

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

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO SOBRE O
DESENVOLVIMENTO ÓSSEO DE EMBRIÕES E PINTOS DE CORTE
RECÉM-ECLODIDOS**

IZABELA LORENA AZEVEDO

**SALVADOR - BAHIA
AGOSTO - 2022**



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

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO SOBRE O
DESENVOLVIMENTO ÓSSEO DE EMBRIÕES E PINTOS DE CORTE
RECÉM-ECLODIDOS**

IZABELA LORENA AZEVEDO
Zootecnista

**SALVADOR - BAHIA
AGOSTO - 2022**

IZABELA LORENA AZEVEDO

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO SOBRE O
DESENVOLVIMENTO ÓSSEO DE EMBRIÕES E PINTOS DE
CORTE RECÉM-ECLODIDOS**

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

Coorientadora: Prof. Dr. Juliana Cantos Faveri

SALVADOR - BA

AGOSTO - 2022

Azevedo, Izabela Lorena.

Influência da temperatura de incubação sobre o desenvolvimento ósseo de embriões e pintos de corte recém-eclodidos / Izabela Lorena Azevedo. - 2022.

121 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Michalsky Barbosa.

Coorientadora: Profa. Dra. Juliana Cantos Faveri.

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Salvador, 2022.

1. Zootecnia. 2. Produção animal. 3. Eclodibilidade. 4. Ovos - Incubação. 5. Ossos - Crescimento. 6. Ossificação. I. Barbosa, Vanessa Michalsky. II. Universidade Federal da Bahia. Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

CDD - 636.5

CDU - 636.5

IZABELA LORENA AZEVEDO

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO SOBRE O
DESENVOLVIMENTO ÓSSEO DE EMBRIÕES E PINTOS DE CORTE
RECÉM-ECLODIDOS**

Tese defendida e aprovada pela Comissão Examinadora em 19 de agosto de 2022.

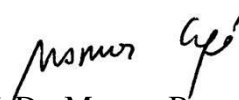
Comissão Examinadora:



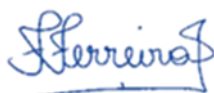
Prof. Dra. Vanessa Michalsky Barbosa
UFBA
Presidente



Prof. Dr. Leonardo José Camargos Lara
UFMG



Prof. Dr. Marcos Barcellos Café
UFG



Prof.ª. Dr.ª. Fabiana Ferreira
UFMG



Prof. Dr. Fúlvio Viegas Santos Teixeira
de Melo
IF Baiano

**SALVADOR - BA
AGOSTO – 2022**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Sebastião e Suzana, que sempre me apoiaram e me deram suporte para chegar onde cheguei.

Às minhas irmãs Taís e Ravena, pela amizade e incentivo.

Ao meu esposo Natan, por estar ao meu lado todos esses anos e me amparar nos momentos mais difíceis.

Ao meu filho Bento que ainda vai nascer, mas que me deu forças e serenidade para construir esse trabalho.

A toda minha família, pelo amor e pela torcida, mesmo estando distantes.

À minha orientadora Prof^a Vanessa Michalsky, por todos os ensinamentos passados ao longo de todos esses anos.

Ao meu grupo de pesquisa NUPIA, Taís Borges, Tayana França, Nayana Mercês, Larissa Kiana, e Vanessa Michalsky, pelos anos de estudos, aprendizado e amizade.

Aos professores e servidores da escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA.

Ao pessoal do laboratório de Química e Farmácia da UFBA, pela colaboração.

Ao professor Luís Vitor Vidal pela contribuição nas análises estatísticas.

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

À Viviane Morita e à Unesp, pela cooperação e ajuda com o projeto.

Aos membros da comissão examinadora, prof. Leonardo Lara, prof. Marcos Café, prof^a. Fabiana Ferreira e prof. Fúlvio Viegas por aceitarem fazer parte deste trabalho.

Aos meus amigos, pelo suporte emocional ao longo de todos esses anos de formação.

Ao IFBaiano pela concessão da licença.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação e sobretudo, para a realização dessa pesquisa, meu muito obrigada!

Influência da temperatura de incubação sobre o desenvolvimento ósseo de embriões e pintos de corte recém-eclodidos

RESUMO

A temperatura de incubação controla o desenvolvimento embrionário e provavelmente tem efeito sobre a formação e crescimento do esqueleto, que se inicia durante a embriogênese. Assim, nosso objetivo com esse trabalho foi avaliar se variações de temperatura da casca (acima ou abaixo da recomendada) durante a fase intermediária da embriogênese afetam o rendimento de incubação, a qualidade dos pintos, a utilização de minerais a partir dos componentes do ovo e o desenvolvimento ósseo de embriões e pintos. Foram incubados 2408 ovos de matrizes Cobb 500[®] com 45 semanas em quatro diferentes temperaturas de casca (TCO): 1) Controle (TCO de 37,8°C durante toda a incubação); 2) TCO baixa (36,7°C entre os dias 8 e 18,5 de incubação); 3) TCO alta (38,9°C entre os dias 8 e 18,5 de incubação) e 4) TCO muito alta (39,4°C entre os dias 8 e 18,5 de incubação). Foram avaliados o rendimento da incubação (perda de peso do ovo, mortalidade, fertilidade, eclodibilidade, refugagem), a qualidade de pinto (peso e comprimento, peso do corpo sem gema, peso de gema residual, peso relativo de órgãos, escore de umbigo), os parâmetros da casca (peso, espessura, cálcio, fósforo, manganês e magnésio), da gema (Ca, P, Mn e Mg), do sangue (Ca, P, hormônios T₃, T₄, PTH, calcitonina e vitamina D₃, Fosfatase Alcalina) e do osso (Ca, P, Mn, Mg, morfometria, cinzas, calcificação e resistência). A temperatura de incubação afetou a maioria das variáveis analisadas. O rendimento da incubação foi impactado negativamente por todas as alterações de TCO, sendo a TCO muito alta a que mais prejudicou os índices avaliados, seguida da TCO baixa ($p \leq 0,05$). O peso relativo de órgãos foi influenciado negativamente pelo aumento da temperatura ($p \leq 0,05$). A TCO baixa, alta e muito alta promoveram redução na qualidade dos pintos; na utilização dos minerais da casca e da gema; nos minerais do sangue e da tíbia; prejuízo às características ósseas e diminuição nos hormônios tireoideanos, no PTH e na vitamina D₃ ($p \leq 0,05$). Para todas essas variáveis a TCO muito alta causou os **piores** resultados. A calcitonina aumentou igualmente na TCO alta e muito alta ($p \leq 0,05$). A Fosfatase Alcalina foi aumentada apenas pela TCO muito alta ($p \leq 0,05$). Altas temperaturas prejudicaram de forma mais acentuada a mobilização e utilização de minerais a partir dos componentes do ovo, os hormônios calciotrópicos e conseqüentemente o desenvolvimento ósseo durante a incubação. Variações de temperatura da casca (acima ou abaixo da recomendada) durante a fase intermediária da embriogênese reduzem o rendimento de incubação e a qualidade dos pintos.

Palavras-chave: Calcitonina, Eclodibilidade, Fêmur, Mineralização, PTH, Tíbia, Vitamina D.

Influence of incubation temperature on broiler embryo bone development

ABSTRACT

Incubation temperature controls embryonic development and probably has an effect on skeletal formation and growth, which begins during embryogenesis. Thus, our aim with this work was to evaluate whether variations in eggshell temperature (above or below the recommended) during the middle stage of embryogenesis affect incubation yield, chick quality, utilization of minerals from the egg components and bone development of embryos and hatchlings. 2408 eggs from broiler breeders Cobb 500[®] with 45 weeks of age were incubated at four different eggshell temperatures (EST): 1) Control (EST of 37.8°C during the entire incubation period); 2) low EST (36.7°C between days 8 and 18.5 of incubation); 3) high EST (38.9°C between days 8 and 18.5 of incubation) and 4) very high EST (39.4°C between days 8 and 18.5 of incubation). Incubation yield (egg weight loss, mortality, fertility, hatchability, culling), chick quality (chicken body weight and length, yolk free body mass, residual yolk weight, relative organ weight, navel score), parameters of eggshell (weight, thickness, calcium, phosphorus, manganese and magnesium), yolk (Ca, P, Mn and Mg), blood (Ca, P, hormones T3, T4, PTH, calcitonin and vitamin D₃, Alkaline Phosphatase) and bone (Ca, P, Mn, Mg, morphometry, ash, calcification and strength). The incubation temperature affected most of the analyzed variables. The incubation performance was worsened by all changes in EST, with very high EST being the one that most affected the evaluated indices, followed by low EST ($p \leq 0.05$). The organs relative weight was negatively influenced by the increase in temperature ($p \leq 0.05$). Low, high and very high EST promoted a reduction in chick quality; in the eggshell and yolk minerals utilization; in the blood and tibia minerals; worsening of bone characteristics and decrease in thyroid hormones, PTH and vitamin D₃ ($p \leq 0.05$). For all these variables, the very high EST caused the worst results. Calcitonin increased equally at high and very high EST ($p \leq 0.05$). Alkaline Phosphatase was increased by very high EST ($p \leq 0.05$). High temperatures markedly impaired the mobilization and utilization of minerals from egg components, calcitropic hormones and consequently, bone development during incubation. Eggshell temperature variations (above or below the recommended) during the middle stage of embryogenesis worsen incubation yield and chick quality.

Keywords: Calcitonin, Hatchability, Femur, Mineralization, PTH, Tibia, Vitamin D.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura de um osso longo.....	16
Figura 2.	Ossificação endocondral.....	18
Figura 3.	Regiões anatômicas do disco epifisário.....	20
Figura 4.	Peso do pinto sem gema (YFBM, g) ao longo da incubação em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia.....	70
Figura 5.	Comprimento do pinto (cm) ao longo da incubação em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia.....	71
Figura 6.	Peso da gema (g) ao longo da incubação em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia.....	72
Figura 7.	Peso da casca (g) ao longo da incubação em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia.....	76
Figura 8.	Espessura da casca (g) ao longo da incubação em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia.....	77
Figura 9.	Teor de cálcio (mg) da casca ao longo da incubação em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia.....	78
Figura 10.	Teor de fósforo (mg) da casca ao longo da incubação em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia.....	79
Figura 11.	Teor de manganês (µg) da casca ao longo da incubação em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia.....	80

Figura 12.	Teor de magnésio (mg) da casca ao longo da incubação em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia.....	81
Figura 13.	Teor de cálcio (mg) da gema ao longo da incubação em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia.....	84
Figura 14.	Teor de fósforo (mg) da gema ao longo da incubação em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia.....	85
Figura 15.	Teor de manganês (µg) da gema ao longo da incubação em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia.....	86
Figura 16.	Teor de magnésio (mg) da gema ao longo da incubação em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia.....	87
Figura 17.	Minerais sanguíneos (mmol/L) de pintos de um dia incubados em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre 8° e o 18,5° dia.....	89
Figura 18.	Hormônios sanguíneos (ng/mL) de pintos de um dia incubados em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia.....	91
Figura 19.	Fosfatase Alcalina sanguínea (U/L) de pintos de um dia incubados em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre 8° e o 18,5° dia.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Artigos abordando o efeito da temperatura de incubação sobre o desenvolvimento ósseo.....	50
Tabela 2.	Principais efeitos da temperatura sobre o desenvolvimento ósseo de embriões e frangos de corte.....	53
Tabela 3.	Número de pintos retirados do nascedouro a cada 12 horas.....	56
Tabela 4.	Parâmetros de incubação em temperaturas de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia.....	65
Tabela 5.	Peso do ovo antes da incubação, pesos dos pintos, peso relativo de órgãos e escore de umbigo no momento da eclosão de pintos incubados em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia..	69
Tabela 6.	Composição mineral da tíbia dos embriões aos 18,5 dias e dos pintos recém-eclodidos incubados em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia.....	95
Tabela 7.	Características morfométricas, biofísicas e mecânicas da tíbia dos embriões aos 18,5 dias e dos pintos recém-eclodidos incubados em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia.....	98
Tabela 8.	Características morfométricas, biofísicas e mecânicas do fêmur dos embriões aos 18,5 dias e dos pintos recém-eclodidos incubados em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina trifosfato
Ca	Cálcio
CO ₂	Dióxido de carbono ou gás carbônico
Cu	Cobre
FA	Fosfatase Alcalina
Fe	Ferro
GH	Hormônio do crescimento
Hsp90	Proteína de choque térmico 90
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
K	Potássio
MCA	Membrana corioalantóide
Mn	Manganês
Mg	Magnésio
MSV	Membrana do saco vitelínico
Na	Sódio
NPT2b	Cotransportador de sódio-fosfato
O ₂	Gás oxigênio
PTH	Paratormônio
P	Fósforo
PO ₄ ³⁻	Fosfato
SEM	Erro padrão da média
TNAP	Fosfatase Alcalina de tecido não-específico
T ₃	Triiodotironina
T ₄	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
Zn	Zinco

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO

15

2 REVISÃO DE LITERATURA

16

2.1. DESENVOLVIMENTO ÓSSEO DE EMBRIÕES E FRANGOS DE CORTE 16

2.1.1 O tecido ósseo 16

2.1.2 Desenvolvimento ósseo 17

a) Formação do osso 17

b) Mineralização 18

a) Crescimento ósseo 20

b) Remodelação óssea 21

2.1.3 Hormônios que regulam o desenvolvimento ósseo de aves 21

a) Hormônios tireoidianos 22

b) Hormônio do crescimento 24

c) Insulina 24

d) Hormônios sexuais (estrogênio e testosterona) 25

e) Corticosterona 26

f) Interação entre os hormônios 27

g) Calcitonina 27

h) Paratormônio (PTH) 28

i) Vitamina D₃ 28

j) Interações entre os hormônios reguladores do metabolismo de cálcio e fósforo 30

2.1.4 Utilização dos minerais do ovo para o desenvolvimento ósseo 31

a) Minerais envolvidos na formação óssea 32

b) Minerais da casca 33

c) Minerais da gema 35

d) Minerais do albúmen 37

2.2. TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO 37

a) Temperatura ideal 38

b) Temperatura da máquina x temperatura do embrião 38

c) Fatores que afetam a temperatura do embrião 39

d) Consequências das temperaturas não ideais 40

Temperatura e resultados da incubação 40

Temperatura x metabolismo de nutrientes 40

Temperatura x desenvolvimento embrionário 42

2.3. EFEITOS DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO SOBRE O DESENVOLVIMENTO ÓSSEO DE EMBRIÕES	43
2.3.1 Temperatura alta e o desenvolvimento ósseo na incubação	44
2.3.2 Temperatura baixa e o desenvolvimento ósseo na incubação	48
3 MATERIAL E MÉTODOS	54
3.1 Local	54
3.2 Ovos e tratamentos	54
3.3 Pré-incubação e incubação dos ovos	55
3.4 Nascimento dos pintos	56
3.5 Análises de rendimento de incubação	56
3.5.1 Perda de peso dos ovos durante o período de incubação	56
3.5.2 Mortalidade embrionária e fertilidade	57
3.5.3 Taxa de eclosão total em relação ao número de ovos férteis	57
3.6 Análises em cascas	58
3.7 Análises em gemas e saco vitelínico residual	58
3.8 Análises em embriões e pintos	59
3.8.1 Peso do corpo sem o saco vitelínico residual (YFBM) e comprimento	59
3.8.2 Qualidade de umbigo, peso dos órgãos e dos pintos recém-eclodidos	59
3.8.3 Parâmetros fisiológicos dos pintos de um dia	60
3.8.4 Análises ósseas	61
a) Peso, comprimento e largura dos ossos	61
b) Teste biomecânico	61
c) Análises de cinzas e minerais dos ossos	62
d) Calcificação óssea	62
3.9 Análise Estatística	63
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1 Rendimento de incubação e qualidade dos pintos	63
4.2 Parâmetros de casca e gema	75
4.3 Parâmetros sanguíneos	88
4.4 Análises ósseas	95
5 CONCLUSÕES	103
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES	103
REFERÊNCIAS	105

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos a indústria avícola têm intensificado o melhoramento genético dos frangos de corte, visando alcançar índices zootécnicos superiores. Houve aumento na capacidade do consumo de ração e conversão alimentar e na velocidade e potencial de ganho de peso (YAIR *et al.*, 2012; IPEK; SOZCU, 2016). Entretanto o esqueleto dessas linhagens modernas não foi trabalhado da mesma forma e assim, o rápido ganho de peso associado a fatores como nutrição, ambiência e manejo inadequados podem levar as aves a severos problemas de locomoção que prejudicam o bem-estar, o desempenho e o rendimento ao abate (KESTIN *et al.*, 1992; HAMMOND *et al.*, 2007).

O desenvolvimento ósseo se inicia durante a vida embrionária da ave (GÜZ *et al.*, 2020). A fase intermediária da incubação é especialmente crítica pois é o momento em que os anexos embrionários estão plenamente formados (KERSCHNITZKI *et al.*, 2016), a taxa metabólica e a produção de calor se elevam (LOURENS *et al.*, 2007; MOLENAAR *et al.*, 2013), permitindo que o aproveitamento dos minerais do ovo atinja seu ápice (YAIR; UNI, 2011; HALGRAIN *et al.*, 2022) e assim, que o esqueleto se desenvolva de forma acelerada (TORRES; KORVER, 2018).

Como a temperatura na incubação exerce papel fundamental sobre o metabolismo, o crescimento dos órgãos e do embrião como um todo, é provável que também haja influência deste fator físico sobre os ossos (MORITA *et al.*, 2020). Entretanto, há escassez de pesquisas que abordam o tema e não há consenso sobre os efeitos devido a inúmeras variações nas metodologias aplicadas. Além disso, aspectos cruciais ainda não foram explorados, como o impacto da temperatura sobre os hormônios calciotrópicos, a mobilização dos minerais da casca e da gema e sua utilização pelo embrião, de forma que não é possível traçar um panorama completo sobre a atuação da temperatura de incubação e os mecanismos envolvidos na formação e crescimento dos ossos.

Assim, nosso objetivo com esse trabalho foi avaliar se variações de temperatura da casca (acima ou abaixo da recomendada) durante a fase intermediária da embriogênese afetam o rendimento de incubação, a qualidade dos pintos, a utilização de minerais a partir dos componentes do ovo e o desenvolvimento ósseo de embriões e pintos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. DESENVOLVIMENTO ÓSSEO DE EMBRIÕES E FRANGOS DE CORTE

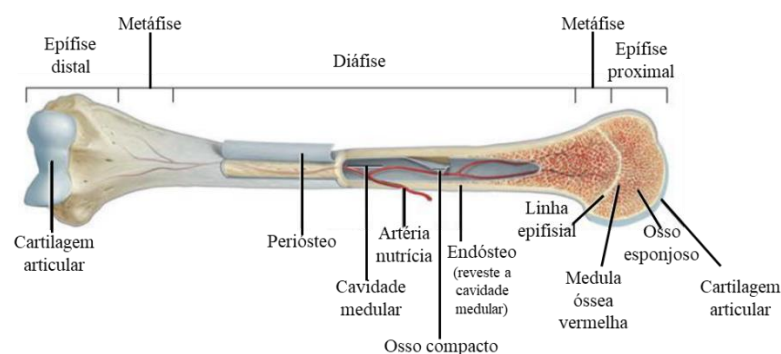
2.1.1 O tecido ósseo

O osso é um tecido multifuncional formado por células vivas e matriz intracelular impregnada em minerais. Suas funções principais são a sustentação da musculatura; proteção dos órgãos internos contra lesões; locomoção e atuação como reservatório de cálcio e fósforo (RATH *et al.*, 2000).

As células que formam o tecido são os osteoblastos e osteócitos, responsáveis pela formação do osso, as células osteoprogenitoras ou osteogênicas, precursoras das duas primeiras e, por fim, os osteoclastos, responsáveis pela reabsorção e remodelação óssea (CLARKE, 2008; YAIR *et al.*, 2012).

Os ossos também podem ser classificados em longos, curtos, pneumáticos, laminares, irregulares e sesamoides. Ossos longos (Figura 1) são aqueles cujo comprimento é maior que a largura e a espessura (fêmur, úmero, rádio, ulna). Visualmente pode ser dividido em partes: a diáfise representa o comprimento do osso formado em sua maioria por tecido ósseo compacto, contendo osso esponjoso apenas delimitando o canal medular; as metáfises são as partes mais largas próximas das extremidades, onde está a área de crescimento mais ativo e podem ocorrer as alterações que se tornarão problemas ósseos; e as epífises são as extremidades formadas por osso esponjoso por dentro e por cartilagem articular por fora (GÜZ, 2022).

Figura 1 – Estrutura de um osso longo



Fonte: TORTORA (2013)

2.1.2 Desenvolvimento ósseo

O esqueleto do embrião começa a se desenvolver logo no início da incubação. Na primeira semana se inicia a formação do osso e na segunda, já é possível observar mineralização (BARBOSA, 2011; GÜZ *et al.*, 2020).

Quando o pintinho nasce o esqueleto já está formado, mas o desenvolvimento não se encerrou. Os ossos ainda crescerão, passarão por constante remodelação interna e eventualmente serão reparados em casos de fraturas (DIBNER *et al.*, 2007). No osso jovem o resultado será o aumento do tamanho e diâmetro. No osso velho, as mudanças ocorrerão internamente sem alteração da forma (LONG; ORNITZ, 2013).

a) Formação do osso

Inicialmente as células mesenquimatosas se aglomeram e elaboram um modelo do futuro tecido ósseo no corpo do embrião em formação. A partir desse molde, os ossos de fato podem se formar por dois métodos distintos: ossificação intramembranosa e endocondral (VAN DER POL *et al.*, 2014; GROVES; MUIR, 2016).

A ossificação intramembranosa ocorre por transformação das células mesenquimatosas em osteoblastos. Estes secretam a matriz óssea e se diferenciam em osteócitos, fazendo surgir uma rede de trabéculas que abrigarão a medula óssea vermelha. Por fim o perióstio é formado, também a partir do mesênquima (CREUZET *et al.*, 2005; SASSO *et al.*, 2021).

A ossificação endocondral, por sua vez, consiste na deposição de tecido ósseo sobre um “modelo” de cartilagem hialina (Figura 2). Condrócitos originados das células mesenquimatosas secretam matriz cartilaginosa e formam o pericôndrio, que é uma camada primordial mais externa do osso em formação. A partir daí ocorre a formação do centro de ossificação primária, na parte média da diáfise. Vasos sanguíneos invadem o tecido trazendo células que se converterão em osteoblastos e formarão um “colar” ao redor da região, que nesse momento já é a camada externa definitiva do osso, passando a ser chamada de perióstio. A matriz é então calcificada, criando trabéculas (redes de osso esponjoso) e a cavidade medular, que abrigará a medula óssea e os vasos sanguíneos. O próximo passo é a calcificação da diáfise, formando o osso compacto. Os centros secundários ocorrem nas epífises, sem um colar perióstico. Toda a cartilagem, com

exceção do disco epifisário e da superfície articular será substituída por osso (LONG; ORNITZ, 2013; WU *et al.*, 2016).

Figura 2 – Ossificação endocondral



Fonte: Blog Ciência à Bessa (2014)

A ossificação ocorre ao longo de toda a incubação, atingindo as maiores taxas de desenvolvimento na última semana (YAIR *et al.*, 2012). Alguns autores demonstram inclusive que eventuais erros na formação dos ossos podem ser corrigidos antes da eclosão (YALÇIN; SIEGEL, 2003).

b) Mineralização

A deposição de minerais no osso, especialmente cálcio e fósforo, confere rigidez ao tecido. Outros minerais traço como o zinco, o cobre, manganês e o magnésio também são essenciais para a adequada formação e manutenção (BHAGAVAN, 2002).

Os minerais dos componentes do ovo devem ser absorvidos para o corpo do embrião e então alocados em vesículas que os convertem e transportam pela corrente sanguínea até o tecido ósseo em formação. O local onde essas vesículas são formadas, porém, ainda é incerto, tendo como possibilidades as células localizadas na gema ou na casca, responsáveis pela absorção de cálcio para o embrião (KERSCHNITZKI *et al.*, 2016).

No organismo o cálcio e o fósforo são encontrados em sua forma orgânica e devem ser transformados em cristais para compor a hidroxiapatita e mineralizar o tecido ósseo em formação. O mecanismo que inicia a conversão desses minerais para sua forma inorgânica ainda não é bem compreendido. Uma das teorias levantadas é a de que a Fosfatase Alcalina (FA) do fluido da cartilagem atua sobre a hexose monofosfato (produto da glicogenólise), gerando fosfato inorgânico e provocando a mineralização dos tecidos (ROBINSON, 1923). A FA é encontrada tanto na cartilagem em calcificação quanto no cérebro, placenta e intestino, embora sejam de tipos diferentes. A dos ossos, rins e fígado é a TNAP (sigla em inglês para Fosfatase Alcalina de tecido não específico) (PIZAURO JÚNIOR *et al.*, 2002). Outros autores defendem que o verdadeiro substrato da FA (localizada na membrana das vesículas extracelulares) seria o pirofosfato, produto da hidrólise do ATP. Essa molécula forneceria o fosfato inorgânico para a formação da hidroxiapatita (CUI *et al.*, 2016).

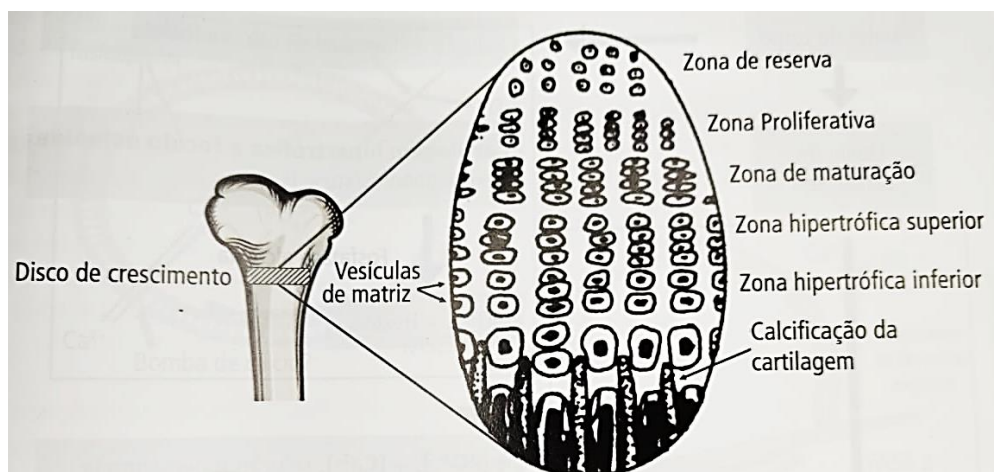
Existe um fenômeno denominado nucleação ou semente, que consiste na formação de um arranjo mineral de cálcio e fosfato que se precipita, graças ao estado metaestável dos íons nos fluidos, saturados de cálcio e fosfato. Na fase 1 o cálcio e o fosfato são transportados para o interior de vesículas extracelulares por canais através das membranas. Na vesícula o cálcio se liga aos lipídios da membrana e às proteínas ligadoras de cálcio. Ao mesmo tempo ocorre a liberação do fosfato pela FA. O aumento dos dois íons gera fosfato de cálcio amorfo, não cristalino, que posteriormente é convertido em microcristais na forma de agulha ou bastão, precursor da hidroxiapatita. Na fase 2 a membrana da vesícula será rompida pelos cristais de hidroxiapatita, que extravasam para o meio e crescem, talvez por contato com o fluido extravascular. O controle da mineralização das vesículas parece sofrer ação da vitamina D₃, dos hormônios calciotrópicos, citocinas e íons metálicos (ANDERSON, 1989; WUTHIER; LIPSCOMB, 2011; PIZAURO JÚNIOR *et al.*, 2017b). A mineralização também se prolonga por toda a incubação, alcançando seu ápice na última semana, quando a força e rigidez dos ossos aumenta significativamente (YAIR *et al.*, 2012).

a) Crescimento ósseo

Existem dois mecanismos através dos quais os ossos crescem: intersticial (aumento do comprimento) e aposicional (espessura) (ROACH, 1997; WILLIAMS *et al.*, 2004). Ambos os processos têm início durante o desenvolvimento embrionário, mas acontecem de forma mais acentuada após a eclosão (YALÇIN *et al.*, 2007).

O crescimento intersticial ocorre a partir das placas epifisárias. Essas placas são divididas em zonas que abrigam condrócitos em diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 3): a) zona de reserva: mais próxima da epífise, contém condrócitos jovens, dispersos e inativos; b) zona de proliferação: condrócitos maiores, que sofrem divisão celular e se acumulam em pilhas; c) zona de hipertrofia: condrócitos em amadurecimento e intensa secreção de matriz e; d) zona de cartilagem calcificada: condrócitos sofrem degeneração e passam a integrar o tecido ósseo, aumentando o comprimento da diáfise. O tempo de vida de um condrócito é aproximadamente 3 dias em aves de crescimento rápido (PECHAK *et al.*, 1986; OZNURLU *et al.*, 2016).

Figura 3 – Regiões anatômicas do disco epifisário



Fonte: PIZAURO JÚNIOR *et al.* (2017b)

Em condições naturais esse processo seguiria até a maturidade sexual, por volta das 30 semanas, quando a placa epifisária será calcificada, encerrando o crescimento ósseo. Porém, frangos de corte são abatidos às 6 semanas, não chegando a completar o desenvolvimento (YALÇIN *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 2018).

Já o crescimento em espessura ocorre a partir do periósteo, onde os osteoblastos passam a produzir matriz, acabam aprisionados nela e se diferenciam em osteócitos. A partir das secreções desses últimos se formam cristas que se fundem circundando os vasos sanguíneos e dando origem ao endósteo (camada interna do osso) e diversas lamelas concêntricas. Essas estruturas organizadas formarão novos ósteons (unidade estrutural do osso compacto), aumentando o diâmetro do osso (PECHAK *et al.*, 1986; APPLGATE; LILBURN, 2002).

b) Remodelação óssea

Ao longo da vida da ave o tecido ósseo velho é continuamente substituído para manter a integridade mecânica do osso ou para equilibrar os níveis de minerais sanguíneos. Esse processo é denominado remodelação óssea e consiste na remoção de minerais, fibras e matriz pelos osteoclastos e deposição desses componentes pelos osteoblastos (PECHAK *et al.*, 1986).

Em condições normais, a quantidade de osso reabsorvida é equilibrada pelo osso formado, sem alteração na homeostase do cálcio. Porém, em aves de crescimento rápido pode haver alteração no processo, fazendo com que ocorra reabsorção maior que a reposição, diminuindo o tecido ósseo mineralizado (YAIR *et al.*, 2012).

Em resumo, o tecido ósseo é composto por células, matriz e minerais e é responsável por diversas funções imprescindíveis para o organismo. Existem diversos tipos de ossos, entre eles os ossos longos, como a tíbia e o fêmur, que são os mais estudados. O desenvolvimento ósseo se inicia na incubação e segue por boa parte da vida pós-eclosão da ave. Os principais processos são a formação inicial, mineralização, crescimento, remodelação e regeneração de fraturas.

2.1.3 Hormônios que regulam o desenvolvimento ósseo de aves

Os processos de desenvolvimento ósseo como a formação, crescimento e remodelação são dependentes de hormônios. Os principais deles são os hormônios da tireoide e paratireoide, o hormônio do crescimento, a insulina, os hormônios sexuais, o corticosterona e a forma ativa da vitamina D.

a) Hormônios tireoidianos

Os hormônios da tireoide são formados a partir do aminoácido tirosina, acrescido de moléculas de iodo: três iodios, no caso da triiodotironina ou T₃; e quatro, no caso da tiroxina ou T₄. O T₄ pode ser deionizado e se transformar em T₃, que permanece circulante por menos tempo, mas tem ação mais potente. O hormônio do crescimento (GH) parece influenciar a conversão de T₄ em T₃ (ROBSON *et al.*, 2002; VAN DER EERDEN *et al.*, 2003). Esses dois hormônios estão envolvidos em vários aspectos do desenvolvimento embrionário, desde o aumento do metabolismo, o consumo de oxigênio e na transição para a respiração pulmonar do embrião (BURTON; TULLET, 1985; OVIEDO-RONDÓN; MURAKAMI, 1998; DECUYPERE; BRUGGEMAN, 2005; SHOKRANEH *et al.*, 2020), tendo, inclusive, sua concentração plasmática utilizada como indicador do nível de metabolismo (WILLEMSSEN *et al.*, 2010).

Atuam estimulando a liberação do GH, o que acelera o crescimento e desenvolvimento do esqueleto. Também induz a produção de sinalizadores que afetam a síntese de IGF-I nos ossos. O T₃ (e o T₄, em menor grau) estimula a hipertrofia dos condrócitos e a invasão dos vasos sanguíneos para a formação da placa de crescimento e do osso trabecular da metáfise. Sobre os osteoblastos, atua inibindo a proliferação. A síntese de proteínas da matriz é beneficiada pela liberação dos hormônios tireoidianos (LEWINSON *et al.*, 1989; ROBSON *et al.*, 2002; VAN DER EERDEN *et al.*, 2003; SHAO *et al.*, 2006; WILLEMSSEN *et al.*, 2011; GÜZ *et al.*, 2020).

Alguns autores defendem que seu efeito na verdade seria indireto: já que afeta o metabolismo como um todo, é natural que tenha ação também sobre os ossos, principalmente no que diz respeito à disponibilização de energia no fim da incubação (PIESTUN *et al.*, 2009).

Segundo McNabb e Wilson (1997) as matrizes depositam hormônios da tireoide nos ovócitos antes mesmo da formação do ovo, e esses hormônios são depois utilizados pelos embriões ao longo do desenvolvimento embrionário. Embora essa contribuição materna não seja tão significativa para o crescimento do embrião, parece exercer efeito sobre a formação da cartilagem do pintinho em desenvolvimento. Os primórdios da tireoide do embrião propriamente dito surgem com 36 horas de incubação e a produção de tiroxina se inicia aos dez dias (DE GROEF *et al.*, 2008; BARBOSA, 2011). O período crítico da

maturação do eixo hipófise-tireoide ocorre entre os dias 10 e 14 de incubação (DECUYPERE; BRUGGEMAN, 2005).

Entre 18 e 21 dias ocorre aumento expressivo na síntese dos hormônios tireoideanos, que atingem o pico durante a bicagem externa e participam ativamente no processo de eclosão (OVIEDO-RONDÓN; MURAKAMI, 1998; PIESTUN *et al.*, 2009). Nesse meio tempo, entre a bicagem interna e a eclosão a conversão de T₄ em T₃ parece ocorrer de forma mais lenta (WILLEMSSEN *et al.*, 2011).

Quando há excesso desses hormônios em embriões pode haver 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 T₃ 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 T₃ e T₄ em alta temperatura. Shokraneh *et al.* (2020) elevaram a temperatura da casca para 38,9°C do dia 18 a 21, o que causou maior liberação de T₃ e T₄ 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 T₃ e T₄ 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 T₃ 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 (SHOKRANEH *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).

b) Hormônio do crescimento

O GH é um hormônio produzido que tem como principal função o crescimento do organismo como um todo, bem como do tecido ósseo (DECUYPERE; BRUGGEMAN, 2005). Atua principalmente durante a fase embrionária (BARKAN *et al.*, 2000) e no animal jovem, mas também exerce algum efeito na vida adulta (VAN DER EERDEN *et al.*, 2003).

A secreção de GH pode ser estimulada pela presença de hormônios sexuais e triiodotironina (T_3). Seu principal mecanismo de ação no metabolismo ósseo consiste em estimular a produção do fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I ou somatomedina C) no fígado e nos condrócitos da placa de crescimento, além de aumentar a resposta desse último tecido ao fator. O IGF-I do fígado é então transportado para a placa, onde estimula 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 (ROBSON *et al.*, 2002; KÜHN *et al.*, 2005; DE GROEF *et al.*, 2008; GÜZ *et al.*, 2020).

Em embriões de aves é incerto o momento do início da produção de GH, mas aparentemente isso ocorre entre os dias 12 a 14 (DE GROEF *et al.*, 2008). Após os 18 dias de incubação, é possível observar aumento significativo da síntese e liberação, provavelmente devido ao processo de eclosão (OVIEDO-RONDÓN; MURAKAMI, 1998).

c) Insulina

Hormônio produzido pela parte endócrina do pâncreas que, juntamente com o glucagon, regula a homeostase da glicose sanguínea (LETO; SALTIEL, 2012; SHIMAMOTO *et al.*, 2019).

A insulina é liberada quando os níveis de glicose do sangue estão elevados, reduzindo a concentração plasmática. No que diz respeito ao desenvolvimento ósseo, a

insulina atua aumentando a disponibilidade de energia (a partir da glicose) para a ossificação. Também estimula o crescimento da placa epifisária e a síntese de proteínas da matriz. Esse hormônio parece estar fortemente relacionado com o GH, aumentando ou até mesmo viabilizando sua ação. Na ausência de insulina ocorre a hiperglicemia, que atrapalha a atividade osteoblástica, desencadeando apoptose dos condrócitos e também prejudicando a diferenciação das células mesenquimatosas, o que leva à osteopenia (SHIMAMOTO *et al.*, 2019; CIGNACHI *et al.*, 2020; ARAÚJO *et al.*, 2022). Sua síntese se inicia durante a vida embrionária, mais precisamente ao final do quarto dia de incubação (BARBOSA, 2011).

Os níveis de insulina geralmente não são avaliados em estudos abordando manipulação térmica durante a incubação, mas efeitos indiretos são relatados. A alta temperatura de incubação aumenta os níveis de corticosterona, que podem inibir a atuação da insulina, mantendo os níveis de glicose sanguínea elevados (PECHOVA; PAVLATA, 2007; SHOKRANEH *et al.*, 2020).

d) Hormônios sexuais (estrogênio e testosterona)

Os hormônios sexuais são o estrogênio, produzido pelo ovário nas fêmeas, e a testosterona, produzida pelos testículos nos machos (WOLFF *et al.*, 2012; CARSON; MANOLAGAS, 2015). Ao surgirem no organismo, influenciam a densidade e a qualidade óssea. Esses efeitos ocorrem porque o estrógeno e a testosterona estimulam a liberação de GH, que desencadeia a síntese e secreção de IGF-I, cuja ação sobre o desenvolvimento ósseo já foi mencionada anteriormente. Também é conhecido que os esteroides sexuais são capazes de estimular a atividade dos osteoblastos, evitando a apoptose, além de reduzir a atividade dos osteoclastos, minimizando a reabsorção de cálcio a partir dos ossos (CHEN *et al.*, 2002; VAN DER EERDEN *et al.*, 2003; IRIE *et al.*, 2005; CARSON; MANOLAGAS, 2015). O estrógeno atua ainda na ativação da vitamina D₃ (HANSEN *et al.*, 2004) e aumentando a absorção de cálcio no intestino (LV *et al.*, 2019). Por outro lado, os hormônios sexuais estimulam o fechamento da placa epifisária, que encerra o crescimento longitudinal dos ossos (KARPERIEN *et al.*, 2005; WOLFF *et al.*, 2012).

Atuam nos animais jovens e adultos. Em humanos o aumento repentino de hormônios sexuais na puberdade causa o estirão de crescimento. No adulto a testosterona

e o estrogênio diminuem a reabsorção e promovem a deposição (osteoblastos) (VAN DER EERDEN *et al.*, 2003). Em mulheres na menopausa ocorre queda brusca dos níveis de estrogênio, aumentando a apoptose dos condrócitos, e provocando menor formação e maior desmineralização do osso (MONTECUCCO *et al.*, 1992; CHEN *et al.*, 2002). Nos embriões de aves, o estrogênio começa a ser sintetizado no embrião de quatro dias de vida e aos sete dias já se inicia a diferenciação sexual (BARBOSA, 2011).

e) Corticosterona

Os glicocorticoides são produzidos no córtex da adrenal (SHOKRANEH *et al.*, 2020) e, como parte do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal atua no metabolismo, na função imune e na resposta ao estresse, além de desempenhar papel importante no início do processo de eclosão (WILLEMSSEN *et al.*, 2010).

De maneira geral, o aumento do corticosterona altera diversas vias metabólicas no sentido de aumentar a disponibilidade de energia para que a ave possa resistir ao episódio de estresse (SHOKRANEH *et al.*, 2020). Ocorre indução da gliconeogênese (WILLEMSSEN *et al.*, 2011), interferência na ação da insulina (PECHOVA; PAVLATA, 2007), estímulo à lipólise e ao catabolismo de proteínas plasmáticas (OGNIK; SEMBRATOWICZ, 2012). É natural deduzir que essas alterações influenciam indiretamente no desenvolvimento ósseo.

Em termos diretos, quando os níveis de glicocorticoides são altos no sangue, a formação de GH e IGF-I é reduzida (aumenta síntese de somatostatina, que inibe o GH). Atuam também sobre os osteoblastos, fazendo com que se dividam menos, diferenciem mais rápido e sofram apoptose antes de estarem prontos para compor o osso. Isso reduz a espessura da placa de crescimento (menos condrócitos na zona proliferativa e mais condrócitos mortos na zona hipertrófica) e o resultado é redução na formação do osso. Outro efeito é a supressão da síntese de proteínas e mucopolissacarídeos que compõem a matriz do osso, ao mesmo tempo em que aumenta a expressão de proteases que degradam essa matriz, aumentando a reabsorção óssea. Tem ainda a capacidade de reduzir a absorção intestinal de cálcio, além de afetar negativamente a produção dos hormônios sexuais e o metabolismo da vitamina D₃ (ROBSON *et al.*, 2002; VAN DER EERDEN *et al.*, 2003).

A síntese de corticosterona se inicia aos 5 dias de incubação (DE GROEF *et al.*, 2008; BARBOSA, 2011) e aumenta rapidamente quando a eclosão se aproxima (18 a 21

dias) (OVIEDO-RONDÓN; MURAKAMI, 1998). O eixo hipófise-adrenal passa pelo período crítico de formação entre os dias 13 e 19 de incubação (DECUYPERE; BRUGGEMAN, 2005; WILLEMSSEN *et al.*, 2010).

A elevação da temperatura durante a incubação pode aumentar os níveis de corticosterona plasmáticos, e essa alteração geralmente é lida como indicativo de estresse (WILLEMSSEN *et al.*, 2010; SHOKRANEH *et al.*, 2020). Porém, se a modificação na temperatura ocorrer na forma de aclimação, com um pequeno aumento, em torno de 1°C e durante pouco tempo, os níveis de corticosterona podem ser reduzidos, inclusive melhorando a resposta do frango ao estresse térmico ao longo da vida produtiva (YALÇIN *et al.*, 2009).

f) Interação entre os hormônios

Como é possível perceber, os hormônios GH, IGF-I, tireoidianos, sexuais e o corticosterona estão fortemente relacionados (ROBSON *et al.*, 2002; VAN DER EERDEN *et al.*, 2003; KÜHN *et al.*, 2005) e exercem diferentes ações. Em aves essa relação parece ser mais marcante durante a incubação que no período pós eclosão (DECUYPERE; BRUGGEMAN, 2005).

g) Calcitonina

A calcitonina é um hormônio proteico produzido pelas células parafoliculares da glândula tireoide de mamíferos. Em aves, o órgão responsável pela produção é a glândula ultimobranquial, que é incorporada pela tireoide durante o desenvolvimento embrionário (ISLER, 1973).

Existem receptores específicos na tireoide e também nos néfrons, no cérebro, no trato gastrointestinal e nos ossos que, ao perceber aumento no cálcio sanguíneo, estimulam a secreção de calcitonina. Esse hormônio age para reduzir os níveis plasmáticos de cálcio, impedindo a reabsorção nos ossos e aumentando a deposição, além de diminuir a absorção pelo intestino e aumentar a excreção pelos rins (MALGAROLI *et al.*, 1989; PROSZDOWIEC-WEGLARZ; ANGEL, 2013; PIZAURO JÚNIOR *et al.*, 2017a). A secreção de calcitonina se torna marcante no fim da incubação, após 18 dias (BARBOSA,

2011). Os efeitos da temperatura sobre os níveis plasmáticos de calcitonina não são tema recorrente na literatura consultada.

h) Paratormônio (PTH)

O PTH é um hormônio produzido nas glândulas paratireoides. Nas aves, é constituído por 88 aminoácidos (quatro a mais que os mamíferos) e sua concentração no sangue é menor (PROSZDOWIEC-WEGLARZ; ANGEL, 2013).

A redução na concentração de cálcio no soro é detectada por receptores específicos das células da paratireoide e induz a secreção de PTH. Os demais receptores que atuam na liberação da calcitonina também o fazem em relação ao PTH, porém na presença de níveis de cálcio abaixo do controle. Após secretado, esse hormônio age no sentido de aumentar os níveis de cálcio plasmáticos. Inicialmente, estimula a secreção da enzima 1α -hidroxilase renal, o que, por sua vez, provoca a secreção da forma ativa da vitamina D. O resultado é o aumento da absorção do cálcio e fósforo no intestino delgado e da reabsorção renal de cálcio. Também aumenta a remodelação do osso pelos osteoclastos, liberando cálcio para o sangue (PARSONS; POTTS JÚNIOR, 1972; LUENGO *et al.*, 1991; MOE, 2008; PIZAURO JÚNIOR *et al.*, 2017a). A secreção de paratormônio se inicia aos 10 dias de incubação (BARBOSA, 2011). Não foram encontrados na literatura pesquisada artigos abordando o impacto da temperatura de incubação sobre os níveis de PTH.

i) Vitamina D₃

O que se chama de vitamina D na realidade é um grupo de moléculas semelhantes aos esteroides. Seus representantes que participam do metabolismo do cálcio são o colecalciferol (vitamina D₃) e o ergosterol (vitamina D₂). Em mamíferos ambas são equivalentes quanto à atividade biológica, mas nas aves a vitamina D₃ é 30 a 40 vezes mais potente que a D₂ (CHEN *et al.*, 2020).

Pode ser obtida via dieta ou produzida pelo organismo (na presença de luz). Na epiderme o 7-deidrocolesterol (intermediário na síntese de colesterol) sofre uma reação não-enzimática ao ser exposto à luz ultravioleta e produz a pré-vitamina D₃. Ocorre então uma isomerização térmica que a converte em vitamina D₃, que é difundida das camadas basais da pele para a circulação. Por fim será transportada por uma proteína específica e

convertida por hidroxilação enzimática nas formas ativas 25-(OH)₂D₃ (no fígado) e 1,25-(OH)₂D₃ (nos rins). Essa última é a forma natural mais potente da vitamina D (BISHOP; NORMAN, 1975; FATEMI *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2021).

Quando ofertada via dieta deve-se observar as exigências de acordo com as particularidades e condições da criação (por exemplo, a exigência aumenta quando o nível de cálcio é baixo ou quando a relação Ca/P é alterada) (KORELESKI; SWIATKIEWICZ, 2005).

A vitamina D₃ não é um hormônio propriamente dito, mas atua como tal no metabolismo do cálcio. Sua forma ativa regula o crescimento e diferenciação das células do tecido ósseo (condrogênese e osteogênese), o metabolismo e a homeostase do cálcio (aumenta os níveis de cálcio no sangue, estimulando a síntese de proteína ligadora de cálcio e a absorção pelo intestino) (GIULIANI; BOLAND, 1984; CHEN *et al.*, 2021). Atua, juntamente com outros fatores, na liberação das vesículas extracelulares, na ativação de proteínas quinases e na indução de apoptose. Aves deficientes em vitamina D₃ apresentam lentidão na formação e remodelação dos ossos. Esses processos são regulados principalmente pelo PTH, mas a 1,25-(OH)₂D₃ parece ser necessária para que ocorram corretamente. No processo de regulação da homeostase do cálcio pelo PTH a vitamina D₃ atua como fator de transcrição e expressão de transportadores de cálcio (via gênica), além de causar diretamente o aumento da absorção ao ligar-se com o receptor (via não gênica). 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)₂D₃ é depositada na gema pela matriz, para ser usada pelo embrião em desenvolvimento (VIEIRA, 2007; FATEMI *et al.*, 2020). Teoricamente os rins só produziriam 1,25-(OH)₂D₃ aos 9 dias de incubação (BISHOP; NORMAN, 1975), mas no trabalho de Chen *et al.* (2021), a utilização das duas formas de vitamina D₃ tiveram o mesmo efeito sobre o desenvolvimento (ósseo, adiposo e muscular), indicando que o embrião aos 3 dias foi capaz de converter 25-(OH)₂D₃ em 1,25-(OH)₂D₃ antes mesmo da formação completa dos rins.

Os efeitos da temperatura de incubação sobre os níveis ou o metabolismo da vitamina D₃ não são muito abordados pelos pesquisadores na literatura. Fatemi *et al.* (2020) trabalharam no sentido oposto, avaliando a influência da fonte de vitamina D₃ injetada *in ovo* sobre a temperatura do embrião, mas não foram observadas diferenças significativas.

Por outro lado, Yair *et al.* (2015) encontraram aumento no consumo de minerais da gema e nas cinzas e rigidez dos ossos de frangos ao abate após injetar *in ovo* uma combinação de vitamina D₃ e minerais traço na forma orgânica.

j) Interações entre os hormônios reguladores do metabolismo de cálcio e fósforo

As concentrações plasmáticas do Ca²⁺ e do PO₄³⁻ devem ser mantidas dentro de limites muito estreitos para que atuem corretamente: a concentração varia menos que 5% em condições normais e o balanço é zero (quantidade excretada é repostada pela absorvida no intestino). Participam da regulação os hormônios PTH e calcitonina (mecanismo ainda não totalmente elucidado) e a vitamina D₃ e seus metabólitos (1,25-dihidroxicolecalciferol; 1,25(OH)₂D₃ ou colecalciferol). Hormônios estrogênicos, androgênicos e prostaglandinas também atuam no metabolismo do cálcio. Os receptores para o metabolismo do cálcio encontram-se no intestino delgado, ossos e rins. Os hormônios regulam os fluxos de cálcio entre esses três órgãos e o fluido extracelular, controlando a deposição e reabsorção óssea, a absorção intestinal, a excreção renal e o transporte de cálcio, fosfato e magnésio entre os órgãos (PARSONS; POTTS JÚNIOR, 1972; PROSZDOWIEC-WEGLARZ; ANGEL, 2013; PIZAURO JÚNIOR *et al.*, 2017a; CHEN *et al.*, 2020).

A reabsorção renal de cálcio e fósforo é regulada pelo PTH sem a participação da vitamina D₃. A maior parte do cálcio não ligado à proteína é filtrado e reabsorvido pelos rins até que a capacidade seja atingida e o excedente, excretado. Isso ocorre sem a ação de hormônios, visto que o PTH regula apenas os estágios finais do processo (LUENGO *et al.*, 1991; BOUILLON *et al.*, 2003; MOE, 2008).

Quanto à homeostase do cálcio no tecido esquelético, há dois processos reguladores. O primeiro é a ação do PTH e vitamina D₃ sobre as células ósseas para regular a troca de cálcio solúvel entre o osso e o fluido extracelular. O segundo é a remodelação óssea (reabsorção pelos osteoclastos e formação pelos osteoblastos) para manter a integridade mecânica do osso (GIULIANI; BOLAND, 1984; ADHIKARI *et al.*, 2020).

Os osteócitos encontram-se aprisionados no tecido ósseo e se comunicam por canalículos preenchidos por fluido extracelular. Esse fluido tem saturação de cálcio menor que o fluido extracelular do organismo, o que pode causar difusão do cálcio por gradiente de concentração do último para o primeiro. Os osteócitos possuem receptores para PTH e

existem mecanismos pelos quais o cálcio pode ser transportado para o fluido extracelular para manter a homeostase. Os osteoclastos também contribuem solubilizando o cálcio ao reabsorver o osso. A transferência para fora do tecido ósseo pode ocorrer por difusão ou por bombas de cálcio, ambos regulados por PTH e outros hormônios (BOUILLON *et al.*, 2003; PIZAURO JÚNIOR *et al.*, 2017a).

A homeostase do fósforo em aves ainda não é bem compreendida, embora saiba-se que seu metabolismo está diretamente ligado ao do cálcio. Frangos com deficiência de fósforo apresentam baixos níveis plasmáticos de fósforo, o que estimula a produção de 1α -hidroxilase renal, ativando a síntese de vitamina D₃ e, conseqüentemente, aumentando a absorção de fósforo no intestino e a reabsorção nos rins e ossos (PROSZDOWIEC-WEGLARZ; ANGEL, 2013). Os rins têm papel crucial nas alterações dos níveis e na absorção de fósforo, comprovado pelo fato de que 90% do ultrafiltrado do plasma é fósforo. Como a maior parte é difusível e filtrável, facilmente é eliminado pelos rins em caso de excesso. Em condições normais, a quantidade excretada na urina é igual à absorvida no intestino (BILEZINKIAN *et al.*, 2019).

De maneira geral, todo o processo de formação e o desenvolvimento ósseo é controlado por hormônios e fatores biológicos. O GH, a insulina, os hormônios sexuais, os tireoidianos e o corticosterona atuam especialmente sobre as células ósseas (divisão, maturação, atividade, síntese de proteínas e apoptose) ou sobre o metabolismo energético. Esses hormônios interagem por *feedback*. A calcitonina, o PTH e a vitamina D₃ regulam a homeostase do cálcio e do fósforo, garantindo que seus níveis plasmáticos sejam adequados para a mineralização óssea. Também interagem fortemente por *feedback*. Os hormônios são sintetizados em diferentes momentos da vida embrionária e podem ser afetados pela temperatura de incubação, o que pode prejudicar o desenvolvimento ósseo.

2.1.4 Utilização dos minerais do ovo para o desenvolvimento ósseo

Na mineralização óssea que ocorre durante a incubação, os minerais que serão utilizados pelo embrião são obtidos a partir dos componentes do ovo (FREEMAN; VINCE, 1974; TUAN, 1987). A ave deposita os nutrientes através do ovário (gema) ou do oviduto (albúmen, casca e membranas) (YAIR *et al.*, 2015). Esses nutrientes são limitados e

dependem da genética, da idade e da nutrição da matriz (VIEIRA, 2007; YAIR *et al.*, 2017; TORRES; KORVER, 2018).

a) Minerais envolvidos na formação óssea

A rigidez do tecido ósseo é resultante da deposição de cálcio e fósforo, na forma de hidroxiapatita, durante o processo de mineralização. A maior parte do cálcio e fósforo do organismo está nos ossos, mas existe uma pequena fração nos fluidos intra e extracelulares que tem papel importante nas funções fisiológicas (BHAGAVAN, 2002; RYAN *et al.*, 2015).

O cálcio é o mineral encontrado em maior quantidade e de maior exigência na dieta de aves, dado seu uso na calcificação do tecido ósseo em frangos de corte e formação da casca do ovo nas poedeiras. Uma fração do Ca^{2+} do esqueleto e do perióstio formam o *pool* de Ca^{2+} missíveis, trocados livremente para alimentar a homeostase do cálcio. Outra fração encontra-se nas células (livre ionizado; complexado com ácidos orgânicos, citrato e fosfato; ou ligado a proteínas) e no fluido extracelular. A forma ionizada do cálcio (Ca^{2+}) atua na integridade e transporte das membranas, na coagulação sanguínea, na liberação de hormônios e neurotransmissores, na ativação e regulação de enzimas, na transmissão de impulsos nervosos e na contração muscular (BOUILLON *et al.*, 2003; PROSZDOWIEC-WEGLARZ; ANGEL, 2013).

O fósforo é componente de sais inorgânicos dos ossos e dos fosfolipídios de membrana, atua no transporte de energia, nos ácidos nucleicos, na regulação de enzimas e na ligação do oxigênio à hemoglobina. Encontra-se nos ossos e nos tecidos moles, na forma de fosfato. Pode estar livre, ligado às proteínas ou complexado com cálcio e magnésio. Os alimentos usuais para aves têm quantidades suficientes de fósforo, sendo rara a deficiência (PIZAURO JÚNIOR *et al.*, 2017a; BILEZINKIAN *et al.*, 2019).

Existem ainda elementos traço essenciais para a adequada formação e manutenção do tecido ósseo: o zinco, o cobre, o manganês e o magnésio. Esses elementos participam de metaloenzimas que são componentes estruturais ou catalíticos na formação de tecidos (BHAGAVAN, 2002).

O manganês (Mn) é o mineral traço cuja atuação é objeto de discordância entre os estudiosos. Sua deficiência leva a alterações morfofisiológicas espécie-específicas, o que

indica que as aves tenham uma exigência maior que os mamíferos. Além disso a absorção parece ser afetada por outros componentes da dieta como o fitato, que atua como agente quelante forte e impede a absorção de diversos íons metálicos. O manganês é cofator de enzimas que participam da síntese de cartilagem hialina do tecido ósseo. Logo, sua deficiência leva à redução na matriz orgânica dos ossos e da casca dos ovos. Também ocorre a redução da atividade da Fosfatase Alcalina no tecido ósseo, o que resulta em perose nas aves (LEACH *et al.*, 1969; BHAGAVAN, 2002).

O magnésio (Mg) é um nutriente pouco estudado, provavelmente porque está presente em quantidades razoáveis nas dietas comuns de frangos. Seu metabolismo está ligado ao do Ca e P, sendo que altos teores de Mg atrapalham a relação Ca: P necessária para a adequada formação óssea (HESS; BRITTON, 1997; SHASTAK; RODEHUTSCORD, 2015) e pode reduzir a atividade do PTH em aves adultas (HESS; BRITTON, 1997), mas não em embriões e seus níveis no osso parecem ser regulados pelas células do tecido (RAMP *et al.*, 1977).

O zinco atua no tecido esquelético estimulando a formação óssea pelos osteoblastos e inibindo a reabsorção pelos osteoclastos, o que aumenta a massa do tecido. É cofator de enzimas importantes para o desenvolvimento ósseo e estimula a diferenciação dos osteoblastos e a expressão de enzimas que participam na regulação da formação dos cristais de hidroxiapatita durante o crescimento dos ossos longos (BHAGAVAN, 2002; KWUN *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2013).

O cobre, quando em falta, causa anormalidades e maior susceptibilidade a fraturas. Seus níveis no organismo dependem da concentração na dieta e das concentrações dos antagonistas que competem pela absorção e uso no metabolismo (MIR *et al.*, 2007; GÜÇLÜ *et al.*, 2008).

O ferro participa do metabolismo energético oxidativo celular como componente das proteínas hemoglobina e mioglobina, responsáveis pelo transporte de oxigênio, e de enzimas de oxi-redução (YAIR; UNI, 2011).

b) Minerais da casca

A casca do ovo é formada por 98,2% de cálcio, 0,9 % de fósforo e 0,9% de magnésio, além de pequenas quantidades de minerais traço como cobre, zinco, manganês

e ferro (VIEIRA, 2007). Embora a casca seja composta basicamente por cinzas e sirva de reserva, a maioria dos minerais nela contidos são indisponíveis para o embrião (YAIR; UNI, 2011). Dela pode ser extraída grande quantidade de cálcio, pequena porção de magnésio e muito pouco de Fe, Mn e P (YAIR *et al.*, 2015).

A casca é a fonte primária de cálcio para o embrião (OLIVEIRA *et al.*, 2015; TORRES; KORVER, 2018). Do 13º dia até a eclosão, 80% do cálcio é obtido da casca (de forma acentuada entre os dias 14 e 18) e o restante da gema. Apesar da maioria dos minerais traço serem depositados na gema, o cobre também é encontrado na casca e membranas, onde atua garantindo a estrutura e a síntese e manutenção da matriz colágena e pode ser mobilizado pelo embrião para utilização no desenvolvimento ósseo (VIEIRA, 2007).

Essa mobilização é feita através da membrana corioalantóide (MCA), se inicia por volta do 12º dia e atinge o ápice no 17º dia (TORRES; KORVER, 2018). A MCA é um tecido altamente vascularizado, responsável pela respiração e troca de calor do embrião com o meio externo, além da translocação do cálcio para a circulação do embrião. Sua ligação com a superfície interna da casca do ovo torna-se completa a partir do 12º dia de incubação, permitindo a mobilização dos minerais ali presentes (KERSCHNITZKI *et al.*, 2016; TORRES; KORVER, 2018; HALGRAIN *et al.*, 2022).

A membrana expressa a enzima anidrase carbônica, que acidifica áreas específicas do interior da casca, dissolvendo o carbonato de cálcio até gerar cálcio livre, tornando-o disponível para o embrião (SZELESZCZUK *et al.*, 2016). O mecanismo que se segue ainda não está completamente elucidado, podendo ocorrer por três possíveis vias: o cálcio livre seria captado por proteínas cálcio-ligantes, Ca²⁺-ATPases e pela anidrase carbônica e então translocado através da membrana corioalantóide (GABRIELLI; ACCILI, 2010; TORRES; KORVER, 2018).

Por intermédio da vitamina D₃, o cálcio é transportado para a gema antes de ser absorvido pelo pintinho (RICHARDS; STEELE, 1987; TUAN, 1987; OLIVEIRA *et al.*, 2015). Assim, durante a última semana da incubação o teor desse mineral aumenta no saco vitelínico e no plasma enquanto diminui na casca (FREEMAN; VINCE, 1974; TUAN, 1987; MUIR; GROVES, 2017).

De fato, ao longo da incubação ocorrem variações nas concentrações de quase todos os minerais da casca. A concentração do cálcio e magnésio reduzem enquanto a do fósforo aumenta. Esse resultado do fósforo ocorre porque, até a eclosão o peso total da casca

diminui, logo, se um nutriente não é utilizado, sua concentração aumentará. Os níveis de boro, ferro e zinco não são alterados (SZELESZCZUK *et al.*, 2016). Conforme a casca é desmineralizada ocorre redução em seu peso, espessura e força, o que facilita o processo de ruptura que precede a eclosão (BARBOSA, 2011; HALGRAIN *et al.*, 2022).

c) Minerais da gema

A gema é composta principalmente por água (50%) lipídios (33%) e proteínas associadas a eles (17%). A vitelogenina é uma proteína bastante importante, pois sofre proteólise no ovo, gerando lipovitelina e fosfovítina (VIEIRA, 2007). Essa última contém fósforo, ferro e aminoácidos, representando 80% do fósforo da gema e sendo a principal fonte desse mineral para o desenvolvimento ósseo do embrião (LI *et al.*, 2014). As cinzas representam pouco mais de 1% da gema, e são compostas principalmente por cálcio, fósforo e potássio. A maioria dos minerais traço se encontra na gema (YAIR; UNI, 2011; TORRES; KORVER, 2018).

O saco vitelínico é a principal fonte de minerais durante a incubação, fornecendo a maioria do P, Zn, Cu, Mn e Fe (YAIR *et al.*, 2015). Esses minerais são consumidos quase que totalmente até o dia 17, após isso o consumo é reduzido e restam apenas pequenas quantidades para o uso no fim da incubação (YAIR; UNI, 2011; TORRES; KORVER, 2018). Concentrações ainda mais reduzidas de minerais permanecerão na gema residual, que o pintinho utilizará nos primeiros dias de vida para continuar seu desenvolvimento ósseo (YAIR; UNI, 2011). Uma pequena parte do cálcio necessário para formação óssea é proveniente da gema e esse é utilizado antes que o da casca. Conforme mencionado, no fim da incubação, ao contrário do que acontece com os outros minerais da gema, a concentração de cálcio permanece alta, graças à chegada do conteúdo mobilizado da casca (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Diferente do que ocorre com os minerais da casca, a absorção dos minerais da gema tem início já na primeira semana de incubação e prossegue por todo o período do desenvolvimento embrionário (YAIR; UNI, 2011). A mobilização do fósforo, por exemplo, atinge seu máximo entre os dias 13 e 17, simultaneamente ao maior desenvolvimento ósseo do embrião (TORRES; KORVER, 2018).

Os embriões obtêm os minerais da gema através dos vasos sanguíneos presentes na membrana do saco vitelínico (KERSCHNITZKI *et al.*, 2016; HALGRAIN *et al.*, 2022).

Para utilização do fósforo, a fosfovitina é desfosforilada e o mineral é então transportado pelos vasos sanguíneos da membrana do saco vitelínico até a circulação do embrião, mas esse processo ainda não está totalmente elucidado. O transporte provavelmente é realizado por um cotransportador de sódio-fosfato (NPT2b). Durante a segunda semana de incubação, 90% do Cu, Zn e Mn da gema também serão mobilizados pelo embrião (TORRES; KORVER, 2018).

Ao avaliar as modificações nos minerais da gema ao longo da incubação (do dia 0 a 17,5), Hopcroft *et al.* (2019) observaram que as concentrações de Fe, P e Zn diminuíram enquanto que as de cálcio, magnésio e estrôncio aumentaram. As concentrações de Cu, K e Na aumentaram até o dia 6,5 e depois diminuíram. O Mn não foi alterado. Os autores esclareceram que, além da utilização pelo embrião, também ocorre mobilização de reservas da casca e influxo de nutrientes entre o albúmen e a gema.

Com exceção do cálcio, o conteúdo mineral da gema é insuficiente para garantir o desenvolvimento do esqueleto. Assim, no fim da incubação ocorre estagnação ou piora nas características mecânicas e morfométricas da tíbia e do fêmur, dada a pouca disponibilidade de minerais para formação (YAIR *et al.*, 2012). Uma estratégia sugerida por alguns autores para contornar esse problema é a nutrição *in ovo*. Yair *et al.* (2013) demonstraram que enriquecer o ovo com minerais durante a incubação melhora a mineralização e as propriedades mecânicas ósseas do embrião. Em outro estudo, Yair *et al.* (2015) injetaram minerais orgânicos e inorgânicos (e vitamina D₃) aos 17 dias nos ovos e também perceberam aumento no conteúdo mineral da gema, maior consumo de minerais pelo embrião e melhoria nas características do osso (conteúdo de cinzas e resistência óssea), independente da natureza do mineral.

Um fator que deve ser considerado, visto que pode afetar a utilização dos minerais da gema é a temperatura de incubação. Shokraneh *et al.* (2020) ressaltam que temperaturas de casca elevadas durante os últimos dias podem aumentar a demanda do embrião por minerais no período próximo da eclosão, fase na qual esse estoque está quase esgotado. A morfologia do intestino delgado (altura de vilos e profundidade de criptas) e a expressão de genes responsáveis pelo transporte de nutrientes em pintinhos também podem ser prejudicadas pela alta temperatura (39,6° C a partir do 13° dia), o que afeta a capacidade absorptiva e reduz a utilização do conteúdo da gema (BARRI *et al.*, 2011).

d) Minerais do albúmen

O albúmen é constituído principalmente por água (88%) e proteínas. Lipídios, vitaminas e minerais representam uma pequena fração desse componente. Cerca de 4% do conteúdo é de íons inorgânicos como o potássio, sódio, enxofre e cloro em maiores quantidades e fósforo, cálcio, manganês, magnésio e ferro em teores quase imperceptíveis (WILLEMS *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Geralmente os minerais em sua forma orgânica são depositados no albúmen, e os inorgânicos na gema (VIEIRA, 2007; YAIR; UNI, 2011). Os nutrientes do albúmen são misturados aos do fluido amniótico e transportados para o saco vitelínico e só então são absorvidos pelo embrião (UNI *et al.*, 2012; WILLEMS *et al.*, 2014).

Basicamente, os minerais do ovo são utilizados para formar os ossos. Da casca o embrião obtém quase todo o Ca e Mg de que precisa (e outros minerais em pequenas quantidades, já que maioria está indisponível), enfraquecendo-a enquanto fortalece o esqueleto. A mobilização do cálcio ocorre através da MCA. A gema é a principal fonte da maioria dos minerais (P, Zn, Cu, Mn e Fe), que são absorvidos pelo embrião a partir da membrana do saco vitelínico (MSV). O P da gema se encontra majoritariamente ligado à proteína fosfovítina. O albúmen possui poucos minerais em sua composição, mas é de onde vem a maioria do Na e K. Os minerais devem ser mobilizados, transportados até a gema e então para a circulação, convertidos em cristais e depositados no osso. A temperatura de incubação parece afetar a utilização dos nutrientes do ovo, especialmente da gema.

2.2. TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO

Para que o embrião no ovo fecundado se desenvolva é necessário promover condições ideais dentro da máquina de incubação. Os fatores físicos que devem ser controlados são a umidade relativa do ar, a ventilação, os níveis de oxigênio e gás carbônico, a viragem dos ovos e a temperatura. Todos os fatores estão relacionados entre si e afetam o embrião (DECUYPERE; MICHELS, 1992; LOURENS *et al.*, 2007; MOLENAAR *et al.*, 2011).

A temperatura de incubação diz respeito à temperatura em que o ar no interior da máquina será mantido e tem como objetivo final garantir a temperatura ideal do embrião (MEIJERHOF; VAN BEEK, 1993). Esse fator exerce um papel fundamental no controle

da taxa de desenvolvimento e crescimento embrionário, além de interferir no rendimento da incubação e qualidade dos pintos (MEIJERHOF, 1999).

a) Temperatura ideal

A temperatura é o fator da incubação mais conhecido desde o antigo Egito. Ainda assim não se sabia ao certo como ela deveria ser controlada, o que causava grande variação nos resultados. Além disso, pouco se sabia sobre os outros fatores a serem manipulados na incubadora, então o sucesso ou fracasso da incubação eram atribuídos totalmente à temperatura (BAROTT, 1937). A partir do estudo de Barott (1937) foi definido que a temperatura que promovia os melhores resultados era 100°F / 37,8° C, que inclusive estava abaixo da preconizada até então. A partir desse estudo, tal temperatura se tornou padrão nos incubatórios. Posteriormente alguns programas passaram a sugerir a redução de 1°C nos últimos 3 dias, já próximo do momento da eclosão (FRENCH, 1997).

Muitos estudos testaram temperaturas abaixo e acima desse valor (LOURENS *et al.*, 2005; VAN DER POL *et al.*, 2014; VAN DEN BRAND *et al.*, 2019) analisando os efeitos sobre as mais diversas características, mas nunca ficou estabelecido que a temperatura deveria ser modificada, embora ainda há muito dos efeitos metabólicos para serem elucidados.

b) Temperatura da máquina x temperatura do embrião

Usualmente se mensura a temperatura do ar dentro da máquina (TM). Porém, pesquisas vêm mostrando que ocorrem variações bastante significativas entre os ovos de acordo com a localização de cada um dentro da máquina, o que pode causar diferentes respostas metabólicas. Assim, recomenda-se que, ao invés da TM, a temperatura do embrião (TE) seja usada como guia (LOURENS *et al.*, 2005).

A TE pode ser medida pelo líquido corioalantóide, pela temperatura cloacal do embrião ou pelo fluxo sanguíneo dos vasos da membrana corioalantóide com sondas (JANKE *et al.*, 2002). Um método mais fácil, menos invasivo e bastante eficaz é a mensuração da temperatura da casca do ovo (TCO) (LOURENS *et al.*, 2005; MEIJERHOF, 2013). Embora a temperatura da casca e a temperatura do embrião não sejam idênticas, são consideradas equivalentes (MEIJERHOF; VAN BEEK, 1993; LOURENS *et al.*, 2007).

É importante salientar que a medição nos primeiros dias não é fidedigna porque a produção de calor pelo embrião é baixa e a rede de vasos ainda é incipiente, então a casca é aquecida mais rapidamente que o embrião. O desenvolvimento dos vasos sanguíneos promove maior transferência do calor do embrião para a casca e então a semelhança entre as temperaturas de ambos aumenta (MEIJERHOF, 2013).

c) Fatores que afetam a temperatura do embrião

A temperatura do embrião sofre influência de diversos fatores como a temperatura de incubação; a quantidade de calor perdido na evaporação; a produção de calor metabólico do embrião e condutividade térmica do ovo (determinada pela temperatura e umidade em torno do ovo, a condutância da casca e a velocidade do ar) (MEIJERHOF; VAN BEEK, 1993; LOURENS *et al.*, 2011).

Quanto à produção de calor, Decuyper *et al.* (2013) afirmam que embriões sob temperatura adequada se comportam seguindo um padrão. Há uma elevação gradual na produção a partir do quarto dia, que se transforma em rápido aumento na segunda semana. Aos 9 dias de incubação a TE pode ultrapassar a TM (HULET; MEIJERHOF, 2001), daí a importância de se guiar pela TCO ao invés da TM. Ao atingir 80% do período de incubação o embrião chega a uma fase em que há baixa disponibilidade de O₂, o que desacelera a taxa metabólica, causando estagnação da produção de calor. Esse período é conhecido como fase platô (JANKE *et al.*, 2002).

Conforme o fim da incubação se aproxima o embrião aumenta de tamanho, resultando em nova elevação na taxa metabólica e conseqüentemente, na produção de calor. Esse efeito é acentuado quando a temperatura de incubação é mais alta do que deveria (MEIJERHOF; VAN BEEK, 1993; LOURENS *et al.*, 2007). Nessa fase, o baixo nível de O₂ e alto nível de CO₂ parecem estimular a bicagem interna, a partir da qual a produção de calor volta a aumentar até a eclosão, dessa vez de forma bastante acentuada (MOLENAAR *et al.*, 2013).

Um fato que deve ser destacado é o de que a ontogenia da termorregulação dos frangos se inicia na incubação, por volta dos 5 dias, mas só se completa por volta dos 14 dias pós-eclosão. O embrião, portanto, é capaz de reagir até certo ponto às alterações na temperatura, mas não tolera desvios muito grandes (TZSCHENTKE; 2007).

d) Consequências das temperaturas não ideais

Temperatura e resultados da incubação

Temperaturas acima ou abaixo da ideal podem promover alteração na produção de calor do embrião, queda nos índices da incubação, má formação e qualidade do pinto (BAROTT, 1937; LOURENS *et al.*, 2007; VAN DEN BRAND *et al.*, 2019), redução no peso corporal e no peso relativo do coração (SHIM; PESTI, 2011; VAN DEN BRAND *et al.*, 2021), alteração na eficiência de utilização dos componentes da gema (OVIEDO-RONDÓN *et al.*, 2008a; DAYAN *et al.*, 2020) e nos hormônios da tireoide (WILLEMSSEN *et al.*, 2010; AL-RUKIBAT *et al.*, 2017).

Tais consequências dependem do grau e tempo de exposição à temperatura não ideal. Embriões submetidos à temperatura de 38,9 °C a partir do 8º dia de incubação têm seu desenvolvimento comprometido e apresentam pior qualidade ao nascer, com maior gema residual, menor peso do corpo sem gema residual (YFBM) e menor peso do coração e do fígado (VAN DEN BRAND *et al.*, 2021).

É importante ressaltar que os embriões são mais sensíveis às temperaturas altas do que baixas e a sensibilidade aumenta com a idade. Ocorre a morte do embrião quando sua temperatura interna atinge 46,5°C. Devido à produção de calor, essa temperatura é atingida mais rápido nos embriões mais velhos (FRENCH, 1997).

Temperatura x metabolismo de nutrientes

Para utilizar os nutrientes da gema o embrião dispõe de diferentes vias metabólicas, dependendo de suas demandas ao longo do desenvolvimento e da formação dos anexos embrionários. O metabolismo dos nutrientes está diretamente relacionado a diversos fatores internos e externos ao ovo, especialmente a temperatura de incubação e a disponibilidade de oxigênio (BAROTT, 1937; LOURENS *et al.*, 2007).

A presença de oxigênio no interior do ovo depende do desenvolvimento das membranas extraembrionárias, sendo que a respiração do embrião é desempenhada por diferentes tecidos entre o início e o fim da incubação. Na primeira semana o metabolismo embrionário ainda é pouco significativo e as poucas trocas gasosas são realizadas pela membrana do saco vitelínico, que é a primeira estrutura a se formar (CIROTTI; ARANGI,

1989). Por volta do quarto dia, o alantoide se funde ao cório, iniciando o desenvolvimento da membrana corioalantóide, mas sua formação completa só se dá entre 10 e 12 dias (BURTON; TULLET, 1985). Portanto, até o 10° dia de incubação a produção de calor é irrisória e a temperatura do ovo é igual ou ligeiramente menor que a do ambiente (LOURENS *et al.*, 2007).

Após sua completa formação a membrana corioalantóide assume o papel principal na respiração, garantindo o máximo aporte de oxigênio que permite o aumento rápido da taxa metabólica e do crescimento do embrião (TAZAWA, 1980; BURTON; TULLET, 1985). Entretanto, aproximadamente no 16° ou 17° dia de incubação o metabolismo e a demanda por oxigênio se tornam tão altas que superam a capacidade dos órgãos de respiração. Além disso existem barreiras para a difusão dos gases através da casca que limitam a entrada de oxigênio. Assim, entre os dias 17 e 19 ocorre a já mencionada fase de platô, com estagnação no consumo de oxigênio, na taxa metabólica e na produção de calor (JANKE *et al.*, 2002).

Embora o consumo de oxigênio se estabilize durante o platô, a demanda segue aumentando, dado o acelerado desenvolvimento embrionário. A alta exigência associada à condição momentânea de hipóxia induz a bicagem interna e a transição para a respiração pulmonar. Após iniciada, a transição se completa em cerca de 24 horas, aumentando a disponibilidade de oxigênio para o embrião e permitindo que a taxa metabólica e produção de calor voltem a crescer (TAZAWA, 1980; BURTON; TULLET, 1985).

Os hormônios da tireoide: triiodotironina (T₃) e tiroxina (T₄) estão envolvidos no aumento do metabolismo, no consumo de oxigênio e na transição para a respiração pulmonar (BURTON; TULLET, 1985).

Ao longo da maior parte da incubação a fonte de energia mais utilizada pelo embrião é a oxidação de lipídios, que se encontram em grande quantidade na gema do ovo. Porém, essa via tem alta demanda por oxigênio. Assim torna-se impossível sua realização no início e, principalmente, no fim da incubação, quando os níveis são insuficientes. Durante essas fases o embrião utiliza a via glicolítica aeróbica ou anaeróbica, metabolizando os carboidratos; ou a gliconeogênese, formando glicose a partir de compostos provenientes das proteínas (LOURENS *et al.*, 2007; MAATJENS *et al.*, 2017).

Nesse sentido, é evidente que o aumento da temperatura representa crescimento na taxa metabólica e na produção de calor, devido ao excessivo consumo de oxigênio. Nessas

situações ocorrem alterações no metabolismo dos nutrientes dos embriões (OLIVEIRA *et al.*, 2008; MOLENAAR *et al.*, 2013), podendo prejudicar o desenvolvimento embrionário e posterior desempenho da ave após a eclosão (LOURENS *et al.*, 2007).

Quanto aos carboidratos, TCO acima de 38,9° C reduzem as reservas de glicogênio hepático no fim da incubação. Essas reservas são utilizadas para gerar energia, dada a alta demanda energética e a pouca disponibilidade de oxigênio (MAATJENS *et al.*, 2017). O resultado é um menor aporte de glicose e conseqüentemente, de energia necessária no momento da eclosão (MOLENAAR *et al.*, 2011; MOLENAAR *et al.*, 2013; MAATJENS *et al.*, 2014b). Molenaar *et al.* (2013) confirmaram, por meio da injeção de glicose com carbonos marcados, que a exigência e oxidação de glicose são maiores em embriões submetidos à alta temperatura (38,9°C).

As temperaturas de incubação elevadas também afetam indiretamente o metabolismo de proteínas (MOLENAAR *et al.*, 2013). A baixa concentração de glicose em situações de alta exigência para produção de energia induz à mobilização de aminoácidos para gliconeogênese ou geração de energia. A mobilização prejudica a deposição de músculos do embrião e o peso relativo de órgãos como o coração (MAATJENS *et al.*, 2014a). A utilização de aminoácidos é comprovada pelo aumento nos níveis de ácido úrico sanguíneos (MOLENAAR *et al.*, 2011; MOLENAAR *et al.*, 2013). A consequência da incubação em condições inadequadas costuma ser o pintinho com menor YFBM, indicando piora na eficiência de utilização dos nutrientes disponíveis no ovo (LOURENS *et al.*, 2007; MOLENAAR *et al.*, 2011).

Temperatura x desenvolvimento embrionário

Existem diversos estudos relacionando a temperatura de incubação e o desenvolvimento embrionário. Segundo Lourens *et al.* (2005) a temperatura baixa na primeira semana causa retardo no desenvolvimento embrionário e tanto a eclodibilidade quanto o desenvolvimento embrionário pioram quando a temperatura não é mantida constante ao longo da incubação.

Até a segunda semana, aumentar a temperatura de incubação produz uma resposta quase imediata sobre o metabolismo embrionário, aumentando-o (LOURENS *et al.*, 2006). Na terceira semana, entretanto, por mais que a temperatura seja alterada, a demanda por oxigênio já é tão alta que geralmente não pode ser atingida. Assim, o efeito da concentração

de oxigênio tem maior importância que a da temperatura nessa fase (LOURENS *et al.*, 2007).

Maatjens *et al.* (2016 e 2017) defendem que pode ser benéfico para a fisiologia do embrião reduzir a temperatura de incubação para 35,5 ou 36,7 °C após os 15 dias de incubação. Dessa maneira os autores obtiveram melhores resultados de YFBM e peso de órgãos à eclosão. Por outro lado, Lin *et al.* (2017) afirmam que temperaturas um pouco acima da ideal no início da incubação (38,1°C do dia 0 a 5) podem melhorar a vascularização da membrana do saco vitelínico e corioalantóide durante a incubação, além de melhorar a conversão alimentar e o músculo peitoral durante a vida da ave. Segundo Gao *et al.* (2013) condições inadequadas de incubação também podem promover estresse oxidativo devido à maior produção de calor no fim da incubação após o início da respiração pulmonar.

Dentre os fatores físicos da incubação a temperatura é um dos mais explorados. A temperatura considerada ideal é 37,8°C e desvios nesse padrão podem provocar uma série de problemas nos embriões e futuros frangos. Guiar a incubação pela temperatura da casca ao invés da máquina é mais eficaz para garantir que o embrião estará no ambiente mais propício para seu desenvolvimento. Fatores como a produção e perda de calor, a condutividade térmica e a própria regulação da máquina afetam a forma como o calor chega para o embrião. Quando a temperatura é desviada do ótimo (dependendo do grau, do momento e do tempo de exposição) podem ocorrer problemas na produção de calor, no desenvolvimento embrionário e na utilização de nutrientes, impactando os resultados da incubação e qualidade do pinto. Embriões parecem ser mais sensíveis às temperaturas altas.

2.3. EFEITOS DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO SOBRE O DESENVOLVIMENTO ÓSSEO DE EMBRIÕES

Se a temperatura afeta o metabolismo como um todo, obviamente atua também sobre o desenvolvimento ósseo (SGAVIOLI *et al.*, 2016; MORITA *et al.*, 2020). Muitos autores observaram mudanças na ossificação e mineralização ao variar a temperatura de incubação (BROOKES; MAY, 1972; YALÇIN; SIEGEL, 2003; YALÇIN *et al.*, 2007; HAMMOND *et al.*, 2007; OVIEDO-RONDÓN *et al.*, 2008a; OVIEDO-RONDÓN *et al.*, 2008b; OVIEDO-RONDÓN *et al.*, 2009; AL MUSAWI *et al.*, 2012; GROVES; MUIR,

2014; VAN DER POL *et al.*, 2014; GROVES; MUIR, 2016; IPEK; SOZCU, 2016; OZNURLU *et al.*, 2016; SGAVIOLI *et al.*, 2016; MUIR; GROVES, 2017; MUIR; GROVES, 2019; GÜZ *et al.*, 2020)

Entretanto os efeitos não são consenso entre os pesquisadores (Tabelas 1 e 2). Tais diferenças nos resultados refletem as inúmeras variações nas metodologias dos experimentos, como diferentes temperaturas, período e duração da alteração, ter como base a temperatura da máquina ou da casca, linhagem das aves testadas, parâmetros ósseos avaliados, entre outros (GROVES; MUIR, 2014 e 2016; VAN DER POL *et al.*, 2014).

2.3.1 Temperatura alta e o desenvolvimento ósseo na incubação

Os embriões são muito sensíveis às variações de temperatura acima da considerada ideal (37,8°C) e essa sensibilidade aumenta conforme a incubação avança e o embrião passa a produzir mais calor em resposta ao metabolismo (FRENCH, 1997; LOURENS *et al.*, 2005; 2007). A alta temperatura pode afetar a formação, mineralização e crescimento dos ossos (OVIEDO-RONDÓN *et al.*, 2008a; GROVES; MUIR, 2016).

Um exemplo foi observado por Yalçın e Siegel (2003). Ao utilizarem temperaturas acima ou abaixo da ideal (21°C por 24h no 14º dia; 36,9°C ou 39,6°C por 6h do 1º ao 8º ou do 10º ao 18º dia) foi identificado crescimento assimétrico dos ossos dos embriões até próximo do fim da incubação, embora essas desigualdades tenham sido corrigidas antes da eclosão num tipo de crescimento compensatório.

O efeito negativo da alteração da temperatura sobre o crescimento ósseo também foi verificado por Yalçın *et al.* (2007). Quando submetidos a um aumento (39°C) da temperatura durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (0 a 8 dias), os embriões apresentaram problemas na diferenciação dos condrócitos. O atraso na diferenciação foi evidenciado pelo impacto sobre três marcadores avaliados. Ocorreu aumento na expressão de colágeno tipo II, que indica aumento no número de condrócitos não diferenciados na zona de proliferação; e de osteopontina, cujo aumento marcaria o início da diferenciação e calcificação, porém a atividade fisiológica dessa proteína depende de seu estado de fosforilação, que nesse estudo parece ter sido insuficiente para ativar a molécula. Houve ainda redução na atividade da Fosfatase Alcalina na placa, que sinaliza menor hipertrofia e calcificação.

Quando a manipulação térmica (39°C) foi empregada entre 10 e 18 dias, houve redução no peso da tíbia dos embriões. Esses resultados mostraram que a atividade na placa de crescimento e o desenvolvimento da tíbia tem estágios críticos diferentes, pois a diferenciação dos condrócitos é mais afetada pela temperatura no início da incubação, enquanto o crescimento da tíbia sofreu mais danos com o aumento no fim (YALÇIN *et al.*, 2007).

Oznurlu *et al.* (2016) também encontraram alterações na placa de crescimento de embriões em alta temperatura de incubação. O aumento de 1°C na temperatura padrão a partir do décimo dia modificou a espessura das áreas da placa, reduzindo a zona de proliferação e aumentando a zona hipertrófica, além de ter diminuído a atividade da Fosfatase Alcalina. As consequências foram problemas no processo de ossificação e piora das características da tíbia dos embriões.

Outro trabalho que apontou assimetria relativa como resposta ao aumento na temperatura da máquina foi o de Oviedo-Rondón *et al.* (2008a). Nesse estudo, entretanto, a diferença entre os ossos das duas pernas foi percebida ao elevar para 38 e 39°C a temperatura nos quatro últimos dias da incubação. Esse período corresponde a uma fase de platô no metabolismo e é bastante crítica para os embriões, dado o alto desenvolvimento dos órgãos como um todo e principalmente do esqueleto. Os autores testaram duas linhagens com diferentes condutâncias de casca (embora não mencionem quais seriam) e notaram que a temperatura alta pode ter impactos ainda mais drásticos sobre os ossos longos quando associada à níveis reduzidos de oxigênio em linhagens com baixa condutância, que teriam maior dificuldade em eliminar calor. Nangsuay *et al.* (2016) confirmam que a condutância da casca pode variar entre linhagens, observando maior condutância nos ovos de Ross 308[®] em comparação aos Cobb 500[®].

Os efeitos da temperatura alta durante o período de platô foram semelhantes em perus: a diferenciação dos condrócitos foi afetada, prejudicando o desenvolvimento da tíbia e do fêmur e causando assimetria entre os dois membros inferiores (OVIEDO-RONDÓN *et al.*, 2008b).

A temperatura elevada (39°C) na última semana de incubação também causou queda no peso relativo do fêmur de pintinhos recém-eclodidos (OVIEDO-RONDÓN *et al.*, 2009). Em contrapartida o peso da tíbia só foi afetado quando os embriões foram

submetidos a uma combinação de temperatura alta na última semana e baixa (36,7°C) na primeira.

Quanto ao teor de cinzas dos ossos à eclosão, Van Der Pol *et al.* (2014) não visualizaram resposta ao modificar a temperatura (39,4°C). Os pesquisadores justificaram que essa característica parece ser influenciada pelo período em que a alteração é aplicada, sendo a fase inicial uma etapa de programação para o desenvolvimento ósseo futuro. Como nesse estudo a temperatura foi alta durante toda a incubação, os autores esclareceram que a mineralização pode ter sido afetada no início e depois corrigida quando o embrião se adaptou ao ambiente. As características morfológicas do osso, entretanto, foram afetadas pela incubação em temperatura muito alta (39,4°C) nesse estudo. O peso e comprimento dos ossos longos da perna diminuíram, enquanto a largura da tíbia aumentou. Porém, essa última característica parece estar relacionada com uma maior curvatura do osso, resultando em maior incidência de problema de pernas no futuro (VAN DER POL *et al.*, 2014).

Diversos trabalhos apontaram que ocorre aumento na produção de proteínas de choque térmico durante o estresse por calor (HAMMOND *et al.*, 2007; YALÇIN *et al.*, 2007; OZNURLU *et al.*, 2016). Trata-se de chaperonas que contribuem para manter os processos de enovelamento, transporte e degradação normais das proteínas em situação de estresse por calor, permitindo o retorno à homeostase (MACKEI *et al.*, 2021). A presença dessas proteínas foi observada em diversos locais da placa de crescimento, indicando que tais moléculas exercem atividades distintas em cada estágio de diferenciação dos condrócitos. Pelo menos uma delas (Hsp90) parece atrapalhar as interações entre células, necessárias para a diferenciação, o que explicaria grande parte dos efeitos negativos da alta temperatura sobre o desenvolvimento ósseo (HAMMOND *et al.*, 2007; YALÇIN *et al.*, 2007; GROVES; MUIR, 2016; OZNURLU *et al.*, 2016).

Alguns autores defendem que altas temperaturas de incubação afetam positivamente o desenvolvimento ósseo. Brookes e May (1972) testaram temperaturas baixas (35 e 36°C) e altas (39 e 40°C) até o 10º dia de incubação, quando avaliaram os embriões. Para cada incremento de 1°C na temperatura, houve aumento linear de 20% no cálcio do esqueleto e na fração ossificada, enquanto que o desenvolvimento embrionário e o comprimento total dos ossos incluindo cartilagem variaram apenas 12%. Essa diferença indica que o crescimento ósseo foi mais afetado que o restante do desenvolvimento. Os autores atribuíram os efeitos à dilatação dos vasos, que promoveram maior fluxo sanguíneo

para os ossos. Também destacaram a importância da integridade da mitocôndria na síntese de componentes da matriz, fundamentais para a ossificação. Por outro lado, ressaltaram que é pouco provável ter ocorrido aumento na atividade endócrina, já que as análises foram realizadas aos dez dias de incubação, quando as glândulas ainda não estão formadas.

Hammond *et al.* (2007) submeteram ovos a elevação na temperatura (38,5°C) entre os dias 4 e 7 de incubação e observaram aumento no comprimento da tíbia e do tarso aos 12 dias e do fêmur aos 15, embora a mineralização não tenha sido afetada. Os pesquisadores teorizaram que os efeitos se devem a uma cascata de eventos: a alta temperatura durante a formação dos membros ativou proteínas de choque térmico que estimularam os movimentos do embrião, induzindo a produção de IGF-s (fatores de crescimento semelhantes à insulina), que aumentaram o desenvolvimento dos músculos e então dos ossos. A proliferação dos condrócitos na placa epifisária também foi intensificada nesse período, mas só se tornou aparente alguns dias após a manipulação térmica, quando a diferenciação ocorreu.

Testando o mesmo período e temperatura, Al Musawi *et al.* (2012) perceberam melhoria de algumas características ósseas (aumento no comprimento da tíbia/tarso e a área transversal do fêmur) tanto em embriões de frangos quanto de poedeiras aos 18 dias. Entretanto, a extensão do efeito foi maior nas poedeiras. Quanto ao desenvolvimento muscular, altamente relacionado ao do esqueleto, a temperatura alta teve efeito positivo para as poedeiras e negativo para os frangos. Esses resultados indicam que a regulação do desenvolvimento pode ser diferente entre linhagens.

Yalçin *et al.* (2007) também apontaram aspectos positivos ao alterar a temperatura (39°C) no início do desenvolvimento embrionário (0 a 8 dias). Nesse estudo ocorreu aumento no teor de cinzas da tíbia de pintinhos recém-eclodidos, embora as diferenças não tenham se mantido durante a criação.

Avaliando o aumento da temperatura no final da incubação, Groves e Muir (2014) realizaram uma meta análise que mostrou associação positiva entre a temperatura de casca entre os dias 16 e 18 e a percentagem de cinzas dos ossos à eclosão. Os autores destacaram que essa mineralização pode contribuir para a melhoria da habilidade locomotora do frango ao abate.

2.3.2 Temperatura baixa e o desenvolvimento ósseo na incubação

A redução na temperatura de incubação, por sua vez, impacta o desenvolvimento embrionário de diversas formas, podendo atuar sobre a osteogênese (YALÇIN *et al.*, 2007; OVIEDO-RONDÓN *et al.*, 2009; MUIR; GROVES, 2017).

Segundo Oviedo-Rondón *et al.* (2009) a simetria do esqueleto do embrião é um dos fatores prejudicados pela baixa temperatura. A tíbia e a perna se tornaram mais assimétricas quando a temperatura foi mantida em 36,7°C durante a primeira semana de incubação.

Outra característica afetada foi a diferenciação dos condrócitos, que ocorreu com atraso significativo quando a temperatura foi reduzida para 36,9°C no início da incubação (0 a 8 dias) (YALÇIN *et al.*, 2007).

No mesmo estudo, entretanto, Yalçin *et al.* (2007) encontraram também efeitos positivos da utilização de temperatura baixa no início da incubação sobre o teor de cinzas da tíbia no momento da eclosão.

A melhoria na mineralização dos ossos à eclosão em resposta à baixa temperatura inicial também foi verificada por Groves e Muir (2014) e Muir e Groves (2017). O primeiro estudo foi uma meta análise que analisou artigos com temperaturas entre 35,5°C e 39,1°C nos primeiros 15 dias. Os autores relataram aumento nas cinzas dos ossos quando a temperatura era reduzida, mas não deixaram claro se todas as temperaturas baixas avaliadas foram benéficas.

No trabalho de Muir e Groves (2017) a incubação foi iniciada com temperatura de 37,2°C, que foi gradualmente elevada até atingir 37,8°C, aos 13 dias. Os pesquisadores apontaram que a redução na temperatura atrasou a eclosão. Devido a esse atraso os pintinhos desses tratamentos passaram menos tempo no nascedouro em temperatura inadequada e sem alimento antes de serem avaliados, o que foi positivo para a deposição de minerais nos ossos.

Já em outra pesquisa, iniciando a incubação com 36,75°C e atingindo 37,8°C aos 16 dias, os mesmos autores não encontraram diferenças nas cinzas dos ossos (MUIR; GROVES, 2019). Esses resultados evidenciaram que o efeito da temperatura sobre a mineralização do osso depende do quanto a temperatura está abaixo da ideal em cada fase do desenvolvimento embrionário e da linhagem avaliada. Os autores também observaram queda na eclodibilidade (4,6% dos não nascidos estavam vivos, mas sem quebrar a casca) e a piora na qualidade dos pintos. A eclodibilidade da linhagem Ross 308[®] foi mais afetada

pela temperatura que a Cobb 500[®]. Ao que tudo indica, a incubação mais longa exauriu as reservas de energia desses embriões, não restando forças suficientes para eclodir. Sendo assim, não seria possível recomendar uma mesma redução de temperatura inicial para todas as linhagens de frango, pois o desenvolvimento ósseo pode ser beneficiado, enquanto que o crescimento embrionário é prejudicado.

Tabela 1 – Artigos abordando o efeito da temperatura de incubação sobre o desenvolvimento ósseo

(Continua)

Artigo	Linhagem	Temperatura (°C)			Período da incubação com T (°C) alterada			Efeitos na incubação			
		TM/ TCO ¹	Alta	Baixa	Semana			T°C			
					1°	2°	3°	Alta		Baixa	
Autor e ano								+	-	+	-
Brookes e May (1972)	Leghorn branca híbrida	TM	39 e 40	35 e 36	x	Até 10d	---	x	--	--	--
Yalçin e Siegel (2003)	Linhagem comercial	TM	39,6	36,9 e 21	6h/dia 0-8d	36,9 6h/dia aos 10-18d e 21 24h aos 14d	6h/dia 10-18d	--	x	--	--
Yalçin <i>et al.</i> (2007)	Ross	TM	39	36,9	6h/dia 0-8d	6h/dia 10-18d	6h/dia 10-18d	x	x	x	x
Hammond <i>et al.</i> (2007)	Leghorn branca	TM	38,5	---	4-7d	---	---	x	--	--	--
Oviedo-Rondón <i>et al.</i> (2008a)	2 linhagens (alta e baixa condutância da casca, não nomeadas)	TM	39	36	---	---	18-21d	--	x	--	--
Oviedo-Rondón <i>et al.</i> (2008b)	Perus	TM	39	36	---	---	18-21d	--	x	--	--
Oviedo-Rondón <i>et al.</i> (2009)	Cobb 500®	TCO	39	36,7	36,7 de 1-7d	---	39°C 18-21d	--	x	--	x
Shim e Pesti (2011)	Cobb 500®	TM	38,5	36,5	4 a 7d	---	---	--	--	--	--

Tabela 1 – Artigos abordando o efeito da temperatura de incubação sobre o desenvolvimento ósseo

(Continuação)

Artigo Autor e ano	Linhagem	Temperatura (°C)			Período da incubação com T (°C) alterada			Efeitos na incubação			
		TM/ TCO ¹	Alta	Baixa	Semana			T°C			
Al Musawi <i>et al.</i> (2012)	Leghorn branca e Ross®	TM	38,5	---	4 a 7d	---	---	x	--	--	--
Groves e Muir (2014)	Linhagem de empenamento rápido	TCO	---	---	---	---	---	x	--	x	--
Van der Pol <i>et al.</i> (2014)	Ross 308®	TCO	38,6 e 39,4	36,9	x	x	x	--	x	--	--
Groves e Muir (2016)	Cobb 500®	TCO	---	36,9 e 37,3	36,9 atinge 37,8 aos 7d	36,9 atingiu 37,8 aos 14d	37,3 atingiu 37,8 aos 16d	--	--	x	--
Ipek e Sozcu (2016)	Cobb 500®	TCO	38,9-40	33,6-36,7	---	Início 10d	Fim 18d	--	--	--	--
Onznurlu <i>et al.</i> (2016)	Ross 308®	TM	38,8	---	---	Início 10d	Até a eclosão	--	x	--	--
Sgavioli <i>et al.</i> (2016)	Cobb®	TM	39	---	x	x	x	--	--	--	--
Muir e Groves (2017)	Linhagem de crescimento rápido	TCO	---	37,2	x	Atingiu 37,8 aos 13d	---	--	--	x	--
Muir e Groves (2019)	Cobb 500® e Ross 308®	TCO	---	36,75	x	x	Atingiu 37,8 16d	--	--	--	x

¹TM = temperatura da máquina; TCO = temperatura da casca do ovo

Tabela 1 – Artigos abordando o efeito da temperatura de incubação sobre o desenvolvimento ósseo

(Continuação)

Artigo Autor e ano	Linhagem	Temperatura (°C)			Período da incubação com T (°C) alterada			Efeitos na incubação			
		TM/ TCO ¹	Alta	Baixa	Semana		T°C				
Guz <i>et al.</i> (2020)	Ross 308®	TCO	38,9	36,7	---	Alta 1-7d	Baixa 15- 21d	--	--	--	--
Morita <i>et al.</i> (2020)	Cobb 500®	TCO	39	36	---	Início 13d	Até a eclosão	--	--	--	--

¹TM = temperatura da máquina; TCO = temperatura da casca do ovo

Tabela 2 – Principais efeitos da temperatura sobre o desenvolvimento ósseo de embriões e frangos de corte

Característica	Efeitos na incubação			
	T°C alta		T°C baixa	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Diferenciação dos condrócitos	--	Yalçin <i>et al.</i> (2007); Oviedo-Rondón <i>et al.</i> (2008b); Onznurlu <i>et al.</i> (2016)	--	Yalçin <i>et al.</i> (2007)
Densidade dos condrócitos	--	Oviedo-Rondón <i>et al.</i> (2008b)	--	--
Expressão de fatores e proteínas	--	Oviedo-Rondón <i>et al.</i> (2008b)	--	--
Simetria entre membros	--	Yalçin e Siegel (2003); Oviedo-Rondón <i>et al.</i> (2008a e 2008b)	--	Yalçin e Siegel (2003); Oviedo-Rondón <i>et al.</i> (2009)
Peso de ossos longos	--	Oviedo-Rondón <i>et al.</i> (2008a; 2008b e 2009); Van der Pol <i>et al.</i> (2014); Onznurlu <i>et al.</i> (2016)	--	--
Comprimento dos ossos longos	Brookes e May (1972); Hammond <i>et al.</i> (2007); Al Musawi <i>et al.</i> (2012)	Yalçin <i>et al.</i> (2007); Oviedo-Rondón <i>et al.</i> (2008a e 2008b); Van der Pol <i>et al.</i> (2014); Onznurlu <i>et al.</i> (2016)	--	--
Espessura dos ossos longos	--	Oviedo-Rondón <i>et al.</i> (2008a)	--	--
Cinzas nos ossos (mineralização)	Brookes e May (1972); Yalçin <i>et al.</i> (2007); Groves e Muir (2014)	--	Muir e Groves (2017 e 2019); Yalçin <i>et al.</i> (2007); Groves e Muir (2014)	Muir e Groves (2019)
Relação osso mineralizado: cartilagem (ossificação)	Al Musawi <i>et al.</i> (2012)	--	--	--

A temperatura de incubação exerce influência sobre o desenvolvimento ósseo em diversos aspectos. Os trabalhos na literatura relataram efeitos positivos e negativos tanto da redução quanto da elevação da temperatura e tais impactos são percebidos na incubação e eclosão. Uma maior quantidade de artigos relatou efeitos negativos da alta temperatura sobre o esqueleto durante a incubação, sinalizando que esse perfil pode ter

maior influência sobre o sistema locomotor dos frangos, mas novos estudos para confirmar essa teoria são necessários.

As características mais afetadas pela alteração na temperatura durante a incubação foram a diferenciação dos condrócitos, a simetria entre os membros, a morfometria de ossos longos e o teor de cinzas dos ossos.

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 experimento foi realizado no Núcleo Brasileiro de Pesquisas em Incubação Artificial de Ovos (NUPIA), pertencente à Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (EMEVZ-UFBA), localizado na cidade de Salvador, Bahia.

3.2 Ovos e tratamentos

Foram obtidos um total de 2.464 ovos incubáveis de matrizes pesadas da linhagem Cobb 500[®] com idade de 45 semanas, provenientes de um incubatório comercial. Utilizou-se ovos pertencentes à segunda coleta do mesmo dia. Imediatamente após a coleta, ainda na granja, os ovos destinados à incubação foram desinfetados pelo método de fumigação com paraformaldeído na concentração de 10g/m³ e posteriormente transportados para o incubatório em veículo climatizado, com temperatura inferior ao ponto zero fisiológico, considerado aproximadamente 21°C.

Na chegada ao incubatório realizou-se a seleção dos ovos, eliminando aqueles considerados não incubáveis (sujos, trincados, quebrados, pequenos e deformados). Em seguida os ovos incubáveis com peso entre 64,0 e 66,5g foram colocados em bandejas de incubação com capacidade para 86 ovos cada. 28 bandejas foram selecionadas e

identificadas aleatoriamente, sendo 7 bandejas identificadas para cada tratamento (temperatura da casca do ovo baixa, controle, alta e muito alta). Os ovos dos respectivos tratamentos permaneceram na sala de armazenamento por três dias, com médias de temperatura e umidade relativa do ar (UR) de 20°C e 80%, respectivamente.

3.3 Pré-incubação e incubação dos ovos

Após o período de armazenamento e antes do início da incubação, realizou-se um pré-aquecimento dos ovos durante 10 horas. A sala de pré-aquecimento foi mantida em temperatura média de 28°C e UR média de 55%. Após este período os ovos foram transferidos do incubatório para o NUPIA e imediatamente antes da entrada dos ovos na incubadora, cada bandeja com 86 ovos foram pesadas de acordo com os tratamentos.

No período de incubação foram utilizadas quatro máquinas incubadoras modelo Premium Ecológica® IP600 de estágio único, com capacidade para 600 ovos e controle digital de temperatura, umidade e viragem. A viragem ocorreu num ângulo de 45° a cada hora e a umidade relativa nas incubadoras foi mantida entre 45 e 60%.

As máquinas de incubação foram reguladas para manter a temperatura da máquina em 37,8°C (100°F). Entre o 8º e 18,5º dia de incubação, uma máquina foi regulada para manter a temperatura de casca em 37,8°C (TCO controle) e outras três máquinas foram reguladas para manter a temperatura de casca do ovo (TCO) em: 36,7°C (98°F) (Tratamento TCO baixa), 38,9°C (102°F) (Tratamento TCO alta) e 39,4°C (103°F) (Tratamento TCO muito alta).

Com a finalidade de incubar os ovos com o controle da temperatura da casca, em cada máquina foram incluídos sete sensores de temperatura (TI-33Ri plus®). Os sensores foram unidos às cascas de ovos por meio de fita adesiva (Scotch® ToughDuct Tape – 3M) em sua região equatorial. A temperatura da casca foi monitorada a cada 6 horas por meio do programa (SITRAD® versão 4.13) e quando necessário, ajustes nas máquinas de incubação foram realizados para manter as temperaturas da casca desejadas em cada tratamento. Nos ovos que continham os sensores, foi realizada ovoscopia diária entre o 8º e o 18,5º dia de incubação para confirmação da viabilidade dos mesmos.

Aos 18,5 dias de incubação, os ovos foram transferidos para bandejas de nascimento e todas as máquinas foram reguladas para a temperatura de máquina fixa em 37,8°C (100°F) até o nascimento.

3.4 Nascimento dos pintos

O momento em que os ovos foram colocados na incubadora foi denominado hora zero. Os ovos dos tratamentos controle, TCO alta e TCO muito alta começaram a eclodir a partir de 19,5 dias de incubação (468H), e a partir desse momento foram feitas retiradas de pintos do nascedouro a cada 12 horas até as 516H, quando a incubação foi finalizada para esses tratamentos. Os ovos do tratamento TCO baixa começaram a eclodir às 492H e a incubação foi encerrada às 540H (Tabela 3). Todos os pintos foram analisados 12 horas após a retirada do nascedouro.

Tabela 3 – Número de pintos retirados do nascedouro a cada 12 horas

Tratamento	Pintos retirados do nascedouro							Total de pintos
	468H	480H	492H	504H	516H	528H	540H	
Controle	2	3	3	3	3	0	0	14
Alta	2	3	3	3	3	0	0	14
Muito alta	2	3	3	3	3	0	0	14
Baixa	0	0	2	3	3	3	3	14

Os pintos eclodidos em cada bandeja dos tratamentos foram registrados para avaliação da “janela de nascimento”, que compreendeu o momento entre os primeiros e os últimos pintos nascidos. Os pintos nascidos foram contabilizados e colocados em caixas devidamente identificadas de acordo com os tratamentos e horário da retirada. Em cada retirada foi contabilizado o total de pintos mortos, assim como a presença de refugos, como pintos com canela vermelha, ponto vermelho no bico, caixa craniana aberta, cavidade abdominal aberta, desidratados, balofos e com anormalidades.

3.5 Análises de rendimento de incubação

3.5.1 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:

$$\text{Perda de peso} = \frac{(\text{Peso dos ovos na incubação} - \text{Peso dos ovos na transferência})}{\text{Peso dos ovos no início da incubação}} \times 100 \quad [1]$$

3.5.2 Mortalidade embrionária e fertilidade

Aos 18,5 dias e ao final do período de nascimento, o número de ovos não eclodidos de cada máquina foi registrado, sendo os mesmos examinados para se determinar o percentual de ovos inférteis, ovos bicados (pintos que não conseguiram eclodir) e a fase em que ocorreu a mortalidade embrionária, incluindo a observação sobre mau-posicionamento e anormalidades morfológicas e conformacionais, de acordo com 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 8 a 18,5 dias de incubação;
- Ovos com embriões que morreram entre 19 a 21 dias de incubação;
- Ovos bicados com embriões vivos ou mortos;

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).

3.5.3 Taxa de eclosão total em relação ao número de ovos férteis

Os ovos inférteis foram identificados aos 18,5 dias de incubação e ao final do nascimento. A taxa de eclosão total em relação ao número de ovos férteis foi determinada utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de eclosão total em relação aos ovos férteis} = \frac{\text{Total de pintos nascidos}}{\text{N}^\circ \text{ ovos férteis}} \times 100 \quad [2]$$

3.6 Análises em cascas

As avaliações em cascas foram realizadas em 14 amostras por tratamento, nos ovos incubáveis, aos 8, 18,5 dias de incubação e ao nascimento. Após a quebra dos ovos e separação do albúmen e gema, as cascas foram lavadas em água corrente para a retirada de resíduos de albúmen e membranas, secaram a temperatura ambiente durante 24 horas e foram pesadas individualmente em balança analítica digital (0,001g) (Mater[®], modelo AY200).

A espessura da casca dos ovos foi mensurada em duplicata, por meio de um micrômetro digital (Digimess[®] resolução 0.001mm, 0-25mm) em fragmentos retirados das regiões apical, equatorial e basal, a partir dos quais se obteve a espessura média por ovo (mm). Após a mensuração de espessura, as cascas resultantes foram armazenadas a 4°C até a realização das análises de minerais das cascas.

As determinações de minerais nas cascas: cálcio (mg), fósforo (mg), manganês (µg) e magnésio (mg) foram realizadas em duplicata e de acordo com a metodologia de Yair e Uni (2011). As cascas foram trituradas e queimadas em mufla (Solidsteel[®],) a 600°C por 10 horas e cerca de 100 a 150mg das cinzas foram digeridas com uma mistura de 2mL de 30% H₂O₂ e 4mL de 70% HNO₃ em tubo plástico de 50ml por 6h em banho-maria a 95°C. As amostras digeridas foram analisadas por meio de espectrofotômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) (Varian[®], Mulgrave, Austrália) utilizando soluções padrão (Certipur Merck[®], Darmstadt, Alemanha). Os resultados foram expressos como média de peso absoluto do mineral na casca, multiplicando-se a concentração de cada mineral analisado na amostra pelo total do peso da casca.

3.7 Análises em gemas e saco vitelínico residual

As avaliações foram realizadas em 14 amostras por tratamento, na gema dos ovos incubáveis, no saco vitelínico residual aos 8, 18,5 dias de incubação e ao nascimento. Após a quebra dos ovos ou a eutanásia dos pintos recém-eclodidos, feita por deslocamento cervical, a separação das gemas/saco vitelínico foi realizada manualmente e os resíduos de albúmen aderidos foram removidos com o auxílio de papel absorvente. Após este procedimento, as gemas/saco vitelínico foram homogeneizadas, pesadas

individualmente em balança analítica digital (0,001g) (Mater[®] modelo AY200) e armazenadas a -20°C para posterior análises de minerais.

O conteúdo de gema de cada amostra foi separado da membrana vitelínica e cerca de 100 a 150g foi utilizado para as determinações de minerais: cálcio (mg), fósforo (mg), manganês (µg) e magnésio (mg). As análises foram realizadas em duplicata e de acordo com a metodologia de Yair e Uni (2011), descrita para as análises das cascas. Os resultados foram expressos como média de peso absoluto do mineral na gema/saco vitelínico residual, multiplicando-se a concentração de cada mineral analisado na amostra pelo total do peso da gema/saco vitelínico residual.

3.8 Análises em embriões e pintos

3.8.1 Peso do corpo sem o saco vitelínico residual (YFBM) e comprimento

Aos 8 e 18,5 dias de incubação, 2 ovos por bandeja e tratamento foram retirados da máquina para que os embriões tivessem seu peso sem o saco vitelínico residual – (YFBM –*yolk free body mass*) registrados individualmente em balança analítica de 0,001g. Ao longo dos nascimentos, 14 pintos recém-eclodidos por tratamento também foram selecionados aleatoriamente para a determinação desta variável.

Todos os embriões/pintos recém eclodidos de cada tratamento também tiveram o seu comprimento mensurado por um paquímetro digital (Digimess[®] resolução 300 mm, 0-0,001mm), da ponta do bico até o dedo do membro inferior direito, desconsiderando a unha, de acordo com Hill (2001).

3.8.2 Qualidade de umbigo, peso dos órgãos e dos pintos recém-eclodidos

Os pintinhos recém eclodidos, utilizados nas análises anteriores, foram classificados quanto à cicatrização do umbigo, onde receberam escores: 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 de acordo com Tona *et al.* (2003).

Os pesos absolutos dos pintos, assim como os órgãos (coração, pulmão, fígado, estômago (proventrículo+moela), intestinos, bursa, baço e saco vitelínico) foram

coletados para que pudessem ser pesados individualmente em balança analítica de 0,001g. A abertura da cavidade abdominal se iniciou pelo orifício umbilical com exposição de todos os órgãos. Primeiramente se retirou o saco residual da gema. Os órgãos abdominais foram retirados em conjunto e depois foram separados, sendo coletado o fígado, o baço, o proventrículo + moela e depois os intestinos. O coração também foi coletado, finalizando-se com a retirada dos pulmões e bursa. Esses órgãos foram expressos de forma relativa ao YFBM, que foi obtido pela subtração entre o peso do pinto e o peso do saco vitelínico residual.

3.8.3 Parâmetros fisiológicos dos pintos de um dia

Para avaliar o status fisiológico dos pintos de um dia, as mesmas amostras de 14 pintos por tratamento foram utilizadas. Os pintinhos foram eutanasiados por deslocamento cervical e as amostras de sangue coletadas por meio da veia jugular. Imediatamente após a coleta, as amostras de sangue foram acondicionadas em tubos tipo Vacutaner[®]. 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 cálcio, fósforo e Fosfatase Alcalina foram determinadas por meio de um analisador bioquímico automático (BioSystems[®]) utilizando-se kits comerciais (Labtest Diagnóstica[®]. Lagoa Santa, MG, BR). As análises hormonais de triiodotironina (T₃), tiroxina (T₄), foram determinadas por ELISA utilizando kits comerciais (Monobind[®], Lake Forest, CA, USA) (Morita *et al.*, 2016). A vitamina D3 no soro foi analisada pelo kit ELISA 1,25-dihidroxivitamina D3 (Elabscience, Houston, Texas, USA), paratormônio pelo kit chicken PTH (Elabscience, Houston, Texas, USA) (Guz *et al.*, 2019); calcitonina pelo kit chicken calcitonin (MyBioSource, San Diego, CA, USA) e contador de radiação gamma (Gamma-C12, Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA, USA).

3.8.4 Análises ósseas

a) Peso, comprimento e largura dos ossos

Aos 18,5 dias de incubação e ao longo do nascimento, foram retiradas a tíbia e fêmur da perna esquerda de cada uma das 14 amostras por tratamento obtidas aleatoriamente. Os ossos foram limpos de todos os tecidos moles e cartilagens e pesados em balança analítica digital (0,001 g). O peso relativo dos ossos foi calculado dividindo-se o peso da tíbia ou fêmur pelo YFBM (mg/g). Após a pesagem, os ossos foram mensurados externamente duas vezes por um paquímetro digital (Digimess[®] resolução 300 mm, 0-0,001 mm). O comprimento do fêmur foi determinado da borda proximal do trocânter até a borda distal do côndilo. O comprimento da tíbia foi medido da extremidade proximal na eminência intercondilar até a extremidade da epífise distal. Para a largura foi considerado o diâmetro mediolateral. Após estes procedimentos, os ossos foram envoltos em gaze embebida com soro e armazenados em sacos plásticos a -20°C para análises posteriores.

b) Teste biomecânico

Os mesmos ossos foram submetidos a um ensaio biomecânico para a análise de força para a fratura usando o método descrito por Shim *et al.* (2012). No dia do teste, a tíbia e o fêmur esquerdos foram descongelados à temperatura ambiente dentro dos sacos plásticos. No momento da análise da resistência à ruptura, cada amostra óssea foi retirada do saco e mantida umedecida com gaze embebido em água destilada até ser colocada no instrumento. Para evitar variação adicional na medida de força, cada osso foi orientado para garantir que a flexão ocorresse em torno do ponto médio da face ântero-posterior. A resistência à fratura óssea foi medida usando o teste de flexão de 3 pontos com o uso de uma máquina universal EMIC[®], Instron, DL 3000 e software BlueHill[®]. O osso foi ancorado em dois pontos de apoio medindo 5 mm de distância. Uma sonda de base redonda foi acoplada a uma célula de carga de 5kg e a força foi aplicada no ponto médio da face ântero-posterior de cada osso com velocidade de aplicação da carga de 1 mm/min. A resistência à fratura óssea foi definida como a carga de compressão máxima (Kg) aplicada na qual a amostra óssea não era mais resistente.

c) Análises de cinzas e minerais dos ossos

Após a tíbia e fêmur esquerdos das amostras serem testados mecanicamente, uma pequena secção da diáfise média de cada osso (cerca de 15% do comprimento) foi removida para a quantificação de cinzas usando o método descrito por Yair *et al.* (2012). Cada amostra foi colocada num recipiente com acetona por 12 horas para a remoção de todos os lipídeos. Posteriormente as amostras foram dispostas em cadinhos de cerâmica e aquecidas em forno em uma temperatura de 105°C por 6h para a remoção de toda a água. Após o aquecimento, a amostra foi pesada para a determinação do peso seco em balança analítica digital (0,001g) e colocadas em cadinhos de cerâmica para serem queimadas em mufla a 600°C por 10 horas. As cinzas remanescentes foram pesadas, e desta forma, o percentual de cinzas dos ossos secos de cada amostra foi determinada.

Cerca de 100 a 150 mg de cada amostra de cinzas da tíbia foi coletada para examinar o conteúdo dos minerais cálcio (mg), fósforo (mg), manganês (μg) e magnésio (mg), por meio de espectrofotômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) (Varian®, Mulgrave, Austrália) utilizando soluções padrão (Certipur Merck®, Darmstadt, Alemanha). Os resultados do conteúdo de Ca, Mn, P e Mg foram calculados em percentual relativo ao peso das cinzas.

d) Calcificação óssea

A tíbia e o fêmur direitos foram utilizados para a análise de calcificação, sendo 14 amostras por tratamento aos 18,5 dias e ao nascimento. O estágio de desenvolvimento dos ossos foi investigado usando a técnica de coloração diferencial na qual as amostras foram coradas com Alcian Blue e Alizarin Red (KELLY; BRYDEN, 1983; BLOM; LILJA, 2004) para análise de tecido não calcificado e calcificado, respectivamente. As imagens digitais foram tiradas usando 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. O percentual de calcificação ($[\text{área calcificada}/\text{área óssea}] * 100$) foi medido a partir de imagens digitais e calculada por meio do aplicativo ImageJ® (National Institutes of Health, Bethesda, MD) disponível online em:

<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). A barra de escala impressa nas imagens digitais foi utilizada para calibrar o programa.

3.9 Análise Estatística

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

$$Y_i = \mu + \text{Temperatura}_i + \varepsilon_i \quad [3]$$

Onde Y_i = a variável dependente, μ é a média geral, Temperatura_i = TCO (i = baixa, controle, alta ou muito alta), e ε_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%. Também foi conduzida uma análise de regressão.

Nas variáveis do rendimento de incubação foram utilizadas 7 bandejas (602 ovos) por tratamento e a bandeja foi considerada a repetição. As avaliações em cascas, gemas, embriões e pintos foram realizadas em 14 amostras por tratamento, sendo o ovo, embrião ou pinto considerados a unidade experimental. As premissas do modelo foram verificadas pelo exame das distribuições das médias e resíduos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As alterações nas temperaturas de casca (TCO) tiveram efeito significativo sobre a maioria das variáveis analisadas. De forma geral, tanto o teste de médias quanto a regressão identificaram as diferenças. Nos casos de regressão significativa, os modelos que melhor se ajustaram foram os quadráticos.

4.1 Rendimento de incubação e qualidade dos pintos

Quanto aos resultados da incubação (Tabela 4), apenas a fertilidade e a mortalidade inicial não apresentaram diferenças significativas. A perda de peso aumentou

com a TCO, seguindo um padrão quadrático ($p \leq 0,05$). A eclodibilidade total sobre os ovos férteis teve o melhor resultado na TCO controle, sendo reduzida em 10,81% na TCO alta, 17,33% na baixa e 28,69% na muito alta. Quanto à mortalidade embrionária, os menores valores foram obtidos quando a TCO foi 37,8°C, sendo que qualquer desvio nessa temperatura resultou em aumento na mortalidade. A TCO muito alta promoveu os maiores índices de mortalidade em todos os estágios, exceto na fase intermediária (8 a 18,5 dias), quando foi semelhante à TCO baixa ($p \leq 0,05$). As alterações na TCO também aumentaram a incidência de embriões que chegaram a bicar os ovos, mas não nasceram, sendo que a TCO muito alta teve os maiores valores, seguidos pela alta e baixa, que foram semelhantes entre si. A refugagem também foi influenciada pela TCO, sendo mais elevada na TCO muito alta, seguida pela baixa e então pela alta (aumento de 3,72%; 2,27% e 1,34% em relação ao controle, respectivamente).

Tabela 4 – Parâmetros de incubação em temperaturas de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia

Temperatura	Perda de peso (%)	Fertilidade (%)	Eclod. ¹ (%)	Mortalidade (%)						Refugos (%)
				Inicial	Intermediária	Tardia	Bicados	Tardia+bicados	Total	
Baixa	10,07 ^d	97,58	76,22 ^c	3,02	5,56 ^a	12,27 ^b	2,92 ^b	15,20 ^b	23,77 ^b	2,47 ^b
Controle	10,81 ^c	97,77	93,55 ^a	2,79	0,83 ^c	1,61 ^d	1,20 ^c	2,81 ^d	6,44 ^d	0,20 ^d
Alta	11,91 ^b	97,93	82,74 ^b	2,96	3,42 ^b	8,42 ^c	3,42 ^b	11,85 ^c	18,25 ^c	1,54 ^c
Muito alta	12,88 ^a	97,82	64,86 ^d	2,86	5,90 ^a	20,69 ^a	5,67 ^a	26,37 ^a	35,13 ^a	3,92 ^a
SEM	0,218	0,214	2,035	0,173	0,407	1,341	0,324	1,634	2,009	0,264
Valor de P										
ANOVA	<0,0001	0,957	<0,0001	0,970	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Quadrática	<0,0001	0,8637	<0,0001	0,9486	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
R ²	0,8849	----	0,9618	----	0,9005	0,9665	0,8995	0,9774	0,9771	0,9631

^{a,b} Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

¹Taxa de eclodibilidade sobre o total de ovos férteis

SEM: erro padrão da média

A ausência de diferença significativa na fertilidade demonstra a homogeneidade do lote utilizado, sendo os valores compatíveis com a idade da matriz. Da mesma forma, o peso dos ovos foi padronizado, havendo seleção para garantir uma variação de, no máximo, 2,5g.

Ao longo da incubação o ovo perde parte da água nele contida, sendo esse fato necessário para a formação da câmara de ar que será utilizada na transição para a respiração pulmonar (RAHN *et al.*, 1974; MEIJERHOF; VAN BEEK, 1993). Esse processo resulta em redução de 11 a 14% do peso inicial do ovo até o momento da transferência para o nascedouro (FRENCH, 2004; DECUYPERE *et al.*, 2013). Embora o aumento na TCO tenha elevado a perda de peso do ovo, todas as médias se mantiveram dentro dos níveis esperados. Os principais fatores que afetam essa característica são a condutância da casca e a diferença de pressão do vapor d'água entre o ovo e o ambiente (principalmente influenciado pela umidade relativa do ar, temperatura e ventilação) (MEIJERHOF; VAN BEEK, 1993; BARBOSA, 2011). Assim, o aumento da TCO modificou a pressão do vapor d'água, promovendo maior evaporação do conteúdo de água do ovo e, conseqüentemente, maior perda de peso.

Conforme era esperado, a mortalidade inicial não foi afetada pelas temperaturas, visto que os tratamentos só foram iniciados aos 8 dias de incubação. A TCO influenciou negativamente a mortalidade nos estágios seguintes, embora com algumas diferenças. Na fase intermediária o efeito da TCO baixa foi igual ao da muito alta, enquanto que na fase tardia a TCO muito alta teve os piores resultados. Essas discrepâncias provavelmente se devem ao fato de que o metabolismo em cada uma das fases de desenvolvimento embrionário ocorre de forma distinta. Entre 8 e 18,5 dias o embrião tem alta disponibilidade de oxigênio garantida pela membrana corioalantóidea (MCA) e pode se desenvolver em maior velocidade graças à utilização dos lipídios da gema (LOURENS *et al.*, 2005; MAATJENS *et al.*, 2017). Porém, nos últimos dias de incubação ele atravessa uma fase estressante em que a demanda por O₂ é tão alta que ultrapassa a capacidade de trocas gasosas da MCA e da casca (LOURENS *et al.*, 2007). Quando a TCO é elevada na fase intermediária, a taxa metabólica aumenta, assim como o consumo de O₂, a oxidação de carboidratos e o catabolismo de proteínas, agravando o cenário mencionado do fim da incubação (OLIVEIRA *et al.*, 2008; PIESTUN *et al.*, 2009; MOLENAAR *et al.*, 2010; MAATJENS *et al.*, 2014b). Essas alterações resultam em pior desenvolvimento do

embrião, o que no presente trabalho foi corroborado pela menor utilização da gema, YFBM e qualidade do pinto.

Esse efeito sobre o metabolismo também parece ser o responsável pelo aumento no número de ovos bicados, mas não eclodidos. Na TCO alta e muito alta a exigência de energia associada à baixa disponibilidade de O₂ leva o embrião à necessidade de consumir as reservas de glicogênio que seriam utilizadas no momento da eclosão (DECUYPERE; MICHELS, 1992; CHRISTENSEN *et al.*, 2001; MOLENAAR *et al.*, 2010), além de não desenvolverem adequadamente o músculo da eclosão (*pipping muscle*) (MOLENAAR *et al.*, 2013). Na TCO baixa, o metabolismo mais lento prolongou a duração da incubação, o que também pode ter exaurido as reservas energéticas (MUIR; GROVES, 2019). Em ambos os casos, os embriões chegam a fazer a bicagem interna, mas não tem forças suficientes para romper a casca e eclodir. Os resultados da mortalidade total e total somada aos bicados foram um reflexo especialmente da mortalidade tardia, com o tratamento TCO muito alta sendo pior que os demais. A redução na eclodibilidade se deve ao aumento da mortalidade embrionária, sendo prejudicada em todas as alterações de temperatura e tendo os piores resultados na TCO muito alta e na TCO baixa.

As alterações no metabolismo promovidas pela TCO durante a incubação podem afetar o embrião de modo que o pintinho chega a eclodir, mas sua qualidade é inferior ao padrão e, portanto, serão considerados refugos (DECUYPERE; BRUGGEMAN, 2007). No presente estudo, todos os desvios na TCO promoveram aumento na incidência de refugos, com maiores valores na TCO muito alta, seguidos da TCO baixa e então da alta.

A duração da incubação variou entre os tratamentos ($p \leq 0,05$). A temperatura de casca baixa prolongou o tempo até a eclosão, enquanto as temperaturas altas aceleraram o fim da incubação (TCO baixa = 21,5a; TCO controle = 20,9b; TCO alta = 20,4c; TCO muito alta = 20,3c). A retirada dos pintos, entretanto, foi feita de maneira controlada, selecionando um número igual a cada 12 horas em todos os tratamentos. Dessa forma, em cada uma das temperaturas houveram pintos nascidos em todos os momentos, e então a diferença na duração da incubação não influenciou os resultados. É preciso destacar que, para as variáveis de rendimento da incubação a temperatura de casca muito alta foi a mais prejudicial para todas as características, seguida da temperatura baixa, que promoveu resultados piores que a alta temperatura.

Os resultados de peso do ovo antes da incubação, pesos dos pintos, peso relativo de órgãos e escore de umbigo no momento da eclosão estão apresentados na Tabela 5.

A variável peso do ovo não apresentou diferença significativa. O peso corporal dos pintos ao nascer foi prejudicado pelo aumento na TCO, mas não pela redução. Porém, ao analisar o peso do corpo sem a gema (YFBM) é possível observar que todas as alterações da temperatura surtiram efeito negativo ($p \leq 0,05$). A sua redução em relação ao tratamento controle foi de 1,1% na temperatura baixa; 12,6% na alta e 14,5% na muito alta. O YFBM foi afetado de forma mais acentuada, visto que o peso corporal (considerando a gema) foi reduzido em apenas 0,7%; 4,7% e 5,1% nos respectivos tratamentos.

O peso dos órgãos em relação ao YFBM foi influenciado de diferentes formas. O peso do intestino, fígado, pulmões e bursa foram semelhantes entre o controle e a TCO baixa, mas diminuíram quando a temperatura foi aumentada, sendo que para o intestino e bursa a TCO muito alta teve efeito ainda mais pronunciado na redução ($p \leq 0,05$). O peso do baço foi reduzido em todas as alterações de temperatura, quando comparadas ao controle. O maior resultado foi encontrado na TCO controle, seguido da baixa e então da alta e muito alta, que foram semelhantes entre si. O peso do coração, por outro lado, diminuiu conforme a TCO aumentou. O peso relativo do estômago e pâncreas não foram afetados pelos tratamentos. As variações na TCO também influenciaram negativamente a qualidade do umbigo, sendo o pior escore encontrado nos pintinhos submetidos à temperatura muito alta, seguidas da TCO alta, baixa e controle ($p \leq 0,05$).

Tabela 5 – Peso do ovo antes da incubação, pesos dos pintos, peso relativo de órgãos e escore de umbigo no momento da eclosão de pintos incubados em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8º e o 18,5º dia

Temperatura	Peso do ovo (g)	Pinto de 1 dia (g)		Peso de órgãos relativo ao YFBM (%)								Umbigo
		Peso	YFBM	Coração	Fígado	Estôm. ¹	Intestino ²	Pulmões	Baço	Pâncreas	Bursa	
Baixa	65,21	46,76 ^a	41,26 ^b	0,87 ^a	3,26 ^a	6,98	4,91 ^a	1,06 ^a	0,04 ^b	0,17	0,13 ^a	2,10 ^c
Controle	65,17	47,10 ^a	41,72 ^a	0,83 ^b	3,29 ^a	6,98	4,90 ^a	1,06 ^a	0,05 ^a	0,18	0,12 ^a	1,40 ^d
Alta	65,18	44,89 ^b	36,47 ^c	0,68 ^c	2,75 ^b	6,85	4,43 ^b	0,96 ^b	0,03 ^c	0,18	0,09 ^b	2,30 ^b
Muito alta	65,24	44,68 ^b	35,65 ^d	0,58 ^d	2,69 ^b	6,82	4,19 ^c	0,92 ^b	0,03 ^c	0,16	0,09 ^c	2,90 ^a
SEM	1,100	0,152	0,369	0,015	0,041	0,026	0,043	0,009	0,001	0,001	0,002	0,074
Valor de P												
ANOVA	0,9942	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,051	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,059	<0,0001	<0,0001
Quadrática	0,9646 ³	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0223 ³	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0576 ³	<0,0001	<0,0001
R ²	----	0,8136	0,9246	0,9653	0,7568	----	0,8922	0,6706	0,7574	----	0,8713	0,9273

^{a,b} Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

¹ Estômago = proventrículo + moela

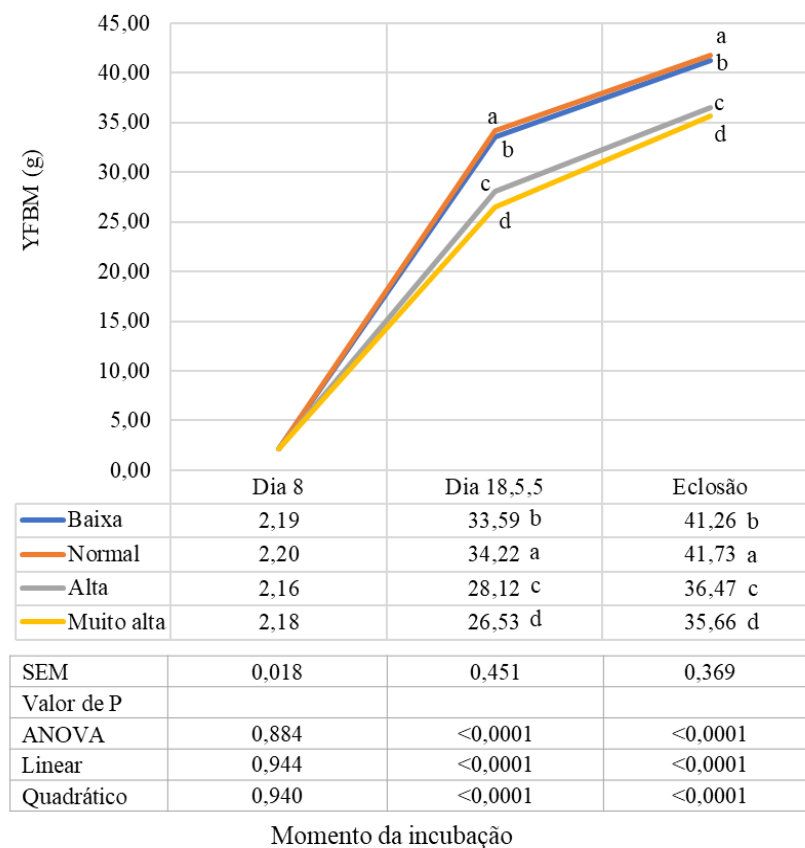
² Intestino delgado + intestino grosso

³ Parâmetros da regressão não foram significativos

SEM: erro padrão da média

O YFBM (Figura 4) e o comprimento do pinto (Figura 5) durante a incubação foram influenciados de forma semelhante pela temperatura. Aos 8 dias não houve diferença significativa entre os tratamentos, mas tanto aos 18,5 dias quanto no momento da eclosão qualquer variação na temperatura promoveu redução no YFBM e comprimento do pinto, em comparação ao controle ($p \leq 0,05$). O YFBM aos 18,5 dias foi reduzido em 0,62 g na TCO baixa; 6,1 g na TCO alta e 7,68 g na TCO muito alta, e na eclosão a redução foi de 0,46 g; 5,25 g e 6,07 g nos respectivos tratamentos. O comprimento aos 18,5 dias sofreu diminuição de 0,18 cm (TCO baixa); 1,3 cm (TCO alta) e 1,6 cm (TCO muito alta), enquanto que na eclosão essa queda foi de 0,3 cm (TCO baixa); 1,31 cm (TCO alta) e 1,75 cm (TCO muito alta).

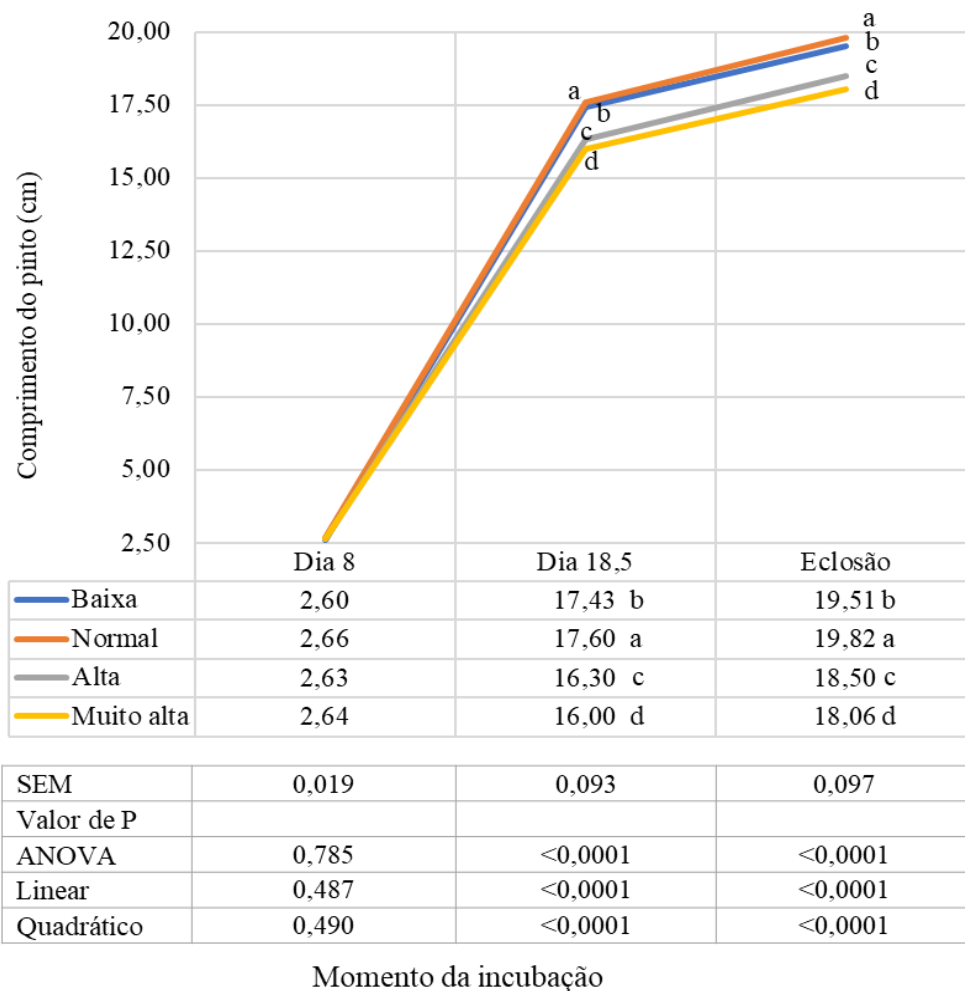
Figura 4 – Peso do pinto sem gema (YFBM, g) ao longo da incubação em temperatura de casca baixa ($36,7^{\circ}\text{C}$), controle ($37,8^{\circ}\text{C}$), alta ($38,9^{\circ}\text{C}$) e muito alta ($39,4^{\circ}\text{C}$) entre o 8^o e o 18,5^o dia



a, b: médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

SEM: erro padrão da média

Figura 5 – Comprimento do pinto (cm) ao longo da incubação em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia

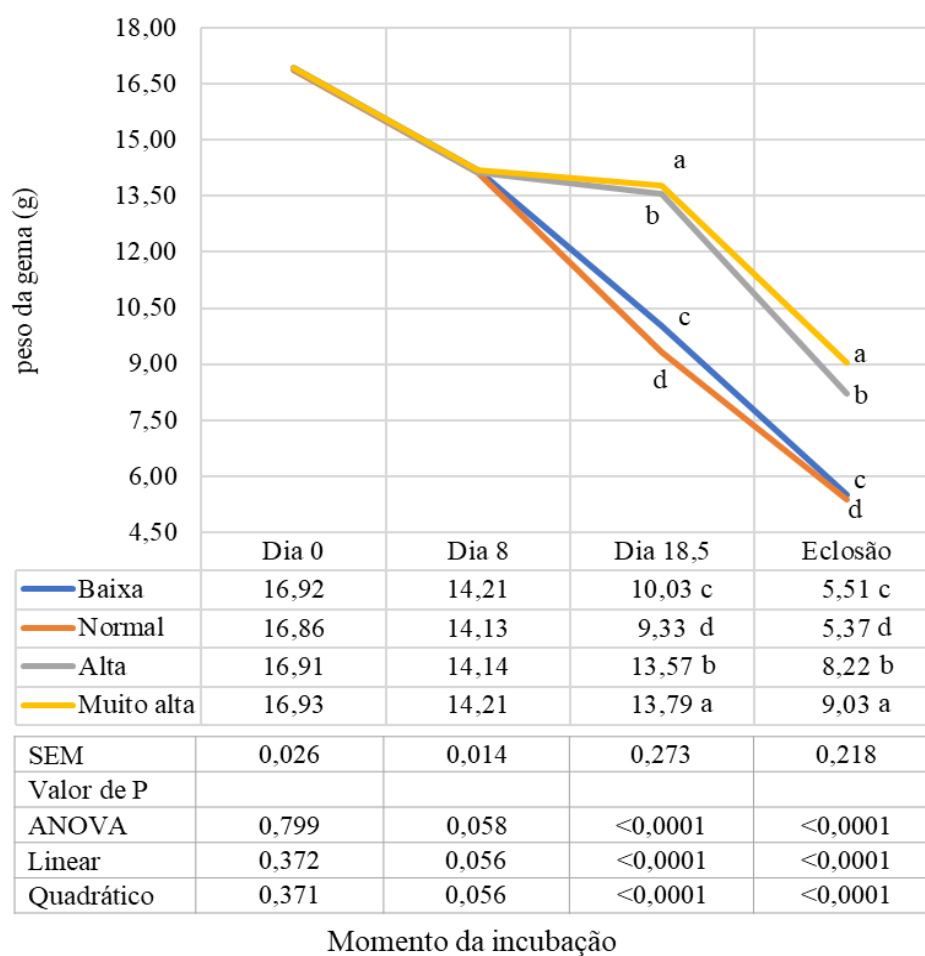


a, b: médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

SEM: erro padrão da média

O peso da gema e saco vitelínico residual (Figura 6) diminuiu com o passar da incubação e esse processo foi influenciado pelos tratamentos a partir do 18° dia de incubação. No 18,5° dia e no momento da eclosão todos os desvios de temperatura acima ou abaixo do controle aumentaram o peso da gema residual ($p \leq 0,05$). Os efeitos se tornaram mais marcantes com o aumento da TCO (TCO baixa = +0,69 g; TCO alta = +4,23 g; TCO muito alta = +4,46 g aos 18,5 dias e TCO baixa = +0,14 g; TCO alta = +2,85 g; TCO muito alta = +3,66 g no dia da eclosão).

Figura 6 – Peso da gema (g) ao longo da incubação em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia



a, b: médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

SEM: erro padrão da média

O peso do pinto geralmente está associado com o peso do ovo (MEIJERHOF, 2009), mas nesse estudo o peso dos ovos foi semelhante, enquanto que o peso do pinto na eclosão foi reduzido pelo aumento na TCO, provavelmente devido à desidratação sofrida pelos pintos após a exposição a essas condições, o que pode ser comprovado pela maior perda de peso dos ovos nos tratamentos com TCO alta e muito alta. A literatura recomenda utilizar o YFBM para avaliar o real aproveitamento dos nutrientes, uma vez que valores maiores dessa variável indicam que o pintinho foi mais eficiente em converter o conteúdo da gema em tecido corporal (LOURENS *et al.*, 2007; MOLENAAR *et al.*, 2011). No nosso estudo, tanto a temperatura baixa quanto as altas reduziram o YFBM e

aumentaram a gema residual aos 18,5 dias e na eclosão. Nossos resultados corroboram com os encontrados por Van Den Brand *et al.* (2021), que observaram redução no YFBM e aumento na gema residual ao utilizar 38,9°C a partir do 8º dia de incubação. Willemsem *et al.* (2010) também observaram valores piores na temperatura alta (40,6°C do 16º ao 18º dia) porém nenhum efeito na temperatura baixa (34,6°C). Maatjens *et al.* (2016) melhoraram os índices mencionados utilizando temperaturas baixas (35,5 ou 36,7 °C), entretanto os tratamentos foram realizados a partir de 15 dias.

Os efeitos da TCO sobre essas variáveis se devem às mudanças que ocorrem no metabolismo embrionário e no padrão de utilização dos nutrientes. Quando a temperatura é elevada o embrião passa a utilizar a glicose para obter energia por via anaeróbica, reduzindo a síntese e o estoque de glicogênio (MOLENAAR *et al.*, 2010; MAATJENS *et al.*, 2014b). Como a quantidade desses carboidratos é limitada, os aminoácidos podem então ser utilizados como fonte de energia ao invés de serem direcionados para a formação dos músculos. O resultado será um pintinho com menor peso corporal e menor YFBM (MOLENAAR *et al.*, 2013; MAATJENS *et al.*, 2014a; DAYAN *et al.*, 2020).

Ao longo da incubação o peso da gema vai reduzindo na medida em que o embrião absorve os nutrientes nela contidos (YAIR; UNI, 2011). Porém, a modificação da temperatura de incubação também afeta a eficiência dessa utilização (LOURENS *et al.*, 2007; OVIEDO-RONDÓN *et al.*, 2008a; MOLENAAR *et al.*, 2011; DAYAN *et al.*, 2020) provavelmente por alterações na vascularização da membrana do saco vitelínico (MSV) (LIN *et al.*, 2017) e na expressão de genes importantes para o transporte dos nutrientes (BARRI *et al.*, 2011).

Assim como aconteceu com o YFBM o comprimento do pinto foi reduzido quando a temperatura foi alterada, provavelmente pelas mesmas razões. Essa redução indica que o desenvolvimento embrionário foi inadequado, devido às alterações metabólicas e na eficiência da utilização dos nutrientes promovidas pelos desvios de temperatura (LOURENS *et al.*, 2007; HULET *et al.*, 2007). O comprimento do pinto também é útil para estimar o desempenho futuro do pintinho, visto que tem alta correlação com o peso do frango aos 42 dias (HILL *et al.*, 2001; MOLENAAR *et al.*, 2011). Autores como Leksrisompong *et al.* (2007) também encontraram redução no comprimento do pinto em temperaturas acima de 38,9°C.

O escore de umbigo é uma medida importante para avaliar a qualidade do pinto de um dia (DECUYPERE; BRUGGEMAN, 2007). Umbigos que não se fecharam completamente podem ser um local de entrada para infecções durante os primeiros dias de vida (TONA *et al.*, 2003). No presente estudo tanto a temperatura baixa quanto as altas resultaram em maior peso de gema residual, o que pode ter dificultado o processo de interiorização e impedido a completa cicatrização do umbigo (TONA *et al.*, 2005; MAATJENS *et al.*, 2016b). Outros autores observaram piora na qualidade do umbigo em temperaturas acima de 38°C (MOLENAAR *et al.*, 2011; VAN DER POL *et al.*, 2014).

Os resultados de YFBM, gema residual, comprimento do pinto, rendimento de órgãos e umbigo mostraram que as alterações na TCO são prejudiciais para a qualidade do pinto de um dia, sendo que a TCO acima da temperatura controle são os mais prejudiciais.

O peso relativo de quase todos os órgãos avaliados diminuiu com o aumento da temperatura de incubação. Quanto à redução no peso relativo do coração, na literatura é possível encontrar inúmeros trabalhos relatando esse efeito das temperaturas altas (LOURENS *et al.*, 2007; MOLENAAR *et al.*, 2010; MAATJENS *et al.*, 2014a; VAN DEN BRAND *et al.*, 2021). A temperatura elevada parece afetar negativamente a proliferação e desenvolvimento das células musculares e cardíacas durante a embriogênese (ROMANOFF, 1960; LEKSRISOMPONG *et al.*, 2007).

Com relação ao peso do fígado, Van Den Brand *et al.* (2021) também observaram redução no peso desse órgão ao utilizar temperatura de 38,9 °C a partir do 8º dia de incubação. Christensen *et al.* (2003) afirmam que a diminuição nas reservas de glicogênio impacta no peso do fígado, diminuindo-o.

Nesse trabalho, as altas temperaturas de incubação prejudicaram o desenvolvimento dos intestinos. Trabalhando com TCO entre 35,6°C e 38,9°C do dia 15 a 19 de incubação, Maatjens *et al.* (2016) também observaram redução no peso relativo desses órgãos na temperatura mais alta. Segundo Maatjens *et al.* (2014a) o consumo das reservas de glicogênio em altas temperaturas podem ajudar a explicar a redução dos intestinos, já que também atuam como reservatório, assim como o fígado e o músculo. De acordo com os mesmos autores, a internalização da gema também parece estar relacionada com o peso dos intestinos. Próximo do fim da incubação, entre o 19º e o 20º dia, a gema é introduzida para o corpo do embrião. Seu conteúdo é então transportado

pelo lúmen intestinal, estimulando o desenvolvimento da estrutura de criptas e vilos. Se menos gema foi utilizada (como no caso do presente estudo, na TCO alta e muito alta), então menor será o estímulo e, conseqüentemente, o peso dos intestinos.

O baço e a bursa também tiveram seus pesos relativos reduzidos pela alta temperatura. Ambos são órgãos do sistema imune responsáveis pela maturação de importantes células de defesa e como tal, demandam altos níveis energéticos para sua maturação (FRENCH, 1997; HULET *et al.*, 2007; OZNURLU *et al.*, 2010). Ozurlu *et al.* (2010) relataram redução no desenvolvimento da bursa em temperaturas acima de 38,8°C, o que pode acarretar em problemas na resposta imune para as aves pós-eclosão. O baço no presente estudo foi o único órgão a ter o peso reduzido pela TCO baixa, o que mostra a sensibilidade dos órgãos linfoides às perturbações durante a embriogênese.

O peso relativo dos pulmões foi reduzido pelas altas temperaturas, principalmente a TCO muito alta. Conforme discutido para a eclodibilidade e o YFBM, a alta TCO modifica as vias metabólicas do embrião, privilegiando o catabolismo em detrimento ao anabolismo, o que prejudica a formação de órgãos como o coração, fígado, intestinos, baço, bursa e pulmões (OLIVEIRA *et al.*, 2008; MOLENAAR *et al.*, 2013; MAATJENS *et al.*, 2014a). Esse efeito é agravado pelo fato de que os nutrientes da gema são utilizados com menor eficiência quando ocorre elevação da TCO (MOLENAAR *et al.*, 2013; MAATJENS *et al.*, 2016a), o que foi confirmado pelos maiores valores de gema residual nos pintos provenientes dos tratamentos com temperatura alta e muito alta.

O peso relativo do estômago e pâncreas não foi influenciado pelos tratamentos. Porém, todos os demais órgãos afetados podem influenciar futuros problemas no desempenho ou produtividade dos frangos, visto que são órgãos vitais com funções imprescindíveis para o pleno funcionamento do organismo.

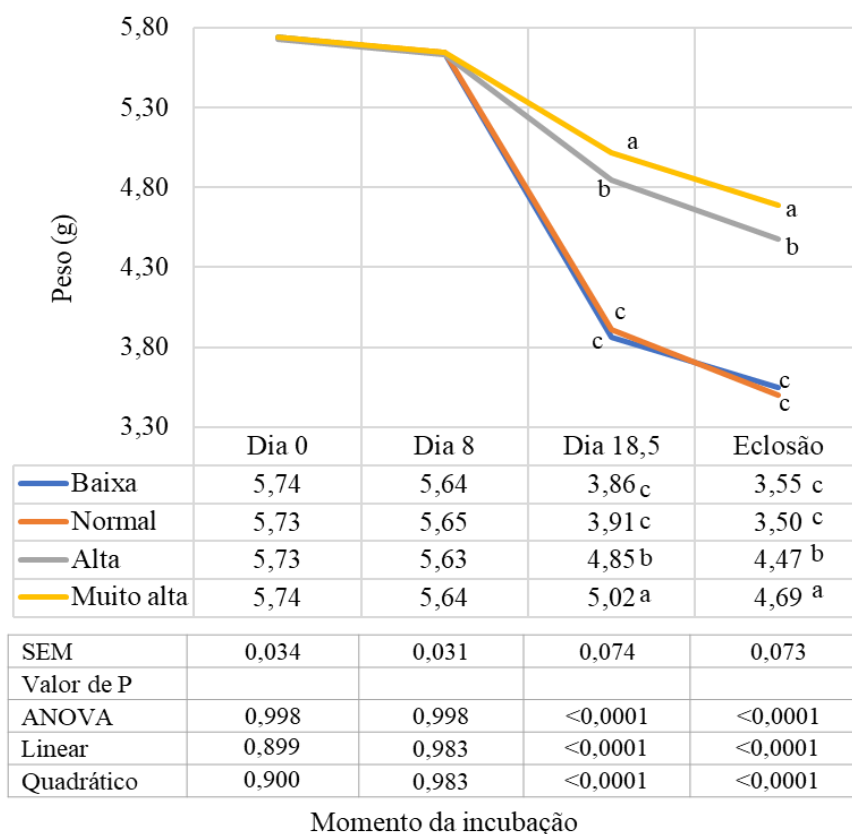
Para as variáveis de rendimento de órgãos, as elevações na temperatura foram mais prejudiciais que a redução, embora todas tenham afetado o peso relativo de alguma forma.

4.2 Parâmetros de casca e gema

Os resultados relacionados à casca do ovo estão representados nas figuras entre 7 a 12. O peso da casca (Figura 7) diminuiu ao longo da incubação (TCO baixa = -38,2%;

TCO controle = -38,9%; TCO alta = -21,9%; TCO muito alta = -18,5%), entretanto esses dados não foram comparados estatisticamente pois não era objetivo do trabalho. Quanto ao efeito do tratamento dos 8 aos 18,5 dias e no momento da eclosão o tratamento com TCO muito alta foi o que apresentou a menor redução de peso, tendo os maiores valores, seguido da TCO alta, sendo a temperatura baixa estatisticamente igual ao controle ($p \leq 0,05$).

Figura 7 – Peso da casca (g) ao longo da incubação em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia

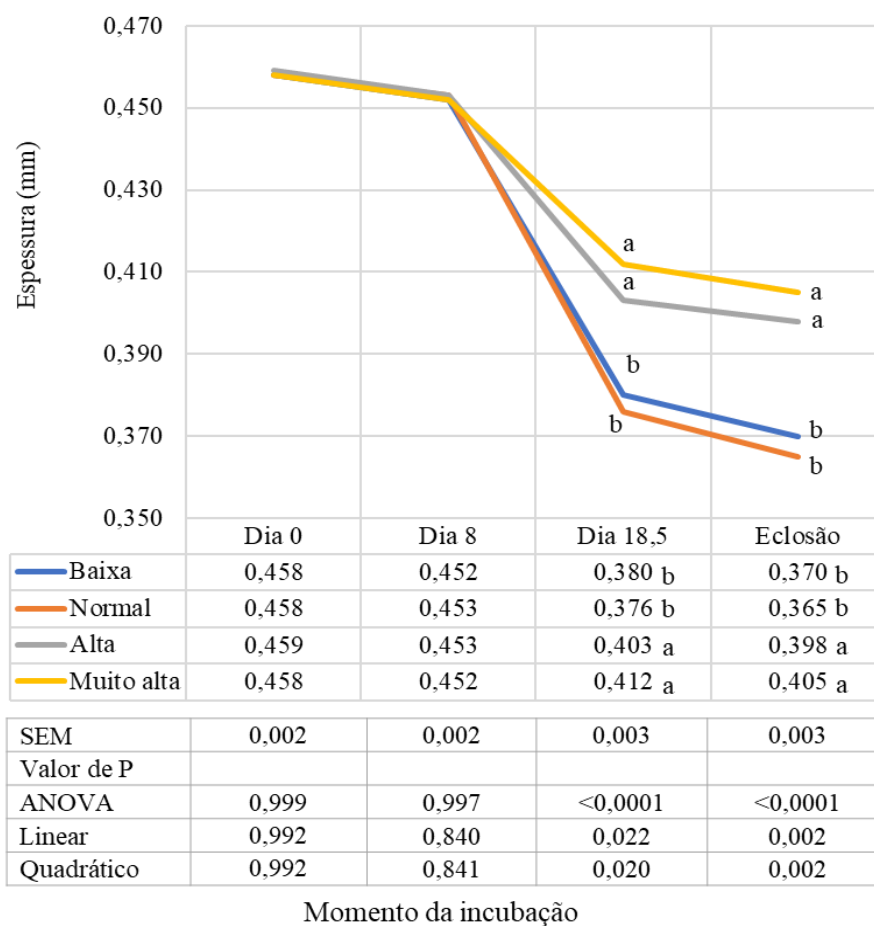


a, b: médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

SEM: erro padrão da média

A espessura da casca (Figura 8) também reduziu entre o início e o fim da incubação (TCO baixa = -17,8%; TCO controle = -20,0%; TCO alta = -13,3%; TCO muito alta = -11,1%). Para a variável espessura, ambas as elevações na TCO acima dos 37,8°C originaram as maiores médias aos 18,5 dias de incubação e no nascimento, sendo a TCO baixa e controle semelhantes entre si ($p \leq 0,05$).

Figura 8 – Espessura da casca (g) ao longo da incubação em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia

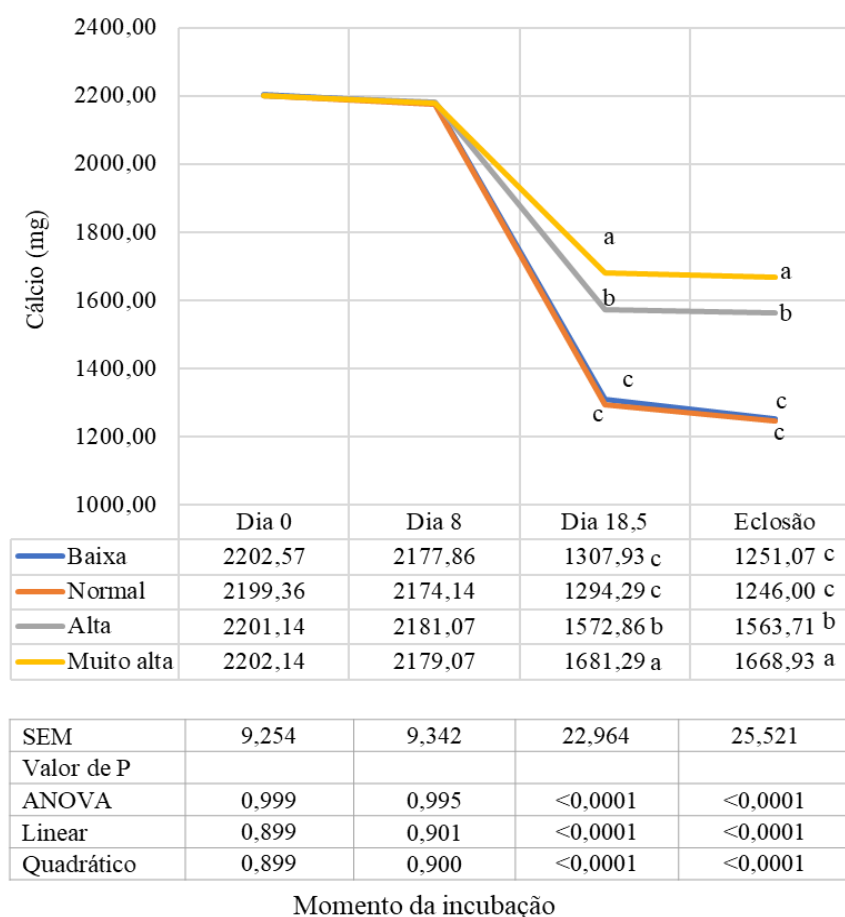


a, b: médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

SEM: erro padrão da média

Ocorreu uma redução na quantidade de cálcio (Figura 9) presente na casca do ovo conforme a incubação avançou, independente do tratamento (TCO baixa = -43,2%; TCO controle = -43,3%; TCO alta = -29,0%; TCO muito alta = -24,2%). Essa diminuição foi semelhante quando a TCO controle e a baixa TCO foram aplicadas, entretanto menos cálcio foi retirado da casca quando a temperatura foi elevada após o 8° dia. Esse efeito observado aos 18,5 dias e no momento da eclosão, sendo mais drástico na temperatura muito alta ($p \leq 0,05$).

Figura 9 – Teor de cálcio (mg) da casca ao longo da incubação em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia

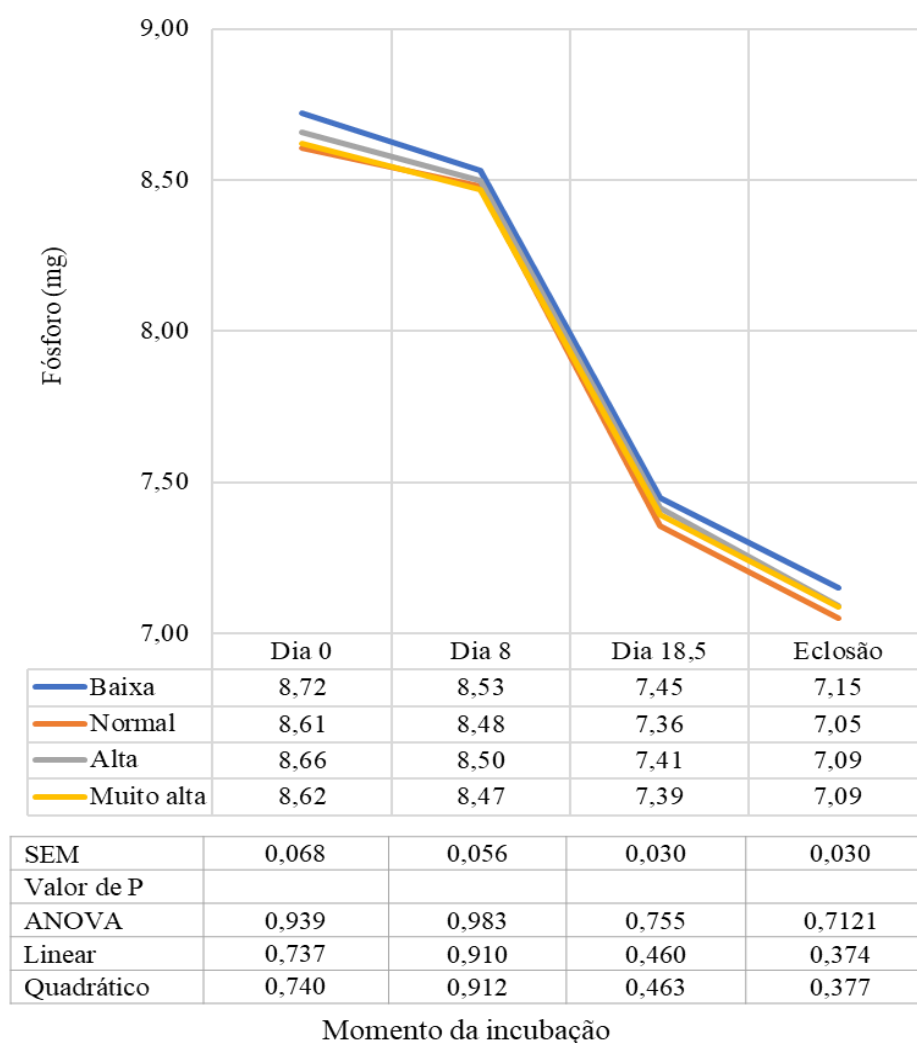


a, b: médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

SEM: erro padrão da média

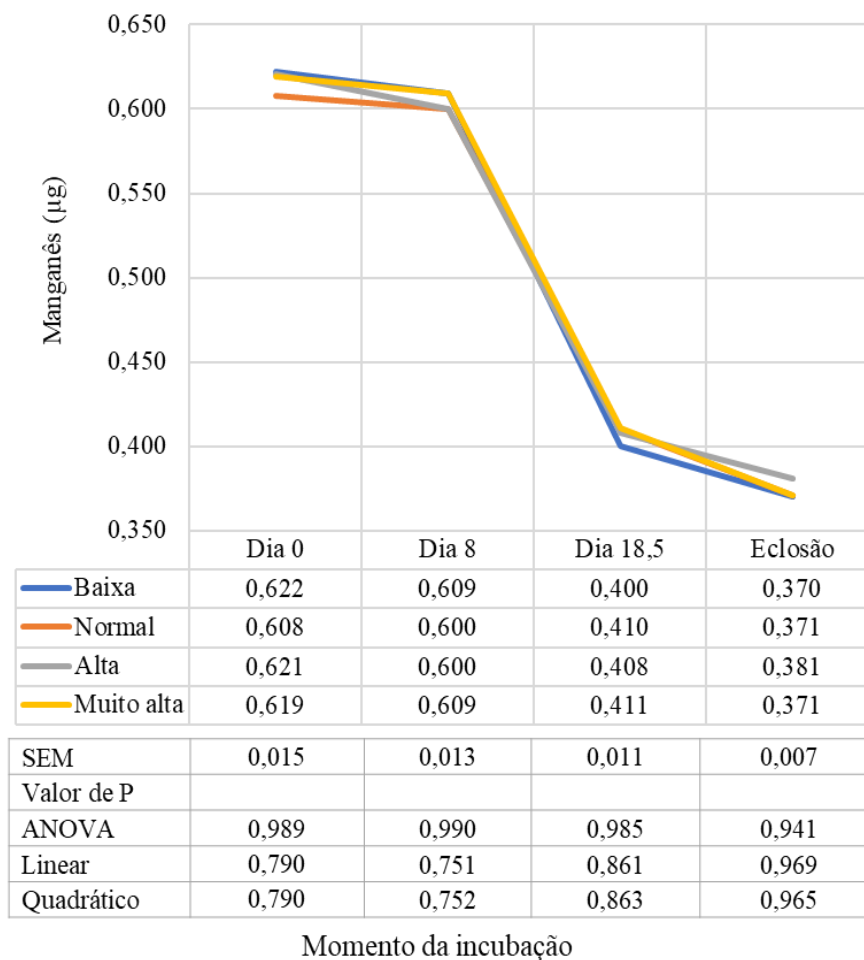
Entre o início e o fim da incubação também houve redução nos teores de fósforo (TCO baixa = -18,0%; TCO controle = -18,1%; TCO alta = -18,0%; TCO muito alta = -17,9%) e manganês (TCO baixa = -40,3%; TCO controle = -38,3%; TCO alta = -38,7%; TCO muito alta = -39,3%) (Figuras 10 e 11). A temperatura de incubação não apresentou efeito significativo sobre a mobilização desses dois minerais da casca.

Figura 10 – Teor de fósforo (mg) da casca ao longo da incubação em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia



SEM: erro padrão da média

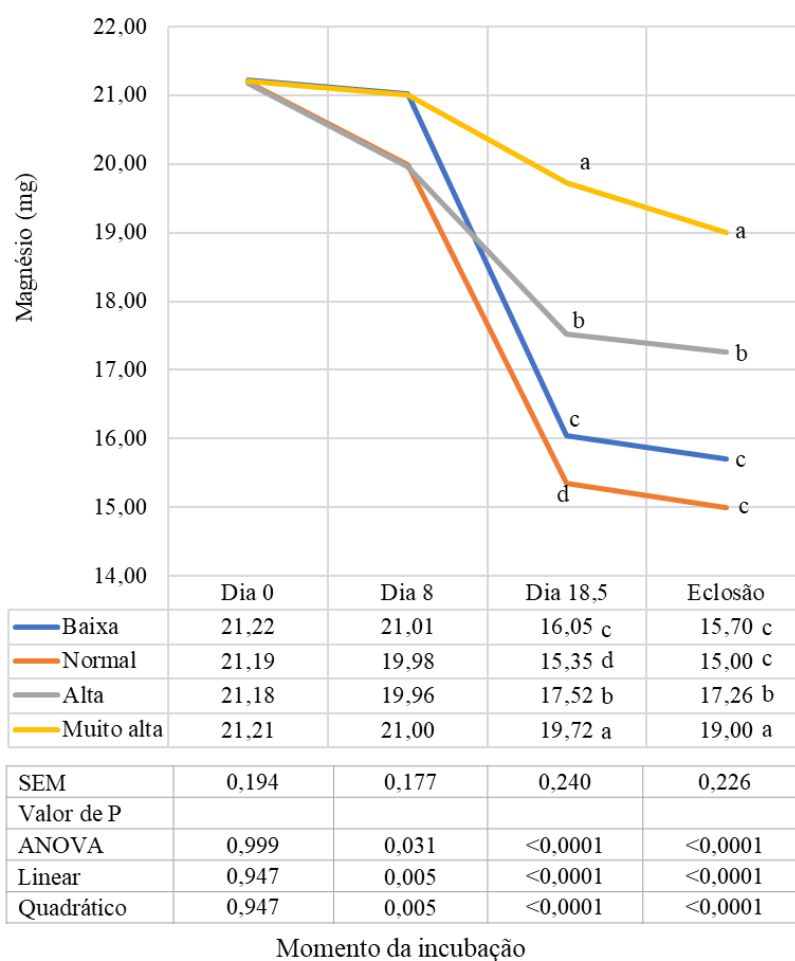
Figura 11 – Teor de manganês (μg) da casca ao longo da incubação em temperatura de casca baixa ($36,7^{\circ}\text{C}$), controle ($37,8^{\circ}\text{C}$), alta ($38,9^{\circ}\text{C}$) e muito alta ($39,4^{\circ}\text{C}$) entre o 8° e o 18,5° dia



SEM: erro padrão da média

Semelhante ao que ocorreu com os outros minerais, o magnésio (Figura 12) da casca reduziu ao longo da incubação (TCO baixa = -26%; TCO controle = -29,3%; TCO alta = -18,5%; TCO muito alta = -10,4%). No 18,5° dia de incubação todos os desvios da TCO controle resultaram em maiores níveis de magnésio na casca, sendo o efeito mais marcante na TCO muito alta, seguido da alta e então da baixa. No dia da eclosão não houve diferença entre o controle e a temperatura baixa, mas os tratamentos com TCO alta e muito alta tiveram os maiores valores de magnésio retido na casca ($p \leq 0,05$).

Figura 12 – Teor de magnésio (mg) da casca ao longo da incubação em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia



a, b: médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

SEM: erro padrão da média

A redução no peso e espessura da casca são esperadas em uma incubação padrão, dada a desmineralização que ocorre ao longo da incubação. O embrião retira da casca minerais para formação do esqueleto, o que contribui ainda para torna-la mais frágil e facilitar o rompimento para a eclosão (BARBOSA, 2011; HALGRAIN *et al.*, 2022). O efeito dos tratamentos foi evidenciado no dia 18,5 e à eclosão, mostrando claramente que a temperatura alta prejudica a mobilização dos minerais da casca.

A diminuição do cálcio da casca ao longo da incubação é relatada na literatura, visto que a casca é a principal fonte desse mineral para o embrião (YAIR; UNI, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2015; TORRES; KORVER, 2018). Para sua utilização, o Ca deve ser retirado da casca por meio da ação da anidrase carbônica, enzima liberada pela MCA que solubiliza e capta o mineral (TORRES; KORVER, 2018; HALGRAIN *et al.*, 2022). A partir daí, o Ca será transportado pela MCA até a gema e então será absorvido para a circulação do embrião e finalmente depositado nos ossos (GABRIELLI; ACCILI, 2010; BARBOSA, 2011; SZELESZCZUK *et al.*, 2016; TORRES; KORVER, 2018). A mobilização aconteceu no presente estudo, entretanto foi dificultada pelas altas TCO, como é possível observar pelos valores elevados de cálcio na casca aos 18,5 dias e na eclosão. O Mg também foi menos utilizado pelos embriões em todas as alterações de temperatura no 18,5º dia e nas TCO alta e muito alta no dia da eclosão. Assim como o Ca, a casca é a principal fonte de magnésio (YAIR; UNI, 2011).

Esses resultados indicam que a temperatura alta prejudica algum dos mecanismos envolvidos na utilização do Ca e do Mg. Como a MCA é a principal responsável pelo transporte dos minerais (HALGRAIN *et al.*, 2022), é possível que a temperatura de incubação tenha alterado o seu funcionamento. Lin *et al.* (2017) observaram aumento na vascularização da MCA e da MSV ao elevar a temperatura no início da incubação (38,1°C até o 5º dia). Nesse trabalho a temperatura utilizada estava pouco acima do padrão e foi utilizada no início da incubação, mas é interessante para demonstrar que a temperatura tem impacto sobre esses anexos embrionários.

Outra possibilidade é trazida pelo estudo de Barri *et al.* (2011), que encontraram redução no mRNA de transportadores de nutrientes na primeira semana de vida após incubar os ovos em 39,6° C a partir do 13º dia. Sabe-se que a MSV também é capaz de expressar transportadores de nutrientes e enzimas digestivas (YAIR; UNI, 2011; YADGARY *et al.*, 2014). Assim, se esse efeito da temperatura sobre a expressão genética também ocorrer com a MSV e a MCA, a atividade de ambas as membranas seria afetada, o que reduziria a utilização da casca e da gema. Esse tópico, entretanto, ainda não está plenamente elucidado e os genes não foram todos identificados (GABRIELLI; ACCILI, 2010). Em pesquisa recente Halgrain *et al.* (2022) notaram que os genes possivelmente envolvidos na mobilização do conteúdo da casca, responsáveis pela dissolução, transporte de íons, regulação e ligação entre moléculas são diferentes entre a MCA e a MSV. Os

autores ressaltaram que a identificação dos componentes envolvidos no funcionamento desses órgãos, que ainda está distante de ser finalizada, é fundamental para compreender sua atuação na mineralização óssea.

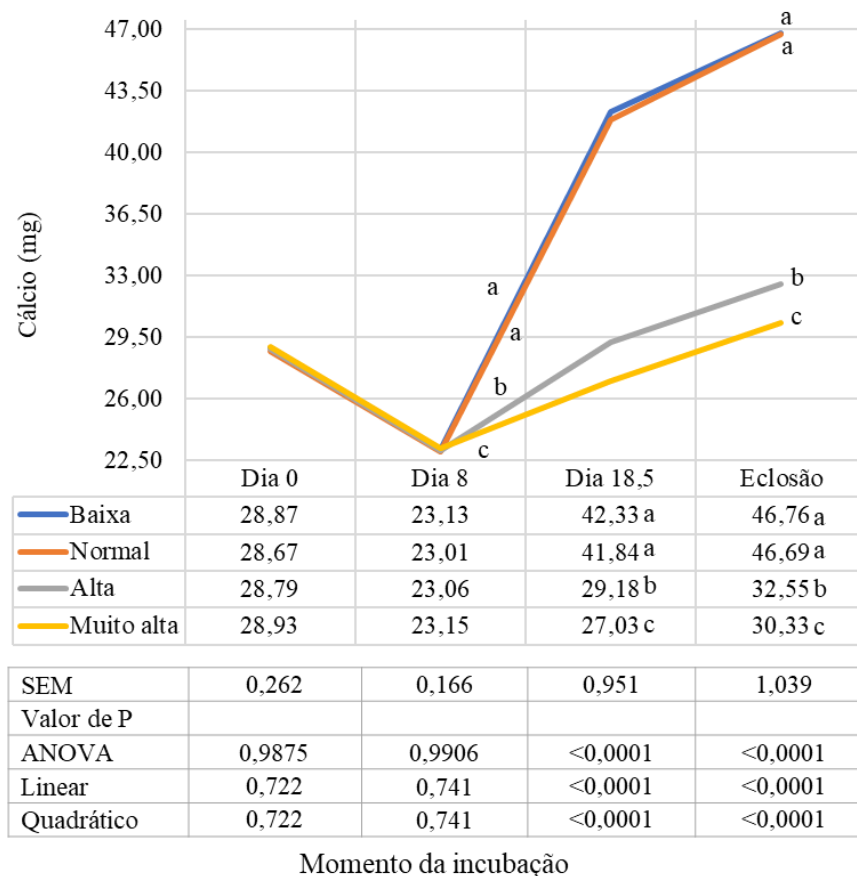
A vitamina D₃ também exerce papel no transporte do Ca para a gema, atuando como fator de transcrição e expressão de transportadores, além de se ligar ao receptor para aumentar a absorção (WIDEMAN *et al.*, 2015; ADHIKARI *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2020). No presente estudo a circulação da vitamina D₃ no sangue foi afetada (em maior grau) pelas temperaturas altas, logo, é possível que essa redução tenha impactado a translocação do Ca. A menor utilização desse mineral refletiu na menor redução do peso e espessura da casca.

Szeleszczuk *et al.* (2016) observaram redução na concentração de Ca e Mg da casca e aumento na concentração do P ao longo da incubação. No nosso trabalho os valores de P reduziram, assim como o Ca e Mg. As diferenças entre os resultados se devem à metodologia utilizada. No presente estudo os resultados foram expressos como média de peso absoluto do mineral na casca, multiplicando-se a concentração de cada mineral analisado na amostra pelo total do peso da casca.

No nosso trabalho a mobilização de P e Mn não foi afetada pela TCO. Esse resultado era esperado, visto que esses minerais não têm na casca, mas sim na gema, sua principal fonte para o embrião (YAIR *et al.*, 2015).

As figuras de 13 a 16 ilustram os resultados das variáveis mensuradas na gema do ovo. O teor de cada mineral presente na gema se alterou de forma diferente ao longo da incubação. O cálcio (Figura 13) apresentou tendência de redução entre os dias 0 e 8, a partir de quando começou a aumentar. Tanto no 18,5° dia quanto na eclosão, com o aumento da TCO os teores de cálcio da gema foram menores, sendo o efeito mais pronunciado na temperatura muito alta ($p \leq 0,05$). Ao final da incubação, os tratamentos com TCO baixa e controle tiveram aumento de 262% e 263% do Ca na gema, sendo semelhantes entre si, enquanto a TCO alta e muito alta tiveram aumento de 213% e 205%, respectivamente.

Figura 13 – Teor de cálcio (mg) da gema ao longo da incubação em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia



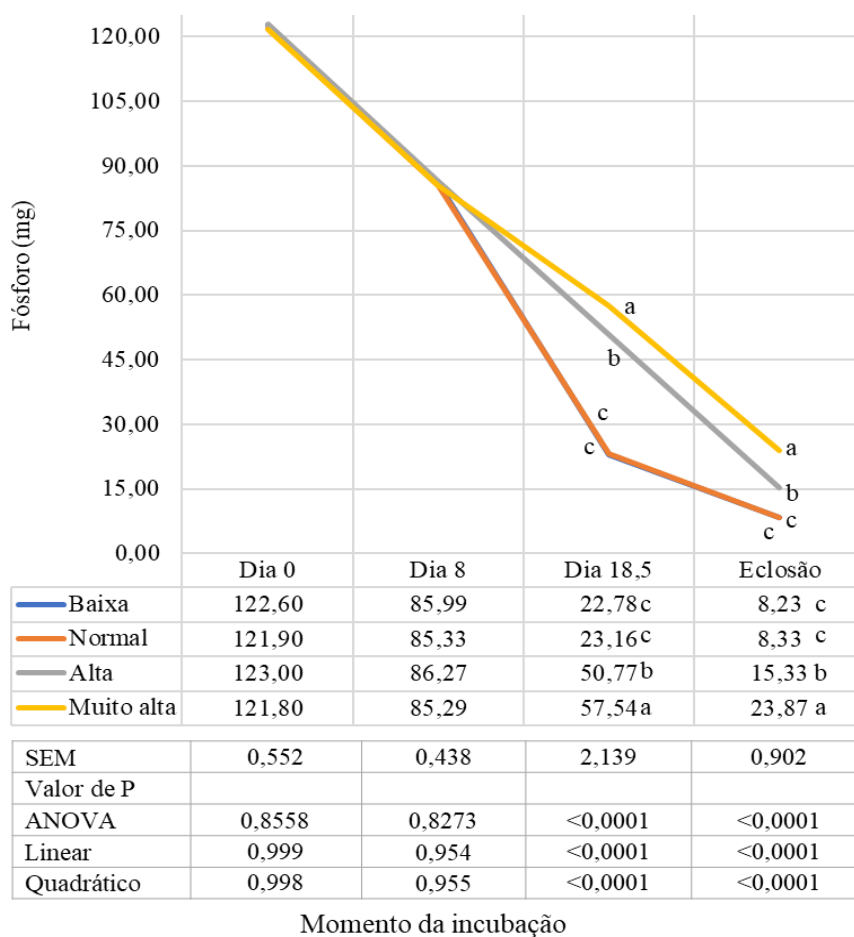
a, b: médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

SEM: erro padrão da média

As quantidades de fósforo (Figura 14) e manganês (Figura 15) da gema reduziram conforme a incubação avançou (dados não analisados estatisticamente). Foram identificadas diferenças entre os tratamentos no 18,5° dia e na eclosão, para ambos os minerais ($p \leq 0,05$). Quando a TCO foi alta e muito alta foram encontrados maiores níveis de fósforo da gema aos 18,5 dias (+27,6 mg e +34,3 mg em comparação ao controle, respectivamente) e à eclosão (7 mg e 15,5 mg maiores que o controle). O controle e a TCO baixa foram estatisticamente iguais. Para o manganês, todos os tratamentos com alteração na temperatura foram estatisticamente diferentes do controle. Os valores foram maiores que o controle em 0,34 μg (TCO baixa); 2,5 μg (TCO alta) e 3,19 μg (TCO muito

alta) aos 18,5 dias e de 0,27 μ g (TCO baixa); 2,89 μ g (TCO alta) e 3,97 μ g (TCO muito alta) na eclosão.

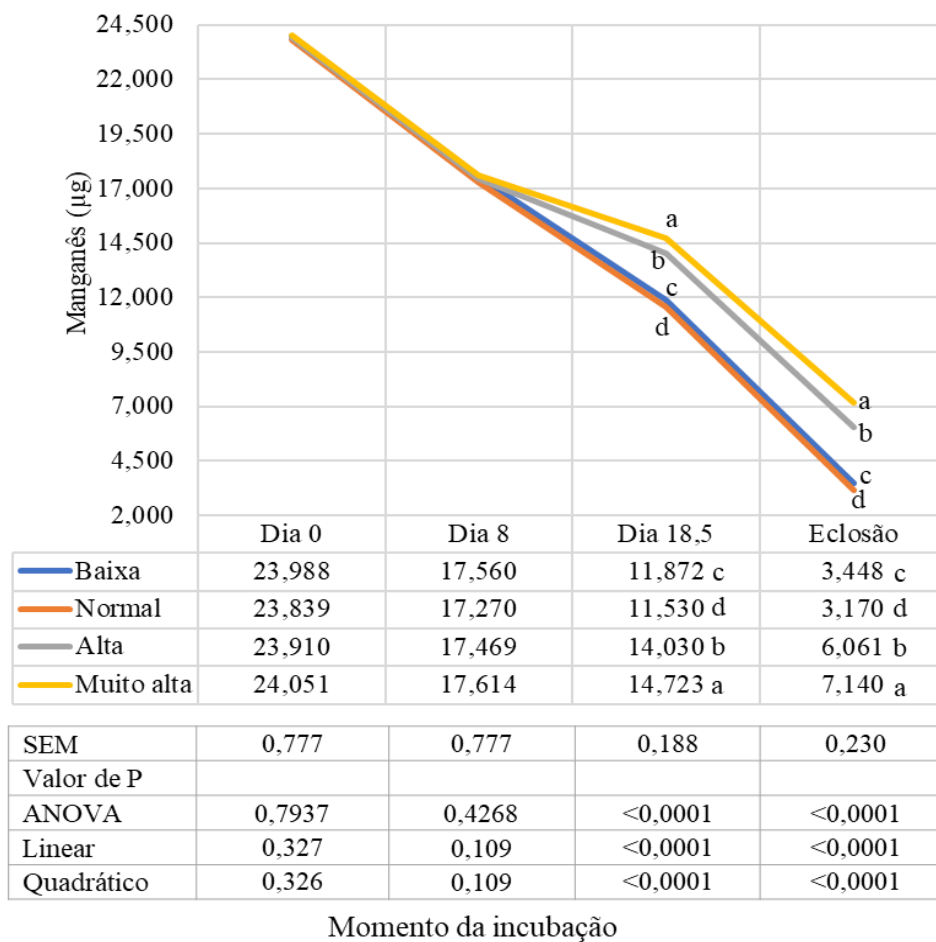
Figura 14 – Teor de fósforo (mg) da gema ao longo da incubação em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia



a, b: médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

SEM: erro padrão da média

Figura 15 – Teor de manganês (μg) da gema ao longo da incubação em temperatura de casca baixa ($36,7^\circ\text{C}$), controle ($37,8^\circ\text{C}$), alta ($38,9^\circ\text{C}$) e muito alta ($39,4^\circ\text{C}$) entre o 8° e o 18,5° dia

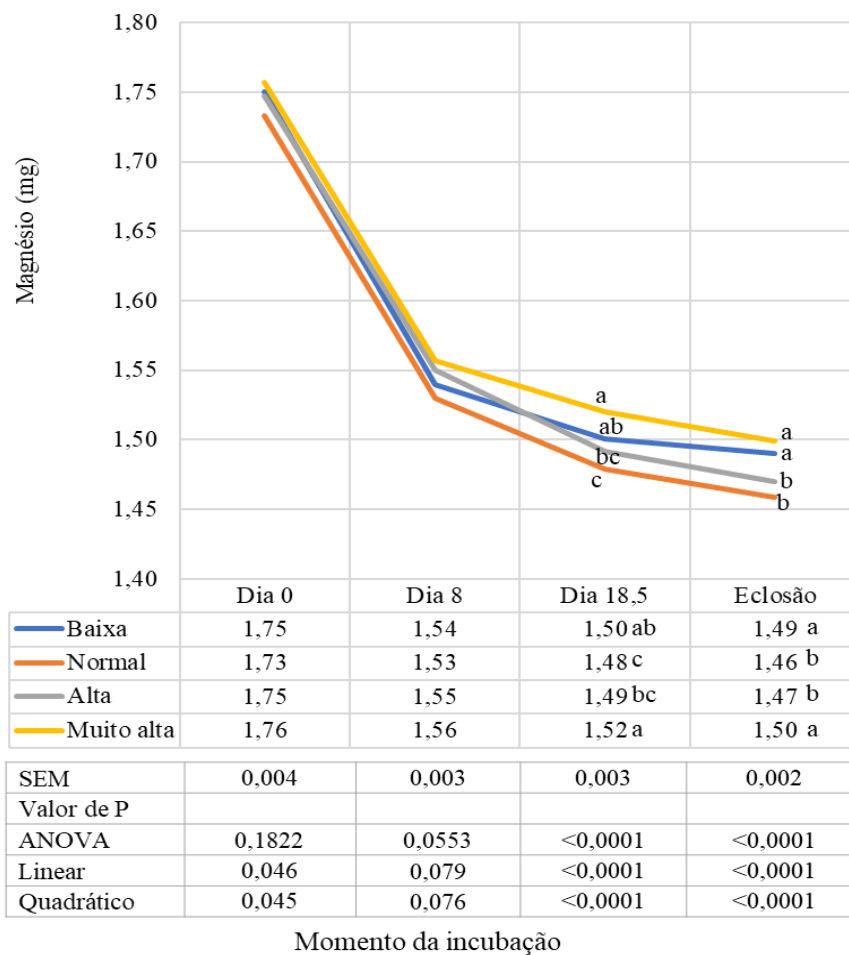


a, b: médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

SEM: erro padrão da média

O magnésio (Figura 16) também reduziu na gema durante a incubação. No 18,5° dia os ovos da TCO controle tiveram os menores valores de magnésio, quando comparados aos da TCO muito alta ($p \leq 0,05$). Já no momento da eclosão, tanto a temperatura baixa quanto a temperatura muito alta originaram teores mais altos que o controle e a temperatura alta ($p \leq 0,05$).

Figura 16 – Teor de magnésio (mg) da gema ao longo da incubação em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia



a, b: médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

SEM: erro padrão da média

A diminuição dos teores de minerais da gema entre o início da incubação e o 8° dia indica que o embrião começou a utilizá-los já na primeira semana, através da MSV (YAIR; UNI, 2011; KERSCHNITZKI *et al.*, 2016). Da segunda semana em diante o padrão mudou: a concentração dos minerais passou a aumentar (Ca) ou reduzir (P, Mn e Mg). Esse comportamento reflete a chegada do fluxo de minerais provenientes da casca, após a formação da MCA (HOPCROFT *et al.*, 2019; HALGRAIN *et al.*, 2022).

O cálcio contido na gema é limitado e foi utilizado pelo embrião antes da mobilização da casca, conforme descrito por Oliveira *et al.* (2015). Assim, o efeito da

temperatura de incubação sobre a redução nos níveis do Ca da gema foi na verdade um reflexo do que ocorreu na casca. Se menos Ca foi extraído da casca nas TCO alta e muito alta, menos Ca chegou à gema.

O fósforo e o manganês, por outro lado, são quase totalmente fornecidos para o embrião pela gema (LI *et al.*, 2014; YAIR *et al.*, 2015). A TCO afetou a utilização pelo embrião. Tanto no dia 18,5 quanto na eclosão os tratamentos com TCO acima de 38,9°C resultaram em maiores valores de P e Mn na gema residual, indicando que uma menor quantidade desse mineral foi absorvida para o sangue do embrião. Os valores de Mn, porém, também foram reduzidos pela temperatura baixa, embora o efeito das temperaturas altas tenha sido mais acentuado.

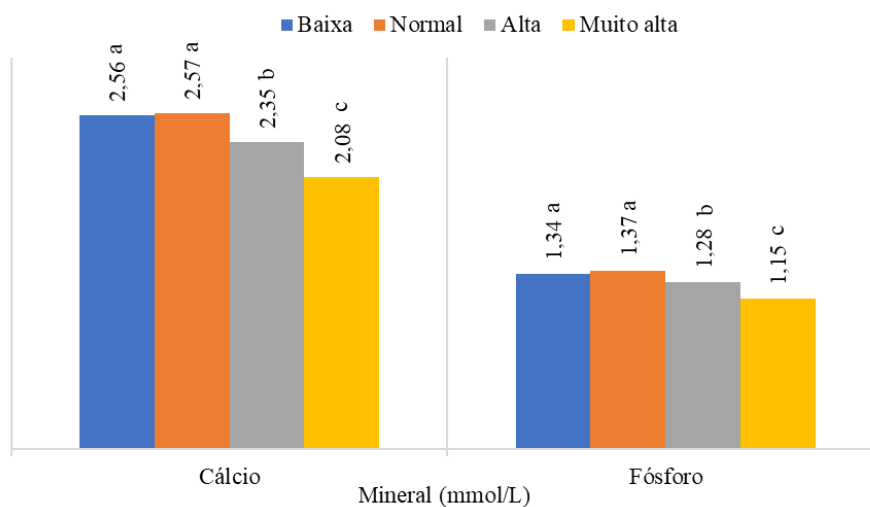
Já o magnésio foi afetado pela temperatura tanto na casca quanto na gema. Entretanto, para esse mineral os resultados na gema não foram um reflexo da menor mobilização da casca. Os valores de Mg só foram maiores na TCO muito alta no dia 18,5 e na TCO baixa e muito alta, no dia da eclosão. Esse efeito pode ter acontecido porque a alteração da TCO prejudicou a utilização da gema (LOURENS *et al.*, 2007; OVIEDO-RONDÓN *et al.*, 2008a).

A maior retenção de minerais na gema nas TCO altas e em menor grau, na temperatura baixa, pode ser explicada pelos mesmos mecanismos que afetaram os valores de gema residual e YFBM: mudanças no metabolismo embrionário e na eficiência de utilização dos nutrientes da gema (MOLENAAR *et al.*, 2010; YAIR; UNI, 2011; MAATJENS *et al.*, 2014a, b; DAYAN *et al.*, 2020).

4.3 Parâmetros sanguíneos

Os resultados das avaliações realizadas no sangue dos embriões e pintos se encontram nas Figuras 17, 18 e 19. Os minerais sanguíneos (Figura 17) foram alterados pelos tratamentos. Tanto o cálcio quanto o fósforo foram menores nos pintos de um dia submetidos às altas temperaturas durante a incubação ($p \leq 0,05$). Quando comparada ao controle, houve redução de 19,07% no Ca sanguíneo ao utilizar TCO muito alta, contra 8,56% na TCO alta. Para o P a redução foi de 16,06% na TCO muito alta e 6,57% na TCO alta.

Figura 17 – Minerais sanguíneos (mmol/L) de pintos de um dia incubados em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre 8° e o 18,5° dia



SEM	0,027	0,011
Valor de P		
ANOVA	<0,0001	<0,0001
Quadrática	<0,0001	<0,0001
R ²	0,9677	0,8676

a, b: médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

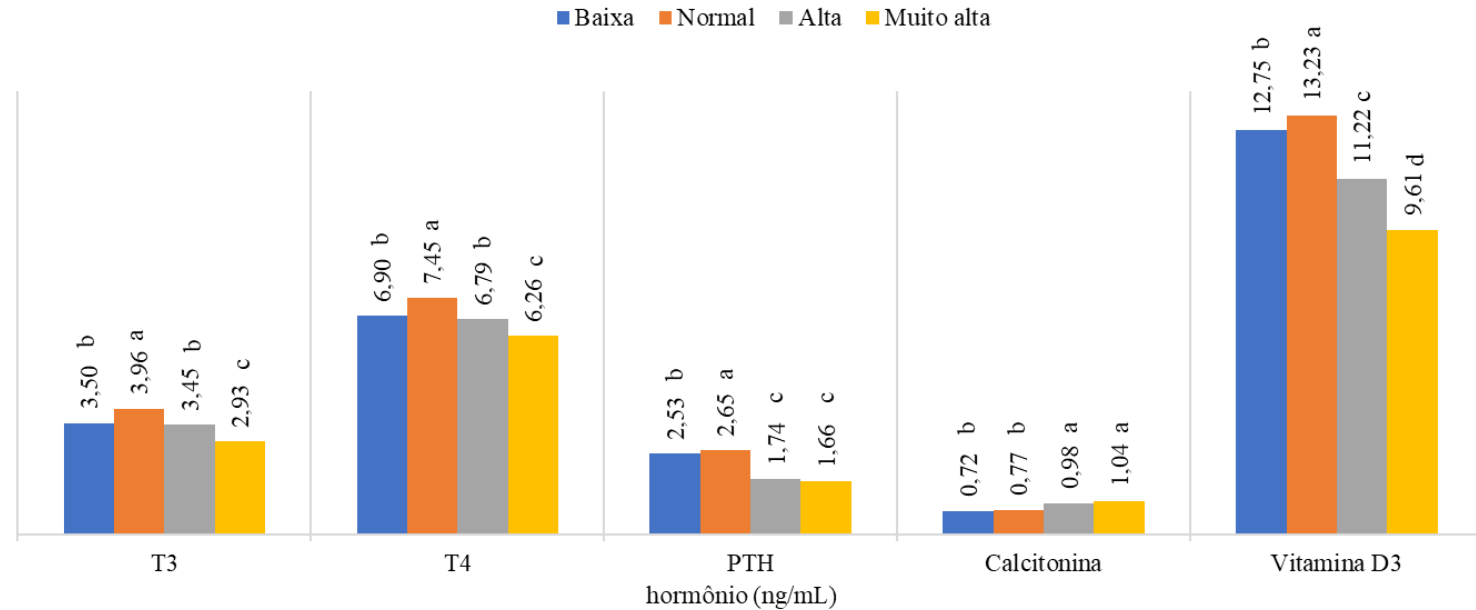
SEM: erro padrão da média

A avaliação de minerais no sangue de pintinhos pode ser útil para mensurar o nível de mobilização a partir da casca e gema, numa tentativa de prever a mineralização óssea (MUIR; GROVES, 2017; MUSTAFA *et al.*, 2019; HOPCROFT *et al.*, 2020). Com relação ao cálcio, os resultados no sangue foram fruto de uma reação em cadeia. Nas TCO alta e muito alta a mobilização de Ca da casca foi menor, fazendo com que menor quantidade chegasse à gema e, conseqüentemente, teores mais baixos chegaram ao sangue.

O fósforo também foi menor nos pintos incubados em TCO alta e muito alta, o que provavelmente foi reflexo da menor utilização da gema observada nesses tratamentos. Muir e Groves (2019) observaram que a baixa temperatura de incubação inicial reduziu os níveis de cálcio e aumentou os de fósforo no sangue, mas não afetou as cinzas do fêmur. As diferenças entre os resultados mostraram que o modo como a temperatura é alterada pode fazer toda a diferença para a formação óssea do embrião, visto que nesse estudo a manipulação térmica ocorreu entre o início da incubação e o 16° dia, de forma gradual, o que segundo os autores pode ter ocasionado a adaptação do embrião.

A temperatura de incubação exerceu efeito sobre todos os hormônios sanguíneos avaliados no dia da eclosão (Figura 18). Os níveis de T_3 e T_4 foram reduzidos nos tratamentos em que houve variação de temperatura, atingindo os menores valores na TCO muito alta (queda de 26% no T_3 e 16% no T_4), seguido pela TCO alta e baixa (semelhantes entre si) e então pela TCO controle. O PTH teve circulação menor nos tratamentos onde ocorreu alteração na temperatura controle, sendo que as duas temperaturas altas reduziram mais os níveis que a TCO baixa ($p \leq 0,05$). Para a variável calcitonina o tratamento com TCO baixa não diferiu do controle, mas teve valores até 35,5% maiores que o controle quando os pintos foram incubados em temperaturas altas ($p \leq 0,05$). Os níveis de vitamina D_3 foram reduzidos em todos os tratamentos onde ocorreu desvios da temperatura controle, sendo os menores valores encontrados na TCO muito alta, seguido da alta, baixa e do controle ($p \leq 0,05$).

Figura 18 – Hormônios sanguíneos (ng/mL) de pintos de um dia incubados em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia



	T3	T4	PTH	Calcitonina	Vitamina D3
SEM	0,050	0,060	0,062	0,019	0,197
Valor de P					
ANOVA	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Quadrática	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
R ²	0,9613	0,8849	0,8457	0,8115	0,9328

a, b: médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

SEM: erro padrão da média

Os hormônios calciotrópicos podem aumentar a absorção do Ca e P a partir do intestino e reabsorção a partir do esqueleto, bem como sua excreção via urina e deposição no osso, modificando a concentração plasmática (BARBOSA, 2011; PROSZDOWIEC-WEGLARZ; ANGEL, 2013; FATEMI *et al.*, 2020).

O PTH e a vitamina D₃ são liberados quando o Ca plasmático está em níveis abaixo do controle e atuam para elevar esses valores (MOE, 2008; CHEN *et al.*, 2021). Um dos efeitos do PTH consiste em estimular a secreção da forma ativa da vitamina D. (PARSONS; POTTS JÚNIOR, 1972; PIZAURO JÚNIOR *et al.*, 2017a). De fato, no presente trabalho o PTH sanguíneo apresentou os maiores níveis no tratamento com TCO controle, o que também ocorreu com a vitamina D₃.

A concentração de vitamina D₃ foi reduzida em todas as variações de temperatura de casca. Essa redução pode ter afetado indiretamente os teores de Ca plasmáticos, visto que a vitamina D₃ atua no transporte desse mineral (WIDEMAN *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2020).

A calcitonina age no sentido contrário do PTH e da vitamina D₃, sendo liberada quando os níveis de Ca se encontram elevados no sangue (MALGAROLI *et al.*, 1989; PROSZDOWIEC-WEGLARZ; ANGEL, 2013). A TCO alta e muito alta promoveram aumento nos níveis de calcitonina no momento da eclosão.

As alterações na TCO afetaram o padrão de comportamento dos três hormônios calciotrópicos. Nos tratamentos com alta TCO os níveis plasmáticos de Ca no momento da eclosão estavam baixos, então o esperado é que as concentrações circulantes do PTH e da vitamina D₃ estivessem elevadas, enquanto as da calcitonina estivessem baixas, mas não foi o que ocorreu (*feedback*). Não foram encontrados na literatura estudos abordando os efeitos da temperatura de incubação sobre esses hormônios, então é possível apenas supor o que possivelmente aconteceu. A alta TCO altera diversos mecanismos biológicos da ave, logo, pode ter atrapalhado a síntese do PTH e da vitamina D₃ ou ter acelerado sua eliminação. No caso da calcitonina, a temperatura pode ter estimulado sua produção ou retardado sua excreção. A síntese desse hormônio só é iniciada aos 18 dias de incubação (BARBOSA, 2011), então talvez ele ainda não seja tão atuante no pintinho de um dia. Outra possibilidade é a de que a alta TCO pode ter promovido uma assimilação ou excreção mais acelerada dos minerais sanguíneos, o que explicaria os níveis mais baixos nessas temperaturas. Uma limitação do estudo é a de que os minerais e os hormônios

foram analisados apenas no momento da eclosão, então pode ser que os níveis tenham mudado rapidamente e não reflitam as alterações que podem ter acontecido durante a manipulação térmica. Novos estudos são necessários para sanar essas questões, talvez realizando mensurações dos teores em outros períodos da incubação, bem como as respostas a longo prazo, como durante a criação dos frangos.

No presente estudo tanto a TCO baixa quanto a alta e muito alta reduziram os níveis de T₃ e T₄ sanguíneos. Esses hormônios estão relacionados ao desenvolvimento ósseo e atuam induzindo a hipertrofia dos condrócitos; estimulando a formação da placa de crescimento e ossificação através da invasão de vasos sanguíneos e aumentando a síntese de proteínas da matriz osteóide (HUNZIKER *et al.*, 1994; ROBSON *et al.*, 2002; KÜHN *et al.*, 2005; DE GROEF *et al.*, 2008; GÜZ *et al.*, 2020).

O T₃ também induz a secreção de GH, que por sua vez aumenta a síntese e a responsividade dos tecidos ao IGF-I, que estimula a proliferação de condrócitos e osteoblastos, além de elevar a síntese de proteínas da matriz e o turnover de cálcio (LEWINSON *et al.*, 1989; ROBSON *et al.*, 2002; VAN DER EERDEN *et al.*, 2003; SHAO *et al.*, 2006; WILLEMSSEN *et al.*, 2011; GÜZ *et al.*, 2020). Por outro lado, o corticosterona (que costuma estar elevado em situações de estresse como são as variações de temperatura) inibe a produção de GH (ROBSON *et al.*, 2002).

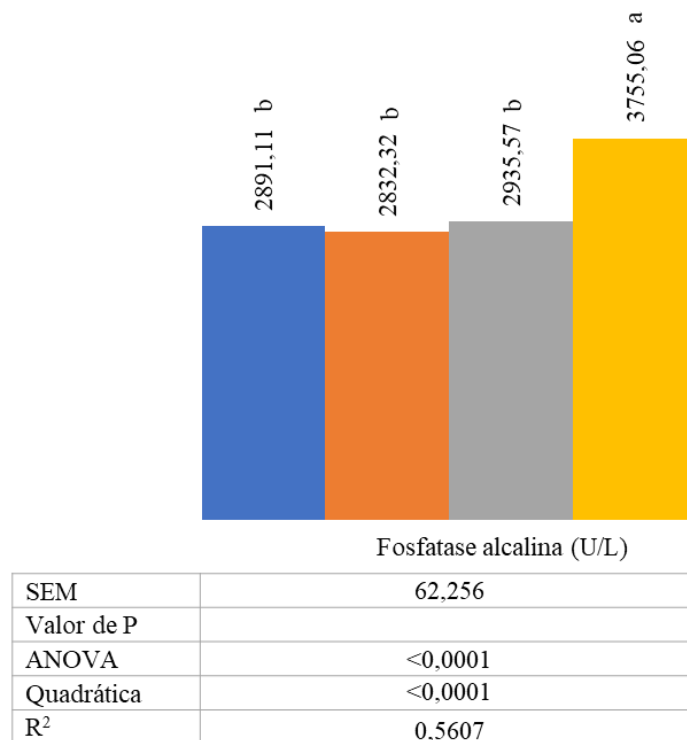
Na literatura a resposta dos hormônios da tireoide à temperatura é divergente. Willemsen *et al.* (2010) testaram dois perfis de incubação: temperatura continuamente alta (desvio de +3° na temperatura padrão) ou baixa (-3°C) do dia 16 ao 18,5 e perceberam queda nos hormônios da tireoide em ambas as temperaturas até o 18° dia. Desse momento até a eclosão, entretanto (coincidindo com o fim da manipulação térmica) os valores dos hormônios voltaram a subir, atingindo seu ápice no dia da eclosão. Os resultados coincidem com os do presente estudo até o 18° dia. Já os resultados da eclosão podem ter sido maiores devido ao curto tempo de exposição à temperatura alterada (3,5 dias apenas), o que permitiu que os embriões se adaptassem e voltassem a liberar T₃ e T₄ nas quantidades normais. É importante ressaltar que esses autores utilizaram temperaturas e períodos diferentes dos utilizados nesse experimento.

Yalçın *et al.* (2012) identificaram redução nos níveis dos hormônios tireoidianos na baixa temperatura (36,6°C por 6 horas diárias entre os dias 10 a 18). Por outro lado, Shokrhaneh *et al.* (2020) obtiveram valores de T₃ e T₄ sanguíneos mais altos ao utilizar

temperatura de incubação elevada (38,9°C dos 18 aos 21 dias de incubação). Em todos os casos os autores atribuíram as alterações nos hormônios da tireoide a uma alteração proporcional da taxa metabólica.

Somente a TCO muito alta influenciou os níveis sanguíneos de Fosfatase Alcalina (Figura 19), aumentando seus valores em mais de 32% quando comparado ao controle.

Figura 19 – Fosfatase Alcalina sanguínea (U/L) de pintos de um dia incubados em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9°C) e muito alta (39,4°C) entre 8° e o 18,5° dia



a, b: médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)
SEM: erro padrão da média

A FA participa da deposição de Ca e P no osso (PIZAURO JÚNIOR *et al.*, 2002), então seu aumento seria benéfico para a mineralização. Entretanto, no tratamento em que seus níveis foram mais altos a mineralização foi menor. Essa enzima pode ser produzida em diversos tecidos (cérebro, placenta, intestino, rins, fígado, ossos e cartilagem) e a avaliação no sangue evidencia principalmente a FA proveniente do fígado. O aumento na circulação pode indicar maior formação óssea (CUI *et al.*, 2016; NARI; GHASEMI, 2020). Porém, na TCO muito alta algum evento ainda não elucidado pode ter impedido

que a enzima atuasse corretamente, visto que a resposta na mineralização não foi equivalente.

Ao observar aumento da atividade da FA no sangue, Basuony *et al.* (2020) consideraram como sendo indicativo de dano hepático, que permitiu a saída dessa enzima para o sangue. Nos nossos resultados o peso relativo de fígado foi reduzido pela TCO muito alta, mas também pela TCO alta, indicando que, se houve lesão, essa não foi grave o suficiente para extravasar enzimas na TCO alta. Para avaliar com maior fidelidade o desenvolvimento ósseo, alguns autores avaliam a atividade da FA diretamente no osso ou na placa de crescimento (YALÇIN *et al.*, 2007; OZNUURLU *et al.*, 2016), o que não foi realizado no nosso estudo.

4.4 Análises ósseas

As Tabelas 6, 7 e 8 apresentam os resultados das variáveis ósseas. Todos os minerais avaliados na tíbia (Tabela 6) foram afetados pelos tratamentos de forma similar, sendo reduzidos por qualquer alteração na temperatura, tanto aos 18,5 dias quanto na eclosão ($p \leq 0,05$). Menores teores de Ca, P, Mn e Mg foram encontrados quando a TCO muito alta foi utilizada, seguida pela alta e então pela baixa.

Tabela 6 - Composição mineral da tíbia dos embriões aos 18,5 dias e dos pintos recém-eclodidos incubados em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia

Temperatura	Cálcio (%) ¹		Fósforo (%) ¹		Manganês (%) ¹		Magnésio (%) ¹	
	18,5 dias	Eclosão	18,5 dias	Eclosão	18,5 dias	Eclosão	18,5 dias	Eclosão
Baixa	29,22 ^b	32,78 ^b	14,66 ^b	16,55 ^b	0,015 ^b	0,015 ^b	0,700 ^b	0,775 ^b
Controle	29,95 ^a	33,53 ^a	15,00 ^a	17,05 ^a	0,015 ^a	0,016 ^a	0,723 ^a	0,798 ^a
Alta	24,77 ^c	27,99 ^c	12,42 ^c	14,34 ^c	0,013 ^c	0,014 ^c	0,622 ^c	0,688 ^c
Muito alta	22,06 ^d	25,11 ^d	10,57 ^d	12,72 ^d	0,011 ^d	0,012 ^d	0,556 ^d	0,625 ^d
SEM	0,439	0,469	0,244	0,237	0,0002	0,0002	0,009	0,009
Valor de P								
ANOVA	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Quadrática	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
R ²	0,9779	0,9827	0,9784	0,9756	0,9564	0,9387	0,9539	0,9729

^{a,b} Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

¹valores de todos os minerais em percentual relativo ao peso das cinzas

SEM: erro padrão da média

No que diz respeito aos minerais da tíbia, o cálcio seguiu o padrão dos resultados dos outros parâmetros avaliados. As altas temperaturas promoveram menor utilização do cálcio da casca, menor conteúdo na gema e sangue e, por fim, menor deposição na tíbia. O fósforo também teve sua utilização a partir da gema prejudicada pela alta TCO e assim resultou em menor concentração no osso. Porém, tanto o Ca quanto o P foram menos incorporados à tíbia no tratamento com TCO baixa, que não havia exercido efeito sobre a mobilização nas outras avaliações. Os níveis de magnésio também não refletiram os resultados de utilização da gema, sendo menores nos ossos de todos os pintinhos submetidos às TCO diferentes da TCO controle.

Ao contrário dos nossos resultados, Yalçin *et al.* (2007) observaram aumento do Ca na tíbia após utilizar temperatura de 36°C por 6h diárias até o 8º dia de incubação. As diferenças podem ter ocorrido porque esses autores empregaram a redução de temperatura no início da incubação e na forma de manipulação térmica intermitente, o que pode ter promovido adaptação do embrião às condições adversas e alterações epigenéticas.

É possível hipotetizar como a TCO afetou o processo de mineralização. Um exemplo é o transporte dos minerais do sangue para o tecido ósseo, que ocorre por intermédio de vesículas extracelulares. No interior dessas vesículas os minerais serão convertidos para a forma inorgânica e então crescerão e extravasarão para o tecido ósseo em formação (ANDERSON, 1989; WUTHIER; LIPSCOMB, 2011; KERSCHNITZKI *et al.*, 2016; PIZAURO JÚNIOR *et al.*, 2017b). Perturbações em qualquer uma dessas etapas afetarão a deposição de minerais no osso, porém muitos mecanismos envolvidos sequer estão completamente elucidados. Os hormônios calciotrópicos também participam do controle da mineralização das vesículas extracelulares (ANDERSON, 1989; WUTHIER; LIPSCOMB, 2011). O presente trabalho mostrou que a temperatura exerce efeito sobre esses hormônios, então é preciso investigar mais a fundo os mecanismos que regeram as alterações.

É importante destacar ainda que a mineralização ocorre de forma bastante intensa conforme a incubação avança (YAIR *et al.*, 2012), mas os teores de minerais da gema atingem o ápice da utilização por volta do 17º dia e então diminuem rapidamente (TORRES; KORVER, 2018), o que pode contribuir para que o efeito da TCO sobre a deposição desses minerais no osso tenha sido mais marcante.

Os teores de manganês encontrados na tíbia eram esperados, visto que houve menor utilização desse mineral a partir da gema em todos os tratamentos onde a TCO foi desviada do controle. O Mn não foi avaliado no sangue, mas dada a sua retenção na gema é possível sugerir que os níveis plasmáticos podem ter sido menores nas TCO baixa, alta e muito alta. Esse mineral é cofator das enzimas polimerase e galactotransferase, envolvidas na síntese do principal componente da cartilagem hialina do tecido ósseo: a condroitina sulfato (LEACH *et al.*, 1969; BHAGAVAN, 2002). Portanto, sua baixa concentração no sangue pode levar à redução na matriz orgânica dos ossos, o que também afetaria a mineralização.

A mudança na temperatura de incubação afetou todas as características avaliadas nos ossos dos embriões e pintos. Com relação às variáveis da tíbia (Tabela 7), o peso absoluto foi reduzido por qualquer alteração na temperatura (alta ou baixa) tanto no dia 18,5 quanto na eclosão ($p \leq 0,05$). O peso relativo, entretanto, sofreu influência apenas quando houve aumento na TCO. O comprimento aos 18,5 dias foi menor em todos os tratamentos em que ocorreu modificação da temperatura, enquanto que na eclosão essa redução ocorreu somente quando os embriões foram submetidos às temperaturas altas. A largura, a % de cinzas, a % de calcificação e a força necessária para ruptura foram reduzidas nos tratamentos em que a TCO foi alterada, tanto aos 18,5 dias quanto na eclosão. O comportamento dessas variáveis foi semelhante ao que ocorreu com os minerais da tíbia, sendo os menores valores observados na TCO muito alta, seguido pela alta, baixa e então pela TCO controle ($p \leq 0,05$).

Tabela 7 – Características morfométricas, biofísicas e mecânicas da tíbia dos embriões aos 18,5 dias e dos pintos recém-eclodidos incubados em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia

Temperatura	Morfometria				Biofísica		Mecânica
	Peso (mg)	Peso rel. (mg/g) ¹	Compr. (mm) ²	Largura (mm)	Cinzas (%)	Calcif. (%) ³	Força (Kg) ⁴
18,5 dias							
Baixa	241,51 ^b	7,18 ^a	29,82 ^b	2,05 ^b	44,20 ^b	58,08 ^b	0,91 ^b
Controle	249,78 ^a	7,30 ^a	30,15 ^a	2,08 ^a	44,81 ^a	58,65 ^a	0,94 ^a
Alta	190,09 ^c	6,75 ^b	27,02 ^c	1,97 ^c	40,88 ^c	55,18 ^c	0,86 ^c
Muito alta	167,93 ^d	6,33 ^c	24,31 ^d	1,87 ^d	37,33 ^d	52,07 ^d	0,77 ^d
SEM	4,720	0,054	0,320	0,011	0,406	0,357	0,009
Valor de P							
ANOVA	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Quadrática	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
R ²	0,9352	0,9123	0,9920	0,9616	0,9821	0,9817	0,9584
Eclosão							
Baixa	304,94 ^b	7,38 ^a	31,87 ^a	2,27 ^b	49,62 ^b	65,02 ^b	1,08 ^b
Controle	311,73 ^a	7,46 ^a	32,01 ^a	2,29 ^a	50,14 ^a	65,82 ^a	1,11 ^a
Alta	253,85 ^c	6,96 ^b	30,77 ^b	2,18 ^c	46,86 ^c	61,95 ^c	0,92 ^c
Muito alta	232,83 ^d	6,53 ^c	29,61 ^c	2,05 ^d	42,16 ^d	58,11 ^d	0,83 ^d
SEM	4,586	0,052	0,133	0,013	0,431	0,411	0,015
Valor de P							
ANOVA	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Quadrática	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
R ²	0,9378	0,9085	0,9633	0,9665	0,9639	0,9847	0,9668

^{a,b} Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

¹ Peso relativo, em mg de osso/g de YFBM

² Comprimento

³ Calcificação

⁴ Teste de força para ruptura

SEM: erro padrão da média

Quanto às características do fêmur (Tabela 8), o peso absoluto e o comprimento seguiram um controle semelhante aos 18,5 dias, quando a temperatura baixa não diferiu da TCO controle e assim apenas as temperaturas alta e muito alta promoveram queda nos valores dessas variáveis. Já no momento da eclosão, todos os desvios na temperatura controle causaram redução no peso e no comprimento. O peso relativo, a largura, as cinzas, a calcificação e a força necessária para ruptura foram afetadas da mesma maneira

pela TCO, tendo seus valores reduzidos nos tratamentos em que houve alteração da temperatura (18,5 dias e eclosão) ($p \leq 0,05$).

A TCO muito alta teve os piores resultados em todas as variáveis em ambos os ossos, independente do momento da avaliação ($p \leq 0,05$).

Tabela 8 – Características morfométricas, biofísicas e mecânicas do fêmur dos embriões aos 18,5 dias e dos pintos recém-eclodidos incubados em temperatura de casca baixa (36,7°C), controle (37,8°C), alta (38,9 °C) e muito alta (39,4°C) entre o 8° e o 18,5° dia

Temperatura	Morfometria				Biofísica		Mecânica
	Peso (mg)	Peso rel. (mg/g) ¹	Compr. (mm) ²	Largura (mm)	Cinzas (%)	Calcif. (%) ³	Força (Kg) ⁴
18,5 dias							
Baixa	158,54 ^a	4,71 ^b	21,01 ^a	2,19 ^b	46,35 ^b	61,01 ^b	0,87 ^b
Controle	164,24 ^a	4,79 ^a	21,18 ^a	2,24 ^a	46,98 ^a	61,43 ^a	0,90 ^a
Alta	125,98 ^b	4,47 ^c	18,66 ^b	2,06 ^c	42,77 ^c	58,10 ^c	0,83 ^c
Muito alta	111,96 ^c	4,21 ^d	16,22 ^c	1,94 ^d	39,86 ^d	55,31 ^d	0,74 ^d
SEM	3,070	0,031	0,274	0,015	0,391	0,335	0,008
Valor de P							
ANOVA	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Quadrática	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
R ²	0,8903	0,9254	0,9836	0,9691	0,9812	0,9798	0,9553
Eclosão							
Baixa	198,89 ^b	4,82 ^b	23,77 ^b	2,39 ^b	50,55 ^b	68,34 ^b	1,04 ^b
Controle	205,73 ^a	4,93 ^a	23,98 ^a	2,45 ^a	51,02 ^a	68,90 ^a	1,07 ^a
Alta	167,41 ^c	4,59 ^c	22,31 ^c	2,25 ^c	47,60 ^c	65,14 ^c	0,91 ^c
Muito alta	155,10 ^d	4,35 ^d	21,06 ^d	2,10 ^d	43,03 ^d	61,96 ^d	0,81 ^d
SEM	2,912	0,031	0,161	0,018	0,431	0,377	0,014
Valor de P							
ANOVA	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Quadrática	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
R ²	0,9178	0,9193	0,9790	0,9793	0,9720	0,9844	0,9818

^{a,b} Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

¹ Peso relativo, em mg de osso/g de YFBM

² Comprimento

³ Calcificação

⁴ Teste de força para ruptura

SEM: erro padrão da média

Os valores de % de cinzas, % de calcificação e força da tíbia em resposta aos tratamentos provavelmente foram consequência direta da deposição de minerais no osso, visto que os resultados de todas essas variáveis tiveram exatamente o mesmo comportamento: menores valores nas temperaturas alteradas, tendo a TCO muito alta o pior cenário.

Embora alguns autores não tenham encontrado impacto do teor de Ca e P no sangue sobre as cinzas dos ossos (MUIR; GROVES, 2019; HOPCROFT *et al.*, 2020), nesse estudo os tratamentos onde foram encontrados maiores níveis de minerais sanguíneos também foram aqueles onde ocorreram maiores % de cinzas na tíbia e no fêmur.

Ao contrário do nosso trabalho, no estudo de Van Der Pol *et al.* (2014) não houve diferenças nas cinzas dos ossos à eclosão de pintinhos mantidos a 36,9°C; 38,6°C e 39,4°C a partir do primeiro dia de incubação. Os autores relataram que é possível que as alterações na mineralização não tenham sido evidenciadas na eclosão porque, como a manipulação térmica ocorreu desde o princípio da incubação, os embriões foram capazes de contornar o efeito deletério.

Outros autores afirmaram que a temperatura de incubação pode afetar a mineralização e rigidez dos ossos. Yalçın *et al.* (2007) encontraram maiores valores de cinzas nos ossos quando a temperatura foi baixa (36,9°C) no início da incubação (0 a 8 dias). Muir e Groves (2017) promoveram um início “lento” para a incubação: a temperatura foi ajustada em 37,2°C no dia 0 e então elevada gradualmente até 37,8°C (13 dias). Nessas condições os pintinhos apresentaram maiores índices de minerais nos ossos. Os autores destacaram que o início lento prolongou a duração da incubação e talvez esse fator tenha sido o principal responsável pela diferença nas cinzas.

A morfometria do osso é influenciada pelos processos de formação, mineralização e crescimento (APPLEGATE; LILBURN, 2002; OZNURLU *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2016). Como as alterações na TCO prejudicaram a deposição de minerais, os impactos sobre o peso absoluto e relativo, o comprimento e a largura eram esperados.

As temperaturas altas são mais estudadas e diversos trabalhos relataram efeitos semelhantes sobre o peso dos ossos, embora os períodos de aplicação dos tratamentos térmicos tenham sido diferentes. Yalçın *et al.*, (2007) observaram redução no peso da tíbia ao utilizar temperatura de 39°C entre os 10 e 18 dias de incubação, e os autores

destacaram que essa variável atinge seu estágio crítico de desenvolvimento no fim da incubação, quando foi mais afetada pela temperatura. Güz *et al.* (2020) corroboram essa afirmação e acrescentam que durante o platô os mecanismos bioquímicos que controlam a ossificação endocondral parecem ser mais afetados pela TCO. Van der Pol *et al.* (2014) também observaram redução no peso dos ossos da tíbia e fêmur em altas temperaturas (39,4°C ao longo de toda a incubação).

No presente trabalho, os pesos absoluto e relativo da tíbia e do fêmur aos 18,5 dias e na eclosão foram reduzidos pela temperatura alta e muito alta, mas reagiram de formas diferentes à TCO baixa. Oviedo-Rondón *et al.* (2008a) também notaram diferenças entre o efeito da temperatura sobre o fêmur e a tíbia. O peso relativo do fêmur foi afetado pela temperatura alta durante a última semana de incubação, mas o da tíbia só foi reduzido quando esse cenário foi combinado com temperatura baixa (36,7°C) na primeira semana.

Quanto ao comprimento dos ossos, os efeitos nocivos da alta temperatura foram descritos por Oviedo-Rondón *et al.* (2008a). Esses autores trabalharam com temperaturas de 39°C nos 4 últimos dias de incubação e notaram queda no comprimento da tíbia e fêmur. Onznurlu *et al.* (2016) encontraram menor comprimento da tíbia no tratamento com temperatura alta (38,8°C do dia 10 até a eclosão). Esses resultados corroboram os encontrados no presente estudo.

Por outro lado, alguns autores encontraram efeitos positivos do aumento da temperatura sobre o comprimento dos ossos. Hammond *et al.* (2007) observaram ossos da perna mais longos ao utilizar uma temperatura 1°C mais alta que o padrão entre o 4° e o 7° dia de incubação. Al Musawi *et al.* (2012) obtiveram resposta semelhante no fêmur modificando a temperatura para 38,5°C entre os dias 4 e 7. Como é possível perceber, a influência positiva da alta temperatura sobre o comprimento dos ossos só é relatada quando essa temperatura foi usada no início da incubação e não foi tão elevada.

No que diz respeito à largura, Van der Pol *et al.* (2014) observaram aumento nessa característica em altas temperaturas (39,4°C ao longo de toda a incubação). Esse resultado foi diferente dos obtidos no nosso experimento (a largura diminuiu em todos os tratamentos), mas os autores justificaram como um efeito negativo que pode estar relacionado com a maior curvatura do osso e não refletir incremento no crescimento aposicional.

Sobre as causas dos efeitos observados, é preciso considerar que a redução das medidas morfométricas dos ossos podem ser reflexo do menor YFBM encontrado nos tratamentos em que houve alteração da TCO. Além disso é possível explicar as diferenças considerando os processos pelos quais ocorre o desenvolvimento dos ossos longos. A formação se dá pela ossificação intramembranácea e endocondral (LONG; ORNITZ, 2013; WU *et al.*, 2016); o crescimento intersticial é responsável pelo comprimento (PECHAK *et al.*, 1986; OZNURLU *et al.*, 2016) e o crescimento aposicional, pela largura (APPLEGATE; LILBURN, 2002). Todas as etapas afetam o peso dos ossos. Alterações na temperatura de incubação podem perturbar os mecanismos desses processos, piorando as características morfométricas (YALÇIN *et al.*, 2007; VAN DER POL *et al.*, 2014).

As altas temperaturas de incubação geralmente aumentam os níveis de corticosterona no sangue, o que promove inibição da insulina. Esse hormônio pancreático tem efeito sobre a diferenciação das células mesenquimais, então se for inibido podem ocorrer problemas no início da ossificação, o que afetará o peso dos ossos no futuro. Esse mesmo sistema de *feedback* prejudica a diferenciação e atividade dos osteoblastos. Os resultados serão ossos com menor peso, comprimento e largura. Outro efeito dos baixos níveis de insulina é a redução nas proteínas da matriz, que afeta a formação, crescimento intersticial e aposicional (SHIMAMOTO *et al.*, 2019; CIGNACHI *et al.*, 2020; ARAÚJO *et al.*, 2022). Na alta temperatura também ocorre a síntese de proteínas de choque térmico, que atrapalham a diferenciação dos condrócitos (HAMMOND *et al.*, 2007; GROVES; MUIR, 2016).

É preciso ressaltar que os níveis de PTH e vitamina D₃ alterados pela TCO podem ser uma das causas das alterações ósseas, já que esses hormônios participam da regulação da diferenciação e hipertrofia dos condrócitos (GIULIANI; BOLAND, 1984; CHEN *et al.*, 2021), e da liberação das vesículas extracelulares, impactando o processo de osteogênese e mineralização (WIDEMAN *et al.*, 2015; ADHIKARI *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2020).

5 CONCLUSÕES

Altas temperaturas prejudicam de forma mais acentuada a mobilização e utilização de minerais a partir dos componentes do ovo, os hormônios calciotrópicos e conseqüentemente o desenvolvimento ósseo durante a incubação.

Variações de temperatura da casca (acima ou abaixo da recomendada) durante a fase intermediária da embriogênese pioram o rendimento de incubação e a qualidade dos pintos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES

A utilização de temperaturas de casca abaixo (36,7°C) ou acima (38,9°C e 39,4°C) da temperatura controle entre os dias 8 e 18,5 de incubação afetaram quase todas as variáveis analisadas.

A TCO muito alta foi a mais prejudicial para o rendimento de incubação. Porém, é importante observar que a TCO baixa também apresentou um efeito bastante negativo, provocando danos maiores do que a TCO alta para essas características.

Para as demais variáveis, a elevação da TCO acima da temperatura controle promoveu os piores resultados, alterando a qualidade dos pintos e o peso dos órgãos, reduzindo a mobilização dos minerais da casca e gema (o que não havia sido demonstrado até então), diminuindo os níveis de minerais que chegam ao sangue. Como consequência para o osso, piorou as características morfológicas, a mineralização e a resistência óssea.

A TCO muito alta foi responsável pela maior redução nos hormônios T₃ e T₄. Para esses hormônios tireoideanos a TCO alta e baixa foram igualmente prejudiciais, corroborando a atuação de temperatura de incubação sobre o metabolismo embrionário relatada na literatura.

Esse trabalho demonstrou de forma inédita que existe influência da temperatura de incubação sobre os hormônios calciotrópicos em pintos recém-eclodidos. O PTH foi reduzido igualmente pelas duas TCO altas e, em menor grau, pela TCO baixa. A vitamina D₃ apresentou níveis diminuídos na TCO muito alta, sendo também reduzida pela TCO alta, seguida pela baixa. A calcitonina aumentou de forma similar nas duas TCO altas e então na baixa. Apesar das diferenças é possível afirmar que, para todos esses hormônios,

a temperatura muito alta foi a mais impactante, assim como a Fosfatase Alcalina foi afetada apenas pela TCO muito alta.

Restaram aspectos do desenvolvimento ósseo em temperaturas de incubação fora do padrão que ainda não foram totalmente elucidados. Os mecanismos envolvidos na utilização dos minerais da casca e da gema e o papel dos hormônios calciotrópicos, principalmente em altas temperaturas, demandam aprofundamento.

REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, R.; WHITE, D.; HOUSE, J. D.; KIM, W. K. Effects of additional dosage of vitamin D3, vitamin D2, and 25-hydroxyvitamin D3 on calcium and phosphorus utilization, egg quality and bone mineralization in laying hens. **Poultry Science**, v. 99, p. 364–373, 2020.
- 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.; AL-ZGHOUL, M. B.; HANANEH, W. M.; AL-NATOUR, M. Q.; ABU-BASHA, E. A. 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-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.
- ANDERSON, H. C. Mechanism of mineral formation in bone. **Laboratory investigation**, v. 60, p. 320-330, 1989.
- APPLEGATE, T. J.; M. S. LILBURN. Growth of the femur and tibia of a commercial broiler line. **Poultry Science**. v. 8, p. 1289–1294, 2002.
- 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.
- 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. **Fisiologia da incubação e desenvolvimento embrionário**. Belo Horizonte: FEP MVZ, 2011. 124 p.
- BARKAN, A. L.; DEMOTT-FRIBERG, R.; SAMUELS, M. H. Growth hormone (GH) secretion in primary adrenal insufficiency: effects of corticosterona withdrawal and patterned replacement on GH pulsatility and circadian rhythmicity. **Pituitary**, v. 3, p. 175–179, 2000.

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 America, v. 553, p.1-45, 1937.

BARRI, A.; HONAKER, C. F.; SOTTOSANTI, J. R.; HULET, R. M.; McELROY, A. P. Effect of incubation temperature on nutrient transporters and small intestine morphology of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 90, p. 118-125, 2011.

BASUONY, H. A.; ELAROUSSI, M. A.; BADRAN, A. M. M. Effects of omega-3 administered *in-ovo* during incubation on some physiological parameters of the developing chick embryos. **Egyptian Poultry Science Journal**, v. 40, n. I, p. 153-171, 2020.

BHAGAVAN, N. V. **Medical Biochemistry**. 2002. Salt Lake City: Academic Press, pp. 1016.

BILEZINKIAN, J. P.; MARTIN, T. J.; CLEMENS, T.; ROSEN, C. **Principles of bone biology**. 4. ed. Salt Lake City: Academic Press, pp. 2024, 2019.

BISHOP, J. E.; NORMAN, A. W. Studies on calciferol metabolism: metabolism of 25-hydroxy-vitamin D3 by the chicken embryo. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 167, p. 769–773, 1975.

BLOG CIÊNCIA À BESSA. **O crescimento e o bebê de seis meses**. 2014. Disponível em: <https://www.blogs.unicamp.br/bessa/2014/09/16/o-crescimento-e-o-bebe-de-seis-meses/>. Acesso em 25 out. 2021.

BLOOM, J.; LILJA, C. A comparative study of growth, skeletal development and eggshell composition in some species of birds. **Journal of Zoology**, v. 262, p. 361-369, 2004.

BOUILLON, R.; VAN CROMPHAUT, S.; CARMELIET, G. Intestinal calcium absorption: Molecular vitamin D mediated mechanisms. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 88, p. 332-339, 2003.

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.

BURTON, F. G.; TULLET, S. G. Respiration of avian embryos. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 82, n. 4, p. 735-744, 1985.

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 D3 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 D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in chicken embryo osteogenesis, adipogenesis, myogenesis, and vitamin D3 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 α ,25(OH) $_2$ -vitamin D3 on the activity and growth of human primary osteoblast-like cells in vitro. **Fertility And Sterility**, v. 77, n. 5, 2002.

CHRISTENSEN, V. L.; WINELAND, M. J.; FASENKO, G. M. e DONALDSON, W. E. Egg storage effects on plasma glucose and supply and demand tissue glycogen Concentrations of broiler embryos. **Poultry Science**, v. 80 p. 1729-1735, 2001.

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 D3, and insulin. **Life Sciences**, v. 263, artigo 118593, 2020.

CIROTTO, C.; ARANGI, I. How do avian embryos breath? Oxygen transport in the blood of early chick embryos. **Comparative Biochemistry and Physiology Par A**, v. 94, p. 607-613, 1989.

DAYAN, J.; REICHER, N.; MELKMAN-ZEHAVI, 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 somatotropic axes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 293, p. 17-24, 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. **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.; BRUGGEMAN, V. The endocrine interface of environmental and egg factors affecting chick quality. **Poultry Science**, v. 86, n. 5, p. 1037-1042, 2007.

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.

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.

FREEMAN, B. M.; VINCE, M. A. **Development of the Avian Embryo. A** Behavioural and Physiological Study. Londres: Chapman and Hall, 1974. 362p.

FRENCH, N. A. Modeling incubation temperature: the effects of incubator design, embryonic development, and egg size. **Poultry Science**, 76, p. 124-133, 1997.

FRENCH, N. Exigências na incubação do frango atual: maximizando o potencial. In: SEMINÁRIO técnico Hubbard – conferência Apinco 2004, Santos. **Tópico temático**. Santos: APINCO, p. 1-10, 2004.

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.

GAO, Y.; XIE, Q.; MA, J.; ZHANG, X.; ZHU, J.; SHU, D.; SUN, B.; JIN, L.; BI, Y. Supplementation of xanthophylls increased antioxidant capacity and decreased lipid peroxidation in hens and chicks. **British Journal of Nutrition**, v.109, p.977–983, 2013.

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.

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.

GÜÇLÜ, B. K.; KARA, K.; BEYAZ, L.; UYANIK, F.; EREN, M.; ATASEVER, A. Influence of dietary copper proteinate on performance, selected biochemical parameters, lipid peroxidation, liver and egg copper content in layer hens. **Biological Trace Element Research**, v. 125, p. 160-169, 2008.

GÜZ, B. C.; MOLENAAR, R.; DE JONG, I. C.; KEMP, B.; VAN DEN BRAND, H.; VAN KRIMPEN, M. Effects of dietary organic minerals, fish oil and hydrolyzed collagen on growth performance. **Poultry Science**. v. 98, p. 6552-6563, 2019.

GÜZ, B. C. **Healthy bones for broiler chickens**. 2022. Tese (Doutorado em Ciências Animais) - Graduate School of Wageningen Institute of Animal Sciences (WIAS). Wageningen, p. 326, 2022.

GÜZ, B. C.; MOLENAAR, R.; DE JONG, I. C.; KEMP, B.; VAN KRIMPEN, M.; VAN DEN BRAND, H. Effects of eggshell temperature pattern during incubation on tibia characteristics of broiler chickens at slaughter age. **Poultry Science**, v. 99, p. 3020-3029, 2020.

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.

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 domesticus*). **The Journal of Experimental Biology**, v. 210, p. 2667–2675, 2007.

HANSEN, K. K.; BECK, M. M.; SCHEIDELER, S. E.; BLANKESHIP, E. E. Exogenous estrogen boosts circulating estradiol concentrations and calcium uptake by duodenal tissue in heat-stressed hens, **Poultry Science**, v. 83, p. 895–900, 2004.

HESS, J. B.; BRITTON, W. M. Effects of dietary magnesium excess in White Leghorn hens, **Poultry Science**, v. 76, p. 703-710, 1997.

HILL, D. Chick length uniformity profiles as a field measurement of chick quality? **Avian and Poultry Biology Reviews**, v. 12, p.188, 2001.

HOPCROFT, R. L.; COWIESON, A. J.; MUIR, W. I.; GROVES, P. J. Changes to mineral levels in the yolk of meat chicken embryos during incubation. **Poultry Science**, v. 98, p. 1511-1516, 2019.

HOPCROFT, R. L.; GROVES, P. J.; MUIR, W. I. Changes to Cobb 500 chick characteristics, bone ash, and residual yolk mineral reserves during time spent in the hatcher. **Poultry Science**, v. 99, p. 2176–2184, 2020.

HULET, R.; GLADYS, G.; HILL, D.; MEIJERHOF, R.; EL SHIEKH, T. Influence of eggshell embryonic incubation temperature and broiler breeder flock age on posthatch growth performance and carcass characteristics. **Poultry Science**, v. 86, p. 408-412, 2007.

HULET, R. M.; R. MEIJERHOF. Real time incubation temperature control and heat production of broiler eggs. **Poultry Science**. 80 (Suppl. 1), p. 128, 2001.

IPEK; A.; SOZCU, A. The effects of egg-shell temperature fluctuations during incubation on welfare status and gait score of broilers. **Poultry Science**, 95, 1296–1303, 2016.

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, p. 441-459, 1973.

JANKE, O.; TZSCHENTKE, B.; HOCHERL, 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.

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.; AKIVA, A.; SHOHAM, A. B.; KOIFMAN, N.; SHIMONI, E.; RECHAV, K.; ARRAF, A. A.; SHULTHEISS, T. M.; TALMON, Y.; ZELZER, E.; WEINER, S.; ADDADI, L. Transport of membrane-bound mineral particles in blood vessels during chicken embryonic bone development. **Bone**, v. 83, p. 65-72, 2016.

KESTIN, S. C.; KNOWLES, T. G.; TINCH, A. E.; GREGORY, N. G., Prevalence of leg weakness in broiler chickens and its relationship with genotype. **Veterinary Record**, v. 131, p. 190-194, 1992.

KORELESKI, J.; SWIATKIEWICZ, S. Efficacy of different limestone particle size and 25-hydroxycholecalciferol in broiler diets. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 14, p. 705–714, 2005.

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.

KWUN, I. N.; CHO, Y. E.; LOMEDA, R. A. R.; SHIN, H. I.; CHOI, J. Y.; KANG, Y. H.; BEATTIE, J. H. Zinc deficiency suppresses matrix mineralization and retards osteogenesis transiently with catch-up possibly through Runx 2 modulation. **Bone**, v. 46, n. 3, p. 732-741, 2010.

LEACH, R. M.; MUENSTER, A. M.; WIEN, E. M. Studies on the role of manganese in bone formation: II. Effect upon chondroitin sulfate synthesis in chick epiphyseal cartilage. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 133, n. 1, p. 22-28, 1969.

- LEKSRIOMPONG, N.; ROMERO-SANCHEZ, H.; PLUMSTEAD, P. W.; BRANNAN, K. E.; BRAKE, J. Effect of elevated temperature during late incubation on body weight and organs of chicks. **Poultry Science**, v. 86, p. 2685-2691, 2007.
- LETO, D.; SALTIEL, A. R. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, p. 383-396, 2012.
- LEWINSON, D.; HAREL, Z.; SHENZER, P.; SILBERMANN, M.; HOCHBERG, Z. Effect of thyroid hormone and growth hormone on recovery from hypothyroidism of epiphyseal growth plate cartilage and its adjacent bone. **Endocrinology**, v. 124, p. 937-945, 1989.
- LI, C.; GENG, F.; HUANG, X.; MA, M.; ZHANG, X. Phosvitin phosphorus involved in chicken embryo bone formation through dephosphorylation. **Poultry Science**, v. 93, p. 3065-3072, 2014.
- 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.
- LIU, Y.; YAN, F.; YANG, W. L.; LU, X. F.; WANG, W. B. Effects of zinc transporter on differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells to osteoblasts. **Biological Trace elements Research**, v. 154, p. 234-243, 2013.
- LONG, F.; ORNITZ, D. M. Development of the Endochondral Skeleton. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. v. 5, n. a008334, 2013.
- LOURENS, A., VAN DEN BRAND, H., MEIJERHOF, R., KEMP, B. Effect of eggshell temperature during incubation on embryo development, hatchability and post-hatch development. **Poultry Science**, v. 84, p. 914-920, 2005.
- LOURENS, A.; VAN DEN BRAND, H.; HEETKAMP, M. J. W.; MEIJERHOF, R.; KEMP, B. Effects 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. e 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.
- 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.
- 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.; REIJRINK, I. A. M.; MOLENAAR, R.; VAN DER POL, C. W.; KEMP, B.; VAN DEN BRAND, H. Temperature and CO₂ during the hatching phase. I. Effects on chick quality and organ development. **Poultry Science**, v. 93, p. 655-663, 2014a.

MAATJENS, C. M.; REIJRINK, I. A. M.; MOLENAAR, R.; VAN DER POL, C. W.; KEMP, B.; VAN DEN BRAND, H. Temperature and CO₂ during the hatching phase. II. Effects on chicken embryo physiology. **Poultry Science**, v. 93, p. 655-663, 2014b.

MAATJENS, C. M.; VAN ROOVERT-REIJRINK, I. A. M.; ENGEL, B.; VAN DER POL, C. W.; KEMP, B.; VAN DEN BRAND, H. Temperature during the last week of incubation. I. Effects on hatching pattern and broiler chicken embryonic organ development. **Poultry Science**, v. 95, p. 956–965, 2016a.

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.

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.

MACKEI, M.; MÁTIS, G.; MOLNÁR, A.; SEBÓK, C.; VÖRÖSHÁZI, J.; PÁL, L.; DUBLECZ, K.; HUSVÉTH, F.; NEOGRÁDY, Z. The relationship between small heat shock proteins and redox homeostasis during acute heat stress in chickens. **Journal of Thermal Biology**, v. 100, artigo 103040, 2021.

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.

MCNABB, A. F. M.; WILSON, M. C. Thyroid hormone deposition in avian eggs and effects on embryonic development. **American Zoology**, v. 37, p. 553-560, 1997.

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

MEIJERHOF, R. Embryo temperature is the key factor in incubation. **World's Poultry Science Journal**, v.15, n.10, p. 42-43, 1999.

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. Aspectos físicos da incubação e sua relação com o desenvolvimento embrionário. *In*: MACARI, M.; GONZALES, E.; PATRÍCIO, I. S.; NÄÄS, I. A.; MARTINS, P. C. **Manejo da Incubação**. 3. ed., FACTA, 2013. cap. 2.3, p. 121-132.

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

MIR, E.; HOSSEIN-NEZHAD, A.; BAHRAMI, A.; BEKHEIRNIA, M. R.; JAVADI, E.; NADERI, A. A.; LARIJANI, B. Adequate serum copper concentration could improve bone density, postpone bone loss and protect osteoporosis in women. **Iranian Journal of Public Health** (Supplementary issue on Osteoporosis), p. 24-29, 2007.

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

MOLENAAR, R.; DE VRIES, S.; VAN DEN ANKER, I.; MEIJERHOF, R.; KEMP, B.; VAN DEN BRAND, H. Effect of eggshell temperature and a hole in the air cell on perinatal development and physiology of layer hatchlings. **Poultry Science**, v. 89, p. 1716-1723, 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.

MOLENAAR, R.; VAN DEN BORNE, J. J. G. C.; HAZEJAGER, E.; KRISTENSEN, N. B.; HEETKAMP, M. J. W.; MEIJERHOF, R.; KEMP, B.; VAN DEN BRAND, H. High environmental temperature increases glucose requirements in the developing chicken embryo. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1-12, 2013.

MONTECUCCO, C.; CAPORALI, R.; CAPROTTI, P.; CAPROTTI, M.; NOTARIO, A. Sex hormones and bone metabolism in postmenopausal rheumatoid arthritis treated with two different glucocorticoids. **The Journal of Rheumatology**, v. 19, p. 1895–1900, 1992.

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. 93:102726. 2020.

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 length strength of two commercial strains of meat chicken subjected to different incubation profiles. **Animal**. n. 13, v. 7, p. 1489-1497. 2019.

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.

NANGSUAY, A.; MEIJERHOF, R.; VAN DEN ANKER, I.; HEETKAMP, M. J. W.; MORITA, V. S.; KEMP, B.; VAN DEN BRAND, H. Effects of breeder age, broiler strain, and eggshell temperature on development and physiological status of embryos and hatchlings. **Poultry Science**, v. 95, p. 1666-1679, 2016.

NARI, N.; GHASEMI, H. A. Growth performance, nutrient digestibility, bone mineralization, and hormone profile in broilers fed with phosphorus-deficient diets supplemented with butyric acid and *Saccharomyces boulardii*. **Poultry Science**, v. 99, p. 926-935, 2020.

NNAMDI, S. E.; HASAN, A.; PARVEEN, A.; SHWANI, A.; RHOADS, D. D. Embryo lethality assay as a tool for assessing virulence of isolates from bacterial chondronecrosis with osteomyelitis in broilers. **Poultry Science**, v. 100, n. 101455, 2021.

OGNIK, K.; SEMBRATOWICZ, I. Stress as a factor modifying the metabolism in poultry. A review. **Annales UMCS, Zootechnica**, v. 30, n. 2, p. 34-43, 2012.

OLIVEIRA, T. F. B.; BERTECHINI, A. G.; BRICKA, R. M.; HESTER, P. Y.; KIM, E. J.; GERARD, P. D.; PEEBLES, E. D. Effects of *in ovo* injection of organic trace minerals and post-hatch holding time on broiler performance and bone characteristics. **Poultry Science**, v. 94, p. 2677-2865, 2015.

OLIVEIRA, J. E.; UNI, Z.; FERKET, P. R. Important metabolic pathways in poultry embryos prior to hatch. **World's Poultry Science Journal**, v.64, p.488–499, 2008.

OVIEDO-RONDÓN, E. O., J. SMALL, M. J. WINELAND, V. L. CHRISTENSEN, P. S. MOZDZIAK, M. D. KOCI, S. V. L. FUNDERBURK, D. T. ORT; K. M. MANN. Broiler embryo bone development is influenced by incubator temperature, oxygen concentration and eggshell conductance at the plateau stage in oxygen consumption. **British Poultry Science**. v. 49, p. 666–676, 2008a.

OVIEDO-RONDÓN, E. O., J. SMALL, M. J. WINELAND, V. L. CHRISTENSEN, J. L. GRIMES, S. V. L. FUNDERBURK, D. T. ORT; K. M. MANN. Effects of incubator temperature and oxygen concentration during the plateau stage of oxygen consumption on turkey embryo long bone development. **Poultry Science**. v. 87, p. 1484–1492, 2008b.

OVIEDO-RONDÓN, E. O., M. J. WINELAND, J. SMALL, H. CUTCHIN, A. MCELROY, A. BARRI; S. MARTIN. Effect of incubation temperatures and chick

transportation conditions on bone development and leg health. **Journal of Applied Poultry Research**. v. 18, p. 671–678, 2009a.

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., CELIK, I., TELATAR, T.; SUR, E. Histochemical and histological evaluations of the effects of high incubation temperature on embryonic development of thymus and bursa of Fabricius in broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 51, n. 1, p. 43-51, 2010.

OZNURLU, Y., E. SUR, T. OZAYDIN, I. CELIK; D. ULUISIK. Histological and histochemical evaluations on the effects of high incubation temperature on the embryonic development of tibial growth plate in broiler chickens. **Microscopy Research and Technique**, v. 79, p. 106–110, 2016.

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

PAUWELS, F. **Biomechanics of the Locomotor Apparatus**. Springer-Verlag, New York. 1980.

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.

PECHOVA, A.; PAVLATA, L. Chromium as an essential nutrient: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 52, n. 1, p. 1-18, 2007.

PIESTUN, Y.; HALEVY, O.; YAHAV, S. Thermal manipulations of broiler embryos—The effect on thermoregulation and development during embryogenesis. **Poultry Science**, v. 88, n. 12, p. 2677-2688, 2009.

PIZAURO JÚNIOR, J. M.; CIANCAGLINI, P.; MACARI, M. Discondroplasia tibial: mecanismo de lesão e controle. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. v. 224, p. 169-185, 2002.

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.

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.

RAHN, H.; PAGANELLI, C. V.; AR, A. The avian egg: air-cell gas tension, metabolism and incubation time. **Respiration Physiology**, v. 22, p. 297-309, 1974.

RAMP, W. K.; THOMAS, J. R.; NIFONG, P. D. Magnesium and the mineral metabolism of chick embryo tibiae in organ culture, **Calcified tissue research**, v. 24, p. 93-98, 1977.

RATH, N. C.; BALOG, J. M.; HUFF, G. R.; KULKARNI, G. B.; TIERCE, J. F. Comparative differences in the composition and biochemical properties of tibiae of seven- and seventy-two-week-old male and female broiler breeder chickens. **Poultry Science**, v. 78, p. 1232-1239, 2000.

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.

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.

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

ROBSON, H.; SIEBLER, T.; SHALET, S. M.; WILLIAMS, G. R. Interactions between GH, IGF-I, glucocorticoids, and thyroid hormones during skeletal growth. **Pediatric Research**, v. 52, n. 2, p. 137-147, 2002.

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.

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

SASSO, G. R. S.; FLORÊNCIO-SILVA, R.; SASSO-CERRI, E.; GIL, C. D.; SIMÕES, M. J.; CERRI, P. S. Spatio-temporal immunolocalization of VEGF-A, Runx2, and osterix during the early steps of intramembranous ossification of the alveolar process in rat embryos. **Developmental Biology**, v. 478, p. 133-143, 2021.

SGAVIOLI, S.; DOMINGUES, C. H. F.; SANTOS, E. T.; QUADROS, T. C. O.; BORGES, L. L.; GARCIA, R. G.; LOUZADA, M. J. Q. L.; BOLELI, I. C. Effect of *in-ovo* ascorbic acid injection on the bone development of broiler chickens submitted to heat stress during incubation and rearing. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.18: n.1, p. 153-162, 2016.

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

SHASTAK, Y.; RODEHUTSCORD, M. A review of the role of magnesium in poultry nutrition, **Poultry Science**, v. 71, p. 125-138, 2015.

SHIM, M. Y.; KARNUAH, A. B.; ANTHONY, N. B.; PESTI, G. M.; AGGREY, S. E. The effects of broiler chicken growth rate on valgus, varus, and tibial dyschondroplasia. **Poultry Science**, v. 91, p. 62–65, 2012.

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.

SZELESZCZUK, L.; KURAS, M.; PISKLAK, D. M.; WAWER, I. Analysis of the changes in elemental composition of the chicken eggshell during the incubation period. **The Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 26, n. 3, p. 583-587, 2016.

THORP, B. H. Skeletal disorders in the fowl: a review. **Avian Pathology**, v. 23, p. 203-236, 1994.

TAZAWA, H. Oxygen and CO₂ exchange and acid-base regulation in the avian embryo. **American Zoologist**, 20, p. 395-404. 1980.

TONA, K.; BAMELIS, F.; DE KETELAERE, B.; BRUGGEMAN, V.; MORAES, V. M. B.; BUYSE, J.; ONAGBESAN, O.; DECUYPERE, E. Effects of Egg Storage Time on Spread of Hatch, Chick Quality, and Chick Juvenile Growth. **Poultry Science**, v. 2, p. 736–741, 2003.

TONA, K.; BRUGGEMAN, V.; ONAGBESAN, O.; BAMELIS, F.; GBEASSOR, M.; MERTENS, K.; DECUYPERE, E. Day-old chick quality: Relationship to hatching egg quality, adequate incubation practice and prediction of broiler performance. **Avian and Poultry Biology Reviews**, v. 16, p. 109-119, 2005.

TORRES, C. A.; KORVER, D. R. Influences of trace mineral nutrition and maternal flock age on broiler embryo bone development. **Poultry Science**, v. 97, p. 2996-3003, 2018.

TORTORA, G. J. **Princípios de anatomia humana**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, 1110p.

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, Ca²⁺-Atpase and carbonic anhydrase. **Journal Cell Science**, v. 82, p. 85-97, 1987.

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

UNI, Z.; YADGARY, L.; YAIR, R. Nutritional limitations during poultry embryonic development. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 21, n. 1, p. 175-184, 2012.

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 crossbreeds. **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.

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

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.

WILLEMS, E.; DECUYPERE, E.; BUYSE, J.; EVERAERT, N. Importance of albumen during embryonic development in avian species, with emphasis on domestic chicken. **World's Poultry Science Journal**, v. 70, n. 3, p. 503–518, 2014.

WILLEMSEN, H.; KAMERS, B.; DAHLKE, F.; HAN, H.; SONG, Z.; ANSARI PIRSARAEI, Z.; 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.

WILLIAMS, B., D. WADDINGTON, D. H. MURRAY.; C. FARQUHARSON. Bone strength during growth: influence of growth rate on cortical porosity and mineralization. **Calcified Tissue International**, v. 74, p. 236-245, 2004.

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.

WU, M.; CHEN, G.; LIM Y.-P. TGF-beta and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. **Bone Research**, v. 4, n. 16009, 2016.

YADGARY, L.; WONG, E. A.; UNI, Z. Temporal transcriptome analysis of the chicken embryo yolk sac. **BMC Genomics**, v. 15, p. 690–705, 2014.

YAIR, R.; CAHANER, A., UNI, Z.; SHAHAR, R. Maternal and genetic effects on broiler bone properties during incubation period. **Poultry Science**, v. 96, p. 2301-2311, 2017.

YAIR, R.; SHAHAR, R.; UNI, Z. *In ovo* feeding with minerals and vitamin D3 improves bone properties in hatchlings and mature broilers. **Poultry Science**, v. 94, p. 2695-2707, 2015.

YAIR, R.; SHAHAR, R.; UNI, Z. Prenatal nutritional manipulation by *in ovo* enrichment influences bone structure, composition and mechanical properties. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 2784-2793, 2013.

YAIR, R.; UNI, Z. Content and uptake of minerals in the yolk of broiler embryos during incubation and effect of nutrient enrichment. **Poultry Science**, v. 90, p. 1523-1531, 2011.

YAIR, R.; UNI, Z.; SHAHAR, R. Bone characteristics of late-term embryonic and hatchling broilers: Bone development under extreme growth rate. **Poultry Science**, v. 91, p. 2614-2620, 2012.

YALÇIN, S.; BRUGGEMAN, V.; BUYSE, J.; DECUYPERE, E.; ÇABUK, M.; 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.; 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.; SIEGEL, P. B. Exposure to cold or heat during incubation on developmental stability of broiler embryos. **Poultry Science**, v. 82, p. 1388-1392, 2003.