 502-507, 2013.

AMJADIAN, T.; SHAHIR, M. H. Effects of repeated thermal manipulation of broiler embryos on hatchability, chick quality, and post-hatch performance. **International Journal of Biometeorology**, v. 64, p. 2177-2183, 2020.

ANDERSON, H. C.; REYNOLDS, J. J. Pyrophosphate stimulation of initial mineralization in cultured embryonic bones. **Calcified Tissue Research**, v. 11, n. 1, p. 205-215, 1973.

ANDREWS, J. E.; SMITH, C. A.; SINCLAIR, A. H. Sites of Estrogen Receptor and Aromatase Expression in the Chicken Embryo. **General and Comparative Endocrinology**, v. 108, n. 2, p. 182-190, 1997.

ARAÚJO, R.; MARTIN, V.; FERREIRA, R.; FERNANDES, M. H.; GOMES, P. S. A new ex vivo model of the bone tissue response to the hyperglycemic environment – The embryonic chicken femur organotypic culture in high glucose conditions. **Bone**, v. 158, artigo 116355, 2022.

AZEVEDO, I. L. Influência da temperatura de incubação sobre o desenvolvimento ósseo de embriões e pintos de corte recém-eclodidos. 2022. 121 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Salvador, 2022.

AZEVEDO, I. L.; SILVA, T. P. B.; FRANCA, T. N.; MERCÊS, N. B.; MARTINS, L. K. S. A.; VIDAL, L. V. O.; BARBOSA, V. M. Bone development of embryos and broiler chicks incubated at different temperatures. In: Conferência Facta Wpsa-Brasil, 2023, Campinas. **Anais [...]**. Campinas: FACTA WPSA-Brasil, 2023.

BAARENDSE, P. J. J.; DEBONNE, M.; DECUYPERE, E.; KEMP, B.; VAN DEN BRAND, H. Ontogeny of avian thermoregulation from a neural point of view. **World's Poultry Science Journal**, v. 63, p. 267-276, 2007.

BALLOCK, R. T.; REDDI, A. H. Thyroxine regulates morphogenesis of columnar cartilage and chondrocyte differentiation. **Journal of Cell Biology**, v. 126, n. 5, p. 1311-1318, 1994.

BARBOSA, V. M. **Fisiologia da incubação e desenvolvimento embrionário**. Belo Horizonte: FEP MVZ, 2011. 124 p.

BARBOSA, V. M.; ROCHA, J. S. R.; BAIÃO, N. C.; MENDES, P. M. M.; POMPEU, M. A.; LARA, L. J. C.; MIRANDA, D. J. A.; CARVALHO, G. B.; CARDOSO, D. M.; CUNHA, C. E.; MARTINS, N. R. S.; LEITE, R. C. Efeitos do momento de transferência dos ovos para o nascedouro e da idade da matriz pesada sobre o rendimento de incubação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 6, p. 1823-1830, 2013.

BARBOSA, V. M.; BAIÃO, N. C.; ROCHA, J. S. R.; MENDES, P. M. M.; LARA, L. J. C.; POMPEU, M. A.; LEME, F. O. P.; CARDEAL, P. C.; MARTINS, N. R. S.; LEITE, R. C. Equilíbrio ácido-básico de embriões e pintos de corte em momentos críticos da incubação e submetidos a diferentes períodos de transferência para o nascedouro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 4, p. 1225-1233, 2014.

BAROTT, H. G. Effect of temperature, humidity and other factors on hatch of hen's eggs and on energy metabolism of chick embryos. **Technical Bulletin**, Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América, v. 553, p. 1-45, 1937.

BARRI, A.; *et al.* Effect of elevated incubation temperatures on nutrient transporter mRNA expression during early post-hatch period in broiler chickens. **Poultry Science**, 2011.

BELL, D. J.; FREEMAN, B. M. *Physiology and biochemistry of the domestic fowl*. London: Academic Press, 1971.

BELLAIRS, R.; OSMOND, M. **Atlas of chick development**. Elsevier, 2005.

BELLAIRS, R.; OSMOND, M. *The atlas of chick development*. 3. ed. London: Academic Press, 2014.

BHAGAVAN, N. V. *Medical biochemistry*. San Diego: Academic Press, 2002.

BISHOP, J. E.; NORMAN, A. W. Studies on calciferol metabolism: metabolism of 25-hydroxy-vitamin D<sub>3</sub> by the chicken embryo. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 167, p. 769–773, 1975.

BLACK, J. L.; BURGGREN, W.W. Acclimation to hypothermic incubation in developing chicken embryos (*Gallus domesticus*) I. Developmental effects and chronic and acute metabolic adjustments. **The Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 1543-1552, 2004.

BLUMER, E. S. The effects of environmental enrichment on bone strength and morphology in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 100, n. 2, p. 287-296, 2021.

BROOKES, M. U.; MAY, K. U. The influence of temperature on bone growth in the chick. **Journal of Anatomy**, v. 111, p. 351–363, 1972.

BURCH, WARNER M.; VAN WYK, JUDSON J. Triiodothyronine stimulates cartilage growth and maturation by different mechanisms. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 252, n. 2, p. E176-E182, 1987.



BURGGREN, W.; BAUTISTA, N. Invited review: Development of acid-base regulation in vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & BLOM, J.; LILJA, C.** A comparative study of growth, skeletal development and eggshell composition in some species of birds. **Journal of Zoology**, v. 262, n. 4, p. 361-369, 2004.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 9, n. 5, p. 641-650, 1988.

CAPLAN, A. I. The cellular and molecular embryology of bone formation. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 225, p. 257-276, 1987.

CAPLAN, A. I.; PECHAK, D. G. The cellular and molecular embryology of bone formation. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 225, p. 257-276, 1987.

CARSIA, R.V.; HARVEY, S. Adrenals. In: WHITTOW, G. C. (Ed). **Sturkie's Avian Physiology**. California: Academic Press, 2000. p. 489-537.

CARSON, J. A.; MANOLAGAS, S. C. Effects of sex steroids on bones and muscles: Similarities, parallels, and putative interactions in health and disease. **Bone**, v. 80, p. 67-78, 2015.

CHEN, C.; TURNER, B.; APPLGATE, T.; LITTA, G.; KIM, W. Role of longterm supplementation of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> on laying hen bone 3-dimensional structural development. **Poultry Science**, v. 99, p. 5771–5782, 2020.

CHEN, C.; WHITE, D. L.; MARSHALL, B.; KIM, W. K. Role of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in chicken embryo osteogenesis, adipogenesis, myogenesis, and vitamin D<sub>3</sub> metabolism. **Frontiers in Physiology**, v. 12, artigo 637629, 2021.

CHEN, F. P.; LEE, N.; WANG, K. C.; SOONG, Y. K.; HUANG, K. E. Effect of estrogen and 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> on the activity and growth of human primary osteoblast-like cells in vitro. **Fertility And Sterility**, v. 77, n. 5, 2002.

CHIEN, Y. C.; HINCKLEY, L. S.; BROWN, A. C.; GRIFFIN, C. E. Ultrastructure of avian eggshell during resorption following egg incubation. **Poultry Science**, v. 88, p. 1176-1180, 2009.

CHRISTENSEN, V. L.; ORT, D. T.; GRIMES, J. L. Physiological factors associated with weak neonatal poults (*Meleagris gallopavo*). **International Journal of Poultry Science**, v. 2, p. 7-14, 2003.

CIGNACHI, N. P.; RIBEIRO, A.; MACHADO, G. D. B.; CIGNACHI, A. P.; KIST, L. W.; BOGO, M. R.; SILVA, R. B. M.; CAMPOS, M. M. Bone regeneration in a mouse model of type 1 diabetes: Influence of sex, vitamin D<sub>3</sub>, and insulin. **Life Sciences**, v. 263, artigo 118593, 2020.

COLLIN, A.; BERRI, C.; TESSERAUD, S.; REQUENA RODÓN, F. E.; SKIBACASSY, CROCHET, S.; DUCLOS, M. J.; RIDEAU, N.; TONA, K.; BUYSE, J.; BRUGGEMAN, V.; DECUYPERE, E.; PICARD, M. e YAHAV, S. Effects of thermal manipulation during early and late embryogenesis on thermotolerance and breast muscle characteristics in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 86, p. 795-800, 2007.

COLLIN, A.; PICARD, M. e YAHAV, S. The effect of duration of thermal manipulation during broiler chick embryogenesis on body weight and body temperature of post-hatched chicks. **Animal Research**, v. 54, p. 105-111, 2005.

DARRAS, V. M.; GEUTEN, S. V.; KÜHN, E. R. Thyroid hormone metabolism in poultry. **Biotechnol Agron Soc Environ**, v. 4, n. 1, p.13–20, 2000.

DAYAN, J.; REICHER, N.; MELKMAN-ZEHAVID, T.; UNI, Z. Incubation temperature affects yolk utilization through changes in expression of yolk sac tissue functional genes. **Poultry Science**, v. 99, n. 11, p. 6128-6138, 2020.

DE GROEF, B.; GROMMEN, S. V. H.; DARRAS, V. M. The chicken embryo as a model for developmental endocrinology: Development of the thyrotropic, corticotropic, and somatotrophic axes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 293, p. 17-24, 2008.

DEBONNE, M.; BAARENDSE, P. J. J.; VAN DEN BRAND, H.; KEMP, B.; BRUGGEMAN, V.; DECUYPERE, E. Involvement of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis and its interaction with the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the ontogeny of avian thermoregulation: a review. **World's Poultry Science Journal**, v. 64, p. 309-321, 2008.

DECUYPERE, E.; BANWELL, R.; HEMERYCK, P.; MORO, D. Desafios do processo de incubação. In: MACARI, M.; GONZALES, E.; PATRÍCIO, I. S.; NÄÄS, I. A.; MARTINS, P. C. (Ed.). **Manejo da incubação**. 3. ed. Jaboticabal: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas - FACTA, 2013. p. 299–314.

DECUYPERE, E.; BRUGGEMAN, V. Endocrine aspects of development: new challenges for the control of incubation process. **World's Poultry Science Journal**, v. 61, p. 278-284, 2005.

DECUYPERE, E.; MALHEIROS, R. D.; MORAES, V. M. B. e BRUGGEMAN, V. **Fisiologia do embrião**. In: MACARI, M.; GONZALES, E. Manejo da incubação. Jaboticabal: FACTA, 2003.

DECUYPERE, E.; MICHELS, H. Incubation temperature as a management tool: a review. **World's Poultry Science Journal**, v. 48, p. 28-38, 1992.

DEEMING, D. C. Behaviour patterns during incubation. In: DEEMING, D. C. **Avian incubation: behaviour, environment and evolution**. Oxford University Press; Oxford: p. 63-87, 2002.

DIBNER, J. J., RICHARDS J. D., KITCHELL M. L.; QUEIROZ M. A. Metabolic challenges and early bone development. **Journal of Applied Poultry Research**. v. 16, p. 126-137, 2007.

EAMES, B. F.; HELMS, J. A. Conserved molecular program regulating cranial and appendicular skeletogenesis. **Development**, v. 131, n. 23, p. 6061-6068, 2004.

EISENSTEIN, R.; SORGENTE, N.; SOBLE, L. W. The resistance of certain tissues to invasion. **American Journal of Pathology**, v. 73, p. 765-774, 1973.

EL-SHATER, S. N.; RIZK, H.; ABDELRAHMAN, H. A.; AWAD, M. A.; KHALIFA, E. F. Embryonic thermal manipulation of Japanese quail: effects on embryonic development, hatchability, and post-hatch performance. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, p. 263, 2021.

EPPLE, A., GOWER, B., BUSCH, M. T., GILL, T., MILAKOFSKY, L., PIECHOTTA, R.; NÍBIO, B.; LEBRE, T.; STETSON, M. H. Stress responses in avian embryos. **American Zoologist**, 37, 536–545, 1997.

EVERAERT, N.; DECUYPERE, E. Thermal manipulation during late incubation affects hatching performance and thermoregulation in chickens. **Poultry Science**, v. 92, p. 333-339, 2013.

EVERAERT, N.; DECUYPERE, E.; WILLEMSSEN, H. The effect of nonventilation during early incubation on the embryonic development and the hatching process in chickens. **British Poultry Science**, v. 49, p. 574-582, 2008.

FATEMI, S. A.; ELLIOTT, K. E. C.; BELLO, A.; DUROJAYE, O. A.; ZHANG, H. J.; PEEBLES, E. D. The effects of in ovo injected vitamin D3 sources on the eggshell temperature and early posthatch performance of Ross 708 broilers. **Poultry Science**, v. 99, p. 1357–1362, 2020.

FLORES, F.; GARCIA, R. G.; NAAS, I. A.; SOUZA, L. I. SOUZA. Thermal Stimulation of Ross lineage Embryos on a Commercial Scale. **Ciência Rural**, v. 46, p. 1668–1674, 2016.

FREEMAN, B. M.; VINCE, M. A. *Development of the avian embryo: a behavioural and physiological study*. London: Chapman and Hall, 1974.

FURLAN, R. L.; MACARI, M.; GONZALES, E. Termorregulação. In: FURLAN, R. L.; MACARI, M. (Ed.). **Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2002. cap. 17, p. 209-230.

GABRIELLI, M. G.; ACCILI, D. The chick chorioallantoic membrane: A model of molecular, structural, and functional adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 1, artigo 940741, 2010.

GABRIELLI, M. G.; SCOLASTICI, C.; ACCILI, D. Osteogenic processes during avian embryo development. **Journal of Morphology**, v. 248, p. 223-232, 2001.

GAY, C. V.; SCHRAER, H.; SCHRAER, R. Calcium transport mechanisms in the chick chorioallantoic membrane. **Journal of Experimental Zoology**, v. 215, n. 2, p. 187-192, 1981.

GIULIANI, D. L.; BOLAND, R. L. Effects of vitamin D3 metabolites on calcium fluxes in intact chicken skeletal muscle and myoblasts cultured in vitro. **Calcified Tissue International**, v. 36, p. 200–205, 1984.

GIVISIEZ, P. E. N.; *et al.* Insulin-like growth factors and avian growth: influence of nutrition and genetics. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 104, n. 2, p. 567-580, 2020.

GOEL, A.; NCHO, C. M.; GUPTA, V.; CHOI, Y. H. Embryonic modulation through thermal manipulation and in ovo feeding to develop heat tolerance in chickens. **Animal Nutrition**, v. 13, p. 150-159, 2023.

GRACITELLI, Mauro EC *et al.* Paratormônio e osteoporose: encontrando o fio da meada. Bases fisiológicas para utilização do PTH no tratamento da osteoporose. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, p. 215-220, 2002.

GROVES, P.; MUIR, W.A. Meta-analysis of experiments linking incubation conditions with subsequent leg weakness in broiler chickens. **PLoS One**. v. 9, n. 7: e102682, 2014.

GROVES, P.J.; MUIR, W. I. Earlier hatching time predisposes Cobb broiler chickens to tibial dyschondroplasia. **Animal**, p. 1-9, 2016.

GÜZ, M. D.; PEREIRA, R. F.; OLIVEIRA, F. C. Regulation of osteoblast proliferation and differentiation by growth factors and hormones. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 6, p. 1794-1805, 2020.

HALEVY, O.; YAHAV, S.; ROZENBOIM, I. Enhancement of meat production by environmental manipulations in embryo and young broilers. **World's Poultry Science Journal**, v. 62, p. 485-497, 2006.

HALGRAIN, J.; *et al.* Concomitant morphological modifications of the avian eggshell, eggshell membranes, and the chorioallantoic membrane during embryonic development. **Frontiers in Physiology**, v. 13, Article 820382, 2022.

HALGRAIN, M.; BERNARDET, N.; CREPEAU, M.; MÊME, N.; NARCY, A.; HINCKE, M.; RÉHAULT-GODBERT, S. Eggshell decalcification and skeletal mineralization during chicken embryonic development: defining candidate genes in the chorioallantoic membrane. **Poultry Science**, v. 101: 101622, 2022.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, v. 88, n. 1, p. 49-92, 1951.

HAMMOND, C. L.; SIMBI, B. H.; STICKLAND, N. C. In ovo temperature manipulation influences embryonic motility and growth of limb tissues in the chick (*Gallus gallus*). **Journal Experimental of Biology**, v. 210, p. 2667-2675, 2007.

HICKMAN, J.; MCEL DUFF, A. Insulin sensitizes a cultured rat osteogenic sarcoma cell line to hormones which activate adenylate cyclase. **Calcified Tissue International**, v. 46, p. 401-405, 1990.

HOPCROFT, R. L.; *et al.* The role of eggshell calcium during embryogenesis in avian species. **Poultry Science**, v. 98, p. 331-341, 2019.

HUNZIKER, E. B.; SCHENK, R. K.; CRUZ-ORIVE, L. M. Quantitation of chondrocyte performance in growth-plate cartilage during longitudinal bone growth. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 69, p. 162-173, 1994.

IQBAL, A.; DECUYPERE, E.; ABD EL AZIM, A.; KÜHN, E. R. Pre- and post- hatch high temperature exposure affects the thyroid hormones and corticosterone response to acute heat stress in growing chickens (*Gallus domesticus*). **Journal of Thermal Biology**, v. 15, p. 149-153, 1990.

IRIE, T.; AIZAWA, T.; KOKUBUM, S. The role of sex hormones in the kinetics of chondrocytes in the growth plate. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 87, p. 1278-1284, 2005.

ISLER, H. Fine structure of the ultimobranchial body of the chick. **The Anatomical Record**, v. 177, n. 3, p. 441-459, 1973.

JANKE, O.; TZSCHENTKE, B.; HOCHER, J.; NICHELMANN, M. Metabolic responses of chicken and Muscovy duck embryos to high incubation temperatures. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A**, v. 131, p. 741-750, 2002.

JOHNSTON, P. M.; COMAR, C. L. Distribution and contribution of calcium from the albumen, yolk and shell to the developing chick embryo. **American Journal of Physiology**, v. 183, p. 365-370, 1955.

KARPERIEN, M.; VAN DER EERDEN, B. C. J.; WIT, J. M. Genomic and non-genomic actions of sex steroids in the growth plate. **Pediatric Nephrology**, v. 20, p. 323-329, 2005.

KELLY, W. L.; BRYDEN, M. M. A modified differential stain for cartilage and bone in whole mount preparations of mammalian fetuses and small vertebrates. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 58, p. 131-134, 1983.

KERSCHNITZKI, M. *et al.* The role of bone matrix architecture in bone strength. **Osteoporosis International**, v. 27, n. 8, p. 2561-2570, 2016.

KUBOTA, M.; HAYASHI, K.; TOSAKA, S. Calcium metabolism in the chick embryo during incubation. **Poultry Science**, v. 60, p. 1725-1730, 1981.

KÜHN, E. R.; GEELISSEN, S. M. E.; VAN DER GEYTEN, S.; DARRAS, V. M. The release of growth hormone (GH): relation to the thyrotropic- and corticotropic axis in the chicken. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p. 43-51, 2005.

KÜHN, L. T.; TIMMERS, H.; BUTTERFIELD, N. C.; RALSTON, S. H. The effect of growth hormone on skeletal development and mineral metabolism. **Bone**, v. 37, n. 4, p. 560-568, 2005.

LAKE, J. A.; BRANNICK, E. M.; PAPAHA, M. B.; LOUSENBERG, C.; VELLEMAN, S. G.; ABASHT, B. Blood gas disturbances and disproportionate body weight distribution in broilers with wooden breast. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 304, 2020.

LEANDRO, N. S. M.; GONZALES, E. e VAROLI JR., J. C. V. Hatchability and chick quality of broiler breeder eggs submitted to stress due to temeperature. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.2, n.1, p.39-44, 2000.

LIN, Y. M.; DRUYAN, S.; YAHAV, S.; BRAKE, J. Thermal treatments prior to and during the beginning of incubation affects development of the broiler embryo and yolk sac membranes, and live performance and carcass characteristics. **Poultry Science**, v. 96, p. 1939-1947, 2017.

LOH, B.; MAIER, I.; WINAR, A.; JANKE, O.; TZSCHENTKE, B. Prenatal development of epigenetic adaptation processes in poultry: changes in metabolic and neuronal thermoregulatory mechanisms. **Avian and Poultry Biology Reviews**, v. 15, p. 119-128, 2004.

LOURENS, A.; MEIJERHOF, R.; KEMP, B.; VAN DEN BRAND, H. Energy partitioning during incubation and consequences for embryo temperature: A theoretical approach. **Poultry Science**, v. 90, p. 516-523, 2011.

LOURENS, A.; MOLENAAR, R.; VAN DEN BRAND, H. E.; HEETKAMP, M. J. W.; MEIJERHOF, R.; KEMP, B. Effect of eggshell temperature and oxygen concentration on embryo growth and metabolism during incubation. **Poultry Science**, v. 86, p. 2194-2199, 2007.

LOURENS, A.; MOLENAAR, R.; VAN DEN BRAND, H.; HEETKAMP, M. J. W.; MEIJERHOF, R.; KEMP, B. Effect of egg size on heat production and the transition of energy from egg to hatchling. **Poultry Science**, v. 85, p. 770-776, 2006.

LOYAU, T.; BERRI, C.; BEDRANI, L.; MÉTAYER-COUSTARD, S.; PRAUD, C.; DUCLOS, M. J.; TESSERAUD, S.; RIDEAU, N.; EVERAERT, N.; YAHAV, S.; MIGNON-GRASTEAU, S. e COLLIN, A. Thermal manipulation of the embryo modifies the physiology and body composition of broiler chickens reared in floor pens without affecting breast meat processing quality. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 3674–3685, 2013.

LU, J. W.; MCMURTRY, J. P.; COON, C. N. Developmental changes of plasma insulin, glucagon, insulin-like growth factors, thyroid hormones, and glucose concentrations in chick embryos and hatched chicks. **Poultry Science**, v. 86, p. 673-683, 2007.

LUENGO, M.; PICADO, C.; PIERA, C.; GUANABENS, N.; MONTSERRAT, J. M.; RIVERA, J.; SETOAIN, J. Intestinal calcium absorption and parathyroid hormone secretion in asthmatic patients on prolonged oral or inhaled steroid treatment. **European Respiratory Journal**, v. 4, p. 441–444, 1991.

LV, Z. P.; YAN, S. J.; LI, G.; LIU, D.; GUO, Y. M. Genistein improves the reproductive performance and bone status of breeder hens during the late egg-laying period. **Poultry Science**, v. 98, p. 7022–7029, 2019.

MAATJENS, C. M., VAN ROOVERT-REIJRINK, I. A. M., ENGEL, B., VAN DER POL, C. W., KEMP, B. and VAN DEN BRAND, H. Temperature during the last week of incubation. III. Effects on chicken embryo Physiology. **Poultry Science**, v. 96, p. 1451–1458, 2017.

MAATJENS, C. M.; REIJRINK, I. A. M.; MOLENAAR, R.; VAN DER POL, C. W.; KEMP, B.; VAN DEN BRAND, H. Temperature and CO<sub>2</sub> during the hatching phase. I. Effects on chick quality and organ development. **Poultry Science**, v. 93, p. 655-663, 2014a.

MAATJENS, C. M.; VAN ROOVERT-REIJRINK, I. A. M.; VAN DEN ANKER, I.; ENGEL, B.; VAN DER POL, C. W.; KEMP, B. e VAN DEN BRAND, H. Temperature during the last week of incubation. II. Effects on first week broiler development and performance. **Poultry Science**, v. 95, p. 2136-2144, 2016b.

MAKANYA, A. N.; HENNIG, B.; DIMAGGIO, G.; DREYER, B.; TSURUGA, S.; DUE, A. Structural and functional development of the chorioallantoic membrane (CAM) in the chicken embryo. **Journal of Morphology**, v. 277, n. 1, p. 61-72, 2016.

MALGAROLI, A.; MELDOLESI, J.; ZALLONE, A. Z.; TETI, A. Control of cytosolic free calcium in rat and chicken osteoclasts: the role of extracellular calcium and calcitonin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 24, p. 14342-14347, 1989.

MAY, J. D.; DEATON, J. W.; BRANTON, S. L. Body temperature of acclimated broilers during exposure to high temperature. **Poultry Science**, v. 66, n. 2, p. 378-380, 1987.

MEIJERHOF, R. The influence of incubation on chick quality and broiler performance. **In Proceedings of the 20th Australian Poultry Science Symposium**, p. 167-176, New South Wales, Sydney, Austrália. 2009.

MEIJERHOF, R.; VAN BEEK, G. Mathematical modeling of temperature and moisture loss of hatching eggs. **Journal of Theoretical Biology**, v. 165, p. 27-41, 1993.

MOE, S. M. Disorders involving calcium, phosphorus and magnesium. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 35, p. 215-237, 2008.

MOLENAAR, R.; REIJRINK, I. A. M.; MEIJERHOF, R.; VAN DEN BRAND, H. Meeting embryonic requirements of broilers throughout incubation: A review. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 12, n. 3, p. 137-148, 2010.

MOLENAAR, R.; VAN DEN ANKER, I.; MEIJERHOF, R.; KEMP, B.; VAN DEN BRAND, H. Effect of eggshell temperature and oxygen concentration during incubation on the developmental and physiological status of broiler hatchlings in the perinatal period. **Poultry Science**, v. 90, p.1257–1266, 2011.



MORAES, V. M. B.; MALHEIROS, R. D.; BRUGGEMAN, V.; COLLIN, A.; TONA, K.; VAN AS, P.; ONAGBESAN, O. M.; BUYSE, J.; DECUYPERE, E.; MACARI, M. Effect of thermal conditioning during embryonic development on aspects of physiological responses of broilers to heat stress. **Journal of Thermal Biology**, v. 28, p. 133-140, 2003.

MORAES, V. M. B.; MALHEIROS, R. D.; BRUGGEMAN, V.; COLLIN, A.; TONA, K.; VAN AS, P.; ONAGBESAN, O. M.; BUYSE, J.; DECUYPERE, E.; MACARI, M. The effect of timing of thermal conditioning during incubation on embryo physiological parameters and its relationship to thermotolerance in adult broiler chickens. **Journal of Thermal Biology**, v. 29, p. 55-61, 2004.

MORAN, E. T. Nutrition of the developing embryo and hatchling. **Poultry Science**, v. 86, p. 1043-1049, 2007.

MORITA, V. S.; ALMEIDA, A. R.; MATOS JÚNIOR, J. B.; VICENTINI, T. I.; ZANIRATO, G. L.; BOLELI, I. C. Neither altered incubation temperature during fetal development nor preferred rearing temperature improves leg bone characteristics of broilers. **Journal of Thermal Biology**, v. 93, p. 102726, 2020.

MORITA, V. S.; ALMEIDA, V.; MATOS JÚNIOR, J. B.; VICENTINI, T. I.; VAN DEN BRAND, H.; BOLELI, I. C. Incubation temperature during fetal development influences morphophysiological characteristics and preferred ambient temperature of chicken hatchlings. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, e0154928, 2016.

MUIR, W. I.; GROVES, P. J. Incubation and hatch management: consequences for bone mineralization in Cobb 500 meat chickens. **Animal**, n. 12, v. 4, p. 794-801, 2017.

MUIR, W. I.; GROVES, P. J. The leg strength of two commercial strains of meat chicken subjected to different incubation profiles. **animal**, v. 13, n. 7, p. 1489-1497, 2019.

NARBAITZ, R.; TOLNAI, S. The functional and structural development of the chick chorioallantoic membrane. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 44, p. 221-232, 1978.

NICHELMANN, M.; JANKE, O.; HOCHER, J.; TZSCHENTKE, B. Development of physiological control systems in avian embryos. **New Biomed Science**, v. 1, p. 15-25, 2001.

NICHELMANN, M.; LANGE, B.; PIROW, R.; LANGBEIN, J. e HERRMANN, S. Avian thermoregulation during the perinatal period. In: ZEISBERGER, E.;

SCHOENBAUM, E. e LOMAX, P. **Thermal balance in health and disease**. APS Advances in Pharmacological Sciences. Birkhäuser Basel, p. 167-173, 1994.

NICHELMANN, M.; TZSCHENTKE, B. Efficiency of thermoregulatory control elements in precocial poultry embryos. **Avian and Poultry Biology Reviews**, v. 14, n. 1, p. 1-19, 2003.

NICHELMANN, M.; TZSCHENTKE, B. Epigenetic temperature adaptation in avian species: Influence of temperature stimulation during the last days of incubation on thermoregulatory responses in Muscovy duck (*Cairina moschata*). **Journal of Thermal Biology**, v. 24, p. 469-475, 1999.

NICHELMANN, M.; TZSCHENTKE, B. Ontogeny of thermoregulation in precocial birds. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A**, v. 14, n. 1, p. 751-763, 2002.

OHLSSON, C.; NILSSON, A.; ISAKSSON, O.; BENTHAM, J.; LINDAHL, A. Effects of triiodothyronine and insulin-like growth factor-I on alkaline phosphatase activity and chondrocyte differentiation. **Journal of Endocrinology**, v. 135, p. 115-123, 1992.

OKE, O. E.; ALO, E. T.; OKE, F. O.; OYEBAMIJI, Y. A.; IJAIYA, M. A.; ODEFEMI, M. A.; ... ONAGBESAN, O. M. Manipulação térmica em idade precoce no desempenho e resposta fisiológica de frangos de corte em clima tropical quente e úmido. **Journal of Thermal Biology**, v. 88, p. 102517, 2020

OLIVEIRA, J. E.; DRUYAN S.; UNI, Z.; ASHWELL, C. M. e FERKET, P. R. Metabolic profiling of late-term turkey embryos by microarrays. **Poultry Science**, v. 92, p. 1011-1028, 2013.

OLIVEIRA, J. E.; UNI, Z.; FERKET, P. R. The role of in ovo nutrition in poultry breeders: impact on embryo development and post-hatch performance. **World's Poultry Science Journal**, v. 71, n. 4, p. 631-640, 2015.

OLIVEIRA, R. F.; *et al.* Influence of growth hormone and IGF system on the skeletal development in broilers. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 10, n. 4, p. 215-221, 2008.

OLSEN, B. R.; REGINATO, A. M.; WANG, W. Bone development. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 16, p. 191-220, 2000.

OVIEDO-RONDÓN, E. O.; MURAKAMI, A. E. Fatores que interferem no desenvolvimento embrionário e seus efeitos nos problemas metabólicos pós-eclosão em frangos de corte. **Acta Scientiarum**, v. 20, n. 30, p. 373-382, 1998.

OZNURLU, Y.; SUR, E.; OZAYDIN, T.; CELIK, I.; ULUISIK, H. The effects of high incubation temperature on tibial growth plate development in broilers. **Poultry Science**, v. 95, n. 1, p. 220-229, 2016.

PARSONS, J. A.; POTTS JÚNIOR, J. T. Physiology and chemistry of parathyroid hormone. **Clinics in Endocrinology and Metabolism**, v. 3, p. 533-556, 1974.

PARSONS, J. A.; POTTS JÚNIOR, J. T. Physiology and chemistry of parathyroid hormone. **Clinics in Endocrinology and Metabolism**, v. 1, p. 33-78, 1972.

PECHAK, D. G.; HOGAN, B. L. M.; CAPLAN, A. I. Differentiation of chick limb bud mesenchymal cells in micromass culture: Chondrogenesis and osteogenesis. **Developmental Biology**, v. 111, p. 395-409, 1986a.

PECHAK, D. G.; HOGAN, B. L. M.; CAPLAN, A. I. Osteogenesis in chick limb bud mesenchymal cell cultures. **Developmental Biology**, v. 118, p. 33-38, 1986b.

PECHAK, D. G.; KUJAWA, M. J.; CAPLAN, A. I. Morphology of bone development and bone remodeling in embryonic chick limbs. **Bone**, v. 7, p. 459-472, 1986.

PIESTUN, Y.; DRUYAN, S.; BRAKE, J.; YAHAV, S. Thermal manipulations during broiler incubation alter performance of broilers to 70 days of age. **Poultry Science**, v. 92, n. 5, p. 1155-1163, 2013.

PIESTUN, Y.; HALEVY, O.; YAHAV, S. Thermal manipulations of broiler embryos - The effect on thermoregulation and development during embryogenesis. **Poultry Science**, v. 88, p. 2677-2688, 2009.

PIESTUN, Y.; HALEVY, O.; YAHAV, S. Thermal manipulations during broiler embryogenesis improves post-hatch performance under hot conditions. **Journal of Thermal Biology**, v. 36, n. 7, p. 469-474, 2011.

PIESTUN, Y.; SHINDER, D.; RUZAL, M.; HALAVY, O.; BRAKE, J. e YAHAV, S. Thermal manipulations during broiler embryogenesis: effect on the acquisition of thermotolerance. **Poultry Science**, v. 87, p. 1516-1525, 2008.

PIESTUN, Y.; ZIMMERMAN, I.; YAHAV, S. Thermal manipulations of turkey embryos: The effect on thermoregulation and development during embryogenesis. **Poultry Science**, v. 94, p. 273-280, 2015.

PIZAURO JUNIOR, J. M.; GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J. Regulação do metabolismo ósseo por hormônios e íons inorgânicos. *In*: MACARI, M.; MAIORKA, A. **Fisiologia das aves comerciais**. Jaboticabal: Funep, 2017a. p. 516-530.

PIZAURO JUNIOR, J. M.; SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M. Estrutura e função do tecido ósseo. *In*: MACARI, M.; MAIORKA, A. **Fisiologia das aves comerciais**. Jaboticabal: Funep, 2017b. p. 492-513.

PROFF, P.; RÖMER, P. The molecular mechanism behind bone remodeling: A review. **Clinical Oral Investigations**, v. 13, p. 355-362, 2009.

PROSZDOWIEC-WEGLARZ, M.; ANGEL, R. Calcium and phosphorus metabolism in broilers: Effect of homeostatic mechanism on calcium and phosphorus digestibility. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, p. 609-627, 2013.

RENAUDEAU, D.; COLLIN, A.; YAHAV, S.; DE BASILIO, V.; GOURDINE, J. L.; COLLIER, R. J. Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. *Animal* 6, 707-728, 2012.

RICHARDS M.P., STEELE N.C. Trace element metabolism in the developing avian embryo: a review. **Journal of Experimental Zoology**; S1, p. 39-51, 1987.

RICHARDS, M. P. Trace mineral metabolism in the avian embryo. **Poultry Science**, v. 76, p. 152-164, 1997.

RICHARDS, M. P.; PACKARD, G. C. Mineral metabolism in avian embryos. **Poultry Science**, v. 75, p. 116-125, 1996.

ROACH, H. I. New aspects of endochondral ossification in the chick: chondrocyte apoptosis, bone formation by former chondrocytes, and acid phosphatase activity in the endochondral bone matrix. **The Journal of Bone and Mineral Research**, v. 12, p. 795-805, 1997.

ROACH, H. I.; SHEARER, J. R. Cartilage resorption and endochondral ossification in the femoral head of the chick. **Bone and Mineral**, v. 6, n. 1, p. 55-65, 1989.

ROBINSON, R. The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. **Biochemistry Journal**, v. 17, p. 286-293, 1923.

ROBSON, H.; ANDERSON, E.; SHAPIRO, D. N.; LAURENT, G. J. Growth hormone and IGF-I as regulators of bone growth: mechanisms of action and implications for disorders of growth. **Journal of Endocrinology**, v. 172, p. 13-24, 2002.

ROCHA, J. S. R.; VITALE, J.; LEONI, G. B.; RIOS, L. R.; NUNES, H. R. C. Efeito da dexametasona, diazóxido e insulina sobre a proliferação de condrócitos em cultura e crescimento do osso metatarsiano de embriões de pintos. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 70, p. 1-7, 1998.

ROMANOFF, A. L. *Biochemistry of the avian embryo: a quantitative analysis of prenatal development*. New York: Interscience Publishers, 1967.

ROMANOFF, A. L. *The avian embryo: structural and functional development*. New York: Macmillan, 1960.

ROMANOFF, A. L.; ROMANOFF, A. J. *Pathogenesis of the avian embryo: an analysis of causes of malformations and prenatal death*. New York: Wiley, 1967.

RUCH, J. V.; BOURRAT, J. C. Effects of triiodothyronine and epidermal growth factor on chondrogenesis and osteogenesis in cultured embryonic mouse mandibles. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 2, p. 35-42, 1987.

RYAN, J. W.; ANDERSON, P. H.; MORRIS, H. A. Pleiotropic activities of vitamin D receptors – Adequate activation for multiple health outcomes. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 36, p. 53-61, 2015.

SHAO, Y. Y.; WANG, L.; BALLOCK, R. T. Thyroid hormone and the growth plate. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v. 7, p. 265-271, 2006.

SHAO, Y.; HE, M.; ZHOU, J.; ZHANG, C. Endochondral ossification and chondrocyte differentiation: molecular signaling pathways. **International Journal of Developmental Biology**, v. 51, n. 5, p. 455-467, 2007.

SHIM, M. Y.; PESTI, G. M. Effects of incubation temperature on the bone development of broilers. **Poultry Science**, v. 90, p. 1867-1877, 2011.

SHIMAMOTO, S.; NAKASHIMA, K.; KAMIMURA, R.; KOHROGI, R.; INOUE, H.; NISHIKOBA, N.; OHTSUKA, A.; IJIRI, D. Insulin acutely increases glucose transporter 1 on plasma membranes and glucose uptake in an AKT-dependent manner in chicken adipocytes. **General and Comparative Endocrinology**, v. 283, artigo 113232, 2019.

SHOKRANEH, M.; SADEGHI, A. A.; MOUSAVI, S. N.; ESMAEILKHANIAN, S.; CHAMANI, M. Effects of in ovo injection of nano-selenium and nano-zinc oxide and high eggshell temperature during late incubation on antioxidant activity, thyroid and glucocorticoid hormones and some blood metabolites in broiler hatchlings. **Acta Scientiarum**, v. 42, artigo e46029, 2020.

SILVA, T. P. B. Técnica de manipulação térmica pré-natal: efeitos sobre o rendimento de incubação e características morfofisiológicas de pintos de corte. 2018. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2018.

SILVA, T. P. B.; FRANCA, T. N.; MARTINS, L. K. S. A.; MERCES, N. B.; SOUZA, V. H. B.; MORITA, V. S.; BARBOSA, V. M. Parâmetros hemogasométricos de pintos de corte termicamente tratados. In: Conferência Facta Wpsa-Brasil, 2019, Campinas. **Conferência Facta Wpsa-Brasil 2019**. Campinas, 2019.

Silva, T. P. B.; Franca, T. N.; Martins, L. K. S. A.; Mercês, N. B.; Oliveira Filho, A. A.; Morita, V. S.; Barbosa, V. M. efeitos da manipulação térmica pré-natal sobre parâmetros bioquímicos de pintos de corte. In: Conferência Facta Wpsa Brasil, 2018, Campinas. **Conferência Facta Wpsa Brasil 2018**. Campinas, 2018.

SILVA, T. P. B.; FRANCA, T. N.; MARTINS, L. K. S. A.; MERCES, N. B.; OLIVEIRA FILHO, A. A.; MORITA, V. S.; BARBOSA, V. M. Efeitos da manipulação térmica pré-natal sobre o peso dos órgãos e a qualidade de pintos de corte. In: Conferência Facta Wpsa-Brasil, 2019, Campinas. **Conferência Facta Wpsa-Brasil**, Campinas, 2019.

SILVA, T. P. B.; FRANCA, T. N.; MARTINS, L. K. S. A.; MERCES, N. B.; CHAVES, N. M.; MORITA, V. S.; BARBOSA, V. M. Efeitos da manipulação térmica pré-natal sobre os parâmetros zootécnicos de pintos recém-eclodidos. In: Conferência Facta Wpsa-Brasil, 2019, Campinas. **Conferência Facta Wpsa-Brasil**. Campinas, 2019.

SIMKISS, K. Calcification in avian eggshells. **Biological Reviews**, v. 36, n. 4, p. 321-367, 1961.

SIMON, E.; PIERAU, F. K.; TAYLOR, D. C. M. Central and peripheral thermal control of effectors in homeothermic temperature regulation. **Physiology Review**, v. 66, p.235–300, 1986.

SPIEKER, R.; *et al.* Avian axial skeleton: its evolution and diversification. **Journal of Morphology**, v. 281, p. 456-469, 2020.

SZELESZCZUK, T.; CEBULSKA, A.; PIETRZYKOWSKA, E. Mineralization dynamics in the avian skeleton during incubation. **Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 26, n. 3, p. 583-589, 2016.

TAZAWA, H. e WHITTOW, G. C. Incubation physiology. In: WHITTOW, G. C. **Sturkey's Avian Physiology**, Fifth edition, Academic Press, p. 617-634, 2000.

THOMMES, R.C.; CALIENDO, J. e WOODS, J. E. Hypothalamo-denohypophysealthyroid interrelationships in the developing chick embryo. VII. Immunocytochemical demonstration of thyrotrophin-releasing hormone. **General and Comparative Endocrinology**, v. 57, p. 1-9., 1985.

THRAILKILL, K. M.; LUMPKIN JR, C. K.; BUNN, R. C.; KEMP, S. F.; FOWLKES, J. L. Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 289, n. 5, p. E735-E745, 2005.

TONA, K.; ONAGBESAN, O. M.; BRUGGEMAN, V.; MERTENS, K.; DECUYPERE, E. Effects of high incubation temperature on embryonic development, the hatching process, and metabolism in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 82, n. 3, p. 508-514, 2003.

TORRES, C. A.; KORVER, D. R. Influence of trace mineral nutrition and maternal flock age on broiler bone development. **Poultry Science**, v. 97, n. 7, p. 2996-3006, 2018.

TUAN, R. S. Calcitrophic hormones and calcium regulation in the chick embryo. **Poultry Science**, v. 66, n. 12, p. 1757-1763, 1987.

TUAN, R. S. Calcium transport and related functions in the chorioallantoic membrane of cultured shell-less chick embryos. **Developmental Biology**, v. 74, p. 196-204, 1980.

TUAN, R. S. Vitamin K-dependent  $\gamma$ -glutamyl carboxylase activity in the chick embryonic chorioallantoic membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, p. 1356-1364, 1979.

TUAN, R. S.; KNOWLES, A. Calcium-binding proteins and ATPase activity in avian eggshell transport. **Journal of Cell Science**, v. 86, p. 337-346, 1986b.

TUAN, R. S.; ONO, T. Regulation of extraembryonic calcium mobilization by the developing chick embryo. **Development**, v. 96, p. 169-182, 1986.

TUAN, R.S.; CARSON, M.J.; JOZEFIAK, J.A.; KNOWLES, K.A. SHOTWELL, B.A. Calcium-transport function of the chick embryonic chorioallantoic membrane. II functional involvement of calcium-binding protein,  $\text{Ca}^{2+}$ -Atpase and carbonic anhydrase. **Journal Cell Science**, v. 82, p. 85-97, 1987.

TULLETT, S. G. Investigations into the porosity of avian eggshells using scanning electron microscopy. **International Journal of Avian Science**, v. 130, p. 233-242, 1988.

TÜRKAY, M. Ultraviolet microscopic and electron microscopic studies on the mesonephric nephron during incubation and posthatching periods in chick. **Poultry Science**, v. 58, n. 2, p. 344-349, 1979.

TZSCHENTKE B. Attainment of thermoregulation as affected by environmental factors. **Poultry Science**, v. 86, p.1025-1036, 2007.

TZSCHENTKE, B. Influence of prenatal temperature adaptation on thermoregulation in birds. **Journal of Thermal Biology**, v. 32, p. 102-108, 2007.

TZSCHENTKE, B.; BASTA D. Early development of neuronal hypothalamic thermosensitivity in birds: influence of epigenetic temperature adaptation. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A**, v. 131, p.825-832, 2002.

TZSCHENTKE, B.; HALLE, I. Influence of temperature stimulation during the last 4 days of incubation on secondary sex ratio and later performance in male and female broiler chicks. **British Poultry Science**, v. 50, n. 5, p. 634-640, 2009.

TZSCHENTKE, B.; NICHELMANN, M. Ontogeny of thermoregulation in precocial birds. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 131, n. 4, p. 751-763, 2002.

TZSCHENTKE, B.; PLAGEMANN, A. Imprinting and critical periods in early development. **World's Poultry Science Journal**, v. 62, n. 4, p. 603-612, 2006.

TZSCHENTKE, B.; RUMPF, M. Embryonic development of endothermy. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 178, n. 1, p. 97-107, 2011.

TZSCHENTKE, B.; TATGE, S. Incubação circadiana. “Treinamento térmico” embrionário para a robustez em aves. In: MACARI, M.; GONZALES, E.; PATRÍCIO, I. S.; NÄÄS, I. A.; MARTINS, P. C. **Manejo de incubação**. 3. ed., São Paulo: FACTA, 2013. 465p. cap. 2.4 p. 135-142.

UNI, Z.; FERKET, P. R. Methods for early nutrition and their potential. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, n. 1, p. 101-111, 2004.

UNI, Z.; YADGARY, L.; YAIR, R. Nutritional limitations during poultry embryonic development. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 21, p. 175-184, 2012.

VAN DE VEN, L. J. F.; VAN WAGENBERG, A. V.; DE GROOT, H.; DECUYPERE, E.; KEMP, B.; VAN DEN BRAND, H. Effects of egg position during incubation, heat production, and embryonic mortality. **Poultry Science**, v. 90, p. 2341-2347, 2011.

VAN DE VEN, L. J. F.; VAN WAGENBERG, A. V.; DECUYPERE, E.; KEMP, B.; VAN DEN BRAND, H. Perinatal broiler physiology between hatching and chick collection in 2 hatching systems. **Poultry Science**, v. 90, p. 1258-1266, 2011.



VAN DEN BRAND, H.; MEIJERHOF, R.; HEETKAMP, M. J. W.; VAN DEN ANKER, I.; OOMS, M.; KEMP, B.; MOLENAAR, R. Interaction between eggshell temperature and carbon dioxide concentration after day 8 of incubation on broiler chicken embryo development. **Animal**, v. 15, n. 6, p. 100223, 2021.

VAN DEN BRAND, H.; VAN DE KRAATS, S. J. F.; SÖZCÜ, A.; JÖERISSEN, R.; HEETKAMP, M. J. W.; VAN DEN ANKER, I.; OOMS, M.; KEMP, B. Both the rooster line and incubation temperature affect embryonic metabolism and hatchling quality in laying hen crossbreds. **Poultry Science**, v. 92, p. 2632–2640, 2019.

VAN DER EERDEN, B. C. J.; KARPERIEN, M.; WIT, J. M. Systemic and local regulation of the growth plate. **Endocrine Reviews**, v. 24, n. 6, p. 782-801, 2003.

VAN DER POL, C. W., I. A. M. VAN ROOVERT-REIJRINK, C. M. MAATJENS, I. VAN DEN ANKER, B. KEMP; H. VAN DEN BRAND. Effect of eggshell temperature throughout incubation on broiler hatchling leg bone development. **Poultry Science**, v. 93, p. 2878–2883. 2014.

VASCONCELOS, T. C.; BARROS, R. L.; FERNANDES, G. V. The relationship between alkaline phosphatase and bone metabolism. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 17, n. 5, p. 341-346, 2011.

VIEIRA, S. L. Chicken embryo utilization of egg micronutrients. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 9, p. 1–8, 2007.

VINOTH, A.; THIRUNALASUNDARI, T.; SHANMUGAM, M.; UTHRAKUMAR, A.; SUJI, S.; RAJKUMAR, U. Evaluation of DNA methylation and mRNA expression of heat shock proteins in thermal manipulated chicken. **Cell Stress and Chaperones**, v. 23, n. 2, p. 235-252, 2018.

WIDEMAN, R. J.; BLANKENSHIP, J.; PEVZNER, I.; TURNER, B. Efficacy of 25-OH vitamin D3 prophylactic administration for reducing lameness in broilers grown on wire flooring. **Poultry Science**, v. 94, p. 1821–1827, 2015.

WILLEMSSEN, H.; KAMERS B.; DAHLKE, F.; HAN, H.; SONG, Z.; ANSARI, Z.; PISARAEI, Z. A.; TONA, K.; DECUYPERE, E.; EVERAERT, N. High and low temperature manipulation during late incubation: Effects on embryonic development, the hatching process, and metabolism in broilers. **Poultry Science**, v. 89, p. 2678-2690, 2010.

WILLEMSSEN, H.; LI, Y.; WILLEMS, E.; FRANSSENS, L.; WANG, Y.; DECUYPERE, E.; EVERAERT, N. Intermittent thermal manipulations of broiler embryos during late incubation and their immediate effect on the embryonic development and hatching process. **Poultry Science**, v. 90, p. 1302-1312, 2011.

WILSON, H. R. 1997. Effects of maternal nutrition on hatchability. **Poultry Science**, v. 76, p. 134-143, 1997.

WINELAND, M. J.; MANN, K. M.; FAIRCHILD, B. D. e CHRISTENSEN, V. L. Effect of different setter and hatcher temperatures upon the broiler embryo. **Poultry Science**, v. 79, p.123. (Abstr.), 2000.

WISE, P. M.; FRYE, B. E. Functional development of the hypothalamo-hypophyseal-adrenal cortex axis in chick embryo, *Gallus domesticus*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 185, p. 277–292, 1975.

WOLFF, R. B.; GOMES, R. C. T.; VERNA, C.; MAIORAL, G. C. C. C.; RAMPAZO, T. C.; SIMÕES, R. S.; BARACT, E. C.; SOARES JÚNIOR, J. M. Molecular features of sexual steroids on cartilage and bone. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 4, p. 493-497, 2012.

WUTHIER, R. E.; LIPSCOMB, G. F. Matrix vesicles: structure, composition, formation and function in calcification. **Front Biosci**, v. 16, n. 8, p. 2812-2902, 2011.

XU, P.; LIN, H.; JIAO, H.; ZHAO, J.; WANG, X. Chicken embryo thermal manipulation alleviates postnatal heat stress-induced jejunal inflammation by inhibiting transient receptor potential V4. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 256, p. 114851, 2023.

YADGARY, L.; KEDAR, O.; UNI, Z. Nutrient transport and metabolism in the avian embryo during incubation. **Journal of Animal Science**, v. 92, n. 3, p. 987-996, 2014.

YAHAV, S.; ALTERMAN, A. L.; DUDU, A.; SHINDER, D. Timing of heat conditioning during embryogenesis: an effective tool for improving post-hatch thermotolerance in broilers. **Poultry Science**, v. 83, p. 958-964, 2004.

YAHAV, S.; COLLIN, A.; SHINDER, D.; PICARD, M. Thermal manipulations during broiler chicken embryogenesis: Effects on the acquisition of thermotolerance. **Poultry Science**, v. 83, n. 12, p. 1959-1968, 2004.

YAHAV, S.; HURWITZ, S. Induction of thermotolerance in male broiler chickens by temperature conditioning at an early age. **Poultry Science**, v. 75, p. 402-406, 1996.

YAHAV, S.; LUGER, D.; PIKEH, S.; BELO, S.; RAZPA, H. Thermoregulation in naked neck chickens subjected to different ambient temperatures. **British Poultry Science**, v. 43, p. 331-338, 2002.

YAHAV, S.; MCMURTRY, J. P. Thermoregulation in poultry: The role of heat shock proteins. **Poultry Science**, v. 83, n. 12, p. 1959-1970, 2004.

YAHAV, S.; MCMURTRY, J. P. Thermoregulatory Responses of Broiler Chickens to Temperature Acclimation. **Poultry Science**, v. 80, n. 6, p. 1026-1033, 2001.

YAHAV, S.; SHINDER, D.; TANNY, J.; COHEN, S. The effect of thermal manipulations during the development of broiler chickens on the acquisition of thermotolerance. **Journal of Thermal Biology**, v. 29, n. 2, p. 171-177, 2004b

YAHN, P.; GREENSADE, S.; LLOYD, C. W. Testosterone interaction with sex steroid and thyroxine receptors in brain and pituitary. **Brain Research**, v. 95, n. 3, p. 438-441, 1975.

YAIR, R.; UNI, Z. Content and uptake of minerals in the yolk of broiler embryos during incubation and their effect on bone development. **Poultry Science**, v. 90, n. 7, p. 1523-1531, 2011.

YALÇIN, S.; BRUGGEMAN, V.; BUYSE, J.; DECUYPERE, E.; ÇABUK, M. e SIEGEL, P.B. Acclimation to heat during incubation: 4. Blood hormones and metabolites in broilers exposed to daily high temperatures. **Poultry Science**, v. 88, p. 2006-2013, 2009.

YALÇIN, S.; ÇABUK, M.; BRUGGEMAN, V.; BABACANOLGLU, E.; BUYSE, J.; DECUYPERE, E. e SIEGEL, P. B. Acclimation to heat during incubation: 1. Embryonic morphological traits, blood biochemistry, and hatching performance. **Poultry Science**, v. 87, p. 1219-1228, 2008a.

YALÇIN, S.; ÇABUK, M.; BRUGGEMAN, V.; BABACANOLGLU, E.; BUYSE, J.; DECUYPERE, E. e SIEGEL, P. B. Acclimation to heat during incubation: 2. Embryo composition and residual egg yolk sac fatty acid profiles in chicks. **Poultry Science**, v. 87, p. 1229-1236, 2008b.

YALÇIN, S.; MOLAYOGLU, H. B.; BAKA, M.; GENIN, O.; PINES, M. Effect of temperature during the incubation period on tibial growth plate chondrocyte differentiation and the Incidence of tibial dyschondroplasia. **Poultry Science**, v.86, p.1772-1783, 2007.

YALÇIN, S.; OZCAN, S.; SIEGEL, P.; YENISEY, Ç.; AKSIT, M. Manipulation of incubation temperatures to increase cold resistance of broilers: Influence on embryo development, organ weights, hormones and body composition. **Journal of Poultry science**, v. 49, p. 133-139, 2012.

YALÇIN, S.; ÖZKAN, S.; ÇABUK, M.; BUYSE, J.; DECUYPERE, E. Pre- and postnatal conditioning strategies to improve poultry performance under challenging environments. **World's Poultry Science Journal**, v. 66, p. 65-76, 2010.

YALÇIN, S.; SIEGEL, P. B. Exposure to cold or heat During incubation on developmental stability of broiler embryos. **Poultry Science**, v. 82, p. 1388-1392, 2003.

YALIN, S.; ÖZKAN, S.; TURKMUT, L.; SIEGEL, P. B. Responses to heat stress in commercial and local broiler stocks 1. Changes in weights of body and internal organs. **British Poultry Science**, v. 42, p. 149-156, 2001.

YANG, L.; TAN, G. Y.; FU, Y. Q.; FENG, J. H.; ZHANG, M. H. Effects of acute heat stress and live weight on broiler thermophysiological responses. **Poultry Science**, v. 89, p. 2573-2580, 2010.

YANG, L.; ZHANG, H.; WANG, Y.; ZHU, X.; LIU, Y.; YIN, H. The effects of different calcium sources on performance and bone parameters of broilers. **Poultry Science**, v. 93, n. 1, p. 65-73, 2014.

YILDIRIM, I. e YETISIR, R. Effects of different hatcher temperatures on hatching traits of broiler embryos during the last five days of incubation. **South African Journal of Animal Science**, v. 34, n. 4, p.211-216, 2004.

ZABOLI, G.; RAHIMI, S.; SHARIATMADARI, F.; TORSHIZI, M. A. K.; BAGHBANZADEH, A.; MEHRI, M. Thermal manipulation during Pre and Post-Hatch on thermotolerance of male broiler chickens exposed to chronic heat stress. **Poultry Science**, v. 96, p. 478-485, 2017.

ZEMKOVÁ, L.; ZITA, L.; FIALA, T.; FIALOVÁ, M.; TŮMOVÁ, E. Changes in the egg quality of layers in different housing systems. **Czech Journal of Animal Science**, v. 52, p. 342-345, 2007.

ZIMMERMAN, C.; BRUGGEMAN, V.; TONA, K.; DE SMET, S.; DECUYPERE, E. Egg handling and storage in relation to hatchability. **World's Poultry Science Journal**, v. 65, p. 600-620, 2009.