

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

**PERFIS TÉRMICOS NA FASE INICIAL DE INCUBAÇÃO SOBRE A
EMBRIOGÊNESE E DESENVOLVIMENTO ÓSSEO DE PINTOS DE CORTE**

TAYANA NERY FRANCA

**SALVADOR - BAHIA
SETEMBRO - 2024**



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

**PERFIS TÉRMICOS NA FASE INICIAL DE INCUBAÇÃO SOBRE A
EMBRIOGÊNESE E DESENVOLVIMENTO ÓSSEO DE PINTOS DE CORTE**

TAYANA NERY FRANCA
Zootecnista

**SALVADOR - BAHIA
SETEMBRO - 2024**

TAYANA NERY FRANCA

**PERFIS TÉRMICOS NA FASE INICIAL DE INCUBAÇÃO SOBRE
A EMBRIOGÊNESE E DESENVOLVIMENTO ÓSSEO DE PINTOS
DE CORTE**

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

Área de Concentração: Produção Animal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanessa Michalsky Barbosa
Coorientador: Prof. Dr. Marcos Barcellos Café

**SALVADOR - BA
SETEMBRO - 2024**

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

Franca, Tayana Nery.

Perfis térmicos na fase inicial de incubação sobre a embriogênese e desenvolvimento ósseo de pintos de corte / Tayana Nery Franca. - 2024.

148 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Michalsky Barbosa.

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Barcellos Café.

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

1. Zootecnia. 2. Ovos - Incubação. 3. Eclodibilidade. 4. Frango de corte - Criação. 5. Frango de corte - Efeito da Temperatura. I. Barbosa, Vanessa Michalsky. II. Universidade Federal da Bahia. Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

CDD - 636.5

CDU - 636.5

**PERFIS TÉRMICOS NA FASE INICIAL DE INCUBAÇÃO SOBRE A
EMBRIOGÊNESE E DESENVOLVIMENTO ÓSSEO DE PINTOS DE CORTE**

Tayana Nery Franca

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

Salvador, 20 de setembro de 2024

Comissão examinadora:

Documento assinado digitalmente
 VANESSA MICHALSKY BARBOSA
Data: 23/09/2024 12:29:02-0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Dra. Vanessa Michalsky Barbosa
UFBA
Orientadora / Presidente

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

Dra. Lia Muniz Barretto Fernandes
UFBA

Izabela Lorena Azevedo

Dra. Izabela Lorena Azevedo
IFBaiano

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

Dra. Fabiana Ferreira
UFMG

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

Dra. Mariana André Pompeu
PUC

A minha família, pelo apoio incondicional. Aos meus amigos, pela constante motivação.
E a todos os que acreditaram em mim, meu sincero agradecimento.

AGRADECIMENTOS

Sou imensamente grata a Deus por todas as bênçãos que me concedeu. A força para superar desafios, a sabedoria para aprender e crescer, e a saúde para realizar este trabalho.

Ao meu pai, José Emídio, minha eterna gratidão por ter me mostrado o valor do conhecimento. Sua presença continua viva em meu coração, me inspirando a cada dia.

À minha mãe, Eliete, meu amor incondicional. Sua força, paciência e carinho foram essenciais em todos os momentos da minha vida.

À minha irmã, Thaís, minha companheira de todas as horas. Obrigada por me ouvir, me apoiar e celebrar minhas conquistas.

Aos meus animais de estimação, por serem a fonte de alegria mais pura.

Aos meus familiares e amigos, um agradecimento especial por fazerem parte da minha história. Cada um de vocês contribuiu de uma forma única para que eu chegasse até aqui.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Vanessa Michalsky, minha eterna gratidão. Sua confiança, orientação e amizade foram fundamentais para a realização deste trabalho. Você é um exemplo de profissional e pessoa.

Ao grupo de pesquisa NUPIA. Taís Borges, Izabela Azevedo, Larissa Kiana, Nayana Mercês e Vanessa Michalsky, agradeço a cada uma de vocês por todo o aprendizado e companheirismo.

Agradeço à Universidade Federal da Bahia pela oportunidade de realizar o doutorado.

Agradeço a todos os professores e servidores da EMEVZ-UFBA.

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.

Agradeço imensamente às professoras, membros da banca examinadora, por terem aceitado o convite para compor este trabalho e por suas valiosas contribuições.

A todos que, de alguma forma, plantaram uma semente em minha jornada, contribuindo para a minha formação e, especialmente, para a realização desta pesquisa, minha mais sincera gratidão.

Perfis térmicos na fase inicial de incubação sobre a embriogênese e desenvolvimento ósseo de pintos de corte

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar como diferentes perfis térmicos aplicados de forma gradual no início da incubação influenciam a embriogênese, o rendimento de incubação, a qualidade dos pintos, o uso de nutrientes dos componentes do ovo, o perfil bioquímico, o equilíbrio ácido-base, a resposta hormonal e o desenvolvimento ósseo de pintos de corte. Para isso, 2.408 ovos de matrizes Cobb 500[®] com 45 semanas de idade foram incubados sob quatro perfis distintos de temperatura da casca do ovo (TCO), com aumento ou redução gradual: 1) TC - temperatura controle (37,8°C durante todo o período de incubação); 2) TL - temperatura baixa (36,7°C, do 0^o ao 8^o dia de incubação); 3) TH - temperatura alta (38,9°C, do 0^o ao 8^o dia de incubação); e 4) TVH - temperatura muito alta (39,4°C, do 0^o ao 8^o dia de incubação). Foram avaliados o rendimento da incubação (perda de peso do ovo, fertilidade, eclodibilidade, mortalidade, refugagem), a qualidade de pinto (peso, comprimento, peso do corpo sem gema, peso de gema residual, peso relativo de órgãos, escore de umbigo), janela de nascimento, duração da incubação, morfologia embrionária, parâmetros da casca (peso, espessura, Ca, P, Mn e Mg), da gema (Ca, P, Mn e Mg), temperatura retal, avaliações do sangue (Ca, P, GH, T₃, T₄, PTH, calcitonina, vitamina D₃, fosfatase alcalina, glicose, ácido úrico, lactato, glicogênio hepático e hemogasometria) e análises ósseas (Ca, P, Mn, Mg, morfometria, biofísica e mecânica). Foi observado que os tratamentos com temperaturas elevadas (TH e TVH) aceleraram o desenvolvimento embrionário, resultando em menor duração de incubação. Enquanto o tratamento TL, obteve maior duração de incubação e indicou um desenvolvimento mais consistente e gradual. Verificou-se que o tratamento TL influenciou positivamente o rendimento da incubação, a qualidade dos pintos, o desenvolvimento ósseo e dos órgãos vitais, além da mobilização e utilização de minerais da casca e da gema, bem como os parâmetros fisiológicos e ósseos de pintos recém-eclodidos ($p \leq 0,05$). Conclui-se que o aumento gradual da TCO na primeira semana de incubação, como demonstrado no tratamento TL (36,7°C), apresentou resultados estatisticamente similares ou superiores ao tratamento controle em todas as variáveis analisadas. Em contraste, TCO elevadas, especialmente TVH (39,4°C), não são recomendadas, pois afetaram negativamente os parâmetros avaliados.

Palavras-chave: Eclodibilidade, Frangos de Corte, Hemogasometria, Mineralização, Sistema Locomotor, Temperatura da Casca do Ovo

Thermal profiles in the initial incubation phase on embryogenesis and bone development of broiler chicks

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate how different thermal profiles applied gradually at the beginning of incubation influence embryogenesis, hatch performance, chick quality, nutrient utilization from egg components, biochemical profile, acid-base balance, hormonal response, and bone development in broiler chicks. 2,408 eggs from 45-week-old Cobb 500[®] breeder hens were incubated under four distinct eggshell temperature (EST) profiles, with gradual increase or decrease: 1) TC - control temperature (37.8°C throughout the incubation period); 2) TL - low temperature (36.7°C, from day 0 to day 8 of incubation); 3) TH - high temperature (38.9°C, from day 0 to day 8 of incubation); and 4) TVH - very high temperature (39.4°C, from day 0 to day 8 of incubation). Hatch performance (egg weight loss, fertility, hatchability, mortality, culling), chick quality (weight, length, yolk-free body mass, residual yolk weight, relative organ weight, navel score), hatch window, incubation duration, embryonic morphology, eggshell parameters (weight, thickness, Ca, P, Mn, and Mg), yolk parameters (Ca, P, Mn, and Mg), rectal temperature, blood assessments (Ca, P, GH, T₃, T₄, PTH, calcitonin, vitamin D₃, alkaline phosphatase, glucose, uric acid, lactate, hepatic glycogen, and blood gas), and bone analyses (Ca, P, Mn, Mg, morphometry, biophysics, and mechanics) were evaluated. It was observed that the elevated temperature treatments (TH and TVH) accelerated embryonic development, resulting in a shorter incubation period. While the TL treatment, with a longer incubation period, indicated a more consistent and gradual development. The TL treatment positively influenced hatch performance, chick quality, bone and vital organ development, as well as the mobilization and utilization of minerals from the eggshell and yolk, along with the physiological and bone parameters of newly hatched chicks ($p \leq 0.05$). It was concluded that the gradual increase in EST during the first week of incubation, as demonstrated by the TL treatment (36.7°C), produced statistically similar or superior results to the control treatment in all analyzed variables. In contrast, elevated EST levels, especially TVH (39.4°C), are not recommended as they negatively affected the evaluated parameters.

Keywords: Broilers, Eggshell Temperature, Hatchability, Blood gas analysis, Locomotor System, Mineralization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Clivagem e formação da linha primitiva.....	19
Figura 2.	Processo de gastrulação nas aves: linha primitiva e Nó de Hensen...	20
Figura 3.	Desenho esquemático da regressão do nó de Hensen.....	21
Figura 4.	Anexos embrionários.....	22
Figura 5.	Secção sagital de um osso longo após maceração (A), e secção sagital de um osso sem tratamento mostrando cartilagem articular e medula óssea vermelha (B).....	27
Figura 6.	Representação esquemática de tecido ósseo imaturo e tecido ósseo maduro.....	27
Figura 7.	Células do tecido ósseo.....	28
Figura 8.	Esquema da ossificação intramembranosa.....	29
Figura 9.	Esquema da ossificação endocondral.....	30
Figura 10.	Representação esquemática das zonas de ossificação nas epífises.....	31
Figura 11.	Janela de nascimento de pintos incubados em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia.....	64
Figura 12.	Duração da incubação de pintos incubados em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia.....	65
Figura 13.	Peso do pinto sem gema (YFBM, g) ao longo da incubação em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia.....	71
Figura 14.	Peso da gema (g) ao longo da incubação em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia.....	72

Figura 15.	Comprimento do pinto (cm) ao longo da incubação em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia.....	73
Figura 16.	Peso da casca (g) ao longo da incubação em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia.....	78
Figura 17.	Espessura da casca (g) ao longo da incubação em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia.....	79
Figura 18.	Teor de cálcio (mg) da casca ao longo da incubação em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia.....	80
Figura 19.	Teor de fósforo (mg) da casca ao longo da incubação em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia.....	81
Figura 20	Teor de manganês (µg) da casca ao longo da incubação em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia.....	82
Figura 21	Teor de magnésio (mg) da casca ao longo da incubação em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia.....	83
Figura 22	Teor de cálcio (mg) da gema ao longo da incubação em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia.....	85
Figura 23	Teor de fósforo (mg) da gema ao longo da incubação em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia.....	86
Figura 24	Teor de manganês (µg) da gema ao longo da incubação em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia.....	87

Figura 25	Teor de magnésio (mg) da gema ao longo da incubação em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9 °C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia.....	88
Figura 26	Temperatura retal (°C) de pintos incubados em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia.....	91
Figura 27	Minerais sanguíneos (mmol/L) de pintos de um dia incubados em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia.....	92
Figura 28	Hormônios sanguíneos (ng/mL) de pintos de um dia incubados em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia.....	96
Figura 29	Fosfatase alcalina sanguínea (U/L) de pintos de um dia incubados em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia.....	98
Figura 30	Teores sanguíneos de glicose (mg/dL), ácido úrico (mg/dL), lactato (mmol/L) e glicogênio hepático (mg/g) de pintos de um dia incubados em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Perfis de temperatura aplicados nos diferentes tratamentos.....	50
Tabela 2.	Número de pintos retirados do nascedouro a cada 8 horas.....	51
Tabela 3.	Parâmetros de incubação em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia.....	61
Tabela 4.	Estágio morfológico de desenvolvimento embrionário determinado aos 8d de incubação após uso de diferentes perfis de temperatura na fase inicial da embriogênese - 1ª Avaliação.....	67
Tabela 5.	Estágio morfológico de desenvolvimento embrionário determinado aos 13d de incubação após uso de diferentes perfis de temperatura na fase inicial da embriogênese - 2ª Avaliação.....	67
Tabela 6.	Estágio morfológico de desenvolvimento embrionário determinado aos 18,5d de incubação após uso de diferentes perfis de temperatura na fase inicial da embriogênese - 3ª Avaliação.....	68
Tabela 7.	Peso do ovo antes da incubação, pesos dos pintos, peso relativo de órgãos e escore de umbigo de recém-eclodidos que foram incubados em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH do 0º ao 8º dia.....	70
Tabela 8.	Parâmetros hemogasométricos de pintos incubados em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia.....	102
Tabela 9.	Composição mineral da tíbia dos embriões aos 18,5 dias e dos pintos recém-eclodidos incubados em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia.....	105
Tabela 10.	Características morfométricas, biofísicas e mecânicas da tíbia dos embriões aos 18,5 dias e dos pintos recém-eclodidos incubados em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia.....	108
Tabela 11.	Características morfométricas, biofísicas e mecânicas do fêmur dos embriões aos 18,5 dias e dos pintos recém-eclodidos incubados em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia.....	108

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Resumo dos principais eventos do desenvolvimento embrionário ósseo em aves.....	25
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
Ca	Cálcio
CO ₂	Dióxido de carbono ou gás carbônico
EST	Eggshell temperature
FA	Fosfatase Alcalina
GH	Hormônio do crescimento
Hb	Hemoglobina
HCO ₃ ⁻	Bicarbonato
Hct	Hematócrito
iCa	Cálcio ionizado
Hsp90	Proteína de choque térmico 90
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
MCA	Membrana corioalantóide
Mn	Manganês
Mg	Magnésio
MSV	Membrana do saco vitelínico
Na	Sódio
O ₂	Gás oxigênio
PTH	Paratormônio
P	Fósforo
SEM	Erro padrão da média
SV	Saco vitelínico
T ₃	Triiodotironina
T ₄	Tiroxina
TCO	Temperatura da casca do ovo
YFBM	Yolk free body mass /Peso do corpo sem o saco vitelino residual

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE <i>GALLUS GALLUS DOMESTICUS</i>	18
2.1.1 Desenvolvimento embrionário antes do período de incubação	18
2.1.2 Desenvolvimento embrionário durante o período de incubação	19
2.1.3 Anexos embrionários.....	22
2.1.4 Estágios de desenvolvimento ósseo durante a incubação.....	24
2.2 FORMAÇÃO DO ESQUELETO DURANTE A INCUBAÇÃO	26
2.2.1 Composição e estrutura do tecido ósseo.....	26
2.2.2 Células do tecido ósseo	28
2.2.3 Tipos de ossificação: intramembranosa e endocondral	28
2.2.4 Mineralização	30
2.2.5 Crescimento e remodelação	31
2.2.6 Utilização dos minerais presentes no ovo para a formação óssea	32
2.3 HORMÔNIOS ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO ÓSSEO	36
2.3.1 Hormônio do crescimento (GH).....	36
2.3.2 Hormônios tireoidianos (T ₃ e T ₄)	37
2.3.3 Calcitonina e paratormônio (PTH).....	37
2.3.4 Vitamina D ₃	38
2.3.5 Insulina, hormônios sexuais (estrogênio e testosterona) e corticosteroides	39
2.4 TEMPERATURA NO PROCESSO DE INCUBAÇÃO	39
2.4.1 Importância da temperatura durante a incubação.....	39
2.4.2 Influência da temperatura de incubação inicial na formação óssea	43
3. MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1 Local.....	48
3.2 Unidades experimentais e tratamentos	48
3.3 Pré-incubação e incubação dos ovos	49
3.4 Nascimento dos pintos	50
3.5 Análises de rendimento de incubação	51
3.5.1 Perda de peso dos ovos durante o período de incubação.....	51
3.5.2 Mortalidade embrionária e fertilidade	51
3.5.3 Taxa de eclosão total em relação ao número de ovos férteis	52

3.6 Análises em cascas	52
3.7 Análises em gemas e saco vitelínico residual	53
3.8 Análises em embriões e pintos	53
3.8.1 Morfologia embrionária	53
3.8.2 Peso do corpo sem o saco vitelínico residual (YFBM) e comprimento	54
3.8.3 Qualidade de umbigo, peso dos órgãos e dos pintos recém-eclodidos.....	54
3.8.4 Parâmetros fisiológicos dos pintos de um dia	54
3.8.4.1 <i>Temperatura retal</i>	54
3.8.4.2 <i>Parâmetros sanguíneos</i>	55
a) <i>Hemogasometria</i>	55
b) <i>Glicose, lactato, ácido úrico</i>	55
c) <i>Hormônios: T₃, T₄, GH, vitamina D₃, PTH e calcitonina</i>	55
d) <i>Cálcio, fósforo e fosfatase alcalina</i>	56
3.8.4.3 <i>Glicogênio Hepático</i>	56
3.8.5 Análises ósseas	57
3.8.5.1 <i>Peso, comprimento e largura dos ossos</i>	57
3.8.5.2 <i>Teste biomecânico</i>	57
3.8.5.3 <i>Análises de cinzas e minerais dos ossos</i>	58
3.8.5.4 <i>Calcificação óssea</i>	58
3.9 Análise Estatística	59
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1 Rendimento de incubação e qualidade dos pintos	59
4.2 Parâmetros de casca e gema	78
4.3 Parâmetros fisiológicos dos pintos de um dia	90
4.4 Análises ósseas	105
5. CONCLUSÕES	112
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
ANEXO	135

1. INTRODUÇÃO

A avicultura moderna, impulsionada por avanços em seleção genética e práticas de manejo, tem elevado consideravelmente a eficiência dos frangos de corte, tanto em termos de crescimento rápido quanto de conversão alimentar. Esses aprimoramentos permitem que as aves alcancem pesos corporais elevados em idades cada vez mais precoces, maximizando o rendimento produtivo e atendendo à demanda crescente da indústria (Zuidhof *et al.*, 2014; Kettrukat *et al.*, 2023). No entanto, esse crescimento acelerado traz desafios, especialmente para a saúde esquelética, comprometendo o bem-estar animal e o desempenho zootécnico, além de gerar perdas econômicas e maior incidência de doenças (Bradshaw *et al.*, 2002; Bessei, 2006; Hashimoto *et al.*, 2013).

A etapa de incubação afeta diretamente o desenvolvimento embrionário e ósseo das aves, sendo determinante para a produção eficiente de pintinhos de qualidade. Durante a primeira semana, ocorre a formação de condrócitos e o estabelecimento das estruturas cartilaginosas (Bellairs; Osmond, 2005; Atalgin; Kürtül, 2009). Na segunda semana, inicia-se o processo de ossificação, seguida pela mineralização progressiva que continua após a eclosão. Todo esse ciclo é regulado por uma rede de mecanismos celulares e moleculares, com a participação de vários agentes reguladores (Bellairs; Osmond, 2005); Pines; Reshef, 2015).

Entre os fatores que interferem diretamente esse desenvolvimento, a temperatura de incubação se destaca como um dos mais críticos. A temperatura da casca do ovo (TCO), que reflete a temperatura interna do embrião, é determinante para o sucesso da embriogênese, eclosão, qualidade dos pintinhos de um dia e do desempenho das aves após a eclosão (Christensen *et al.*, 1999; Lourens *et al.*, 2005; Meijerhof, 2009). Portanto, o monitoramento e o controle da TCO desde o início do processo são fundamentais para garantir condições térmicas ideais, favorecendo a formação óssea, a deposição de nutrientes essenciais como cálcio e fósforo, e o desenvolvimento subsequente das aves (Meijerhof; Van Beek, 1993). Embora os efeitos da temperatura nas fases intermediárias e finais da incubação sejam amplamente estudados, a fase inicial ainda é pouco explorada.

Diante da escassez de estudos sobre os efeitos da temperatura nos estágios iniciais de incubação, torna-se evidente a necessidade de investigar o manejo térmico nos primeiros dias desse processo. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar como diferentes perfis térmicos aplicados no início da incubação influenciam a embriogênese, o rendimento de incubação, a qualidade dos pintos, o uso de nutrientes dos componentes do ovo, o perfil bioquímico, o equilíbrio ácido-base, a resposta hormonal e o desenvolvimento ósseo de pintos de corte.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE *GALLUS GALLUS DOMESTICUS*

2.1.1 Desenvolvimento embrionário antes do período de incubação

A formação do embrião é influenciada por fatores endógenos, como genética, hormônios e metabolismo, e por fatores exógenos, como temperatura, umidade, ventilação e manejo dos ovos na incubação (Tong *et al.*, 2013). Comumente, acredita-se que o desenvolvimento embrionário se restringe apenas ao período de incubação. Contudo, além da fertilização outros eventos importantes ocorrem durante o desenvolvimento embrionário pré-postura.

O processo de clivagem marca o início do desenvolvimento embrionário no oviduto da galinha e envolve sucessivas divisões celulares (Christensen, 2001) sob uma temperatura interna da ave adulta de 41,5°C (Gonzales, 2005). Cerca de três horas após a fecundação, o espermatozoide se une ao óvulo na porção superior do infundíbulo, formando o zigoto (Romanoff, 1960; Barbosa, 2011). Ao atingir o istmo, o zigoto começa a se dividir rapidamente, passando de duas para oito células (Eyal-Giladi; Kochav, 1976). Cerca de cinco horas após a fecundação, o embrião chega ao útero no estágio de 16 células, sendo denominado mórula (Lillie, 1952). As células continuam a se dividir até formar 256 células, originando o blastodisco no polo animal (Barbosa, 2011). O ovo em desenvolvimento entra na fase de blástula, caracterizada pela formação do blastoderma, uma camada de células idênticas organizadas em uma espessa camada centralizada sobre o vitelo (Patten, 1951; Hamburger; Hamilton, 1951; Barbosa, 2011; Cesario, 2013). No momento em que o ovo é posto, o blastoderma contém em torno de 20.000 a 60.000 células (Eyal-Giladi, 1991).

Após a postura, a temperatura permanece como o fator físico mais importante para o desenvolvimento embrionário. Se a temperatura estiver abaixo do ponto zero fisiológico (20-21°C), o desenvolvimento é parcialmente paralisado (Edwards, 1902). Com base nesse princípio, a técnica de armazenamento de ovos é utilizada para interromper o desenvolvimento do embrião, permitindo a incubação simultânea de ovos com diferentes tempos de estocagem, além de facilitar a formação da câmara de ar, essencial para a respiração pulmonar do embrião nas últimas fases de desenvolvimento (Araújo *et al.*, 2009). Ademais, o processo de pré-aquecimento horas antes dos ovos serem colocados nas incubadoras, é recomendado para evitar o choque térmico do embrião e a condensação de umidade (Brito, 2006). Logo, a adaptação

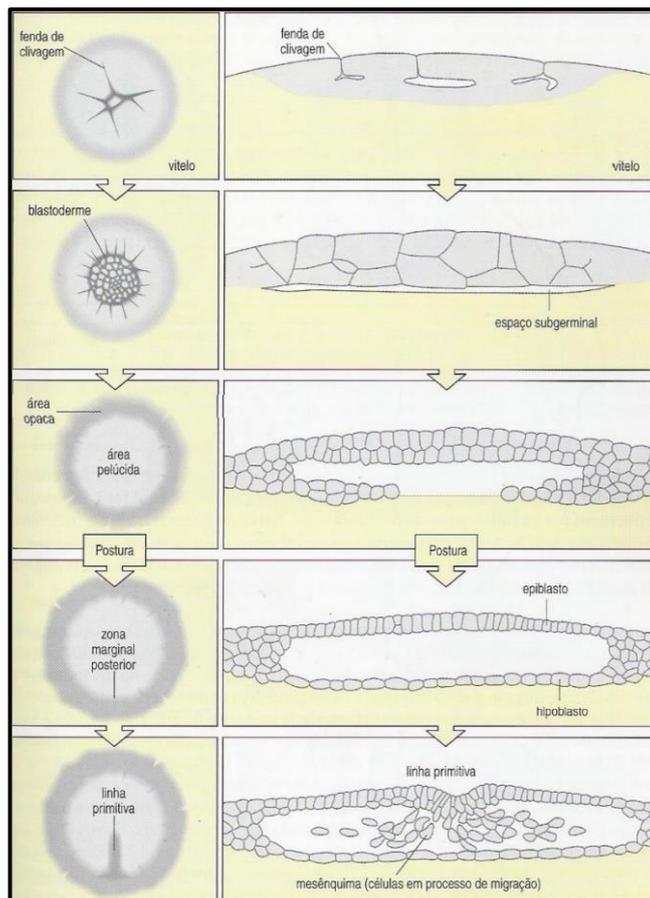
gradual do embrião às condições de temperatura da incubadora é fundamental para otimizar o sucesso da incubação.

2.1.2 Desenvolvimento embrionário durante o período de incubação

A formação dos órgãos e sistemas da ave no decorrer da incubação envolve três eventos: a gastrulação, onde acontece a formação dos tecidos primordiais, seguido da construção dos esboços primários dos órgãos e o terceiro evento é marcado pela formação dos órgãos definitivos (Hamburger; Hamilton, 1951; Bronner-Fraser, 1996; Cesario, 2013).

Nas primeiras horas de incubação, células marginais do blastoderma empurram outras células através de divisão celular mitótica. Verifica-se um deslocamento dessas células por meio da linha mediana vindas de ambos os lados do blastoderma. Cerca de 6 a 7 horas depois de incubação, o espessamento de forma triangular da região posterior da área pelúcida começa a alongar-se e se desenvolve o sulco primitivo. Esse sulco, depois de 10 a 13 horas de incubação, se estende gradualmente e é delimitado por duas linhas paralelas denominadas de bordas primitivas, constituindo a linha primitiva (figura 1) (Etches, 1998; Bellairs; Osmond, 2005; Cesario, 2013).

Figura 1 – Clivagem e formação da linha primitiva

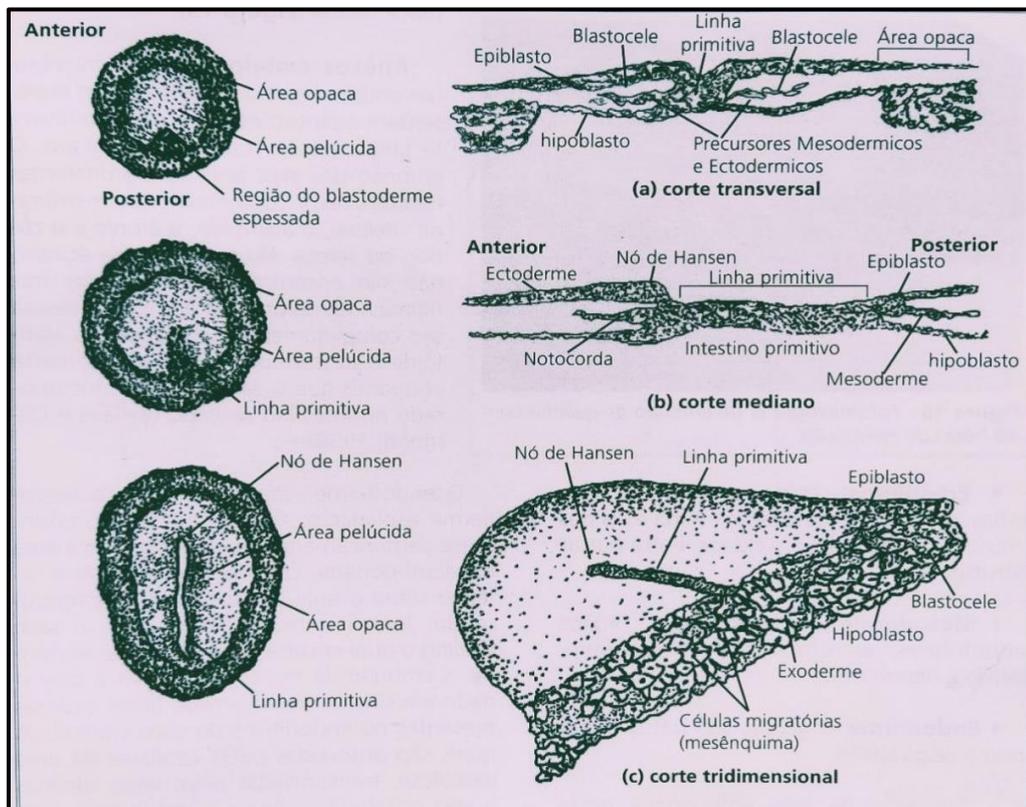


Fonte: Wolpert e Beddington (2000)

A gastrulação consiste na transferência de células do lado externo do blastoderme para dentro do blastoderme através de um canal (figura 2). Ainda não se fala em termos de ectoderme, mesoderme e endoderme, pois os tecidos encontram-se em formação. Como a gastrulação não é um simples termo morfológico, a literatura utiliza as terminologias como epiblasto e hipoblasto para distinguir as camadas até o momento da separação definitiva do mesoderme (Huettner, 1959).

A mesoderme surge entre o hipoblasto e o epiblasto, conforme o aparecimento e o crescimento da linha primitiva. O embrião se desenvolverá anteriormente a essa linha primitiva (Houillon, 1972). A região posterior da linha primitiva é definida como placa primitiva e na extremidade anterior da linha primitiva aparece uma região com espessamento de células chamado de Nó de Hensen que tem caráter transitório (Alves, 2011). Ao migrar para as extremidades direita e esquerda do sulco, as células mesodérmicas distribuem-se por toda região pelúcida. Deste modo, após a postura e na fase inicial de incubação, as três camadas germinativas se diferenciam indicando um blastoderma completamente diferenciado (Barbosa, 2011; Cesário, 2013).

Figura 2 – Processo de gastrulação nas aves: linha primitiva e Nó de Hensen

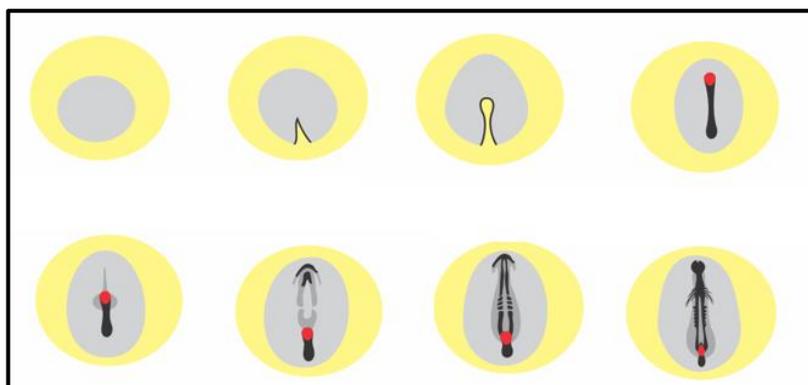


Fonte: Huettner (1959) e Gilbert (2006)

As três camadas germinativas de células têm papel relevante na formação dos órgãos ou sistemas embrionários. A ectoderme originará a epiderme, penas, bico, unhas, sistema nervoso, lente, retina e íris dos olhos, mucosa da boca e cloaca, entre outras estruturas. A endoderme constituirá a mucosa dos tratos digestório e respiratório. Enquanto a mesoderme dará origem aos ossos, músculos, órgãos reprodutores, excretorios, cardiocirculatório, derme e hipoderme (Araújo; Albino, 2011; Cesario, 2013).

A partir do nó de hensen, as células se dirigem adiante e formam então a terceira camada germinativa, o cordomesoderme, ou seja, um prolongamento cefálico correspondente a notocorda. À medida que a notocorda se desenvolve, a linha primitiva regride (figura 3). Posteriormente, começa a formação dos somitos em cada lado da notocorda (Witschi, 1956; Cesario, 2013).

Figura 3 – Desenho esquemático da regressão do nó de Hensen



Fonte: Barbosa (2011)

O desenvolvimento do embrião da galinha é caracterizado pela diferenciação celular que ocorre durante os estágios iniciais e intermediários da incubação, seguido pelo crescimento de órgãos e maturação de sistemas durante o estágio final. Com a diferenciação celular, as células tornam-se especializadas e então tem início a formação de órgãos vitais e sistemas do embrião. Desenvolvem-se também tecidos extra-embriônicos, fundamentais para oxigenação e nutrição do embrião. Após se tornarem especializadas, os grupos de células iniciam, através de sucessivas divisões mitóticas, uma sequência organizada de multiplicação e crescimento celular. Com a formação dos tecidos e órgãos, é iniciado o estabelecimento de suas funções (Decuyper; Michels, 1992; Hamburger; Hamilton, 1951).

Nas primeiras 96 horas de incubação, o embrião tende a se adaptar as condições em que está submetido e reinicia sua formação com intensa multiplicação celular e diferenciação das estruturas (Gonzales, 2005). Um intenso crescimento embrionário acontece por volta do quinto

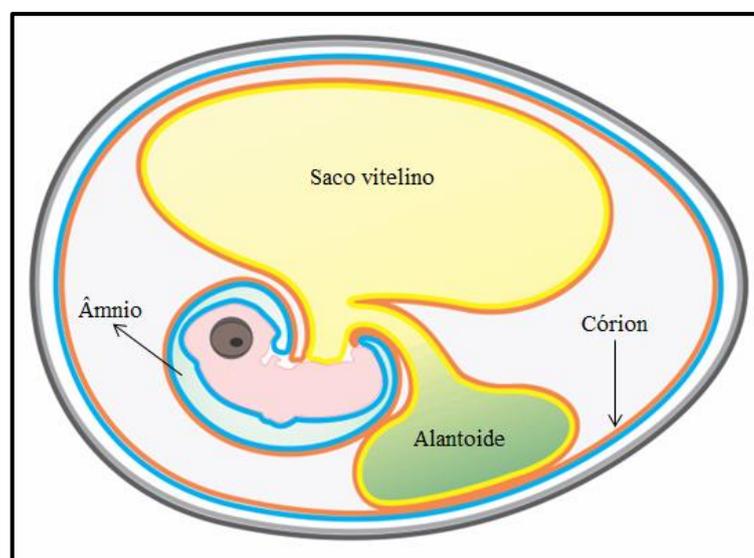
até o 18º dia de incubação. Wilson (1991) ressalta que, as condições físicas aplicadas no ambiente de incubação são relevantes nesta etapa.

Os últimos dias de crescimento e desenvolvimento do embrião (19º até o 21º dia), é caracterizado por notáveis eventos que condicionam a eclosão do pintinho. Dentre os principais acontecimentos, destacam-se o posicionamento da cabeça embaixo da asa direita pelo embrião, rompimento da membrana interna (bicagem interna), respiração por intermédio da câmara de ar, perfuração da casca (bicagem externa) e terminando com a ruptura da casca para o nascimento (Gonzales, 2005).

2.1.3 Anexos embrionários

O saco vitelino, âmnio, alantóide e córion (figura 4) são membranas extraembrionárias responsáveis pela nutrição proteção, respiração e estoques de metabólitos derivados do metabolismo embrionário (Givisiez *et al.*, 2020). A extensão dos três folhetos germinativos (endoderme, mesoderme e ectoderme) determina a formação dos anexos embrionários (Patten, 1951; Houillon, 1972; Barbosa *et al.*, 2011; Cesario, 2013).

Figura 4 – Anexos embrionários



Fonte: Barbosa *et al.* (2011)

Vieira e Moran Jr (1999) descreveram que o saco vitelino confere energia e nutrientes para o embrião, sendo reserva nutritiva da ave por cerca de 72 horas após a eclosão. Além disto, o saco vitelino é *local* primário de formação das *células sanguíneas*, especialmente eritrócitos (Yadgary *et al.*, 2014). O saco vitelino é o primeiro anexo a se formar (cerca de 12 horas de

incubação). É formado a partir da área opaca e consiste inicialmente em um ectoderma epitelial fino sustentado por uma camada de células endodérmicas altas contendo muitas gotículas de vitelo intracelulares, sendo essas camadas contínuas com a área pelúcida (Bellairs; Osmond, 2005).

Everaert e Decuypere (2013), explicaram que o âmnio é uma membrana avascular, não innervada e altamente muscular que envolve o embrião, tendo como função protegê-lo contra choques mecânicos e térmicos, evitando a desidratação e separando-o do meio circundante. O âmnio surge com 33 horas de incubação, na região cefálica. Ao ser ingerido pelo embrião o líquido amniótico fornece água e nutrientes para o mesmo. Essa ingestão é importante para desenvolvimento da mucosa intestinal e preparação para a eclosão, já que a capacidade de digerir e absorver nutrientes é pouco desenvolvida nesta fase (De Oliveira, 2007; Omede *et al.*, 2017).

O córion é formado juntamente com o âmnio, envolve todas as estruturas e protege tanto o embrião quanto as membranas extraembrionárias. Segundo Gabrielli e Accili (2010), o córion é uma membrana extraembrionária formado por duas camadas de trofoblasto e pela mesoderme extraembrionária, unindo-se com o alantoide para desempenhar função respiratória e está localizado logo abaixo da casca. Além do mais, possui um grande contato com as membranas da casca e por isso mobilizam minerais da casca para a construção do esqueleto e ajudam também na respiração. Esta membrana no ovo em processo de incubação interage com o alantoide formando a membrana corioalantóide (Vanderley; Santana, 2015).

O alantoide começa a se formar a partir do intestino posterior por volta de 65-69 horas de incubação e está presente no embrião de 72 horas de incubação. Tem como função armazenar substâncias excretadas pelos rins durante o desenvolvimento embrionário (Bellairs; Osmond, 2005; Barbosa *et al.*, 2011). Este anexo embrionário envolve o albúmen, saco vitelino e o saco amniótico, e alcança volume máximo por volta do décimo terceiro dia de incubação, reduzindo à medida que as células das membranas reabsorvem água e alguns eletrólitos (Everaert; Decuypere, 2013).

O alantoide une-se ao córion para formar a membrana corioalantoide, infiltrada nos poros da membrana da casca, sendo responsável pela troca gasosa entre o embrião e o meio externo até que se suceda a bicagem interna (Gonzales; Cesario, 2003). A membrana corioalantóica atua também no transporte de cálcio e no armazenamento de resíduos nitrogenados produzidos pelo embrião (Bellairs; Osmond, 2005). Com até 96 horas de incubação, completa-se a formação das membranas extra-embrionárias.

2.1.4 Estágios de desenvolvimento ósseo durante a incubação

O desenvolvimento ósseo em aves é complexo e bem coordenado que ocorre desde os estágios iniciais do embrião até após a eclosão. Pode ser dividido em várias etapas principais que envolvem a formação de estruturas cartilaginosas iniciais, seguidas pela ossificação. Este processo também inclui uma rede de mecanismos celulares e moleculares, bem como a interação de diversos agentes reguladores (Bellairs; Osmond, 2005; Pines; Reshef, 2015).

Segundo Floriano (2013) uma característica adicional no desenvolvimento ósseo das aves é a presença de sacos aéreos que se expandem dos pulmões para os ossos, substituindo a medula dos ossos longos, um processo chamado pneumatização, que reduz o peso e auxilia no voo, ocorrendo após o nascimento.

O esqueleto das aves começa a se desenvolver com a migração de células mesenquimais para locais específicos, formando um molde que dará origem ao futuro esqueleto axial, abrangendo crânio, coluna, esterno e costelas, bem como o esqueleto apendicular, que compreende os ossos das extremidades (Karaplis, 2002; Bellairs; Osmond, 2005; Lefebvre; Bhattaram, 2010). Durante a primeira semana de incubação, ocorre a formação da cartilagem (Nakane; Tsudzuki, 1999; Bellairs; Osmond, 2005; Atalgin; Kürtül, 2009), seguida por uma ossificação na segunda semana (Oviedo-Rondón *et al.*, 2008b). Os ossos crescem de forma rápida e gradual, passando por um processo progressivo de mineralização que se prolonga até o período pós-natal (Bellairs; Osmond, 2005; Lefebvre; Bhattaram, 2010; Barbosa, 2011).

Conforme Yair *et al.* (2012), a ossificação e a mineralização se prolongam por toda a incubação, atingindo as maiores taxas de desenvolvimento na última semana. Nesse período, a força e rigidez dos ossos aumentam significativamente. Embora o esqueleto do pintinho esteja formado ao nascimento, o desenvolvimento ósseo não se encerra nesse ponto. Os ossos continuam a crescer, passando por constante remodelação interna e reparação em casos de fraturas (Dibner *et al.*, 2007).

Para melhor compreensão, no Quadro 1 encontra-se um resumo com os principais eventos do desenvolvimento ósseo embrionário em aves.

Quadro 1 – Resumo dos principais eventos do desenvolvimento embrionário ósseo em aves

Dia de Incubação	Principais eventos do desenvolvimento embrionário ósseo em aves	Fonte
Inicial	Células dos somitos migram ao redor do tubo neural e da notocorda para formar estruturas membranosas precursoras das vértebras.	Hamburger e Hamilton (1951); Bellairs e Osmond (2005).
2º - 3º dia	Formação de condrócitos. Desenvolvimento do molde cartilaginoso.	Bellairs e Osmond (2005).
3º - 4º dia	Formação dos brotos dos membros posteriores e superiores.	Hamburger e Hamilton (1951); Caplan (1988); Barbosa (2011).
5º - 6º dia	Membros anteriores e posteriores visíveis. Articulações de cotovelo e joelho distintas.	Hamburger e Hamilton (1951).
6º dia	Osteoblastos produzem a matriz orgânica do osso (osteóide), rica em colágeno tipo I.	Torres e Korver (2018).
7,5º - 8º dia	Formação do centro primário de ossificação e mineralização inicial	Hamburger e Hamilton (1951).
9º dia	Cartilagem hipertrófica é rapidamente substituída por células da medula.	Pechak <i>et al.</i> (1986a, 1986b); Caplan (1988); Proff e Romer (2009); Blumer (2021).
10º dia	A cartilagem continua a se expandir, e os centros de ossificação continuam a formar-se.	Bellairs e Osmond (2005).
10º - 12º dia	Ossificação da coluna vertebral.	
14º - 19º dia	Continuação da ossificação e crescimento ósseo. Crescimento da diáfise média. Ossos dobram de comprimento, espessura e quantidade de minerais presentes.	Bellairs e Osmond (2005); Torres e Korver (2018).
20º - 21º dia	O esqueleto está quase completamente ossificado, pronto para a eclosão.	Bellairs e Osmond (2005).
Crescimento Pós-Natal e Remodelação	Continuação do crescimento dos ossos, remodelação e reparação interna.	

2.2 FORMAÇÃO DO ESQUELETO DURANTE A INCUBAÇÃO

2.2.1 Composição e estrutura do tecido ósseo

O esqueleto da galinha é composto por aproximadamente 160 ossos que funcionam como reservas de cálcio e fósforo, podendo ser mobilizados em situações de distúrbios da homeostase. Comparados aos mamíferos, os ossos das aves possuem uma maior concentração de minerais. Os ossos proporcionam a locomoção, suporte e proteção dos animais (Rath *et al.*, 2000; Frandson *et al.*, 2011; Floriano, 2013). Pizauro Junior *et al.* (2017) destacam que o tecido ósseo é metabolicamente ativo e composto por uma população heterogênea de células em diferentes estágios de diferenciação, que regulam a mobilização e deposição de minerais.

O osso é composto aproximadamente por 70% de minerais, 22% de proteínas e 8% de água e elementos traços. A matriz óssea é formada por 20 a 40% de componentes orgânicos, predominantemente colágeno tipo I (cerca de 95%), além de proteoglicanos, lipídios e proteínas não colágenos (5%). A matriz mineral ou inorgânica representa entre 50 e 70% e é principalmente composta por cálcio e fósforo, na forma de cristais de hidroxiapatita (Rath *et al.*, 2000; Clarke, 2008; Lefebvre; Bhattaram, 2010; Pizauro Junior *et al.*, 2017).

Os ossos podem ser classificados de acordo com seu formato em longos, curtos, pneumáticos, laminares, irregulares e sesamoides. Ossos longos (figura 5), como o fêmur e o úmero, possuem comprimento superior à largura e espessura, e são compostos pela diáfise (parte central de osso compacto), metáfises (áreas mais largas próximas às extremidades) e epífises (extremidades com osso esponjoso interno e cartilagem articular externa) (Clarke, 2008; Güz, 2022). Os ossos curtos, como os encontrados no carpo e tarso, ossos chatos, como o crânio e costelas, e ossos irregulares, como as vértebras, completam a classificação geral dos ossos (Clarke, 2008). Especificamente nas aves, existem ainda os ossos pneumáticos, como o crânio e esterno, que são mais leves e auxiliam na mecânica respiratória (Pizauro Júnior *et al.*, 2017).

Considerando o aspecto macroscópico, o tecido ósseo pode ser classificado em compacto e esponjoso. O osso compacto, caracteriza-se por suas fibrilas de colágeno densamente empacotadas em lamelas bem-organizadas, localizado na periferia e sem cavidades visíveis, desempenhando funções mecânicas e de proteção, e estão presentes na diáfise. Em contraste, o osso esponjoso possui uma matriz porosa e pouco organizada, possui cavidades intercomunicantes formadas por trabéculas de matriz óssea, com medula óssea e vasos sanguíneos, com função metabólica, sendo encontrado na maioria dos ossos chatos e nas epífises dos ossos longos (Rath *et al.*, 2000; Pizauro Júnior *et al.*, 2017).

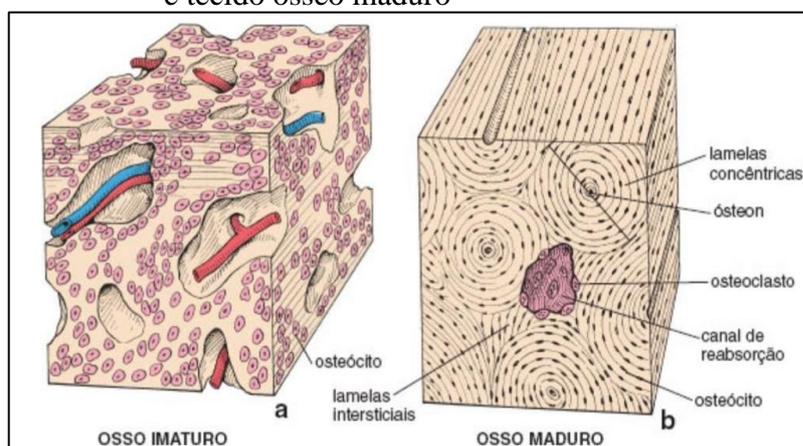
Figura 5 – Secção sagital de um osso longo após maceração (A), e secção sagital de um osso sem tratamento mostrando cartilagem articular e medula óssea vermelha (B)



Fonte: König (2016)

Os ossos podem ser classificados, ainda, conforme a sua constituição histológica em tecido ósseo primário ou imaturo e tecido ósseo secundário ou maduro (figura 6). O tecido ósseo primário apresenta organização menos regular, é rico em osteócitos, possui menor mineralização e fibras colágenas dispostas sem uma orientação definida. Por outro lado, o tecido ósseo secundário, é caracterizado por uma estrutura lamelar altamente organizada, com maior mineralização e fibras colágenas organizadas em sistemas de Havers ou ósteons (Junqueira; Carneiro, 2008; König, 2016; Lorente *et al.*, 2019). Os canais de Havers, contêm vasos sanguíneos e nervos para nutrir as células ósseas. Se conectam entre si e com a cavidade medular através dos canais de Volkmann, que também possuem vasos e nervos, facilitando a vascularização e a comunicação no tecido ósseo (Lorente *et al.*, 2019).

Figura 6 – Representação esquemática de tecido ósseo imaturo e tecido ósseo maduro



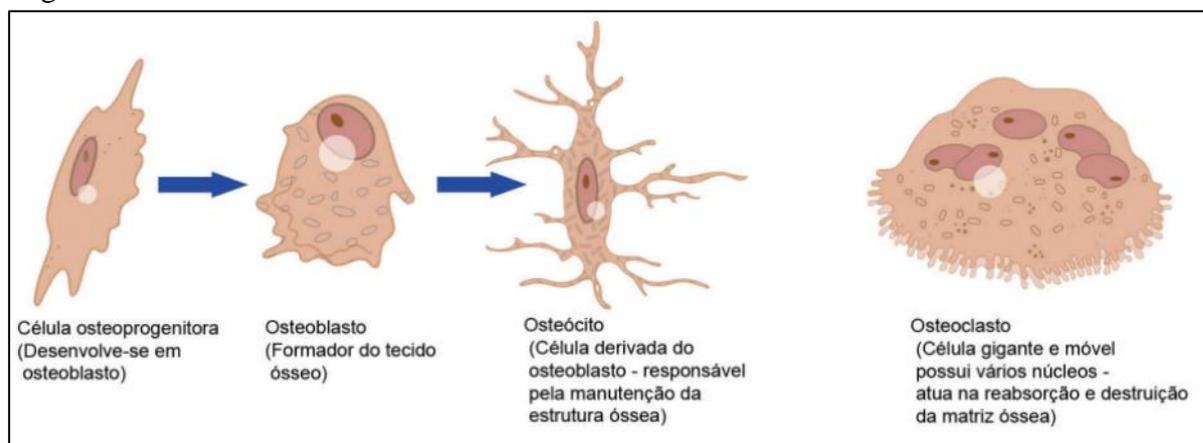
Fonte: Ross *et al.* (1993)

2.2.2 Células do tecido ósseo

O tecido ósseo das aves origina-se de células mesenquimais, que são multipotentes e podem se diferenciar em células especializadas, formando a base do tecido ósseo (Lefebvre; Bhattaram, 2010; Berendsen; Olsen, 2015). As células que formam o tecido ósseo incluem osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e células osteoprogenitoras ou osteogênicas (figura 7) (Pizauro Junior *et al.*, 2017).

As células osteoprogenitoras estão localizadas nas proximidades da superfície óssea, atuando como precursoras dos osteoblastos e osteócitos (Clarke, 2008; Yair *et al.*, 2012; Pizauro Junior *et al.*, 2017). Os osteoblastos são células especializadas do tecido esquelético cuja função primária é a formação e regulação da mineralização da matriz orgânica. Os osteócitos são as células mais abundantes no tecido ósseo, atuando como osteoblastos maduros aprisionados na matriz, são responsáveis pela síntese e reabsorção da matriz óssea em uma escala limitada. Enquanto, os osteoclastos são células grandes, móveis e multinucleadas responsáveis pela reabsorção óssea e encontram-se nas áreas periféricas da superfície óssea quando ativos, sendo células de origem hematopoiética (Pizauro Junior *et al.*, 2017).

Figura 7 – Células do tecido ósseo



Fonte: PROENEM [s.d.]

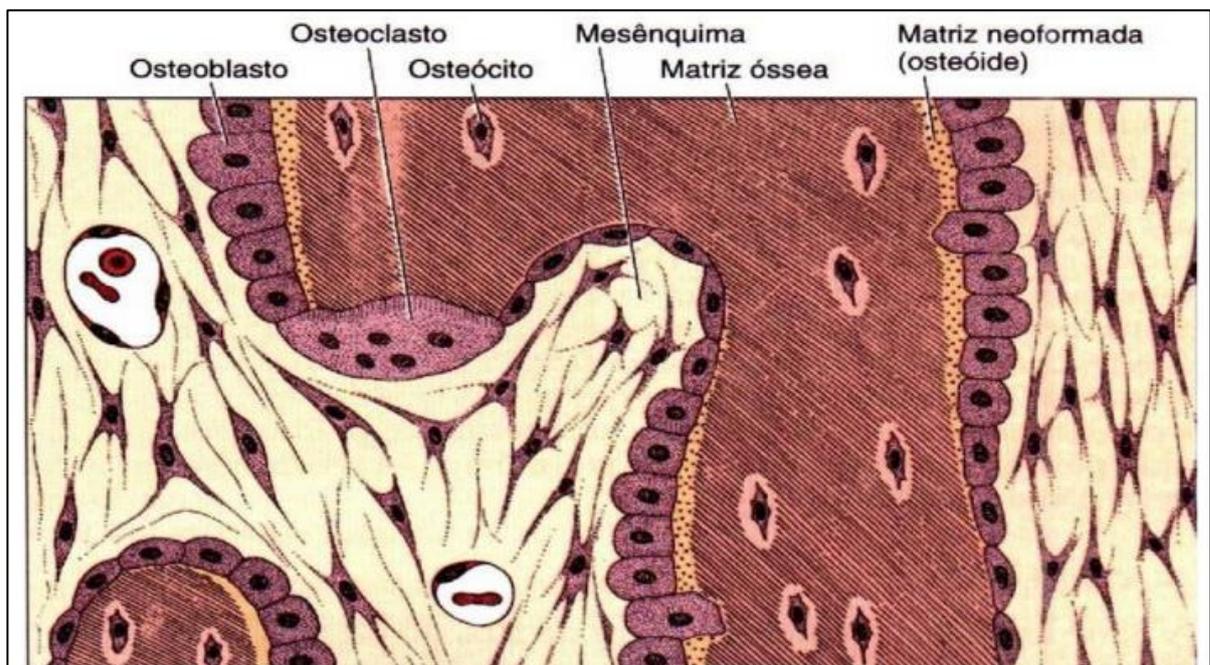
2.2.3 Tipos de ossificação: intramembranosa e endocondral

A formação do esqueleto processa-se através de dois mecanismos principais: a ossificação intramembranosa e a ossificação endocondral. A ossificação intramembranosa (figura 8) é iniciada quando as células mesenquimais se diferenciam em osteoblastos. Esses osteoblastos produzem matriz orgânica não mineralizada (osteóide), que posteriormente é calcificada à medida que os osteoblastos se transformam em osteócitos. A ossificação

intramembranosa é restrita a ossos específicos, incluindo os ossos da abóbada craniana, alguns ossos faciais, e partes da mandíbula e clavícula (Lefebvre; Bhattaram, 2010; Berendsen; Olsen, 2015; Pizauro Júnior *et al.*, 2017).

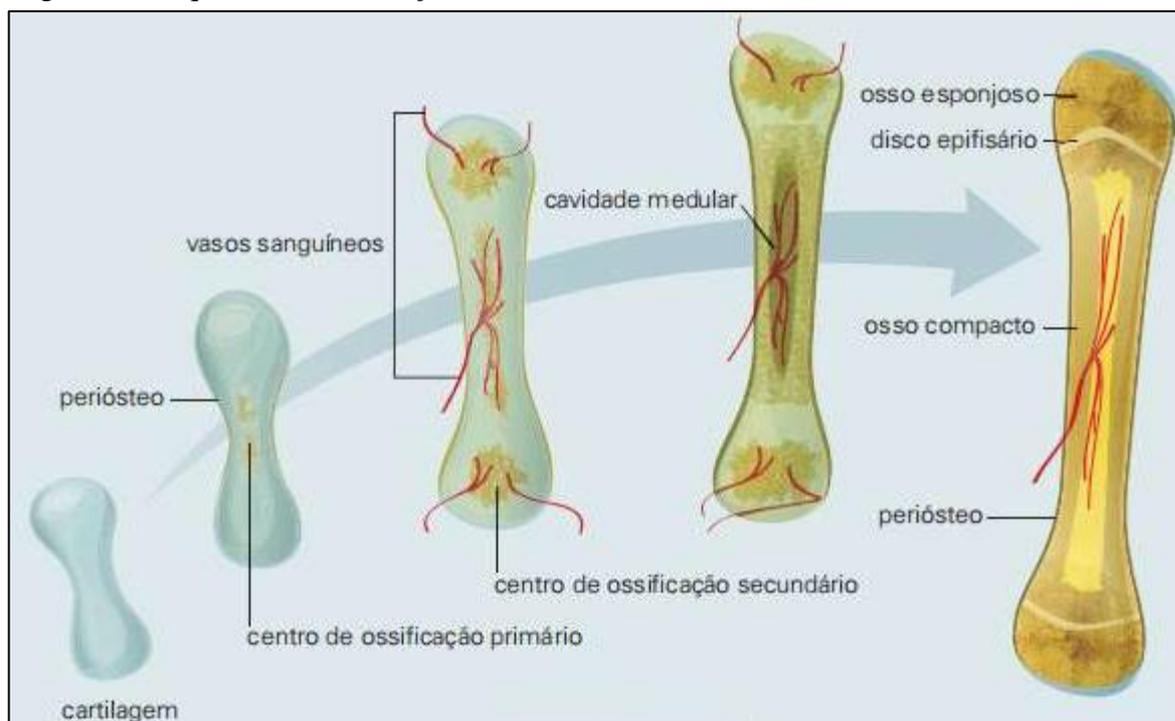
Na ossificação endocondral (figura 9), condrócitos produzem matriz cartilaginosa e estabelecem o pericôndrio, marcando o início da formação do centro de ossificação primária. Vasos sanguíneos penetram no tecido, trazendo células que se diferenciam em osteoblastos e formam um colar ao redor da área, que então se torna o periósteo. A matriz é mineralizada, gerando trabéculas de osso esponjoso e a cavidade medular, que aloja a medula óssea e os vasos sanguíneos. Em seguida, ocorrerá a mineralização da diáfise, dando origem ao osso compacto. Os centros de ossificação secundários surgem nas extremidades do modelo cartilaginoso (epífises) (Long; Ornitz, 2013; Wu *et al.*, 2016). Toda a cartilagem, exceto as placas epifisárias e a superfície articular será substituída por osso (Marks; Odgren, 2002). Este tipo de ossificação é prevalente na coluna vertebral, costelas, pelve e membros (Long; Ornitz, 2013; Berendsen; Olsen, 2015).

Figura 8 – Esquema da ossificação intramembranosa



Fonte: Junqueira e Carneiro (2008)

Figura 9 – Esquema da ossificação endocondral



Fonte: Planeta Biologia [s.d.]

2.2.4 Mineralização

A mineralização óssea é o processo de deposição de minerais no osso, especialmente cálcio (Ca) e fósforo (P), conferindo rigidez ao tecido, com a participação de minerais traço como zinco (Zn), cobre (Cu), manganês (Mn) e magnésio (Mg) (Bhagavan, 2002; Dibner *et al.*, 2007). Kerschnitzki *et al.* (2016) afirmaram que os minerais dos componentes do ovo são absorvidos pelo embrião, armazenados em vesículas, e transportados pela corrente sanguínea até o tecido ósseo em desenvolvimento.

No organismo, o cálcio e o fósforo inicialmente encontram-se em sua forma orgânica e precisam ser convertidos em cristais de hidroxiapatita para mineralizar o tecido ósseo em desenvolvimento. O modo ao qual inicia a formação de cálcio e fosfato inorgânico ainda não está bem elucidado. Uma teoria proposta por Robinson (1923) sugere que os íons fosfato e cálcio são mantidos em equilíbrio nos fluidos corporais e que, nos líquidos da cartilagem, a fosfatase alcalina age sobre a hexose monofosfato, derivada da quebra do glicogênio, liberando o fosfato inorgânico.

A mineralização na placa de crescimento dos ossos longos, mediada por vesículas nas membranas de condrócitos hipertrofiados, abrange a nucleação de cálcio e fosfato em duas etapas. Inicialmente, cálcio e fosfato são transportados para dentro das vesículas, onde se associam a lipídios e proteínas, com a fosfatase alcalina liberando fosfato. Isso leva à

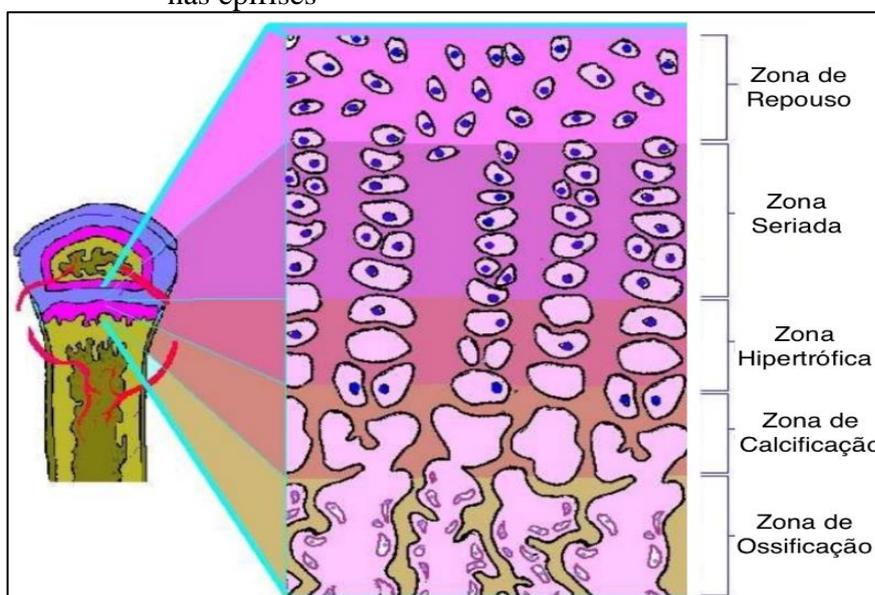
precipitação de cristais de fosfato de cálcio, que se convertem em hidroxiapatita. Na segunda etapa, os cristais de hidroxiapatita rompem a membrana vesicular e extravasam para o meio extracelular, iniciando assim seu crescimento (Anderson, 1989; Kirsch *et al.*, 1997; Pizauro Júnior *et al.*, 2017).

2.2.5 Crescimento e remodelação

O crescimento e a remodelação óssea são contínuos ao longo da vida, iniciando-se no desenvolvimento embrionário e intensificando-se no período pós-natal (Yalçın *et al.*, 2007; Clarke, 2008). De acordo com Williams *et al.* (2004), o crescimento ósseo ocorre por dois mecanismos distintos: o intersticial, que aumenta o comprimento dos ossos, e o aposicional, que aumenta a espessura.

O crescimento ósseo intersticial ocorre por ossificação endocondral através da expansão das epífises, na placa de crescimento ou disco epifisário e é caracterizado pela proliferação de condrócitos (Torres; Korver, 2018). A placa epifisária pode ser dividida em cinco zonas distintas (figura 10) com seus respectivos cenários: 1) zona de repouso ou reserva - condrócitos sem sinais de atividade proliferativa; 2) zona proliferativa ou seriada - condrócitos dividem-se e formam colunas de células empilhadas; 3) zona hipertrófica - condrócitos em amadurecimento e intensa secreção de matriz; 4) zona de reabsorção ou calcificação - apoptose dos condrócitos, reabsorção e calcificação da matriz da cartilagem; e 5) zona de ossificação - consiste em tecido ósseo novo formado pelos osteoblastos (Oznurlu *et al.*, 2016).

Figura 10 – Representação esquemática das zonas de ossificação nas epífises



Fonte: UNIFAL-MG [s.d.]

Em aves, o crescimento ósseo continua após a eclosão, com a placa de crescimento se reduzindo progressivamente ao longo do tempo, resultando na fusão dos centros primários e secundários de ossificação, marcando a completa ossificação das estruturas ósseas. Em condições naturais, esse processo se estende até a maturidade sexual, por volta de 24 semanas, quando a placa epifisária se calcifica. No entanto, frangos de corte são abatidos, em média aos 42 dias de idade, o que impede o completo desenvolvimento ósseo (Yalçın *et al.*, 2007; Lefebvre; Bhattaram, 2010; Berendsen; Olsen, 2015).

Em conformidade com Applegate e Lilburn (2002), o crescimento em espessura do osso é iniciado pelo perióstio, no qual os osteoblastos produzem matriz óssea e se transformam em osteócitos. Essas células formam cristas ao redor dos vasos sanguíneos, originando o endóstio e lamelas concêntricas. Essas estruturas organizadas resultam na formação de novos ósteons, contribuindo para o aumento do diâmetro do osso.

A remodelação óssea refere-se ao processo contínuo de renovação e reorganização interna do osso já existente, essencial para manter a massa e a estrutura do esqueleto adulto (Frost, 1963). Osteoclastos são responsáveis pela reabsorção do osso antigo, liberando minerais como cálcio na corrente sanguínea, enquanto os osteoblastos sintetizam nova matriz óssea que se mineraliza posteriormente. Esse equilíbrio delicado entre formação e reabsorção óssea permite que as aves ajustem a densidade e a estrutura dos ossos em resposta às necessidades de crescimento rápido, comportamento de voo e adaptação ao ambiente (Pechak *et al.*, 1986).

De acordo com Yair *et al.* (2012), em circunstâncias usuais, a quantidade de osso reabsorvida é contrabalanceada pela formação óssea, mantendo a homeostase do cálcio intacta. Entretanto, em aves que crescem rapidamente, esse equilíbrio pode ser perturbado, resultando em uma predominância de reabsorção sobre a reposição, o que leva à diminuição do tecido ósseo mineralizado.

2.2.6 Utilização dos minerais presentes no ovo para a formação óssea

Para melhor compreender o desenvolvimento embrionário em aves, é oportuno dedicar atenção à aplicação dos minerais presentes no ovo para a formação óssea. Minerais oriundos do ovo, principalmente o fosfato de cálcio na forma de hidroxiapatita, são depositados na matriz orgânica do osso em formação. Logo, a rigidez do tecido ósseo é garantida pela incorporação de minerais como cálcio (Ca) e fósforo (P). Além deles, minerais traço como zinco (Zn), cobre (Cu), manganês (Mn) e magnésio (Mg) desempenham um papel fundamental na formação e manutenção dos ossos, atuando em metaloenzimas com funções estruturais e/ou catalíticas

(Bhagavan, 2002; Oviedo-Rondón; Ferket, 2005; Dibner *et al.*, 2007; Yair; Uni, 2011; Pizauro Júnior *et al.*, 2017).

O cálcio se destaca como o mineral mais abundante e de maior exigência na dieta das aves. Sua demanda é particularmente elevada devido ao seu papel essencial na formação do tecido ósseo em aves de corte e na produção da casca do ovo em aves poedeiras. Pode ser encontrado em diversas formas, tais como cálcio ionizado (Ca^{2+}) ou complexado com ácidos orgânicos, citrato e fosfato (Bouillon *et al.*, 2003; Proszdowiec-Weglarz; Angel, 2013). A presença do cálcio em sua forma ionizada desempenha diversas funções fisiológicas. Este íon exerce sua influência na manutenção da integridade e no transporte das membranas celulares, na promoção do processo de coagulação sanguínea, na facilitação da liberação de hormônios e neurotransmissores, na ativação e controle de enzimas, na transmissão eficaz de impulsos nervosos e na regulação da contração muscular.

No início da incubação, o embrião utiliza as reservas de cálcio da gema do ovo, absorvendo-o através da membrana do saco vitelínico (MSV) e seu sistema vascular (Richards; Steele, 1987; Yair; Uni, 2011). Na segunda semana de incubação, a membrana corioalantoide (MCA) torna-se funcional. A partir desse ponto, o cálcio é majoritariamente absorvido da casca do ovo, sendo incorporado tanto na gema quanto nos tecidos embrionários (Romanoff, 1960; Tuan; Ono, 1986).

Conforme mencionado por Pizauro Júnior *et al.* (2017) e Bilezinkian *et al.* (2019), o fósforo constitui componente substancial dos sais inorgânicos presentes tanto nos ossos quanto nos fosfolípidios que compõem as membranas celulares. Sua relevância se estende à participação no transporte de energia, na estruturação dos ácidos nucleicos, na regulação de atividades enzimáticas e na interação com a hemoglobina para o transporte de oxigênio. Esta substância é distribuída nos ossos e nos tecidos moles predominantemente na forma de fosfato. Sua presença pode ser observada de maneira livre, associada a proteínas, ou ainda complexada com íons de cálcio e magnésio.

Quando nos referimos aos minerais traço, o zinco se destaca em vários aspectos, incluindo formação óssea, mineralização, metabolismo, cofator de enzimas para o desenvolvimento ósseo, estimula a diferenciação dos osteoblastos, contribuindo para a regulação da formação dos cristais de hidroxiapatita durante o crescimento dos ossos longos e funcionamento do sistema esquelético (Bhagavan, 2002; Liu *et al.*, 2013).

O cobre é componente da hemoglobina e outras proteínas sanguíneas. Apresenta impacto significativo em sistemas enzimáticos nos quais atua como cofator. Um exemplo relevante é a influência sobre as monoamina oxidases, necessárias para formação da cartilagem.

Quando em falta, causa desenvolvimento retardado, anormalidades e susceptibilidade a fraturas ósseas em embriões ou aves recém-nascidas (Dibner *et al.*, 2007; Mir *et al.*, 2007; Güçlü *et al.*, 2008; Mroczek-Sosnowska *et al.*, 2017).

Yair e Uni (2011) destacam que o ferro é primordial para o metabolismo energético oxidativo celular, como parte das proteínas hemoglobina e mioglobina. Durante o desenvolvimento embrionário, é imprescindível para a formação de células sanguíneas e o transporte de oxigênio para os tecidos em crescimento, influenciando diretamente a diferenciação celular e a formação do esqueleto embrionário. Posteriormente, na fase pós-natal, o ferro continua a ser vital na síntese de hemoglobina, contribuindo para a formação e fortalecimento dos ossos.

O magnésio está ligado ao metabolismo de cálcio e fósforo. Sua deficiência pode resultar em sintomas como baixo crescimento e coordenação motora comprometida. No tecido ósseo, o Mg regula a função das células e a ação dos receptores de cálcio. O equilíbrio adequado de Mg, Ca e P é crucial para a saúde óssea ideal (Rude *et al.*, 1998; Martini, 1999; Morii, 2007; Shastak; Rodehutschord, 2015).

A síntese de mucopolissacarídeos e a formação de proteoglicanos, essenciais para a matriz extracelular dos ossos, envolvem o manganês. Como cofator de enzimas envolvidas na síntese de cartilagem hialina, a deficiência de manganês resulta em diminuição significativa da atividade da Fosfatase Alcalina no tecido ósseo e casca dos ovos, levando a problemas como a perose em aves. Além disso, influencia o metabolismo do IGF-1, afetando o crescimento ósseo (Bhagavan, 2002; Palacios, 2006; Pizauro Junior *et al.*, 2017).

Os minerais necessários para o processo de mineralização óssea durante o desenvolvimento embrionário são obtidos a partir dos componentes do ovo: gema, albúmen, casca e membranas (Romanoff; Romanoff, 1967; Freeman; Vince, 1974; Tuan; Ono, 1986; Uni *et al.*, 2012; Bellairs; Osmond, 2014; Yair *et al.*, 2015). Comentando sobre a etapa de incubação, Barbosa (2011) e Halgrain *et al.* (2022) apontaram mudanças significativas nas concentrações de diversos minerais na casca do ovo. De acordo com os autores referidos, essas mudanças na composição mineral da casca também afetam suas propriedades físicas, como peso, espessura e força, influenciando diretamente no processo de ruptura que precede a eclosão.

Oliveira *et al.* (2015) afirmam que a casca do ovo é a principal fonte de cálcio para o embrião. Composta por 98,2% de cálcio, 0,9% de fósforo e 0,9% de magnésio, a casca também contém pequenas quantidades de minerais traço essenciais para o desenvolvimento saudável do

embrião. A partir do décimo terceiro dia de incubação até a eclosão, 80% do cálcio é obtido da casca e o restante da gema (Vieira, 2007).

A membrana corioalantóide (MCA) é um tecido altamente vascularizado, responsável pela 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 (Kerschitzki *et al.*, 2016; Torres; Korver, 2018; Halgrain *et al.*, 2022). A membrana possui a enzima anidrase carbônica, que torna certas regiões da casca mais ácidas, dissolvendo o carbonato de cálcio e liberando cálcio livre para o embrião (Szeleszczuk *et al.*, 2016).

Para ser absorvido, o cálcio precisa ser transportado para a gema, e esse processo ocorre por intermédio da vitamina D₃ (Richards; Steele, 1987; Oliveira *et al.*, 2015). Deste modo, ao decorrer da última semana de incubação, observa-se um incremento na concentração desse mineral no saco vitelínico e no plasma, concomitantemente há uma diminuição em sua presença na casca (Freeman; Vince, 1974; Muir; Groves, 2017).

A gema, rica em lipídios e proteínas, é especialmente significativa para a formação óssea do embrião. Pode-se destacar a importância da vitelogenina, que sofre proteólise durante o desenvolvimento embrionário, liberando a fosfovítina, uma fonte de fósforo primordial para o crescimento ósseo conforme ressaltado por Li *et al.* (2014). Além disso, Yair e Uni (2011) e Torres e Korver (2018) enfatizaram que a gema é uma considerável fornecedora de minerais traço, fornecendo uma variedade de elementos essenciais, incluindo cálcio, fósforo e potássio.

Durante a incubação, o saco vitelínico é suprimento vital de minerais para o embrião em desenvolvimento. Yair *et al.* (2015) destacam que o saco vitelínico é responsável pelo fornecimento de uma série de minerais, incluindo fósforo, zinco, cobre, manganês e ferro, fundamentais para a formação óssea. No entanto, à medida que a incubação avança, a disponibilidade desses minerais diminui, com o embrião consumindo a maioria deles até o dia 17. Ainda assim, uma reserva mínima permanece na gema residual, o que é essencial para sustentar o desenvolvimento ósseo inicial do pintinho (Yair; Uni, 2011; Torres; Korver (2018).

Estudo conduzido por Oliveira *et al.* (2015) destaca que o albúmen é composto principalmente por água e proteínas. Aproximadamente 4% do conteúdo consiste em íons inorgânicos, tais como potássio, sódio, enxofre e cloro em concentrações mais elevadas, enquanto fósforo, cálcio, manganês, magnésio e ferro estão presentes em quantidades praticamente mínimas.

Enquanto os minerais em sua forma orgânica tendem a ser depositados no albúmen, os inorgânicos são mais comumente encontrados na gema, conforme observado por Vieira (2007)

e Yair e Uni (2011). Esses minerais são então misturados com os nutrientes presentes no fluido amniótico e transportados para o saco vitelínico, onde são finalmente absorvidos pelo embrião, como destacado por Uni *et al.* (2012).

2.3 HORMÔNIOS ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO ÓSSEO

Hormônios são substâncias químicas produzidas e liberadas por células neurais e endócrinas, bem como por neurônios e exercem influência regulatória em várias funções fisiológicas. Atuam no metabolismo, homeostase, crescimento, desenvolvimento, reprodução e comportamento (Gasparotto *et al.*, 2011). O desenvolvimento ósseo é altamente regulado por uma complexa rede de hormônios e fatores biológicos que desempenham papéis fundamentais na formação, crescimento e remodelação do tecido ósseo.

2.3.1 Hormônio do crescimento (GH)

O hormônio do crescimento (GH) promove o desenvolvimento do organismo como um todo, estimula a proliferação e diferenciação das células ósseas, atua no sistema imunológico, participa do metabolismo de lipídios, carboidratos e proteínas, e exerce influência sobre glândulas endócrinas, como o pâncreas, a tireoide e a adrenal (Pines; Hurwitz, 1991; Decuyper; Buyse, 2005).

Seu principal papel no metabolismo ósseo envolve 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. O IGF-I produzido no fígado é então transportado para a placa de crescimento, onde promove a proliferação de condrócitos e osteoblastos, estimulando o crescimento longitudinal do osso (Robson *et al.*, 2002; Kühn *et al.*, 2005; De Groef *et al.*, 2008; Güz *et al.*, 2020).

No desenvolvimento embrionário das aves, o GH foi observado por Scanes (1997) surgindo por volta do 9º dia de incubação. Posteriormente, evidências sugeriram que o início da produção de GH em embriões de aves é incerto, mas aparentemente isso ocorre entre os dias 12 e 14 de incubação (Zheng *et al.*, 2006; De Groef *et al.*, 2008). Após os 18 dias, há um aumento significativo na síntese e liberação de GH, possivelmente associado ao processo de eclosão (Oviedo-Rondón; Murakami, 1998).

2.3.2 Hormônios tireoidianos (T₃ e T₄)

Os hormônios tireoidianos são sintetizados a partir do aminoácido tirosina e iodados com três átomos para formar a triiodotironina (T₃) e quatro átomos para formar a tiroxina (T₄) (Robson *et al.*, 2002; Van Der Eerden *et al.*, 2003). Estão diretamente envolvidos no aumento do metabolismo e no consumo de oxigênio, e transição do metabolismo embrionário para a respiração pulmonar (Burton; Tullet, 1985; Oviedo-Rondón; Murakami, 1998; Decuypere; Buyse, 2005; Shokraneh *et al.*, 2020).

Estimulam a liberação do hormônio do crescimento (GH), atuam na regulação da síntese de fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) nos ossos, promovendo a hipertrofia dos condrócitos e a invasão vascular para formação da placa de crescimento e osso trabecular na metáfise. Adicionalmente, os hormônios tireoidianos influenciam os osteoblastos, inibindo sua proliferação, enquanto favorecem a síntese de proteínas da matriz óssea (Lewinson *et al.*, 1989; Robson *et al.*, 2002; Van der Eerden *et al.*, 2003; Shao *et al.*, 2006; Willemsen *et al.*, 2011; Güz *et al.*, 2020).

Os primórdios da tireoide do embrião propriamente dito surgem com 36 horas de incubação e a produção de tiroxina começa por volta do décimo dia de incubação, enquanto a maturação do eixo hipófise-tireoide é crítica entre os dias 10 e 14 de incubação (Romanoff, 1960; De Groef *et al.*, 2008; Barbosa, 2011; Decuypere; Buyse, 2005). Entre os dias 18 e 21 de incubação, ocorre um aumento significativo na síntese dos hormônios tireoidianos, que alcançam seu pico durante o processo de bicagem externa e desempenham um papel ativo na eclosão (Oviedo-Rondón; Murakami, 1998; Piestun *et al.*, 2009).

2.3.3 Calcitonina e paratormônio (PTH)

Nas aves, o cálcio (Ca) e fósforo (P) são primordiais para a homeostase e saúde óssea. A calcitonina e o paratormônio (PTH), regulam as concentrações plasmáticas desses minerais, assegurando o equilíbrio metabólico necessário (Veum, 2010; Matuszewski *et al.*, 2020).

Em aves, a calcitonina é produzida na glândula ultimobranquial, integrada à tireoide em fase embrionária (Isler, 1973; Stanford, 2006; De Matos, 2008; Pizauro Junior *et al.*, 2017). É um hormônio proteico que reduz a liberação de cálcio dos ossos para o sangue, limitando a reabsorção óssea e favorecendo a maior deposição de cálcio nos ossos. Também aumenta a excreção de cálcio pelos rins, promovendo a eliminação do mineral na urina e regulando os níveis plasmáticos (Malgaroli *et al.*, 1989; Proszdowiec-Weglarz; Angel, 2013; Pizauro Júnior

et al., 2017). A calcitonina começa a ser secretada no estágio final do período de incubação, após o 18º dia de desenvolvimento embrionário (Bellairs; Osmond, 2005; Barbosa, 2011).

O paratormônio (PTH) é sintetizado e liberado pelas glândulas paratireoides. Sua produção se inicia por volta do décimo dia de incubação, conforme descrito por Hamburger e Hamilton (1951) e corroborado por Barbosa (2011). Nos ossos, o PTH estimula os osteoclastos, células responsáveis pela reabsorção de cálcio do tecido ósseo para o sangue. Nos rins, o PTH promove a reabsorção de cálcio nos túbulos renais. Além disso, estimula a produção da forma ativa da vitamina D (calcitriol) nos rins. Assim, o PTH coordena uma resposta multifacetada que envolve a mobilização de cálcio dos ossos, a conservação renal de cálcio e a melhoria da absorção intestinal de cálcio e fósforo (Luengo *et al.*, 1991; Moe, 2008; Shanmugasundaram e SelVaraj, 2012; Pizauro Júnior *et al.*, 2017; Tinawi, 2021)

2.3.4 Vitamina D₃

A vitamina D é elementar não apenas como uma vitamina, mas também como um hormônio esteroide vital para o metabolismo do cálcio. O colecalciferol (vitamina D₃) e o ergosterol (vitamina D₂) são os protagonistas, sintetizados pela pele após a exposição à luz solar ou obtidos pela dieta. Nas aves, a vitamina D₃ é consideravelmente mais eficaz do que a D₂, sendo 30 a 40 vezes mais potente, devido à sua conversão enzimática mais rápida no fígado (Chen *et al.*, 2020; De Matos, 2008; Henry, 2011; Gil *et al.*, 2018).

A vitamina D₃ passa por um processo complexo para se tornar biologicamente ativa. Inicialmente, o 7-deidrocolesterol na pele reage com a luz ultravioleta, formando a pré-vitamina D₃, que se isomeriza termicamente em vitamina D₃. Esta, ao entrar na circulação sanguínea, sofre duas hidroxilações enzimáticas: a primeira no fígado, gerando 25-hidroxivitamina D₃ (25OHD₃), e a segunda no rim, formando a 1,25-di-hidroxivitamina D₃ (1,25OHD₃) (Bishop; Norman, 1975; Fatemi *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2021). A enzima 25-hidroxilase, apresenta atividade detectável já no 9º dia de incubação, aumentando ao longo do desenvolvimento até atingir o pico no 17º dia, coincidindo com o período de máxima mineralização do esqueleto (Kubota *et al.*, 1981).

Em condições de hipocalcemia, a 1,25OHD₃ promove a absorção intestinal de cálcio e fósforo, reduz a excreção renal desses minerais e aumenta sua reabsorção tubular. A 1,25OHD₃, juntamente com o PTH, estimula a atividade dos osteoclastos nos ossos, facilitando a liberação de cálcio na corrente sanguínea para manter a homeostase mineral (Soares Jr, 1984; Bushinsky; Monk, 1998; Palacios, 2006; De Matos, 2008).

2.3.5 Insulina, hormônios sexuais (estrogênio e testosterona) e corticosteroides

A insulina, produzida pelas células beta do pâncreas, regula a homeostase da glicose sanguínea em conjunto com o glucagon (Leto; Saltiel, 2012; Shimamoto *et al.*, 2019). A liberação de insulina é estimulada por altos níveis de glicose no sangue, sendo essencial para o desenvolvimento ósseo, pois aumenta a disponibilidade de energia para a ossificação, estimula o crescimento da placa epifisária e a síntese de proteínas da matriz óssea. A insulina também potencializa a ação do hormônio de crescimento (GH), e sua ausência leva à hiperglicemia, comprometendo a atividade osteoblástica e resultando em osteopenia (Cignachi *et al.*, 2020; Araújo *et al.*, 2022).

Os hormônios sexuais estrogênio e testosterona são sintetizados nos ovários e testículos respectivamente (Wolff *et al.*, 2012; Carson; Manolagas, 2015). Atuam na densidade e qualidade óssea, influenciando o crescimento longitudinal e a homeostase do esqueleto ao promover a atividade dos osteoblastos e inibir a ação dos osteoclastos (Chen *et al.*, 2002; Van Der Eerden *et al.*, 2003; Irie *et al.*, 2005; Carson; Manolagas, 2015). A partir do quarto dia de incubação, o estrogênio começa a ser produzido em ambos os sexos, enquanto nos embriões machos a produção de testosterona aumenta significativamente a partir do 6,5º dia (Hamburger; Hamilton, 1951; Barbosa, 2011).

Os hormônios glicocorticóides (GC) influenciam diversos processos fisiológicos, incluindo a integridade do tecido ósseo. Em concentrações elevadas, aumentam a síntese de somatostatina, inibindo a produção de GH e IGF-I, reduzem a espessura da placa de crescimento, prejudicam a produção de componentes essenciais da matriz óssea e elevam a atividade de enzimas que promovem a reabsorção óssea (Robson *et al.*, 2002; Van Der Eerden *et al.*, 2003; Lakatos *et al.*, 2019).

2.4 TEMPERATURA NO PROCESSO DE INCUBAÇÃO

2.4.1 Importância da temperatura durante a incubação

Para garantir condições ideais de incubação, os seguintes fatores físicos precisam ser minuciosamente controlados: temperatura, umidade relativa do ar, viragem dos ovos, níveis de oxigênio e gás carbônico (Decuyper; Michels, 1992; Lourens *et al.*, 2007; Molenaar *et al.*, 2011). A literatura enfatiza que a temperatura é o fator físico mais significativo e crítico na incubação de ovos de aves (Romanoff, 1960; Deeming; Ferguson, 1991; Decuyper; Michels,

1992), influenciando não apenas o desenvolvimento embrionário, mas também a eclodibilidade e o desempenho pós-eclosão (Christensen *et al.*, 1999; Lourens *et al.*, 2005; Meijerhof, 2009).

Geralmente, incubatórios industriais operam com temperaturas padrão entre 37,5°C e 37,8°C, conforme mencionado por pesquisadores como Wilson (1991), Hulet *et al.* (2007), Shim e Pesti *et al.* (2011) e Ipek *et al.* (2014). A manutenção dentro dessa faixa estreita é determinante, pois variações mínimas podem ter impactos significativos no processo (Decuypere; Bruggman, 2007).

Ao abordar as diferenças entre a temperatura da máquina incubadora (TM) e a temperatura do embrião (TE), observa-se que, no início da incubação, a TE é ligeiramente inferior à da TM. No entanto, a TE aumenta na metade do processo devido à maior produção de calor metabólico, superando a TM. Outro fator está relacionado às variações na condutividade térmica entre os distintos sistemas de incubação e às diferenças entre as máquinas na capacidade de manter a temperatura uniforme, resultando em dessemelhanças entre a TE e a TM (French, 1997). Lourens *et al.* (2005) recomendam, portanto, utilizar a temperatura do embrião (TE) como referência.

Existem diversas técnicas para medir a TE, incluindo a medição pelo líquido corioalantóide, pela temperatura cloacal do embrião ou o fluxo sanguíneo dos vasos da membrana corioalantóide com sondas (Janke *et al.*, 2002). No entanto, o método mais simples e eficaz é a mensuração da temperatura da casca do ovo (TCO), que oferece uma estimativa prática e menos invasiva da TE (Lourens *et al.*, 2005; Meijerhof, 2013). Apesar das pequenas variações entre TCO e TE, esses métodos são considerados equivalentes para fins práticos e de monitoramento durante o processo de incubação (Meijerhof; Van Beek, 1993; Lourens *et al.*, 2007). Meijerhof e Van Beek (1993) e French (1997) destacaram que a TCO geralmente se desvia cerca de 0,1 a 0,2°C em relação à temperatura real do embrião.

A temperatura de incubação adequada contribui para o crescimento dos órgãos e estruturas corporais, aumenta a taxa de eclosão e conseqüentemente confere qualidade ao produto final (Meijerhof, 1999; Ozaydin; Celik, 2014). Embriões são sensíveis a variações mínimas de temperatura, o que pode acelerar ou retardar significativamente o desenvolvimento do fenótipo, demonstrando uma interação dinâmica com o tempo de incubação (Dias; Müller, 1998; Lourens *et al.*, 2005; Van Der Pol *et al.*, 2014; Van Den Brand *et al.*, 2019).

A redução da temperatura atrasa a embriogênese e prolonga a incubação (Black; Burggren, 2004). Conforme apontado por Lourens *et al.* (2005), temperaturas baixas na primeira semana retardam o desenvolvimento embrionário, e a falta de constância na temperatura durante a incubação prejudica tanto a eclodibilidade quanto o desenvolvimento

embrionário. Ao estudar os efeitos de temperaturas da casca do ovo durante a incubação na qualidade dos pintos de corte, no desempenho vivo e no rendimento de processamento posterior, Joseph *et al.* (2006) mostraram que temperaturas baixas (36,6°C) nos primeiros 10 dias de incubação reduziram a eclodibilidade, aumentaram o peso e o rendimento dos pintos, mas reduziram o ganho de peso na primeira semana, em comparação com o grupo controle (37,8°C).

Em contrapartida, elevar a temperatura de incubação acelera o desenvolvimento embrionário, reduzindo o tempo do processo. Nesse sentido, Avsar *et al.* (2022) apoiaram essa ideia ao observar que a exposição dos ovos à alta temperatura da casca de 38,6°C, durante os seis primeiros dias de incubação, encurtou o tempo de eclosão.

É relevante destacar que os embriões são mais vulneráveis a temperaturas elevadas do que baixas, e essa sensibilidade aumenta com o avanço da idade embrionária. Entretanto, Yahav *et al.* (2004) notaram que a manipulação térmica precoce, melhorou a taxa de eclosão e o desenvolvimento embrionário sem impactos negativos no peso corporal ou crescimento. A mortalidade do embrião ocorre quando sua temperatura interna atinge 46,5°C, o que acontece mais rapidamente nos embriões mais desenvolvidos devido à sua maior produção de calor (French, 1997).

As condições térmicas durante a incubação também estão associadas a uma série de impactos abrangentes, incluindo a utilização da gema, a maturação intestinal, o metabolismo da tireoide (Van Der Wagt *et al.*, 2020), o desenvolvimento do coração, o desenvolvimento muscular (Christensen *et al.*, 2003) e taxa de crescimento pós-eclosão dos pintinhos (Wilson, 1991).

No geral, estudos destacam a temperatura de incubação como fator mais relevante para o crescimento embrionário, garantindo pintinhos robustos e de bom desempenho subsequente (Ricklefs, 1987; Christensen *et al.*, 1999; Lourens *et al.*, 2005). O YFBM (yolk-free body mass) é um indicador de qualidade, representando o peso do pintinho sem o saco de gema residual. Menor peso do saco vitelino e maior YFBM indicam condições ideais de incubação e boa utilização dos componentes da gema (Molenaar *et al.*, 2011). Altas temperaturas de incubação (39,5°C) reduzem o peso corporal e o YFBM em comparação com a temperatura controle (37,8°C) (Joseph *et al.*, 2006).

Na relação entre temperatura de incubação e metabolismo dos nutrientes, diferentes fases do desenvolvimento embrionário demandam adaptações metabólicas distintas. Inicialmente, a respiração embrionária é limitada pela membrana do saco vitelínico, com poucas trocas gasosas até a formação da membrana corioalantóide entre 10 e 12 dias de incubação. Esta

membrana assume a respiração principal, facilitando o aumento rápido do metabolismo e crescimento embrionário (Burton; Tullet, 1985; Cirotto; Arangi, 1989). Entre o 16º e 17º dia de incubação, o embrião apresenta uma demanda tão elevada por oxigênio que ultrapassa a capacidade de troca gasosa da casca. Isso resulta em uma fase de platô entre os dias 17 e 19, onde há estagnação no consumo de oxigênio, na taxa metabólica ou na produção de calor (Janke *et al.*, 2002).

Durante a maior parte da incubação, a principal fonte de energia para o embrião é a oxidação de lipídios presentes na gema do ovo, porém essa via é intensamente dependente de oxigênio, o que a torna inviável no início e especialmente no final do processo, quando os níveis são limitados. Nessas fases, o embrião utiliza alternativas como a glicólise aeróbica ou anaeróbica para metabolizar carboidratos, ou a gliconeogênese para sintetizar glicose a partir de compostos proteicos (Lourens *et al.*, 2007; Maatjens *et al.*, 2017). O aumento da temperatura durante a incubação eleva significativamente a taxa metabólica e a produção de calor, aumentando o consumo de oxigênio e impactando o metabolismo dos nutrientes nos embriões (Oliveira *et al.*, 2008; Molenaar *et al.*, 2013), potencialmente prejudicando o desenvolvimento embrionário e o desempenho pós-eclosão das aves (Lourens *et al.*, 2007).

Em relação ao metabolismo proteico, em situações de alta demanda energética e baixa concentração de glicose, há mobilização de aminoácidos para gliconeogênese ou produção de energia, prejudicando a deposição muscular e o peso relativo de órgãos como o coração (Maatjens *et al.*, 2014a). Quanto aos carboidratos, temperaturas acima de 38,9°C reduzem as reservas de glicogênio hepático no final da incubação, afetando o aporte de glicose e, conseqüentemente, a energia disponível no momento da eclosão (Molenaar *et al.*, 2011; Molenaar *et al.*, 2013; Maatjens *et al.*, 2014b; Maatjens *et al.*, 2017).

A avaliação de hemogasometria também contribui para a compreensão do desenvolvimento embrionário das aves ao fornecer dados precisos do balanço ácido-básico. Este procedimento é particularmente relevante durante o platô de consumo de oxigênio, quando o embrião estabiliza sua utilização de oxigênio, mas continua a aumentar sua demanda devido ao rápido crescimento. A hemogasometria permite a leitura de parâmetros vitais, como pH, pCO₂, HCO₃⁻, pO₂, e outros, que são indicadores críticos das condições metabólicas do embrião (Day, 2002; Castro, 2013). Essa análise é especialmente importante na transição para a respiração pulmonar, onde o embrião experimenta uma hipoxia temporária que induz mudanças metabólicas significativas, suportadas pela ação dos hormônios da tireoide, como a triiodotironina (T₃) e a tiroxina (T₄), que regulam o crescimento e o metabolismo energético (Burton; Tullet, 1985).

2.4.2 Influência da temperatura de incubação inicial na formação óssea

A temperatura de incubação é crucial não apenas para a eclodibilidade e a qualidade das aves recém-eclodidas, mas também para a organização e maturação das estruturas esqueléticas dos embriões. Pesquisas demonstram que variações nas condições térmicas durante o período de incubação influenciam significativamente a ossificação e a mineralização óssea, sublinhando sua importância direta no desenvolvimento esquelético embrionário (Hammond *et al.*, 2007; Oviedo-Rondón *et al.*, 2009; Sgavioli *et al.*, 2016; Güz *et al.*, 2020).

A manipulação inicial da temperatura pode ser uma estratégia eficaz para otimizar o crescimento e a morfogênese dos embriões, potencialmente melhorando as práticas de manejo na avicultura. A temperatura pode afetar o desenvolvimento ósseo de várias formas. Entre essas alterações estão a modificação do peso e do comprimento dos ossos e a alteração da densidade celular dos condrócitos (Oviedo-Rondón *et al.*, 2008).

Nesta seção, revisaremos, em ordem cronológica, pesquisas sobre a influência da temperatura de incubação inicial na formação óssea. Exploraremos as evidências científicas que elucidam como variações térmicas durante os primeiros estágios de incubação podem impactar o desenvolvimento esquelético, abordando desde a ossificação até as possíveis consequências para a saúde óssea pós-eclosão.

Avaliando os efeitos da temperatura na formação óssea em embriões da linhagem Leghorn Branca, Brookes e May (1972) incubaram ovos em temperaturas ajustadas de 35 a 40°C, em intervalos de um grau, e aos 10 dias de incubação, os embriões foram analisados quanto ao crescimento ósseo. Observou-se que os pintinhos incubados a 38°C apresentaram maior quantidade de osteoblastos nos ossos. Os resultados revelaram variações de até 20% no comprimento ósseo e no conteúdo de cálcio por grau Celsius. O estudo também discutiu que essas alterações podem ser explicadas pela aceleração ou retardamento da ossificação em diferentes temperaturas, afetando o desenvolvimento esquelético dos embriões.

Dias e Müller (1998) conduziram um experimento para determinar a influência da temperatura de incubação (34,0°C, 37,5°C e 40,0°C por períodos de 48, 72 e 96 horas durante a primeira semana de incubação) no desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus domesticus*. Os resultados mostraram que os embriões incubados a 40,0°C por 96 horas apresentaram o maior comprimento cefalocaudal e os mais elevados pesos após 72 horas. As médias de comprimento aumentaram progressivamente em todas as temperaturas ao longo dos períodos de incubação. Constatou-se que variações na temperatura influenciaram significativamente a morfogênese, acelerando ou retardando o desenvolvimento embrionário.

A exposição tanto ao frio (36,9°C por 6 horas diárias) quanto ao calor (39,6°C por 6 horas diárias) durante a primeira semana de incubação influenciaram significativamente o crescimento das características esqueléticas dos embriões. Sendo que, embriões aquecidos nos primeiros oito dias apresentaram tíbias mais curtas em comparação com os resfriados no mesmo período (Yalçin; Siegel, 2003).

Investigando os efeitos da temperatura durante o período de incubação sobre a diferenciação dos condrócitos da placa de crescimento tibial e a incidência de discondroplasia tibial (TD) em frangos de corte, Yalçin *et al.* (2007) incubaram ovos sob uma temperatura controle de 37,8°C e 36,9°C ou 39°C, cada um por 6 horas diárias, durante o desenvolvimento embrionário inicial (0 a 8 d) ou tardio (10 a 18 d). Os embriões submetidos a baixas temperaturas (36,9°C) apresentaram aumento significativo na incidência de TD em comparação com o grupo controle, juntamente com um aumento no conteúdo de cinza tibial. Em contrapartida, embriões expostos a altas temperaturas (39°C) apresentaram uma maior incidência de discondroplasia tibial (TD), associada a um atraso na diferenciação dos condrócitos. Este atraso foi evidenciado por níveis elevados da proteína de choque térmico Hsp90 em condrócitos articulares, indicando estresse térmico nas células. Além disso, houve uma proliferação anormal de condrócitos indiferenciados na zona proliferativa da placa de crescimento, sugerindo um desenvolvimento inadequado dos tecidos ósseos. O impacto sobre três marcadores avaliados reforçou essa observação: houve um aumento na expressão de colágeno tipo II, indicando um número maior de condrócitos não diferenciados na zona de proliferação, e de osteopontina, que embora marque o início da diferenciação e calcificação, sua atividade fisiológica parece ter sido insuficiente devido a um estado inadequado de fosforilação. Adicionalmente, observou-se uma redução na atividade da Fosfatase Alcalina na placa, sinalizando menor hipertrofia e calcificação dos condrócitos.

Hammond *et al.* (2007) mencionaram que o aumento da temperatura dos ovos em apenas um grau, de 37,5°C para 38,5°C, durante os dias embrionários 4 a 7 teve um impacto significativo no desenvolvimento dos embriões de galinha. Embriões oriundos de temperatura mais elevada expuseram aumento no peso corporal, no comprimento dos ossos das pernas, no número de miocélulas nas pernas e aumento significativo na atividade motora, resultando em crescimento mais robusto dos tecidos musculares e ósseos. Oppenheim e Levin (1975) relataram que a diminuição da temperatura pode reduzir a atividade metabólica e a atividade motora embrionária, indicando a influência da temperatura na motilidade dos embriões. Essas descobertas sugerem que a atividade motora aumentada pode desempenhar um papel crucial no crescimento muscular e ósseo dos embriões de galinha.

Para verificar o impacto das temperaturas de incubação na saúde óssea e no desenvolvimento das pernas em frangos de corte, Oviedo-Rondón *et al.* (2009) submeteram ovos a temperaturas baixas (36,7°C) ou padrão (37,5°C), durante a primeira semana de incubação, seguidas por temperaturas padrão (37°C) ou altas (39°C) na terceira semana. As temperaturas altas durante a fase tardia de incubação reduziram os pesos relativos dos fêmures e das tíbias. Na primeira semana de incubação, observou-se que as temperaturas iniciais influenciaram a utilização da gema, com ovos incubados em temperaturas baixas apresentando maior gema residual. Os resultados do estudo demonstraram que a baixa temperatura inicial de incubação e a alta temperatura tardia podem aumentar a incidência de problemas nas pernas em frangos de corte comerciais.

Al-Musawi *et al.* (2012) conduziram um estudo utilizando embriões de frangos de duas linhagens (poedeira e corte), incubados a duas temperaturas distintas (37,5°C e 38,5°C) durante os dias embrionários 4 a 7. Notou-se que os embriões incubados a 38,5°C apresentaram aumento no comprimento da tíbia/tarso, bem como a área transversal do fêmur em ambas as linhagens, mas o comprimento do fêmur e a proporção osso-cartilagem no fêmur e tíbia/tarso foram aumentados apenas em poedeiras tratadas.

No estudo coordenado por Van der Pol *et al.* (2014), foi explorado o efeito da temperatura da casca do ovo (TCO) durante a incubação no desenvolvimento e assimetria do fêmur, tíbia e metatarso em pintos de frango de corte. A metodologia envolveu a incubação de ovos em quatro diferentes TCO: baixa (36,9°C), normal (37,8°C), alta (38,6°C) e muito alta (39,4°C). Os principais resultados indicaram que a TCO muito alta resultou em menor desenvolvimento ósseo, com reduções significativas no comprimento da tíbia e do metatarso (-3,1 a -8,4%) em comparação com os outros tratamentos, assim como no peso do metatarso (-9,1%) e comprimento do fêmur (-4,9%) em comparação com TCO alto.

Aygün e Nariç (2016), constataram que ovos submetidos a manipulações térmicas, aquecidos a 39,6°C por 6 h diariamente de 0 ao 8 dias de incubação, mostraram aumentos nos comprimentos de tíbia e metatarso em relação ao controle. Essas alterações foram atribuídas pelos autores a um aumento na taxa de divisão celular devido às temperaturas elevadas.

Sgavioli *et al.* (2016) investigaram os efeitos da temperatura de incubação elevada (T2: 39,0°C) em comparação com a temperatura controle (T1: 37,5°C) durante todo o período de incubação sobre parâmetros sanguíneos e o desenvolvimento de pintinhos da linhagem Hisex White. Pintinhos do grupo T1 apresentaram maior massa corporal absoluta e relativa livre de gema e corações mais pesados ($p < 0,05$). O excesso de base sanguínea (BEecf) foi menor em pintinhos T2 do que em pintinhos T1 ($p < 0,05$). Entretanto, essa maior perda de base não

resultou em aumento de hematócrito ou hemoglobina ($p>0,05$). Além disso, os tratamentos não afetaram o pH sanguíneo, $p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$, SO_2 ou HCO_3^- ($p>0,05$). A concentração de cálcio ionizado foi menor no sangue dos pintinhos incubados em T2 ($p<0,05$) do que em T1. Os autores justificaram que o estresse térmico afetou a absorção e a regulação do cálcio, resultando em menor disponibilidade deste elemento para a mineralização óssea. Quanto aos demais íons avaliados ou níveis de glicemia, não foi encontrada diferença entre T1 e T2 ($p>0,05$).

Muir e Groves (2017) conduziram um estudo explorando as condições de temperaturas da casca do ovo e a mineralização óssea em frangos de corte Cobb 500. Os pesquisadores incubaram ovos férteis sob dois diferentes perfis de temperatura: um grupo foi submetido a temperaturas iniciais mais baixas ($36,9^\circ\text{C}$ a $37,3^\circ\text{C}$), que foram gradualmente elevadas para $37,8^\circ\text{C}$ durante os primeiros 7 a 15 dias, enquanto o grupo controle foi mantido a uma temperatura constante de $37,8^\circ\text{C}$. Pintinhos expostos a temperaturas mais baixas nas primeiras semanas de incubação apresentaram uma mineralização óssea superior, resultando em menor gravidade da discondroplasia tibial (TD). Em comparação com TCO constante de $37,8^\circ\text{C}$, as temperaturas variáveis permitiram que os embriões se adaptassem de maneira mais eficaz, promovendo um desenvolvimento ósseo mais saudável.

Ao avaliar os efeitos da alta temperatura de incubação ($38,5^\circ\text{C}$) entre os dias 0 e 11 de incubação sobre as características fisiológicas de embriões de frangos de corte COBB 500, Babacanoglu (2018) observou que os embriões submetidos a essa condição apresentaram um aumento nos níveis de hemoglobina e hematócrito, indicando uma resposta adaptativa ao estresse térmico. Além disso, houve aumento do lactato sugerindo um incremento devido à insuficiência de oxigênio resultante da combinação de alta temperatura e condições hipóxicas. Em comparação com o grupo controle ($37,8^\circ\text{C}$), os embriões expostos a altas temperaturas apresentaram níveis reduzidos de T_3 e T_4 . Essa diminuição nas concentrações hormonais foi atribuída ao estresse térmico, que interfere na função da glândula tireoide e, conseqüentemente, na produção desses hormônios essenciais para o metabolismo e o desenvolvimento embrionário.

Ampliando sua pesquisa, Muir e Groves (2019) incubaram ovos férteis de duas linhagens (Cobb 500 e Ross 308) aplicando incubação de início lento (TCO inicial de $36,75^\circ\text{C}$, aumentando gradualmente até $37,8^\circ\text{C}$ no dia 16) ou incubação controle (TCO de $37,75^\circ\text{C}$ a 38°C até o dia 18). A incubação de início lento atrasou o tempo médio de eclosão, reduziu a eclodibilidade em 4,6% e produziu pintinhos mais pesados e de comprimento menor, com sacos vitelínicos mais pesados. Em termos de mineralização, os autores observaram que os pintinhos da incubação de início lento apresentaram menor cálcio sérico. No entanto, os níveis mais

elevados de fósforo sérico indicaram uma melhor utilização desse elemento. Concluiu-se que a incubação de início lento melhorou a capacidade dos frangos de ficarem em pé, possivelmente devido à interação complexa entre a mineralização óssea e outros aspectos do desenvolvimento físico dos frangos.

Belnap *et al.* (2019), avaliaram os efeitos de diferentes temperaturas de incubação sobre o desenvolvimento motor e ósseo em filhotes recém-nascidos de codorna Bobwhite. A metodologia envolveu incubar ovos fertilizados em três condições térmicas: baixa (36,9°C), alta (38,1°C) e controle (37,5°C) entre o quinto e o oitavo dia de incubação. A exposição a temperaturas frias durante a incubação atrasou a eclosão, reduziu a massa corporal e aumentou a frequência de quedas, a variabilidade no ângulo da articulação intertarsal e no comprimento do passo durante a tarefa de locomoção, em comparação com os filhotes incubados em condições ideais. Já a exposição a temperaturas quentes atrasou o crescimento ósseo e aumentou a frequência de quedas comparado ao grupo controle. Os autores ressaltam que as flutuações térmicas entre os dias 5 e 8 do desenvolvimento embrionário podem afetar o controle motor e o desenvolvimento ósseo. Essas variações de temperatura influenciam processos endócrinos que regulam a proliferação e diferenciação celular, especialmente durante períodos críticos de formação dos membros e articulações dos embriões.

Oksbjerg *et al.* (2019) estudaram o impacto da temperatura durante a incubação inicial sobre o desenvolvimento ósseo e muscular de frangos Ross 308. Foram utilizadas quatro temperaturas da máquina (36,5°C, 37,5°C, 38,5°C ou 39,0°C) do dia embrionário 4 ao 7. A incubação a 38,5°C resultou em aumento da força óssea nos machos, evidenciado por um maior diâmetro da tíbia, indicando maior elasticidade e resistência dos ossos. A discussão sugere que essas mudanças na força óssea podem ser atribuídas ao aumento da deposição de cálcio. Embora as fêmeas não tenham respondido às mudanças de temperatura, foi observado que uma temperatura mais alta durante a incubação beneficia a resistência óssea e a capacidade de locomoção dos machos.

Em trabalho mais recente, Sözcü *et al.* (2022) observaram que o tratamento com alta TCO inicial (38,9°C entre os dias 4 e 7 de incubação) resultou em comprimentos menores do fêmur, tíbia e metatarso aos 18 dias de incubação, em comparação com os outros tratamentos (controle: 37,8°C nos primeiros 14 dias e 36,8°C entre os dias 15 e 21 de incubação; alta TCO tardia: 37,8°C nos primeiros 14 dias e 38,2°C entre os dias 15 e 21). Além disso, os níveis de cinza, cálcio e fósforo na tíbia foram menores no grupo com alta TCO inicial. Os níveis sanguíneos de fosfatase alcalina e fósforo também foram menores nos grupos com alta TCO inicial e tardia em comparação com o grupo controle. Esses resultados indicam que uma alta

TCO inicial afetou negativamente o desenvolvimento ósseo durante a incubação, enquanto uma alta TCO tardia reduz a qualidade dos pintos e a taxa de eclosão.

Conforme observado, a literatura existente é limitada e apresenta dados contraditórios, principalmente devido a variações metodológicas, como diferenças nas temperaturas aplicadas, duração das alterações térmicas, parâmetros avaliados e linhagens de aves estudadas (Oviedo-Rondón *et al.*, 2009; Van Der Pol *et al.*, 2014; Groves; Muir, 2016). Nosso estudo objetiva preencher uma lacuna significativa ao fornecer dados robustos que podem não apenas esclarecer essas inconsistências, mas também aprimorar práticas de incubação e manejo na avicultura, com potencial impacto direto na saúde e produtividade das aves.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os protocolos experimentais utilizados neste estudo estão de acordo com as diretrizes da Universidade Federal da Bahia e do Comitê de Ética do Uso de Animais – CEUA (número de registro 22/2017).

3.1 Local

O experimento foi conduzido no Núcleo Brasileiro de Pesquisa em Incubação Artificial de Ovos (NUPIA-UFBA), pertencente à Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia, situado no município de Salvador-BA.

3.2 Unidades experimentais e tratamentos

2.408 ovos foram obtidos de matrizes pesadas da linhagem Cobb 500[®] com 45 semanas de idade, provenientes de um matrizeiro comercial. Foram utilizados ovos produzidos no mesmo dia e provenientes da segunda coleta do dia. Imediatamente após a coleta, ainda na granja, os ovos foram desinfetados pelo método de fumigação com paraformaldeído na concentração de 10g/m³ e a seguir foram transportados para o incubatório em veículo climatizado, com temperatura inferior ao ponto zero fisiológico, considerado aproximadamente 21°C.

Ao chegar ao incubatório, foi realizada a seleção dos ovos, eliminando-se aqueles considerados não incubáveis, como os sujos, trincados, quebrados, pequenos e deformados.

Posteriormente, os ovos incubáveis foram pesados e aqueles entre 63 e 66g foram separados em bandejas de incubação com capacidade para 86 ovos cada. Foram selecionadas e identificadas aleatoriamente 28 bandejas, sendo 7 bandejas identificadas para cada tratamento. 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.

Os tratamentos consistiram em diferentes perfis térmicos durante o desenvolvimento embrionário, aplicadas entre os dias 0 e 8 de incubação:

- Tratamento TC: temperatura controle - 37,8°C (100°F) - Control
- Tratamento TL: temperatura baixa - 36,7°C (98°F) - LOW
- Tratamento TH: temperatura alta - 38,9°C (102°F) - HIGH
- Tratamento TVH: temperatura muito alta - 39,4°C (103°F) - VERY HIGH

3.3 Pré-incubação e incubação dos ovos

Concluído 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%. Posteriormente, os ovos foram transferidos do incubatório para o NUPIA e antes da entrada dos ovos na incubadora, cada bandeja com 86 ovos foi pesada.

No período de incubação foram utilizadas quatro máquinas incubadoras modelo Premium Ecológica® IP600 de estágio único, com capacidade para 602 ovos cada. As máquinas possuíam controle digital de temperatura, umidade e viragem. A viragem dos ovos foi realizada em um ângulo de 45° a cada hora, enquanto a umidade relativa nas incubadoras foi mantida dentro da faixa de 45% a 60%.

Durante a incubação, as incubadoras foram ajustadas para manter a temperatura em 37,8°C (100°F). Entre o 0º e o 8º dia de incubação, uma máquina foi regulada para manter a temperatura de casca em 37,8°C (TC - controle) e outras três máquinas foram reguladas para iniciar a temperatura de casca do ovo (TCO) em: 36,7°C (98°F) (Tratamento TL), 38,9°C (102°F) (Tratamento TH) e 39,4°C (103°F) (Tratamento TVH). O perfil de temperatura aplicado nos tratamentos foi:

Tabela 1 – Perfis de temperatura aplicados nos diferentes tratamentos

Tratamento	Período de incubação (dias)					
	0	2	4	6	8	9
TC	100°F	100°F	100°F	100°F	100°F	100°F
TL ^{a*}	98°F	98,4°F	98,8°F	99,2°F	99,6°F	100°F
TH ^{b*}	102°F	101,6°F	101,2°F	100,8°F	100,4°F	100°F
TVH ^{c*}	103°F	102,4°F	101,8°F	101,2°F	100,6°F	100°F

^{a*} Acréscimo gradual de 0,4°F até o 8º dia.

^{b*} Decréscimo gradual de 0,4°F até o 8º dia.

^{c*} Decréscimo gradual de 0,6°F até o 8º dia.

Com o objetivo de incubar os ovos com o controle da temperatura da casca, em cada máquina foram incluídos sete sensores de temperatura (TI-33Ri plus[®]), um em cada bandeja. Os sensores foram unidos às cascas de ovos por meio de fita adesiva (Scotch[®] Tough Duct Tape – 3M) em sua região equatorial. A temperatura da casca foi monitorada a cada seis 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 equipados com sensores, foi realizada uma ovoscopia diária com o intuito de confirmar a viabilidade dos mesmos.

Aos 18,5 dias de incubação os ovos foram transferidos para bandeja de nascimento, os sensores foram retirados, e todas as máquinas foram reguladas para a temperatura fixa de 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. A partir de 19,5 dias (468h) os pintos foram checados a cada 8h. Os ovos dos tratamentos controle, alta e muito alta tinham começado a eclodir a partir da avaliação de 480h de incubação. Desse momento em diante os pintos foram marcados com pincel permanente a cada 8 horas até as 512h, quando a incubação foi finalizada para esses tratamentos. Os ovos do tratamento TL (temperatura baixa) haviam começado a eclodir na avaliação de 488h e a incubação foi encerrada às 520h (Tabela 2). Os pintos foram analisados 8 horas após serem identificados de acordo com o tratamento e horário de nascimento.

Tabela 2 – Número de pintos retirados do nascedouro a cada 8 horas

Tratamento	Pintos retirados do nascedouro						Total de pintos
	480h	488h	496h	504h	512h	520h	
TC	2	3	3	3	3	X	14
TH	2	3	3	3	3	X	14
TVH	2	3	3	3	3	X	14
TL	X	2	3	3	3	3	14

Os pintos nascidos em cada bandeja dos respectivos tratamentos foram registrados para avaliação da “janela de nascimento”, que compreendeu o momento entre os primeiros e os últimos pintos nascidos. No final da incubação os pintos eclodidos foram contabilizados e colocados em caixas devidamente identificadas de acordo com os tratamentos e horário de nascimento. Em cada retirada foi contabilizado o total de pintos mortos, 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 determinação da perda de peso dos ovos foi realizada por meio da pesagem individual de todas as bandejas de cada tratamento, antes da colocação dos ovos na incubadora e no momento em que foram transferidos para as bandejas de nascimento; quando foram calculados os pesos médios dos ovos. O percentual de perda de peso dos ovos foi obtido pela seguinte fórmula:

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

3.5.2 Mortalidade embrionária e fertilidade

No 18,5^o dia de incubação 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 e 18,5 dias de incubação;
- Ovos com embriões que morreram entre 19 e 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: $100\% - \% \text{ de ovos inférteis}$.

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

A identificação dos ovos inférteis ocorreu 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, dividindo-se o número total de pintos nascidos pelo número de ovos férteis, e multiplicando-se por 100.

3.6 Análises em cascas

As análises das cascas foram conduzidas em 14 amostras por tratamento nos ovos incubáveis, nos dias 8 e 18,5 de incubação, e no momento do nascimento. Os ovos foram quebrados e seus componentes separados (albúmen e gema). As cascas, depois de lavadas em água corrente para retirada de resíduos do albúmen e membranas, secaram em temperatura ambiente por 24 horas e, em seguida, foram pesadas individualmente em uma balança analítica digital (0,001g) (Mater[®], modelo AY200).

A espessura da casca foi medida em duplicata. Foi utilizado um micrômetro digital (Digimess[®] resolução 0,001mm, 0-25mm). A mensuração foi efetuada em três partes, correspondentes às regiões apical, equatorial e basal, a partir dos quais se obteve a espessura média por ovo (mm), calculada pela média das três regiões. Em seguida, as cascas resultantes foram armazenadas a 4°C até a realização das análises de minerais.

A metodologia de Yair e Uni (2011) foi empregada para as determinações dos minerais nas cascas, incluindo Cálcio (mg), Fósforo (mg), Manganês (μg) e Magnésio (mg), sendo realizadas em duplicata. As cascas foram trituradas e queimadas em mufla (Solidsteel[®]) a 600°C por 10 horas. Cerca de 100 a 150mg das cinzas de cada amostra foi digerida com uma mistura de 2mL de 30% H_2O_2 e 4mL de 70% HNO_3 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

A gema e o saco vitelínico de 14 amostras por tratamento foram analisados em quatro momentos distintos: no início da incubação (dia 0), no oitavo dia, no 18,5^o dia e no momento do nascimento. Após a quebra dos ovos ou a eutanásia dos embriões/pintos recém-eclodidos, por deslocamento cervical, a separação das gemas/sacos vitelínicos foi realizada manualmente e os resíduos de albúmen aderidos foram removidos com o auxílio de papel absorvente. Depois deste procedimento, as gemas/sacos vitelínicos foram homogeneizadas, pesadas individualmente em balança analítica digital (0,001g) (Mater[®] modelo AY200) e armazenadas a -20°C para posterior análises de minerais.

Após a separação do conteúdo de gema/sacos vitelínico, cerca de 100 a 150g de cada amostra foi submetida à análise mineral. Os teores de Cálcio (mg), Fósforo (mg), Manganês (µg) e Magnésio (mg) foram determinados em duplicata, utilizando o método apresentado por Yair e Uni (2011), descrito para 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 Morfologia embrionária

Nos dias 8, 13 e 18,5 de incubação, 2 embriões por bandeja/repetição (14 por tratamento) foram analisados para se determinar o estágio de desenvolvimento embrionário, de acordo com a classificação de Hamburger e Hamilton (HH) (1951) (anexo). O embrião foi isolado da membrana da gema com o auxílio de um papel filtro e lavado com solução salina tamponada para remoção dos resíduos. O lado ventral e dorsal do embrião foi examinado por meio de estereomicroscópio (aumento 3,5 x 90 x) (Global Optics[®]).

A classificação da tabela de Hamburger e Hamilton (1951) mensura o desenvolvimento embrionário baseando-se em fatores externos, como por exemplo: mudanças nas asas, pernas, penas, comprimentos do bico e dedos.

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

Aos 8 e 18,5 dias de incubação e no momento do nascimento, 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, em cada grupo experimental, 14 pintos recém-nascidos foram escolhidos aleatoriamente para a determinação desta variável.

O comprimento de todos os embriões/pintos recém-eclodidos de cada tratamento foi mensurado com 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).

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

Os pintinhos recém-eclodidos, empregados nas análises anteriores, foram submetidos à avaliação da cicatrização do umbigo, que foi classificada em três escores, de acordo com os critérios estabelecidos por Tona *et al.* (2003): escore 1- umbigo fechado e área do umbigo limpa; escore 2 - botão negro até 2 mm no umbigo ou presença de fio negro; escore 3 - botão negro maior que 2 mm ou umbigo aberto.

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. Após a coleta do coração, pulmões e bursa foram removidos. Esses órgãos foram expressos de forma relativa ao YFBM.

3.8.4 Parâmetros fisiológicos dos pintos de um dia

3.8.4.1 Temperatura retal

Após a pesagem, a temperatura retal dos pintos amostrados foi mensurada utilizando-se um termômetro digital (Medeqco Geratherm®) com uma acurácia de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$. O instrumento foi introduzido na cloaca, aproximadamente 3cm. A temperatura retal tem sido utilizada para estimar a temperatura corporal em aves (Lin *et al.*, 2005).

3.8.4.2 Parâmetros sanguíneos

a) Hemogasometria

As análises que permitiram avaliar os níveis sanguíneos de Potencial hidrogeniônico (pH), Pressão parcial de gás carbônico (pCO₂), Pressão parcial de oxigênio (pO₂), Bicarbonato (HCO₃⁻), Saturação de oxigênio (SO₂), Cálcio ionizado (iCa), Sódio (Na⁺), Potássio (K⁺), Hematócrito (Hct) e Hemoglobina (Hb) dos pintos, foram realizadas por meio do aparelho analisador clínico portátil i-STAT[®] e cartuchos modelo Cartridge CG8+ (Abott Laboratories-USA). Foi realizado por meio da veia jugular, a coleta individual de sangue em seringas heparinizadas de 1mL e agulha 30G, nos mesmos pintos utilizados nas análises anteriores. Imediatamente após a coleta, cerca de 100µL de sangue de cada amostra foi inserida no cartucho, que automaticamente fez a leitura dos parâmetros mencionados.

b) Glicose, lactato, ácido úrico

As mesmas amostras de 14 pintinhos por tratamento foram utilizadas. No momento da análise de hemogasometria, amostras de sangue foram coletadas em tubos tipo Vacutainer[®] contendo heparina. Logo após, as amostras de sangue foram centrifugadas durante 10 minutos à velocidade de 3000 rpm. As alíquotas de plasma foram transferidas por meio de micropipetas para novos tubos *ependorff* devidamente identificados de acordo com os tratamentos e foram conservadas a -20°C até ser iniciado o processamento das amostras.

As determinações de glicose¹, lactato² e ácido úrico³ (mensurados no plasma), foram realizadas em espectrofotômetro modelo GT 7220 da marca Global Technology[®], utilizando-se kits comerciais em comprimento de onda apropriados.

¹ Glicose K082. Bioclin. Belo Horizonte, MG, BR. Metodologia: Enzimático colorimétrico.

² Lactato K084. Bioclin. Belo Horizonte, MG, BR. Metodologia: UV enzimático.

³ Ácido úrico K139. Bioclin. Belo Horizonte, MG, BR. Metodologia: Enzimático colorimétrico.

c) Hormônios: T₃, T₄, GH, vitamina D₃, PTH e calcitonina

Novas amostras de 14 pintos recém-nascidos, respeitando o esquema de coleta por meio do horário do nascimento, foram escolhidas aleatoriamente. Os pintos foram eutanasiados por deslocamento cervical e amostras de sangue foram coletadas em tubos tipo Vacutainer[®]. Em seguida, as amostras de sangue foram centrifugadas durante 15 minutos à velocidade de 4500rpm 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.

Os níveis hormonais de triiodotironina (T_3)¹, tiroxina (T_4)² e hormônio do crescimento (GH)³, foram medidas pelo método ELISA (Morita *et al.*, 2016). A vitamina D_3 no soro foi analisada pelo kit ELISA 1,25-dihidroxitamina (D_3)⁴, paratormônio pelo kit chicken PTH⁵ (Guz *et al.*, 2019) e calcitonina pelo kit chicken calcitonin⁶ (Azevedo, 2022). Foi utilizado contador de radiação gamma (Gamma-C12, Diagnostic Products Corp, Los Angeles, CA, USA).

¹ Total Triiodothyronine (Total T3) AccuBind® ELISA Kit (Product Code: 125-300, Monobind, Lake Forest, CA).

² Total Thyroxine (Total T4) AccuBind® ELISA Kit (Product Code: 225-300, Monobind, Lake Forest, CA).

³ Chicken growth hormone ELISA kit (Catalog N°. MBS266317, MyBioSource®, San Diego, CA).

⁴ 1,25-dihydroxyvitamin D3 ELISA Kit (Elabscience®, Houston, Texas, United States).

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

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

d) Cálcio, fósforo e fosfatase alcalina

Para as quantificações de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina, foram utilizadas as mesmas amostras empregadas nas análises hormonais, consistindo de 14 pintinhos por tratamento.

As determinações de cálcio¹, fósforo² e fosfatase alcalina³ (mensurados no soro), foram determinadas por meio de um analisador bioquímico automático (BioSystems®) utilizando-se kits comerciais.

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

² Fósforo 42. Labtest Diagnóstica®. Lagoa Santa, MG, BR. Metodologia: Colorimétrico.

³ Fosfatase Alcalina 40. Labtest Diagnóstica®. Lagoa Santa, MG, BR. Metodologia: Enzimático colorimétrico.

3.8.4.3 Glicogênio Hepático

A determinação do glicogênio hepático foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Bidinotto *et al.* (1998). A amostra de fígado de cada pintinho identificado conforme o tratamento foi pesada na proporção de 100 a 110mg, e logo em seguida, a amostra foi transferida para tubo de ensaio onde foi adicionado 1,0 ml de KOH 6,0N, sendo incubada por 5 minutos em banho maria a 100°C para sua completa dissolução. Dissolvido os tecidos completamente, 125 μl deste extrato foi transferido para um novo tubo previamente identificado e adicionado 1,5ml de etanol e 50 μl de K_2SO_4 10%, seguidos de agitação. Posteriormente, a

amostra foi centrifugada a 3.000 rpm por 3 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado por inversão e o precipitado re-suspendido em 2 ml de água destilada. Após a mistura realizou-se a transferência de 100 µl da amostra, 250 µl de fenol e 1 ml de H₂SO₄ para parar a reação. Posteriormente foi realizada a leitura em espectrofotômetro modelo GT 7220 da marca Global Technology[®] a 480 nm. O conteúdo de glicogênio está expresso em µmoles de glicosil-glicose/mg de tecido total.

3.8.5 Análises ósseas

3.8.5.1 *Peso, comprimento e largura dos ossos*

Foram retiradas a tíbia e fêmur da perna esquerda de cada uma das 14 amostras por tratamento obtidas aleatoriamente, aos 18,5 dias de incubação e ao longo do nascimento. Após limpeza de todos os tecidos moles e cartilagens, os ossos foram pesados em balança analítica digital com precisão de 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 (Digimes[®] 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. Logo após estes procedimentos, os ossos foram envolvidos em gaze umedecida com soro e armazenados em sacos plásticos a -20°C, para posteriores análises.

3.8.5.2 *Teste biomecânico*

Seguindo a metodologia de Shim *et al.* (2012), os mesmos ossos foram submetidos a um ensaio biomecânico para a análise de força para a fratura. No dia do teste, a tíbia e o fêmur esquerdos foram descongelados à temperatura ambiente, ainda 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 correspondeu como a carga de compressão máxima (Kg) aplicada na qual a amostra óssea não era mais resistente.

3.8.5.3 Análises de cinzas e minerais dos ossos

Após a realização de ensaios mecânicos na tíbia e fêmur esquerdos das amostras, procedeu-se à remoção de uma pequena seção da diáfise média de cada osso (cerca de 15% do comprimento total) para a quantificação de cinzas, conforme a metodologia descrita 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. Após a pesagem das cinzas remanescentes, procedeu-se à determinação do percentual de cinzas dos ossos secos de cada amostra.

A fim de examinar o conteúdo dos minerais Cálcio (mg), Fósforo (mg), Manganês (µg) e Magnésio (mg), cerca de 100 a 150 mg de cada amostra de cinzas da tíbia foram analisados por meio de espectrofotômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) (Varian[®], Mulgrave, Austrália) utilizando soluções padrão (Certipur Merck[®], Darmstadt, Alemanha). Os valores do conteúdo de Ca, Mn, P e Mg foram calculados em percentual relativo ao peso das cinzas.

3.8.5.4 Calcificação óssea

Aos 18,5 dias de incubação e ao nascimento, a tíbia e o fêmur direitos foram utilizados para a análise de calcificação, sendo 14 amostras por tratamento. 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; Bloom; Lilja, 2004) para análise de tecido não calcificado e calcificado, respectivamente. As imagens digitais foram coletadas utilizando 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 como referência para a calibração do software de análise de imagem.

3.9 Análise Estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. O modelo geral usado para todos os dados foi:

$$Y_i = \mu + \text{Temperatura}_i + \varepsilon_i$$

Onde Y_i = a variável dependente, μ é a média geral, $\text{Temperatura}_i = \text{TCO}$ ($i =$ baixa, controle, alta ou muito alta), e $\varepsilon_i =$ o erro.

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

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

Os diferentes perfis de temperatura de casca do ovo (TCO) mostraram efeito significativo sobre a maioria das variáveis analisadas.

4.1 Rendimento de incubação e qualidade dos pintos

Os dados relativos ao rendimento de incubação e qualidade dos pintos estão apresentados nas tabelas 3 a 7 e figuras 11 a 15.

A fertilidade e as mortalidades embrionárias inicial e intermediária não foram diferentes entre os tratamentos ($p > 0,05$; tabela 3). A perda de peso dos ovos durante a incubação,

apresentou um aumento significativo à medida que a temperatura foi elevada ($p \leq 0,05$). Os maiores valores de perda de peso foram observados em temperaturas mais altas (TH e TVH), seguido dos tratamentos TC e TL. A eclodibilidade total sobre os ovos férteis variou significativamente com a temperatura de incubação ($p \leq 0,05$). As melhores taxas de eclosão foram encontradas no perfil de incubação em temperatura baixa (TL) e em temperatura controle (TC), enquanto houve uma redução no tratamento TH (-6,81%) e tratamento TVH (-12,24%), comparado ao TC.

A mortalidade embrionária tardia foi significativamente maior no tratamento TVH em comparação ao tratamento controle (+6,81%; $p \leq 0,05$). Para essa variável, observou-se médias semelhantes entre os tratamentos controle e TL, e comportamento estatístico intermediário para o tratamento TH. As variações na TCO também resultaram em um aumento na incidência de embriões que chegaram a bicar os ovos, mas não conseguiram eclodir. Esse efeito foi mais pronunciado no tratamento TVH, seguido por TH. Os grupos TC e TL apresentaram valores semelhantes. Quanto à refugagem, os tratamentos com altas temperaturas (TVH e TH) resultaram em uma incidência significativamente maior de pintos refugados (+1,99% e 1,8%, respectivamente) quando comparado ao tratamento TC e TL. Os resultados também indicaram que as condições experimentais TL e TC durante a incubação inicial resultaram em uma menor e semelhante porcentagem de pintos refugos, sugerindo que essas temperaturas foram mais adequadas para o desenvolvimento embrionário ($p \leq 0,05$).

A ausência de diferenças significativas na fertilidade entre os tratamentos demonstra a uniformidade da amostra de ovos e a homogeneidade do lote. Os valores de fertilidade observados, que variaram entre 96,46% (TL) e 96,85% (TH), estão de acordo com a faixa esperada para a idade das matrizes (COBB, 2008).

Quanto a perda de peso do ovo, cabe ressaltar que desde o início da incubação até a transferência dos ovos para o nascedouro, entre 18 e 19 dias, é necessário que ocorra uma redução de peso entre 11% e 14% (Rosa; Ávila, 2000; Decuypere *et al.*, 2013). Essa perda de peso diminui o volume interno do ovo, expandindo a área da câmara de ar, o que é fundamental para que o embrião infle os pulmões adequadamente e facilite a transição da respiração corioalantoide para a pulmonar durante a bicagem interna (Rahn *et al.*, 1974; Meijerhof; Van Beek, 1993).

Tabela 3 – Parâmetros de incubação em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta –TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia

Temperatura	Perda de peso (%)	Fertilidade (%)	Eclod. ¹ (%)	Mortalidade (%)						Refugos (%)
				Inicial	Intermediária	Tardia	Bicados	Tardia+ bicados	Total	
TL	10,57 ^d	96,46	90,32 ^a	2,10	1,79	4,87 ^b	0,93 ^c	5,79 ^c	9,68 ^c	0,44 ^b
TC	11,32 ^c	96,67	90,52 ^a	2,01	0,82	5,43 ^b	1,22 ^c	6,65 ^c	9,48 ^c	0,55 ^b
TH	12,41 ^b	96,85	83,71 ^b	1,94	1,75	9,21 ^{ab}	3,39 ^b	12,60 ^b	16,29 ^b	2,35 ^a
TVH	13,46 ^a	96,69	78,28 ^c	2,04	1,80	12,24 ^a	5,64 ^a	17,87 ^a	21,72 ^a	2,54 ^a
SEM	0,224	0,206	1,046	0,143	0,145	0,800	0,379	1,059	1,046	0,194
P-valor	<0,0001	0,9371	<0,0001	0,9854	0,0301	0,0005	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

^{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.

n= 7 bandejas com 602 ovos incubados por tratamento.

Os resultados do experimento mostraram que a TCO afetou a perda de peso dos ovos incubados. À medida que a TCO aumentou, a perda de peso dos ovos também se elevou, variando de 10,57% (TL) a 13,46% (TVH). Entretanto, com exceção da média de TL, as demais médias se mantiveram dentro dos níveis esperados. A literatura identifica a condutância da casca e a diferença de pressão de vapor d'água entre o ovo e o ambiente como fatores determinantes na regulação da perda de peso dos ovos. Esses fatores são diretamente influenciados por condições físicas como umidade, temperatura e ventilação (Meijerhof; Van Beek, 1993; Rosa; Ávila, 2000). Portanto, pode-se inferir que o aumento na perda de peso observado no experimento está relacionado à maior evaporação do conteúdo aquoso dos ovos, atribuída ao aumento da pressão de saturação do vapor de água dentro do ovo em temperaturas mais elevadas. Além disso, a perda de peso abaixo do ideal na TL provavelmente resulta da temperatura de casca mais baixa, que reduziu a evaporação do conteúdo aquoso do ovo.

Nas fases de mortalidade inicial e intermediária, as variações nas TCOs testadas não resultaram em diferenças significativas. Isso sugere que os embriões tiveram maior tolerância a pequenas variações de temperatura no início da incubação, ou que as temperaturas testadas não ultrapassaram limites críticos para aumentar a mortalidade nessas fases.

O estudo revelou que temperaturas elevadas na primeira semana de incubação reduziram significativamente a eclodibilidade em comparação com temperaturas controle e baixa. Esse resultado foi atribuído ao aumento da mortalidade embrionária tardia.

A exposição dos embriões à hipertermia nos primeiros dias de incubação pode comprometer o desenvolvimento do sistema cardiovascular. As temperaturas elevadas aceleram o metabolismo embrionário, gerando uma demanda metabólica que o sistema cardiovascular em formação pode não suportar (Decuyper; Michels, 1992; Christensen *et al.*, 1999). O estresse térmico precoce pode causar anomalias, como crescimento irregular do coração e falhas na formação dos vasos sanguíneos. Essas disfunções elevam a mortalidade embrionária e reduzem as taxas de eclodibilidade ao afetar a capacidade do embrião de realizar ajustes fisiológicos críticos para a eclosão (Maatjens *et al.*, 2014a).

A formação da membrana corioalantoide, elementar para a respiração do embrião ao mediar as trocas gasosas através da casca, também pode ser prejudicada pela exposição a altas temperaturas. Ande e Wilson (1981) propuseram que a sensibilidade do embrião ao calor durante os primeiros dias de incubação pode estar relacionada à formação e expansão dessa membrana, o que, se comprometido, resulta em alta mortalidade embrionária. Os achados deste estudo, com maior mortalidade nas temperaturas TH e TVH, sustentam essa hipótese.

Ademais, altas temperaturas de incubação aumentam a taxa metabólica dos embriões, o que eleva a produção interna de calor. Na fase final da incubação, essa aceleração metabólica, associada à diminuição das concentrações de oxigênio, provoca um estresse fisiológico (Moran Jr, 2007). Esse estresse prejudica a eficiente utilização de nutrientes essenciais, resultando em menor consumo da gema pelos embriões e, conseqüentemente, na redução do peso corporal livre de gema (YFBM) (Piestun *et al.*, 2009a). A diminuição do YFBM, observada em condições de temperatura elevada, compromete o desenvolvimento saudável do embrião, resultando em maior mortalidade embrionária e menor taxa de eclodibilidade. Isso ocorre porque os embriões não dispõem dos recursos necessários para completar seu desenvolvimento e atingir a eclosão de maneira adequada (Decuypere; Michels, 1992; Christensen *et al.*, 1999; Molenaar *et al.*, 2013).

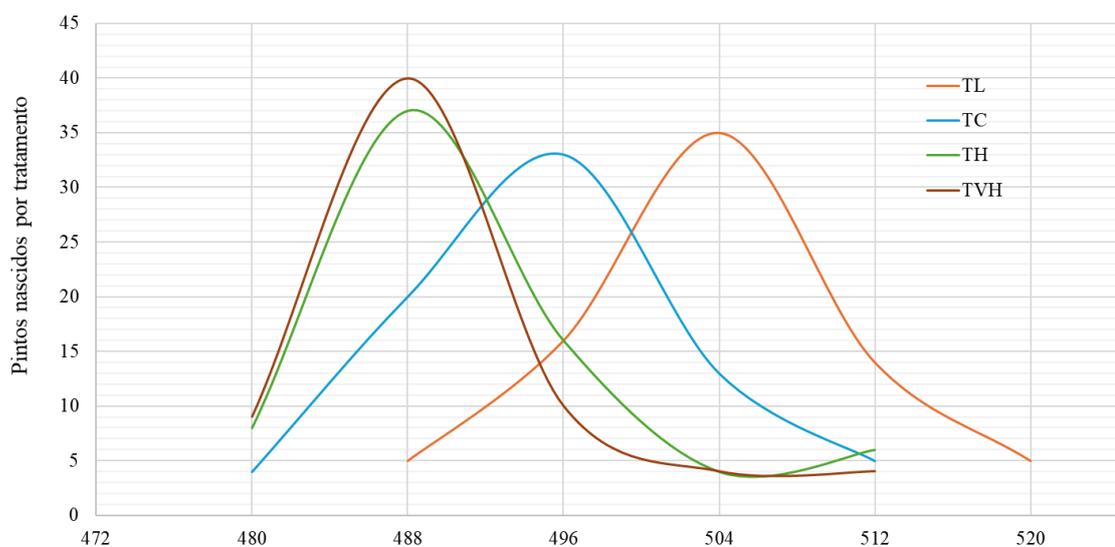
Estudos anteriores corroboram os achados deste experimento. Piestun *et al.* (2013) relataram que o aumento da temperatura para 38,1°C nos primeiros 5 dias de incubação elevou a mortalidade embrionária. Soren *et al.* (2016) demonstraram que a incubação a 39°C por 6 horas diárias entre os dias E4 e E7 reduziu a eclodibilidade. Avşar *et al.* (2022) confirmaram que temperaturas iguais ou superiores a 38,6°C diminuem significativamente a eclodibilidade e aumentam a mortalidade embrionária ($p < 0,001$).

Os resultados obtidos indicam que o percentual de ovos bicados (pintos que iniciaram a bicagem, mas não conseguiram completar a eclosão), mortalidade tardia somada aos ovos bicados e percentual de mortalidade total, refletiram diretamente a mortalidade tardia. Observou-se que o tratamento com a temperatura de incubação muito alta (TVH: 39,4°C) apresentou os piores resultados em comparação com os demais tratamentos.

As alterações metabólicas induzidas pela temperatura de casca elevada durante a incubação são fundamentais para entender a incidência de pintos de qualidade inferior (refugos). Embora esses pintos consigam eclodir, eles não são viáveis para a produção devido a problemas como pernas abertas, umbigos não cicatrizados ou anormalidades físicas (Tona *et al.*, 2003). Estudos de Lourens *et al.* (2007) e Molenaar *et al.* (2011) demonstram que a alta TCO acelera o metabolismo embrionário, o que leva ao estresse térmico e prejudica o desenvolvimento de estruturas essenciais, como os ossos e músculos. Essas condições podem ter contribuído para uma maior incidência de pintos refugos, especialmente em TH e TVH.

A janela de nascimento dos pintos diferiu entre os tratamentos (figura 11). TL promoveu um início de eclosão mais tardia quando comparado ao controle, enquanto TH e TVH anteciparam e concentraram a eclosão em um período mais curto.

Figura 11 – Janela de nascimento de pintos incubados em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia



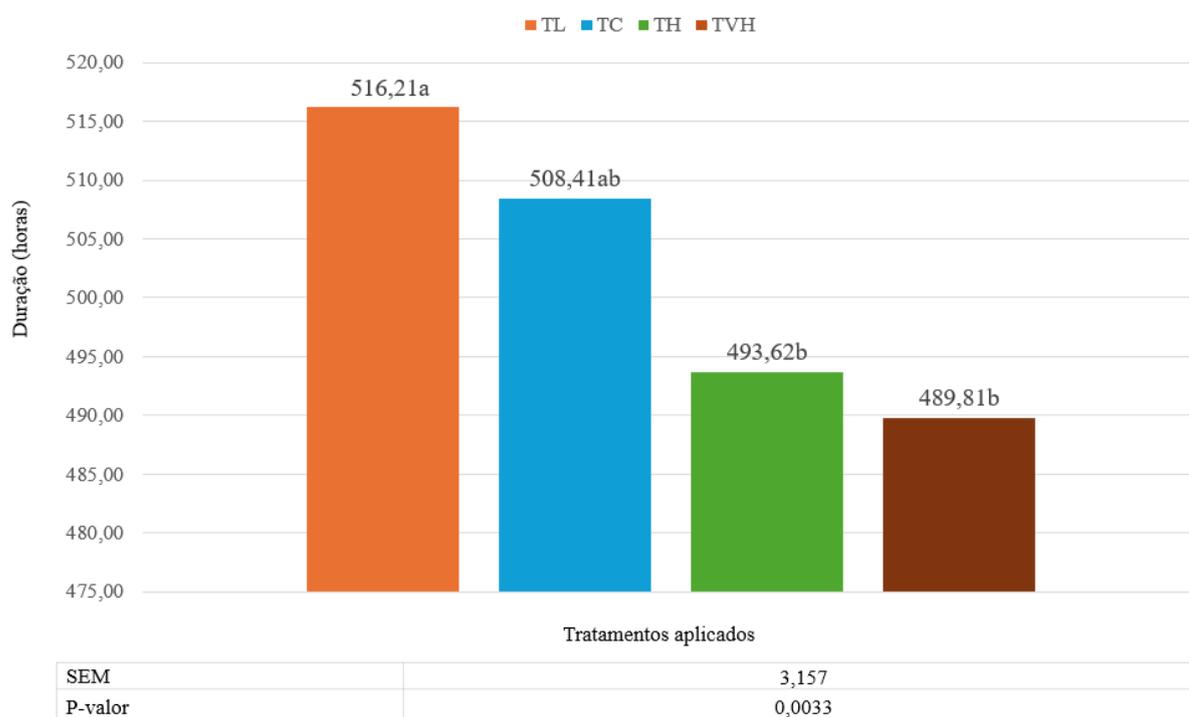
Temperatura	Número de pintos nascidos de acordo com o tempo avaliado					
	480h	488h	496h	504h	512h	520h
TL	x	5	16	35	14	5
TC	4	20	33	13	5	x
TH	8	37	16	4	6	x
TVH	9	40	10	4	4	x

A janela de nascimento refere-se ao intervalo de tempo entre o nascimento do primeiro e do último pintinho dentro de um lote de incubação (Willemsen *et al.*, 2010). A amplitude da janela de nascimento é um indicador fundamental nos incubatórios, pois uma janela muito ampla pode resultar em desidratação dos pintinhos nascidos mais cedo, má formação do sistema termorregulatório, e problemas de cicatrização umbilical nos pintinhos nascidos tardiamente, o que aumenta a ocorrência de pintos refugos, como observado neste trabalho (Hodgetts, 2006).

No presente estudo, os tratamentos com temperaturas mais altas (TH e TVH) concentraram a eclosão em um período mais curto, resultando em um maior número de pintos nascendo de forma antecipada e se estendeu até 512h. Esse padrão, compromete o desenvolvimento adequado das aves e acarreta problemas de manejo e desempenho subsequente (Boerjan, 2006). Por outro lado, a temperatura mais baixa (TL) resultou em uma eclosão tardia, o que também pode levar a desafios adicionais no manejo (Calil, 2007). Porém, a distribuição da janela no tratamento TL foi mais uniforme em comparação a TH e TVH, refletindo maior consistência no processo de eclosão. A temperatura controle (TC) apresentou uma distribuição de nascimentos mais equilibrada, evidenciando-se como o tratamento mais adequado para minimizar os problemas associados a uma janela de nascimento extensa.

Quanto aos resultados da duração da incubação (figura 12), foram observadas diferenças significativas nas médias em função das variações de temperatura ($p \leq 0,05$).

Figura 12 – Duração da incubação de pintos incubados em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º 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 tratamento TL resultou na maior duração de incubação, enquanto TH e TVH apresentaram as menores durações. O grupo controle (TC) teve uma duração intermediária entre TL e os tratamentos de altas temperaturas.

Temperaturas elevadas durante a incubação aceleram o metabolismo embrionário, promovendo um aumento na taxa de divisão celular e na produção de energia, o que impulsiona o desenvolvimento mais rápido dos tecidos e órgãos (Romanoff, 1960). Essa aceleração metabólica, induzida pelo aumento da temperatura, pode levar ao estresse térmico, especialmente em fases críticas de organogênese (Lourens *et al.*, 2007; Molenaar *et al.*, 2011). O estresse térmico, por sua vez, pode desencadear respostas celulares adversas, como a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS), causando danos ao DNA e proteínas, e comprometendo a integridade celular (Meyer; Silva, 1999). Essa intensificação no desenvolvimento embrionário, promovida pelas altas temperaturas, culmina na redução da duração total da incubação, resultando em uma eclosão precoce dos pintos.

De modo inverso, temperaturas mais baixas retardam o desenvolvimento embrionário. Durante os primeiros dias de incubação, o embrião passa por processos críticos, como a gastrulação e a neurulação, que estabelecem as bases para o desenvolvimento dos órgãos (Hamburger; Hamilton, 1951). Temperaturas baixas podem prolongar essas fases iniciais, resultando em uma eclosão tardia e comprometendo a viabilidade dos embriões devido ao atraso no desenvolvimento das membranas extraembrionárias, como o saco vitelino e a corioalantoide, que são fundamentais para a nutrição e respiração do embrião (Hamburger; Hamilton, 1951; Decuypere; Michels, 1992; Boerjan, 2006).

A exposição a baixas temperaturas durante a incubação também pode reduzir a taxa metabólica dos embriões, o que afeta a atividade mitocondrial e a produção de ATP (Black; Burggren, 2004; Lourens *et al.*, 2005). Como o ATP é essencial para a proliferação celular e o desenvolvimento de tecidos, essa redução energética compromete as divisões mitóticas, resultando em uma desaceleração significativa na multiplicação e no crescimento celular. Isso prejudica o desenvolvimento embrionário, pois os processos celulares necessários avançam a um ritmo mais lento (Decuypere; Michels, 1992; Black; Burggren, 2004; Lourens *et al.*, 2005).

Entretanto, o tratamento TL foi caracterizado por um aumento gradual na temperatura (incubação de início lento). Esse perfil térmico progressivo possivelmente permitiu uma adaptação mais eficiente dos embriões, favorecendo o desenvolvimento de funções fisiológicas essenciais, como a absorção de nutrientes e a mineralização óssea. Embora o desenvolvimento tenha sido inicialmente mais lento, o ambiente térmico controlado garantiu um desempenho superior em aspectos chave do crescimento e da qualidade dos pintos. Isso foi evidenciado neste experimento por menores taxas de refugagem, redução na mortalidade embrionária, melhores condições de desenvolvimento de alguns órgãos e melhor qualidade do umbigo (tabela 7).

Os resultados referentes à morfologia embrionária, avaliados em diferentes estágios de incubação, são apresentados nas tabelas 4, 5 e 6. Esses dados descrevem a progressão do desenvolvimento embrionário sob diferentes tratamentos de temperatura, conforme categorizados pelos estágios de Hamburger e Hamilton (1951): estágios H-H.

Aos 8 dias de incubação (tabela 4), o tratamento com temperatura baixa (TL) apresentou maior percentual de embriões nos estágios H-H 32 (28,57%) e 33 (50,00%). O tratamento controle (TC) e o tratamento de alta temperatura (TH) mostram embriões em estágios mais avançados: H-H 34 e H-H 35, com o TC atingindo 57,14% no estágio 34, enquanto o TH atingiu 64,29% no estágio 35. O tratamento de temperatura muito alta (TVH) teve a maioria dos embriões no estágio 35 (78,57%).

Tabela 4 – Estágio morfológico de desenvolvimento embrionário determinado aos 8d de incubação após uso de diferentes perfis de temperatura na fase inicial da embriogênese - 1ª Avaliação

Tratamento	Estágios H-H					
	31 (7d)	32 (7,5d)	33 (7,5-8d)	34 (8d)	35 (8-9d)	36 (10d)
TL	7,14%	28,57%	50,00%	14,29%	---	---
TC	---	---	21,43%	57,14%	21,43%	---
TH	---	---	14,29%	21,43%	64,29%	---
TVH	---	---	---	14,29%	78,57%	7,14%

n = 14 embriões por tratamento.

H-H = estágio de desenvolvimento do embrião de acordo com Hamburger e Hamilton (1951).

A análise aos 13 dias de incubação (tabela 5) revela um avanço dos estágios embrionários. Os tratamentos TL e TC apresentaram a maioria dos embriões no estágio H-H 39, com 71,43% e 78,57%, respectivamente. O TH avançou com 57,14% dos embriões no estágio H-H 39 e 42,86% no estágio H-H 40. No tratamento TVH, 85,71% dos embriões alcançaram o estágio H-H 40.

Tabela 5 – Estágio morfológico de desenvolvimento embrionário determinado aos 13d de incubação após uso de diferentes perfis de temperatura na fase inicial da embriogênese - 2ª Avaliação

Tratamento	Estágios H-H				
	37 (11d)	38 (12)	39 (13d)	40 (14d)	41 (15d)
TL	---	28,57%	71,43%	---	---
TC	---	7,14%	78,57%	14,29%	---
TH	---	---	57,14%	42,86%	---
TVH	---	---	7,14%	85,71%	7,14%

n = 14 embriões por tratamento.

H-H = estágio de desenvolvimento do embrião de acordo com Hamburger e Hamilton (1951).

Observa-se que aos 18,5 dias de incubação (tabela 6), o desenvolvimento embrionário continuou avançando. O tratamento TL mostra uma maioria de embriões no estágio H-H 44 (92,86%), enquanto o TC apresenta uma divisão entre os estágios H-H 44 (78,57%) e H-H 45 (21,43%). No TH, 35,71% dos embriões atingiram o estágio H-H 45, e o TVH avançou até o estágio H-H 46, com 14,29% dos embriões nesse estágio.

Os embriões submetidos a temperaturas mais elevadas (TH e TVH), alcançaram estágios mais avançados, sugerindo um impacto direto no metabolismo embrionário e na utilização de nutrientes. Isso é apoiado pela literatura que indica que altas temperaturas aumentam a atividade metabólica, resultando em maior taxa de desenvolvimento (Yair *et al.*, 2015; Sgavioli *et al.*, 2016). Essa elevação metabólica facilita o desenvolvimento mais rápido dos tecidos e órgãos, antecipando os estágios morfológicos (Romanoff, 1960).

Tabela 6 – Estágio morfológico de desenvolvimento embrionário determinado aos 18,5d de incubação após uso de diferentes perfis de temperatura na fase inicial da embriogênese - 3ª Avaliação

Tratamento	Estágios H-H				
	42 (16d)	43 (17d)	44 (18d)	45 (19-20d)	46 (20-21d)
TL	---	7,14%	92,86%	---	---
TC	---	---	78,57%	21,43%	---
TH	---	---	64,29%	35,71%	---
TVH	---	---	7,14%	78,57%	14,29%

n = 14 embriões por tratamento.

H-H = estágio de desenvolvimento do embrião de acordo com Hamburger e Hamilton (1951).

Os embriões submetidos a temperaturas mais elevadas (TH e TVH), alcançaram estágios mais avançados, sugerindo um impacto direto no metabolismo embrionário e na utilização de nutrientes. Isso é apoiado pela literatura que indica que altas temperaturas aumentam a atividade metabólica, resultando em maior taxa de desenvolvimento (Yair *et al.*, 2015; Sgavioli *et al.*, 2016). Essa elevação metabólica facilita o desenvolvimento mais rápido dos tecidos e órgãos, antecipando os estágios morfológicos (Romanoff, 1960).

Podemos associar os resultados de estágio morfológico às análises de janela de nascimento e duração da incubação. Os tratamentos com temperaturas elevadas (TH e TVH) apresentaram uma janela mais curta e menor duração de incubação, refletindo um desenvolvimento acelerado. Esse comportamento coincide com os estágios morfológicos mais avançados observados nos embriões desses grupos, reforçando que o aumento da temperatura intensificou o metabolismo embrionário. Em contraste, o tratamento TL, com maior duração de incubação e janela mais uniforme, sugere um desenvolvimento mais consistente.

Ao comparar os resultados deste estudo com os de Dias e Müller (1998), que também utilizaram a tabela de Hamburger e Hamilton (1951) para categorizar o desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus domesticus*, verifica-se uma concordância no impacto das altas temperaturas sobre a aceleração da embriogênese. Os autores observaram que temperaturas elevadas (40°C) nos estágios iniciais aceleram o desenvolvimento, levando os embriões a estágios mais avançados, como o H-H 40, similar ao observado nos tratamentos TH e TVH do presente estudo. Essa aceleração, no entanto, pode comprometer o desenvolvimento de estruturas essenciais, como ossos e músculos, devido ao estresse térmico e ao aumento da taxa metabólica, o que prejudica a utilização de nutrientes e, conseqüentemente, a qualidade dos pintinhos e seu desenvolvimento pós-eclosão (Tona *et al.*, 2003; Molenaar *et al.*, 2011).

Ao analisar temperaturas mais baixas, observamos que elas podem retardar o desenvolvimento embrionário. Embriões incubados a 35°C, em comparação com aqueles a 38°C, apresentaram um desenvolvimento mais lento e uma resposta metabólica mais demorada

às variações térmicas, especialmente nos estágios avançados (HH 43-44) (Black; Burggren, 2004). De forma semelhante, Dias e Müller (1998) também observaram que temperaturas mais baixas (34°C) retardaram o progresso, confirmando a tendência de atraso no desenvolvimento sob condições térmicas subótimas encontradas no nosso estudo.

Portanto, temperaturas mais elevadas durante a incubação aceleram o desenvolvimento embrionário, permitindo que os embriões atinjam estágios morfológicos mais avançados. Em contrapartida, temperaturas mais baixas retardam o desenvolvimento, resultando em uma resposta metabólica mais lenta e no atraso dos estágios embrionários.

A variável peso do ovo não apresentou diferença significativa entre os grupos avaliados ($p > 0,05$; tabela 7). O peso dos pintos ao nascer e o YFBM foram significativamente maiores nos tratamentos TL e TC, enquanto os tratamentos TH e TVH apresentaram os menores pesos ($p \leq 0,05$). Os pesos relativos dos órgãos em relação ao YFBM também variaram entre os tratamentos. O coração, fígado, intestino e pâncreas apresentaram os maiores valores nos tratamentos TL e TC, com uma redução significativa observada nos tratamentos TH e TVH. Para os pulmões, o tratamento TC apresentou o maior peso, seguido pelos tratamentos TL e TH, que não diferiram estatisticamente entre si. O tratamento TVH obteve o menor peso pulmonar. Os resultados para o baço e a bursa foram semelhantes, no qual o tratamento TC apresentou os maiores pesos, seguido por TL. Já os tratamentos TH e TVH foram estatisticamente iguais entre si, porém apresentaram os menores pesos para ambos os órgãos ($p \leq 0,05$). O peso relativo do estômago não foi afetado pelos tratamentos ($p > 0,05$). A pontuação do umbigo (indicando qualidade inferior) foi maior no tratamento TVH, superando os valores observados em TH (pontuação+0,41), TL (pontuação+1,07) e TC (pontuação+1,3) ($p \leq 0,05$).

Os diferentes perfis de TCO afetaram significativamente o YFBM durante o desenvolvimento embrionário (figura 13; $p \leq 0,05$). No dia 8, o tratamento TC apresentou um YFBM de 2,24 g, enquanto o tratamento TL teve um valor significativamente inferior, com uma diferença de 0,31 g. Os tratamentos TH e TVH apresentaram valores ligeiramente superiores a TC, mas sem diferença significativa.

Tabela 7 – Peso do ovo antes da incubação, pesos dos pintos, peso relativo de órgãos e escore de umbigo de recém-eclodidos que foram incubados em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia

Temperatura	Peso do ovo (g)	Pinto de 1 dia (g)		Peso de órgãos relativo ao YFBM (%)								Qualidade do umbigo ³
		Peso	YFBM	Coração	Fígado	Estôm. ¹	Intestino ²	Pulmões	Baço	Pâncreas	Bursa	
TL	64,55	46,24 ^a	41,56 ^a	0,85 ^a	3,29 ^a	5,86	4,30 ^a	0,92 ^b	0,041 ^b	0,19 ^a	0,12 ^b	1,68 ^c
TC	64,49	46,57 ^a	41,50 ^a	0,80 ^b	3,26 ^a	5,87	4,28 ^a	1,05 ^a	0,047 ^a	0,19 ^a	0,13 ^a	1,45 ^d
TH	64,51	44,36 ^b	37,76 ^b	0,70 ^c	2,75 ^b	5,75	3,76 ^b	0,92 ^b	0,027 ^c	0,16 ^b	0,09 ^c	2,34 ^b
TVH	64,58	44,16 ^b	35,95 ^c	0,68 ^c	2,40 ^c	5,71	3,51 ^c	0,82 ^c	0,027 ^c	0,17 ^b	0,09 ^c	2,75 ^a
SEM	0,100	0,153	0,327	0,010	0,053	0,027	0,047	0,012	0,001	0,002	0,003	0,072
P-valor	0,9913	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0621	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

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

YFBM: peso do pinto sem o saco vitelino – yolk free body mass).

¹ Estômago: proventrículo + moela.

² Intestino: intestino delgado + intestino grosso

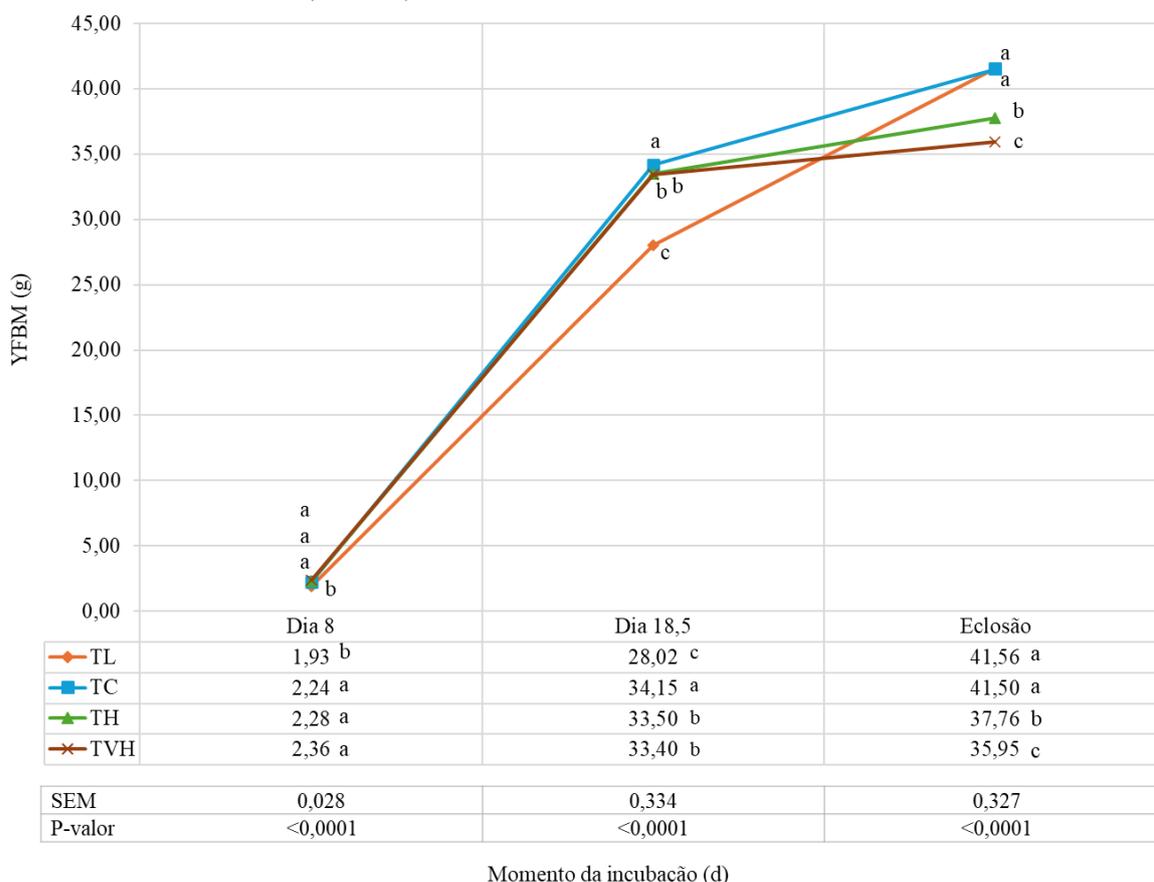
³ Condição de umbigo, onde: 1= boa, 2= moderada, 3= ruim.

SEM: erro padrão da média

n= 14 por tratamento.

Aos 18,5 dias, o YFBM foi menor em 6,13 g na TL; 0,65 g na TH e 0,75g na TVH quando comparado ao controle. No dia da eclosão, TL e TC tiveram os maiores valores de YFBM, sem diferença entre eles. O tratamento TH apresentou um valor significativamente inferior, registrando 3,74 g, enquanto o tratamento TVH mostrou uma diferença ainda mais acentuada, com 5,55 g, ambos em comparação ao controle (TC).

Figura 13 – Peso do pinto sem gema (YFBM, g) ao longo da incubação em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia

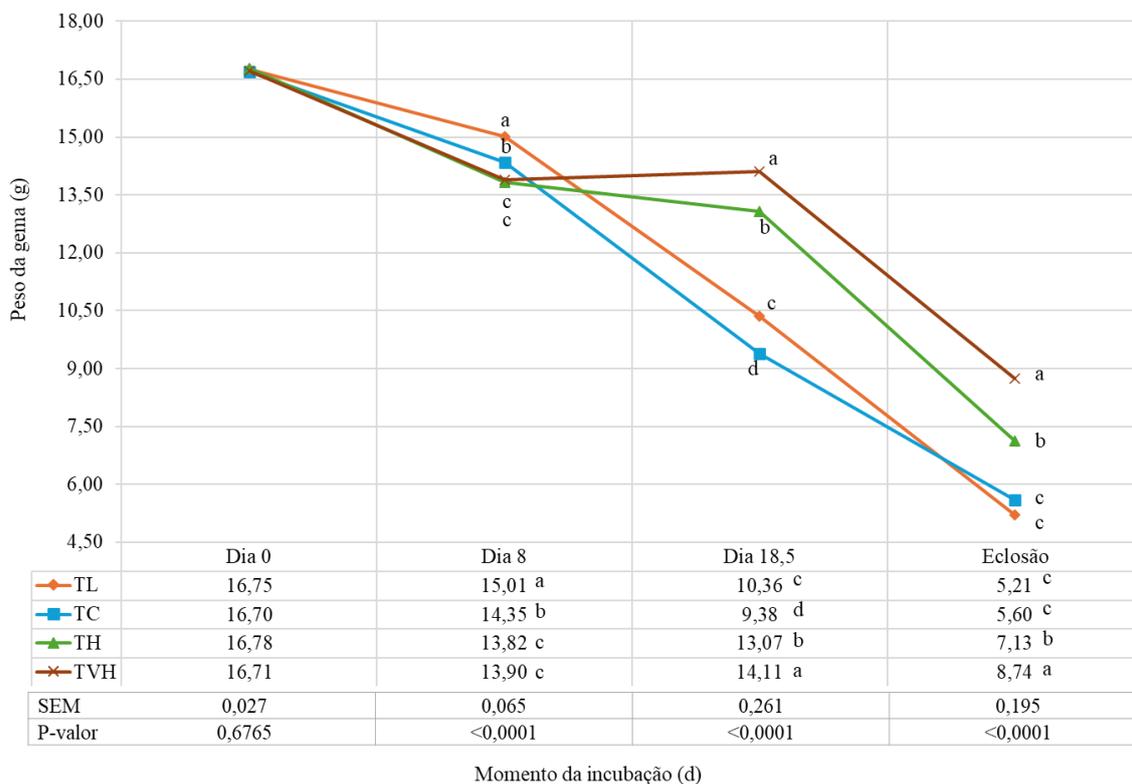


^{a,b} Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).
SEM: erro padrão da média
n= 14 por tratamento.

Ao longo da incubação, observou-se uma redução da gema/saco vitelino, com diferenças significativas entre os tratamentos térmicos a partir do 8º dia (figura 14; $p \leq 0,05$). No 8º dia, observou-se que TL apresentou +0,66 g de gema em relação ao controle, enquanto TH e TVH apresentaram -1,19 g e -1,11 g, respectivamente. Aos 18,5 dias, o tratamento controle apresentou o menor valor, com maior peso observado nas variações da TCO (TL: +0,98 g; TH: +3,69 g; TVH: +4,73 g). No dia da eclosão, TL apresentou semelhança estatística em relação

ao tratamento controle, enquanto TH e TVH exibiram valores maiores de +1,53 g e +3,14 g, respectivamente.

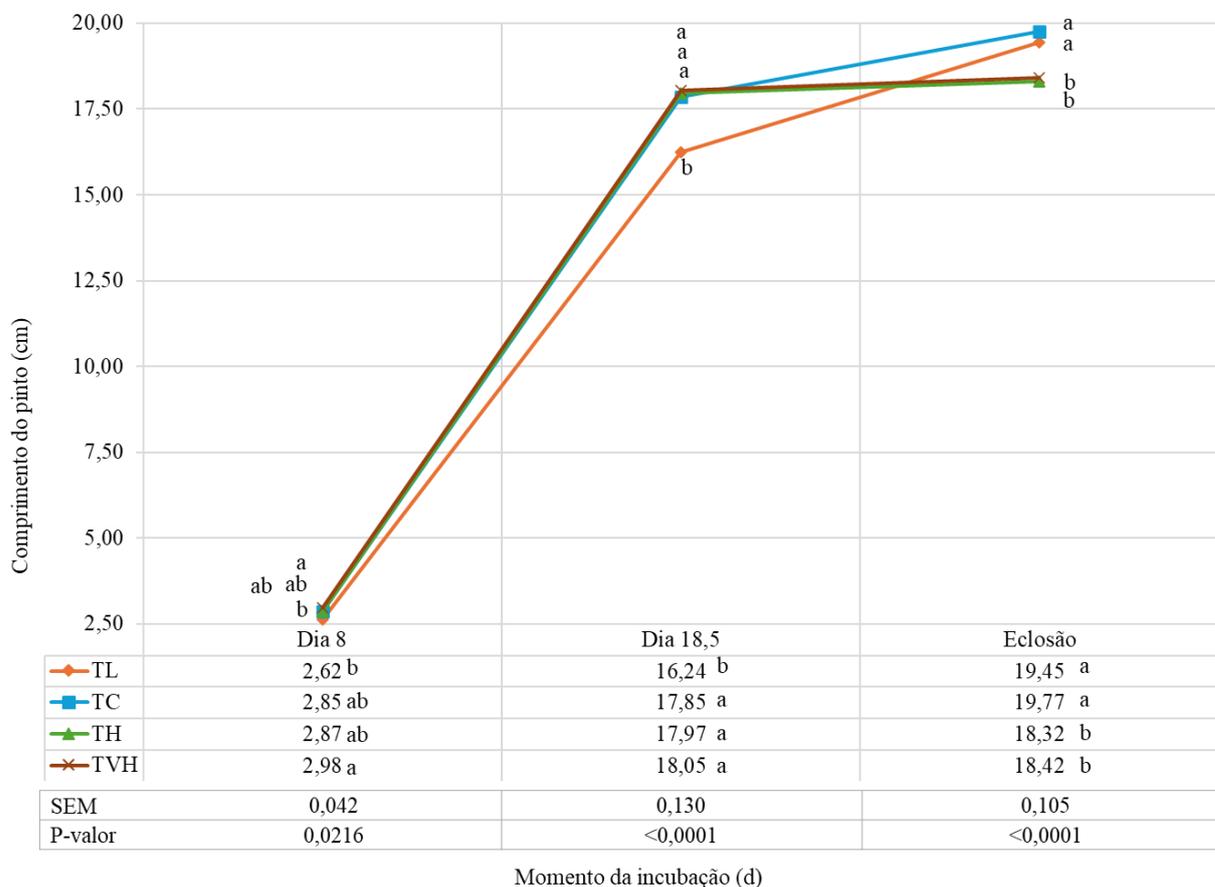
Figura 14 – Peso da gema (g) ao longo da incubação em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia



^{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
n= 14 por tratamento.

O comprimento do pintinho também foi significativamente influenciado pela temperatura durante a incubação (figura 15; $p \leq 0,05$). No 8º dia, a TVH apresentou um comprimento significativamente maior em comparação com a TL. As temperaturas TH e TC não mostram diferenças significativas entre si. Aos 18,5 dias, o comprimento na TL foi menor (-1,61 cm) em comparação ao controle, enquanto as temperaturas TH e TVH apresentaram comprimentos maiores que TL e não diferiram do controle. Na eclosão, o comprimento do pinto na TC e TL foram significativamente maiores do que nas TH e TVH.

Figura 15 – Comprimento do pinto (cm) ao longo da incubação em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º 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
n= 14 por tratamento.

No trabalho atual, os pesos dos ovos antes da incubação não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, confirmando a eficácia da randomização e garantindo que as variações observadas durante a incubação fossem atribuídas exclusivamente aos tratamentos aplicados.

Embora o peso do ovo tenha uma relação positiva com o peso do pintinho ao nascer, os resultados deste estudo revelaram que, sob condições de TH e TVH, os pintos apresentaram peso ao nascer significativamente reduzido. Possivelmente, a desidratação acentuada dos embriões expostos a altas temperaturas, levou a uma maior perda de água e, conseqüentemente, à redução do peso dos pintos ao nascer (Meijerhof, 2009; Cruz *et al.*, 2020). Essa desidratação foi confirmada pela maior perda de peso dos ovos observada nos tratamentos com temperaturas alta e muito alta.

O YFBM é um parâmetro de qualidade que reflete a eficiência com que o pintinho converte os nutrientes da gema em tecido corporal (Lourens *et al.*, 2007; Molenaar *et al.*, 2011; Van der Pol *et al.*, 2014; Van Der Wagt *et al.*, 2020). A eficiente absorção da gema, mediada pela membrana do saco vitelínico (MSV), é crucial para o desenvolvimento saudável, atuando na transferência de nutrientes para a corrente sanguínea e como membrana respiratória primária no início do desenvolvimento (Deeming; Ferguson, 1991).

Temperaturas mais altas, como observado nos tratamentos TH e TVH, tendem a aumentar a taxa metabólica do embrião, acelerando o processo de incubação e reduzindo o tempo disponível para o desenvolvimento (Oliveira *et al.*, 2008; Molenaar *et al.*, 2013). Esse aumento na taxa metabólica sob condições de altas temperaturas também está associado à intensificação da degradação da glicose, o que leva à redução das reservas glicogênicas (Moran Jr, 2007). A limitação de precursores de glicose pode levar o embrião a buscar rotas alternativas para a produção desse componente, forçando-o a utilizar aminoácidos como fonte de energia por meio da gliconeogênese, em vez de direcioná-los para o crescimento e formação estrutural. Como resultado, os embriões incubados a temperaturas mais altas apresentaram menor YFBM e maior peso de saco vitelino residual, sugerindo uma absorção menos eficiente dos nutrientes e comprometimento no desenvolvimento (Joseph *et al.*, 2006; Molenaar *et al.*, 2013; Maatjens *et al.*, 2014a).

O maior peso do saco vitelino indica uma absorção insuficiente de nutrientes. Temperaturas inadequadas (TH e TVH) podem comprometer a eficiência dessa absorção, possivelmente devido a alterações na vascularização da MSV (Lin *et al.*, 2017) e na expressão de genes essenciais para o transporte de nutrientes (Barri *et al.*, 2011).

Por outro lado, as temperaturas de casca baixa (TL) e controle (TC) parecem favorecer uma absorção mais eficiente dos nutrientes, refletida em um menor peso de saco vitelino residual e maior YFBM. Isso indica que as condições térmicas mais moderadas permitem um desenvolvimento embrionário mais equilibrado, sem o estresse metabólico causado por temperaturas excessivas, resultando em pintos mais saudáveis e com maior peso corporal ao nascer (Molenaar *et al.*, 2013; Maatjens *et al.*, 2014b).

De acordo com Decuyper e Bruggeman (2007), é geralmente aceito que um pintinho de 1 dia de idade apresente umbigo completamente fechado e limpo, além da ausência do saco vitelino ou de membranas secas que sobressaem da área do umbigo.

A análise da qualidade do umbigo no dia da eclosão revelou que TH e TVH reduziram de forma mais pronunciada a qualidade em comparação a TC. O aumento no peso do saco vitelino, especialmente em temperaturas elevadas, indica que os embriões não conseguiram

incorporar adequadamente o saco residual de gema na cavidade abdominal, o que resultou em um fechamento incompleto do umbigo (Piestun *et al.*, 2008a). No geral, em temperaturas baixas, o metabolismo mais lento resulta em um desenvolvimento embrionário menos eficiente, o que atrasa a absorção dos nutrientes do saco vitelino e pode levar ao acúmulo de material não absorvido, culminando no fechamento incompleto do umbigo. O fechamento inadequado aumenta o risco de infecções nos primeiros dias de vida, comprometendo a viabilidade e o desempenho dos pintinhos (Tona *et al.*, 2003). No entanto, no nosso estudo, os resultados foram opostos ao esperado, com um desenvolvimento eficiente nos embriões sob o tratamento TL. O perfil de incubação com aumento gradual de temperatura demonstrou benefícios, resultando em uma melhor absorção dos nutrientes do saco vitelino. Isso foi comprovado pelos valores superiores de YFBM e peso de gema, favorecendo um fechamento umbilical adequado e maior viabilidade dos pintos.

O comprimento do pintinho ao longo da incubação reflete tanto o crescimento físico quanto o impacto das condições de incubação sobre o embrião. Essa medida é útil não apenas para monitorar o desenvolvimento imediato, mas também para prever o desempenho futuro do pintinho, uma vez que apresenta alta correlação com o peso do frango aos 42 dias (Hill *et al.*, 2001; Molenaar *et al.*, 2011). No 8º dia de incubação, o tratamento TVH resultou em um comprimento maior em comparação com TL, indicando que o aumento na TCO pode acelerar o crescimento inicial do embrião devido à maior taxa metabólica (Lourens *et al.*, 2007).

Aos 18,5 dias de incubação, o comprimento do pintinho foi menor em TL comparado aos demais tratamentos, indicando que temperaturas mais baixas podem estar associadas a um desenvolvimento mais lento (Black; Burggren, 2004; Lourens *et al.*, 2005; Joseph *et al.*, 2006). Em contraste, TH e TVH apresentaram comprimentos semelhantes ao controle, sugerindo que temperaturas elevadas podem sustentar um maior crescimento até essa fase. Na eclosão, o comprimento do pintinho em TC foi significativamente maior que em TH e TVH. Isso sugere que, embora temperaturas mais altas promovam crescimento inicial mais rápido, elas não resultam em maior comprimento final, possivelmente devido ao esgotamento energético ou ao estresse térmico prolongado (Romanoff, 1960; Lourens *et al.*, 2007; Molenaar *et al.*, 2011; Maatjens *et al.*, 2014a). A similaridade entre TL e TC no comprimento final indica que, apesar de retardar o crescimento, temperaturas mais baixas não prejudicaram o comprimento final e assim foi observado com as outras variáveis nas figuras 13 e 14.

Embora o tratamento TL tenha atrasado o tempo de eclosão em comparação com os tratamentos TH e TVH, esse atraso não comprometeu os resultados finais. Pelo contrário, os embriões submetidos ao perfil térmico TL apresentaram parâmetros positivos no final do

processo. O aumento gradual da temperatura permitiu uma adaptação fisiológica eficiente, resultando em valores superiores de YFBM, peso de gema/saco vitelino e comprimento de pintinhos. Dessa forma, observou-se uma compensação ao final, especialmente na análise do dia de eclosão, com resultados favoráveis.

As temperaturas de casca mais altas, especialmente no tratamento de temperatura de casca muito alta (TVH), apresentaram um efeito negativo generalizado no desenvolvimento dos órgãos dos pintos, resultando em pesos reduzidos em comparação com temperaturas mais baixas ou normais. Na literatura, é bem documentado que temperaturas elevadas durante a incubação afetam negativamente o desenvolvimento dos órgãos (Leksrisompong *et al.*, 2007; Maatjens *et al.*, 2014a; Van Den Brand *et al.*, 2021).

Com relação ao peso do coração, altas temperaturas reduzem o índice mitótico, prejudicam a proliferação e o desenvolvimento das células musculares cardíacas, elevam a taxa metabólica embrionária e aumentam a demanda de oxigênio, sobrecarregando o coração para manter o fluxo sanguíneo necessário ao crescimento de outros órgãos (Maatjens *et al.*, 2014a). O peso do fígado pode ter reduzido devido ao esgotamento mais rápido das reservas de glicogênio causado pelo aumento da taxa metabólica em condições de alta temperatura. Segundo Christensen *et al.* (2003b), o estresse térmico sobrecarrega o fígado, dificulta o crescimento celular e compromete suas funções metabólicas. Os resultados obtidos no estudo de Van der Pol *et al.* (2014), embora aplicado em período diferente, reforçam a relevância dos dados apresentados nesta pesquisa, ao demonstrar que temperaturas elevadas durante toda a incubação, especificamente uma TCO de 39,4°C, podem reduzir os pesos do coração e do fígado.

A redução no peso do intestino também pode ser atribuída ao estresse térmico e ao impacto negativo de temperaturas elevadas no desenvolvimento embrionário. Altas temperaturas prejudicam o crescimento e a função do intestino, afetando a absorção de nutrientes e comprometendo a digestão (Joseph *et al.*, 2006; Willemsen *et al.*, 2010; Ipek *et al.*, 2014; Maatjens *et al.*, 2017). Além disso, a alta temperatura pode interferir na diferenciação celular e na formação das estruturas intestinais, além de impactar a colonização da microbiota intestinal, essencial para a saúde digestiva (Lourens *et al.*, 2005; Molenaar *et al.*, 2011).

A redução no peso do baço e da bursa encontrada em TCO baixa (TL) e mais acentuada em TCO altas (TH e TVH) indica que alterações na temperatura podem comprometer o desenvolvimento do sistema imunológico dos pintinhos. O baço e a bursa de Fabricius são cruciais para a maturação e a função das células imunológicas, e um desenvolvimento inadequado desses órgãos pode resultar em uma resposta imunológica debilitada, tornando os

pintinhos mais suscetíveis a infecções e doenças (Wijnen *et al.*, 2020). Estes dados estão em concordância com estudo de Sözcü *et al.* (2022), que também observaram redução nos pesos do coração, fígado, intestino, baço e da bursa ao utilizar TCO de 38,9°C entre os dias 4 à 7 de incubação.

Quanto a redução no peso dos pulmões, em temperaturas baixas, a desaceleração do metabolismo limita o crescimento dos pulmões. Em contraste, temperaturas altas e muito altas induzem o estresse térmico, que pode favorecer ao catabolismo, uma vez que o organismo começa a degradar os nutrientes armazenados para obter energia, comprometendo processos como a proliferação celular e o desenvolvimento pulmonar, prejudicando a eficiência respiratória (Oliveira *et al.*, 2008; Molenaar *et al.*, 2013; Maatjens *et al.*, 2014a).

A diminuição do peso do pâncreas observada em TH e TVH pode ser atribuída a alterações metabólicas que prejudicam a formação desse órgão vital. Isso afeta a capacidade digestiva e a absorção de nutrientes, uma vez que o pâncreas é responsável pela produção de enzimas digestivas essenciais. Como resultado, a eficiência alimentar dos pintinhos pode ser reduzida, impactando seu crescimento e saúde geral, além de comprometer a função endócrina do pâncreas (Maltby; Stickland, 2003; Lourens *et al.*, 2005).

A ausência de diferenças significativas no peso do estômago entre as diferentes temperaturas de incubação sugere que este órgão foi menos sensível às variações térmicas durante a incubação em comparação com outros órgãos vitais.

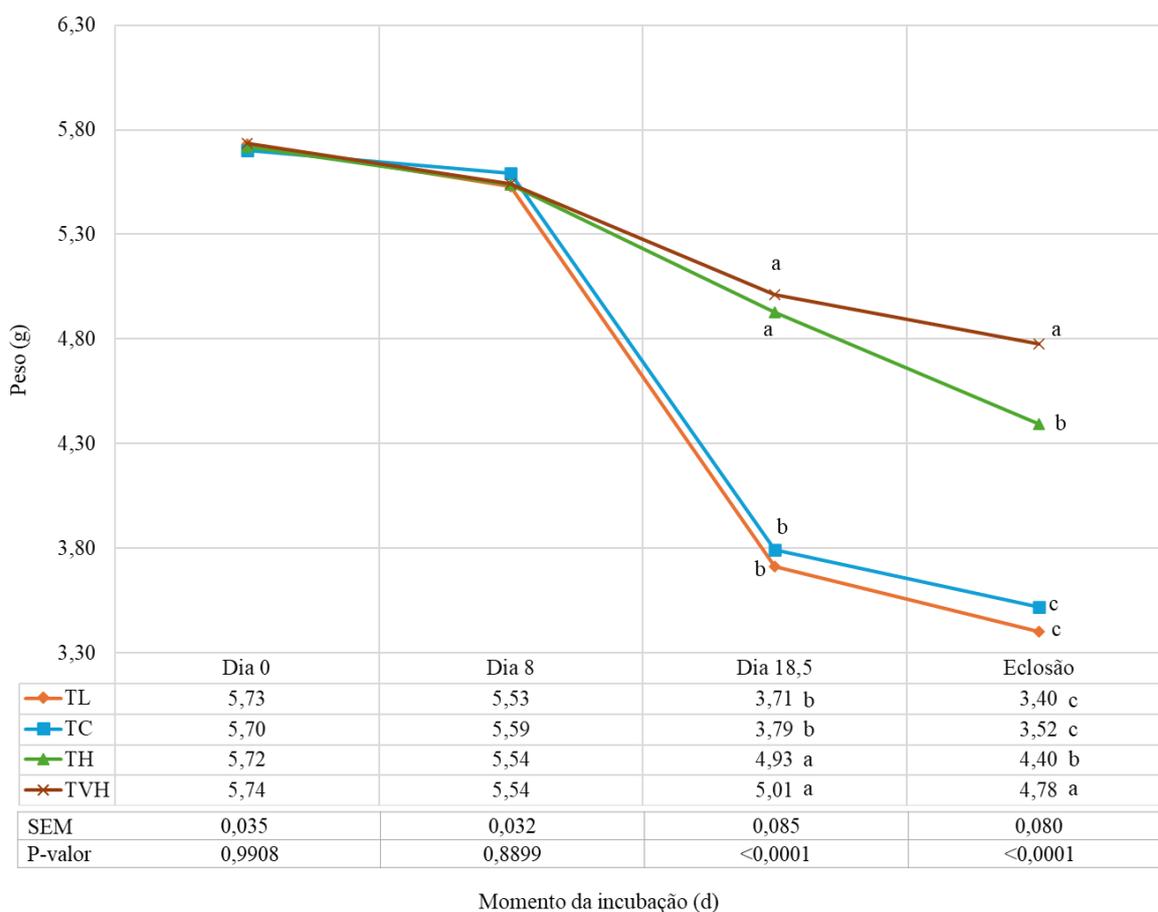
No entanto, esses resultados diferem de outros estudos, como o de Joseph *et al.* (2006), que observaram pesos reduzidos dos órgãos, incluindo o estômago, quando os embriões foram incubados a uma temperatura baixa (36,6°C) durante os primeiros dias. Por sua vez, Van der Pol *et al.* (2014) relataram uma redução no peso do estômago sob uma TCO muito alta (39,4°C). As discrepâncias entre esses estudos podem ser atribuídas as diferenças nas condições experimentais, como o período, a duração da exposição a temperaturas extremas e as metodologias utilizadas, o que destaca a complexidade das respostas embrionárias às variações térmicas.

As temperaturas de casca ovo alta (TH) e muito alta (TVH) resultaram em uma qualidade inferior dos pintinhos, evidenciada por menor comprimento, menor YFBM, maior peso residual de gema, e piores pontuações de umbigo. Adicionalmente, houve uma redução significativa no peso de órgãos vitais, comprometendo não apenas a embriogênese, mas também a sobrevivência e o desempenho dos pintinhos na fase pós-eclosão. O tratamento TVH, em particular, apresentou os piores resultados entre as variáveis analisadas.

4.2 Parâmetros de casca e gema

As figuras 16 a 21 apresentam os resultados das variáveis mensuradas na casca do ovo (peso, espessura e teores de Ca, P, Mn e Mg). Quanto ao efeito dos tratamentos aplicados, verificou-se que a TCO influenciou significativamente o peso da casca a partir do 18,5º dia de incubação (figura 16; $p \leq 0,05$). Aos 18,5 dias, os tratamentos TH e TVH apresentaram valores superiores de +1,14 g e +1,22 g, respectivamente, em comparação com o controle (TC), enquanto TL foi semelhante ao TC. Na eclosão, TL manteve dados estatisticamente semelhantes a TC, enquanto TH e TVH evidenciaram valores superiores de +0,88 g e +1,26 g, nessa ordem.

Figura 16 – Peso da casca (g) ao longo da incubação em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia



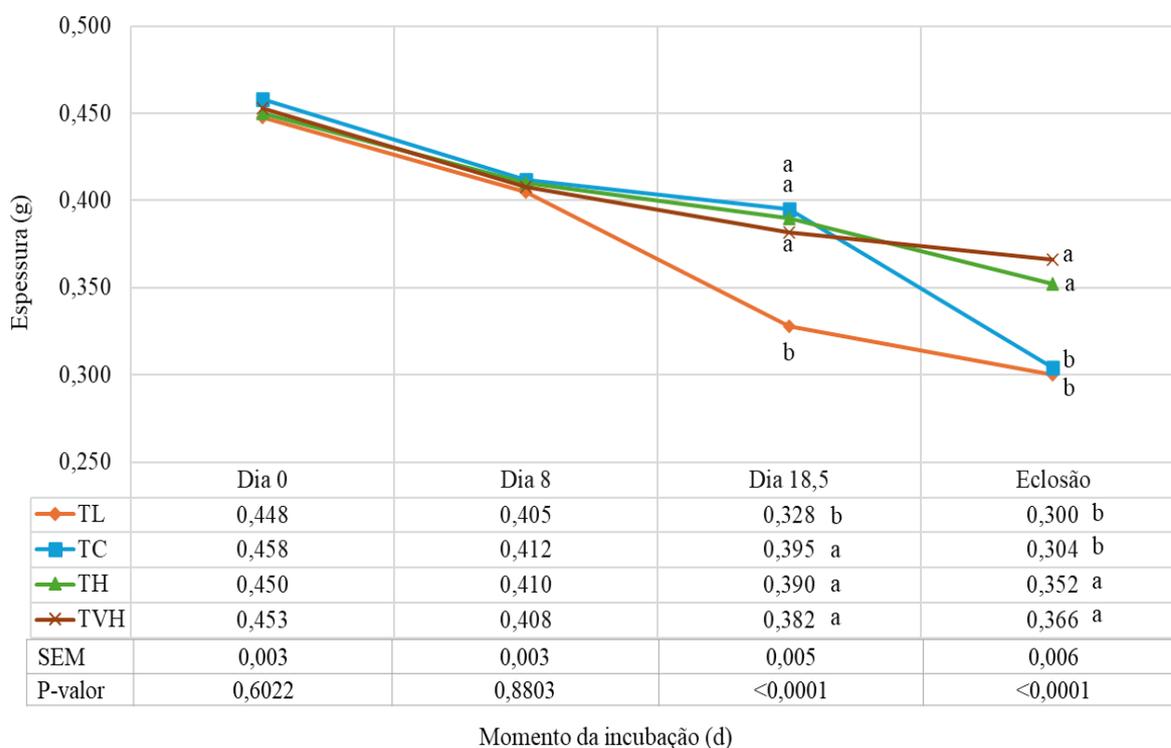
^{a,b} Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

SEM: erro padrão da média

n= 14 por tratamento.

Para a espessura da casca (figura 17), aos 18,5 dias, os tratamentos TH e TVH apresentaram espessuras de casca semelhantes ao controle (TC), enquanto TL teve a menor espessura entre os tratamentos. Na eclosão, TL e TC não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$), enquanto TH e TVH demonstraram espessuras maiores que TC e TL, com diferenças de +0,048 g e +0,062 g, respectivamente ($p \leq 0,05$) em comparação ao controle.

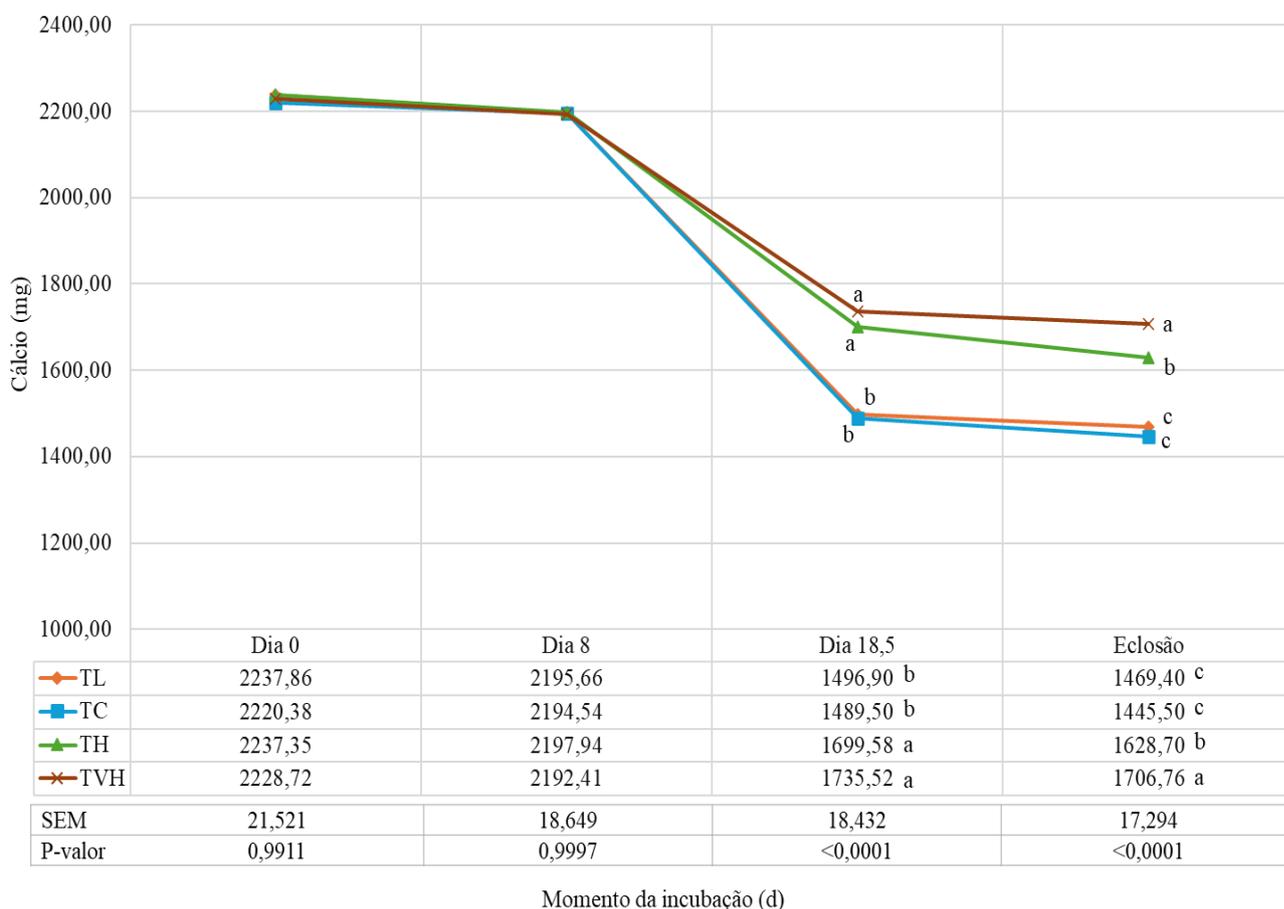
Figura 17 – Espessura da casca (g) ao longo da incubação em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia



^{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
n= 14 por tratamento.

Verificou-se que a TCO influenciou significativamente o teor de cálcio da casca (figura 18) a partir do 18,5º dia de incubação ($p \leq 0,05$). Aos 18,5 dias, os tratamentos TH e TVH apresentaram teores de cálcio superiores que TC e TL, sendo TC e TL semelhantes entre si. Na eclosão, TVH teve o maior valor de cálcio (+261,26 mg) seguido de TH (+183,20 mg) em relação ao controle. TC e TL tiveram valores semelhantes.

Figura 18 – Teor de cálcio (mg) da casca ao longo da incubação em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º 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
n= 14 por tratamento.

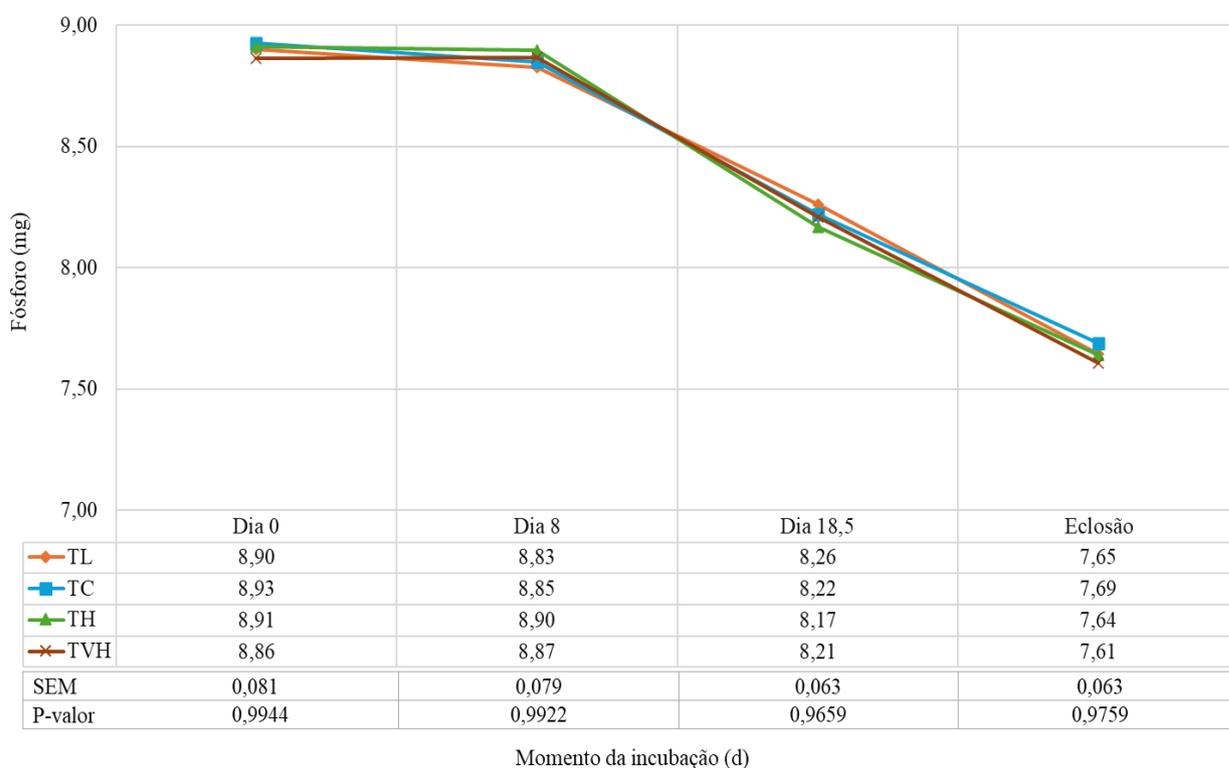
Ocorreu uma redução no teor de fósforo (figura 19) presente na casca do ovo conforme a incubação avançou, independente do tratamento. Ademais, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ($p > 0,05$).

O teor de manganês da casca (figura 20) ao longo da incubação apresentou um comportamento semelhante ao do fósforo. Os diferentes perfis de TCO não tiveram impacto significativo na perda de manganês, demonstrando que a redução desse mineral foi consistente, independentemente das variações térmicas aplicadas ($p > 0,05$).

Para o teor de magnésio da casca (figura 21), na mensuração do dia 18,5 de incubação, as diferenças entre os tratamentos foram evidentes ($p \leq 0,05$). Os tratamentos com temperaturas mais elevadas, TH (+2,13 mg) e TVH (+2,27 mg), apresentaram teores de magnésio

significativamente maiores em comparação ao controle (TC). Essa tendência persistiu até o dia da eclosão, onde TH (+1,97 mg) e TVH (+2,79 mg) continuaram a apresentar teores mais elevados. O tratamento TL apresentou um comportamento semelhante ao controle (TC) em ambos os momentos avaliados.

Figura 19 – Teor de fósforo (mg) da casca ao longo da incubação em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia



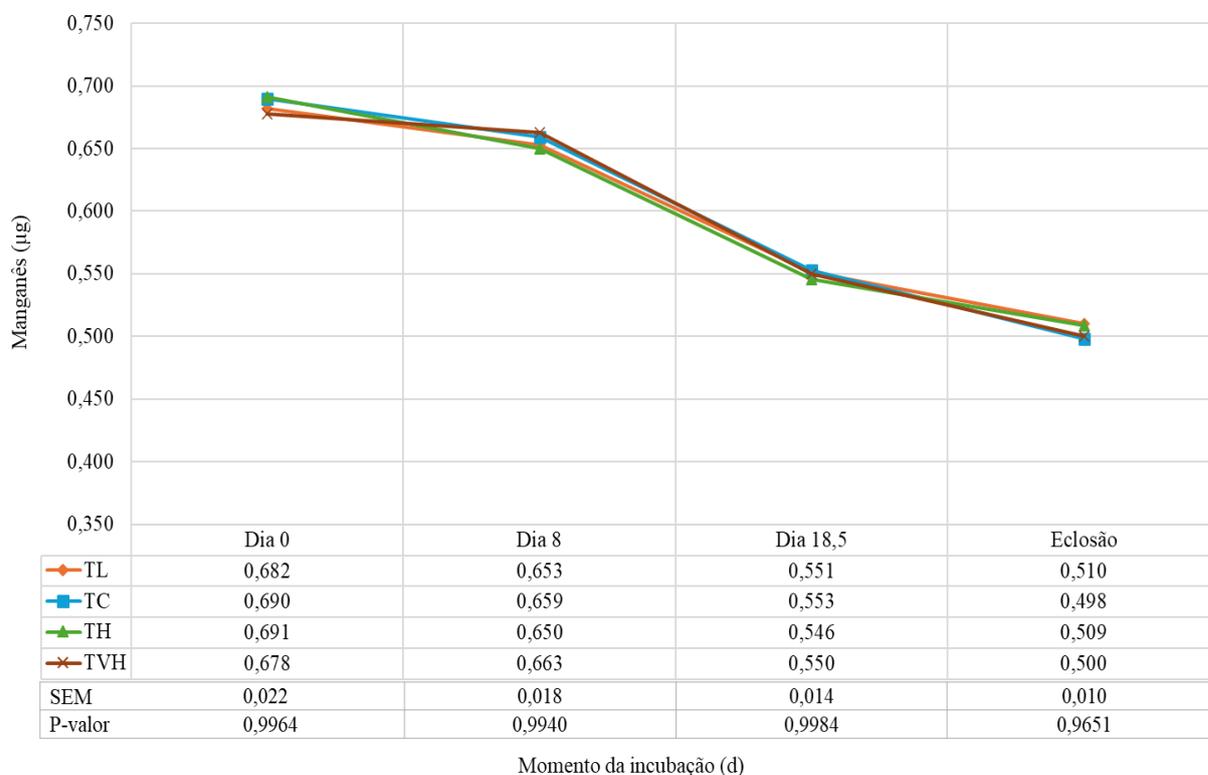
^{a,b} Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

SEM: erro padrão da média

n= 14 por tratamento.

Durante a incubação, o embrião utiliza os nutrientes e minerais armazenados no ovo, causando a redução natural da espessura e do peso da casca. O cálcio é mobilizado a partir da casca do ovo e direcionado para o crescimento e desenvolvimento do esqueleto embrionário. Esse processo também enfraquece a casca, facilitando seu rompimento no momento da eclosão (Romanoff, 1960; Tuan; Ono, 1986; Peebles *et al.* 2001; Abdel-Salam *et al.*, 2006; Barbosa, 2011; Halgrain *et al.*, 2022).

Figura 20 – Teor de manganês (μg) da casca ao longo da incubação em temperatura de casca baixa – TL ($36,7^\circ\text{C}$), controle – TC ($37,8^\circ\text{C}$), alta – TH ($38,9^\circ\text{C}$) e muito alta – TVH ($39,4^\circ\text{C}$) do 0º ao 8º dia



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

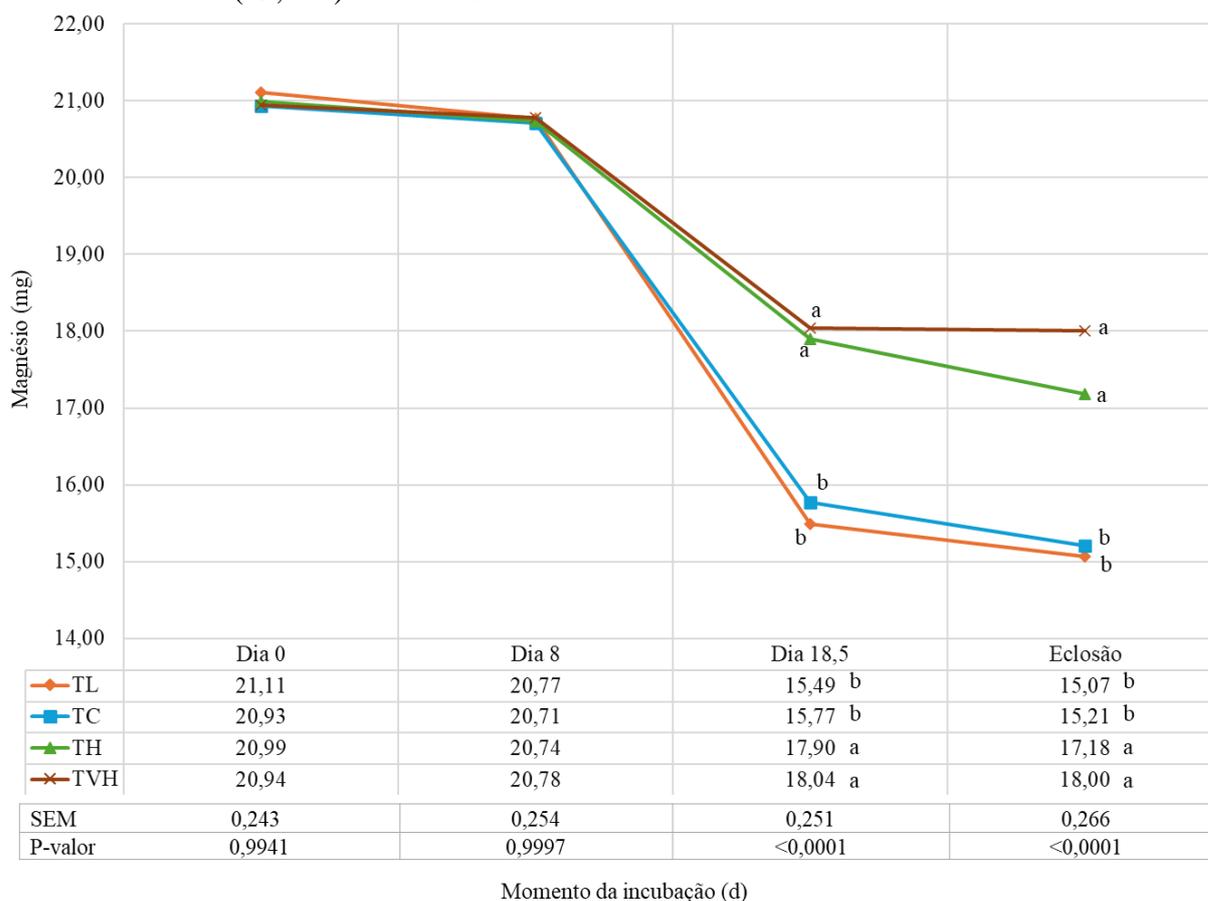
SEM: erro padrão da média

n= 14 por tratamento.

Os resultados indicaram que os tratamentos com TCOs elevadas (TH e TVH), impactaram significativamente a mobilização de cálcio e magnésio da casca para o embrião, aumentando a retenção desses minerais na casca e, conseqüentemente, em um maior peso e espessura da mesma. Esses achados são corroborados pela literatura, com Azevedo (2022) encontrando resultados semelhantes para a alta temperatura ($39,4^\circ\text{C}$), demonstrando claramente que temperaturas elevadas prejudicam a utilização de minerais da casca.

A casca do ovo é a principal fonte de cálcio, e sua solubilização é mediada pela ação da enzima anidrase carbônica, liberada pela MCA, que facilita a mobilização de cálcio para o embrião (Tuan; Zrike, 1978; Gabrielli; Accili, 2010; Torres; Korver, 2018; Halgrain *et al.*, 2022). No entanto, temperaturas elevadas parecem comprometer a eficiência desse processo, reduzindo a mobilização do mineral e resultando em um aumento na retenção de cálcio na casca. De maneira semelhante, o magnésio, que também é mobilizado a partir da casca, apresentou teores elevados, indicando que, assim como o cálcio, sua utilização pelo embrião foi comprometida (Yair; Uni, 2011).

Figura 21 – Teor de magnésio (mg) da casca ao longo da incubação em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º 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
n= 14 por tratamento.

A casca do ovo, ao servir como fonte primária desses minerais para o embrião, deveria sofrer um afinamento progressivo à medida que os minerais são retirados para a formação do esqueleto embrionário. Entretanto, a menor redução na espessura nos grupos de alta temperatura indica que o cálcio e o magnésio não foram eficientemente utilizados pelo embrião, permanecendo na casca (Romanoff; Romanoff, 1967).

As condições de TH e TVH podem ter causado alterações no funcionamento do sistema de transporte de minerais, especialmente na MCA e MSV (Gabrielli; Accili, 2010). Temperaturas elevadas durante o início da incubação (38,1°C) até o quinto dia, provocaram um aumento significativo na vascularização da MCA e MSV (Lin *et al.*, 2017). Conforme os autores citados, essa maior vascularização é uma resposta adaptativa do embrião para melhorar a troca de gases e o transporte de nutrientes em um ambiente de maior demanda metabólica devido à elevação da temperatura.

O aumento da vascularização durante a incubação, embora inicialmente benéfico, pode sobrecarregar o sistema e comprometer a eficiência de outros processos vitais. Esse excesso de vascularização pode alterar o equilíbrio ácido-base, a ação da anidrase carbônica, dificultando a dissolução da casca e, conseqüentemente, a mobilização de minerais essenciais, como o cálcio (Stewart; Terepka, 1969; Gabrielli *et al.*, 2001; Halgrain *et al.*, 2022).

Temperaturas extremas durante a incubação também podem influenciar negativamente a expressão de genes relacionados ao transporte de nutrientes e à atividade da MCA e da MSV (Barri *et al.*, 2011). No entanto, ainda existem lacunas na compreensão completa desse processo, pois os genes envolvidos na mobilização de minerais e outros conteúdos da casca não foram todos identificados (Gabrielli; Accili, 2010; Halgrain *et al.*, 2022).

Podemos destacar também a influência da vitamina D₃ nos resultados observados. A vitamina D₃ atua no transporte e na absorção de cálcio da casca para a gema (Richards; Steele, 1987; Oliveira *et al.*, 2015). A redução nos níveis de vitamina D₃ em condições de temperatura muito alta (TVH), pode estar diretamente relacionada ao aumento do peso e da espessura da casca, além do maior teor de cálcio retido na casca. A menor disponibilidade de vitamina D₃ compromete a eficiência desse transporte, resultando em uma absorção inadequada de cálcio pelo embrião, que permanece na casca e contribui para os resultados observados em TVH. Este experimento teve esses resultados para a vitamina D₃, os quais serão discutidos em detalhes posteriormente.

Os resultados referentes ao fósforo e ao manganês indicam que a mobilização desses minerais não foi significativamente afetada pelas variações da TCO. Estudos anteriores, destacam que a gema contém a maior parte dos minerais essenciais necessários para o desenvolvimento embrionário, incluindo fósforo e manganês. Esses minerais são mobilizados da gema para o embrião conforme suas necessidades de crescimento, desempenhando papéis cruciais na formação da matriz óssea e no desenvolvimento de tecidos moles (Romanoff; Romanoff, 1967; Richards, 1997).

Yair *et al.* (2015) reforçam essa visão, afirmando que, devido à predominância desses minerais na gema, as variações na temperatura da casca não afetaram sua utilização. Dessa forma, a constância na disponibilidade de fósforo e manganês, independentemente das condições térmicas, pode ser atribuída à sua principal origem na gema, confirmando que a casca exerce um papel secundário na provisão desses minerais.

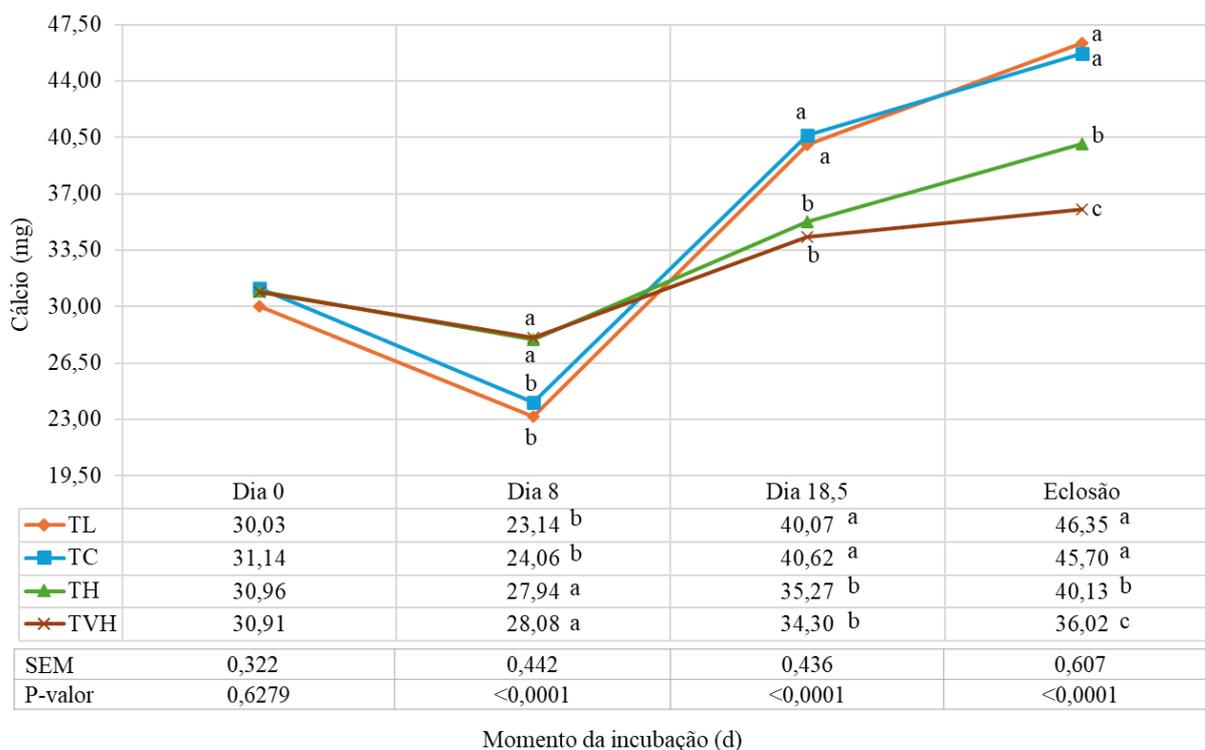
Os nossos achados evidenciaram que temperaturas elevadas durante a incubação comprometem a mobilização de cálcio e magnésio da casca para o embrião, resultando em maior retenção desses minerais na casca e aumento de sua espessura. Esse processo, aliado à

menor eficiência no transporte mediado pela anidrase carbônica, prejudica o desenvolvimento ósseo. A redução nos níveis de vitamina D₃ em altas temperaturas também agrava a menor absorção de cálcio, destacando a importância das condições térmicas no equilíbrio mineral durante a incubação.

As concentrações de minerais na gema do ovo (Ca, P, Mn e Mg), analisadas ao longo do período de incubação, estão representadas nas figuras 22 a 25.

A partir do 8º dia de incubação, o teor de cálcio (figura 22) da gema começou a mostrar diferenças significativas entre os tratamentos ($p \leq 0,05$). Nesse ponto, observou-se uma redução geral no cálcio da gema, com os tratamentos TH e TVH mantendo teores mais elevados em comparação a TL e TC. No 18,5º dia, houve um aumento no teor de cálcio em todos os tratamentos, com TL e TC destacando-se por suas maiores concentrações, enquanto TH e TVH apresentaram valores mais baixos. Na eclosão, essa tendência se manteve, com TL e TC exibindo os teores mais altos de cálcio, ao passo que TH e TVH apresentaram os menores valores.

Figura 22 – Teor de cálcio (mg) da gema ao longo da incubação em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia

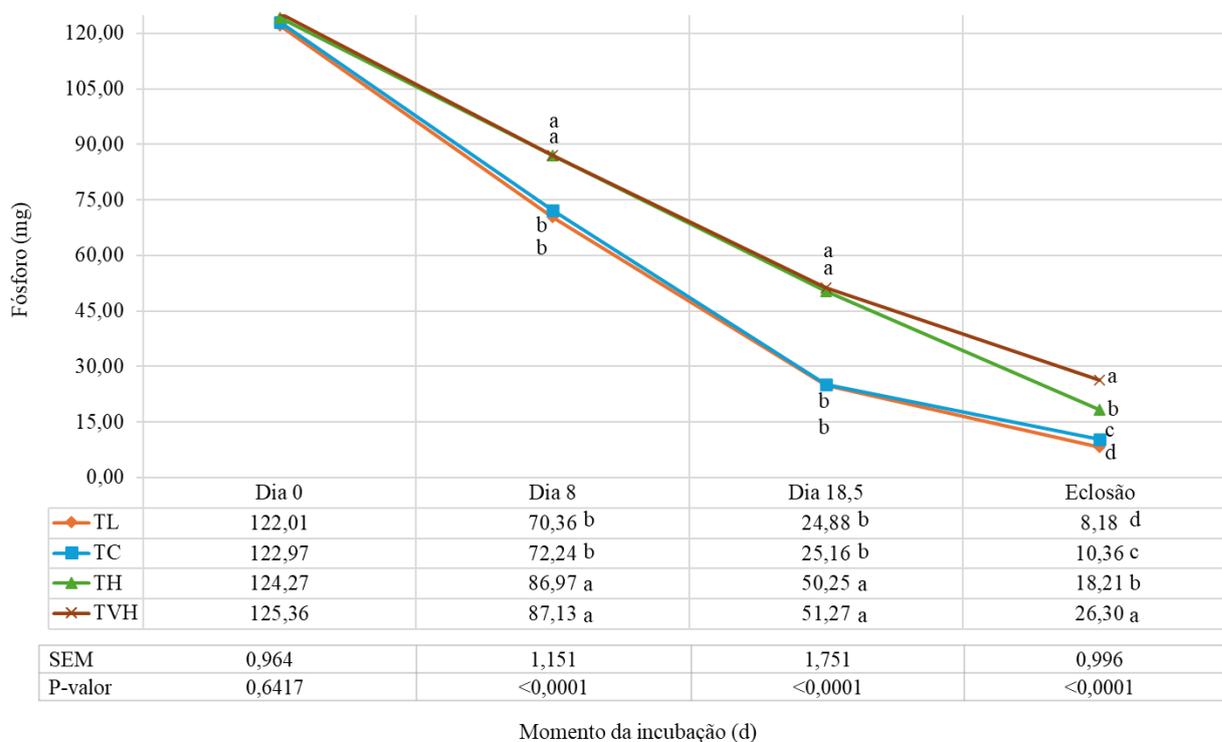


^{a,b} Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).
SEM: erro padrão da média
n= 14 por tratamento.

Assim como no teor de cálcio, a análise do teor de fósforo (figura 23) da gema durante a incubação mostrou variações significativas entre os tratamentos a partir da segunda semana ($p \leq 0,05$).

No 8º dia de incubação, as temperaturas mais altas (TH e TVH) resultaram em teores superiores de fósforo em comparação a TL e TC, indicando uma mobilização mais lenta desse mineral nesses grupos. No 18,5º dia, essa tendência se manteve, com TH e TVH apresentando teores superiores em relação a TL e TC. Na eclosão, as diferenças se acentuaram ainda mais: TL apresentou o menor teor de fósforo (8,18 mg), enquanto TC foi superior em +2,18 mg em relação a TL. Em comparação ao TC, os tratamentos TH e TVH mostraram aumentos ainda mais expressivos, de +7,85 mg e +15,94 mg, respectivamente. Esses resultados indicam que as temperaturas mais altas (TH e TVH) promoveram uma maior retenção de fósforo ao longo da incubação, contrastando com as temperaturas mais baixas (TL e TC), que favoreceram uma mobilização mais acentuada desse mineral.

Figura 23 – Teor de fósforo (mg) da gema ao longo da incubação em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia



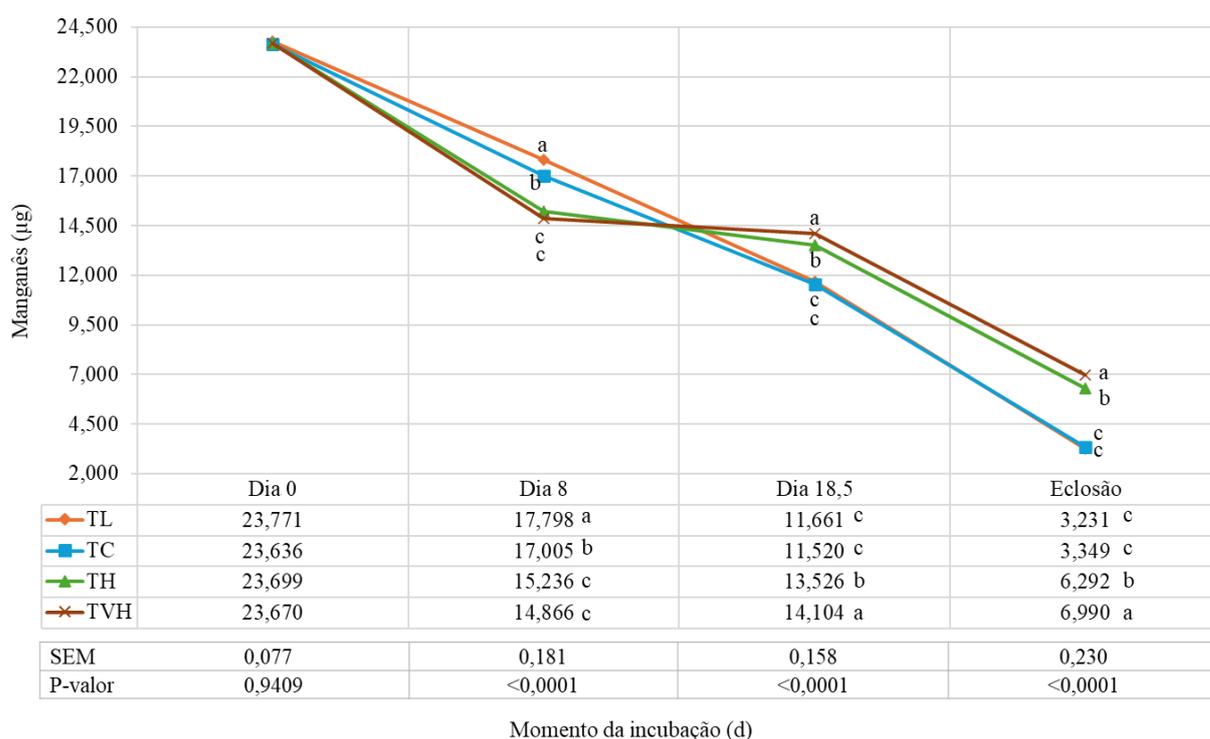
^{a,b} Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

SEM: erro padrão da média
n= 14 por tratamento.

A análise do teor de manganês (figura 24) da gema ao longo da incubação, também revelou variações significativas entre os tratamentos, especialmente a partir do 8º dia ($p \leq 0,05$).

Aos 8 dias de incubação, todos os tratamentos mostraram uma diminuição no teor de manganês na gema, com TL e TC mantendo valores mais altos, enquanto TH e TVH apresentaram reduções mais acentuadas. No entanto, essa tendência se inverteu no 18,5º dia, onde TH e TVH apresentaram maiores concentrações de manganês em relação a TL e TC. Na eclosão, essa inversão se acentuou, com TL e TC registrando os menores teores de manganês, enquanto TH e TVH mantiveram teores significativamente mais altos. Esses resultados indicam que, apesar das temperaturas mais baixas inicialmente favorecerem a retenção de manganês na gema, as temperaturas mais altas resultaram em uma maior retenção do mineral até o final da incubação.

Figura 24 – Teor de manganês (μg) da gema ao longo da incubação em temperatura de casca baixa – TL ($36,7^\circ\text{C}$), controle – TC ($37,8^\circ\text{C}$), alta – TH ($38,9^\circ\text{C}$) e muito alta – TVH ($39,4^\circ\text{C}$) do 0º ao 8º 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

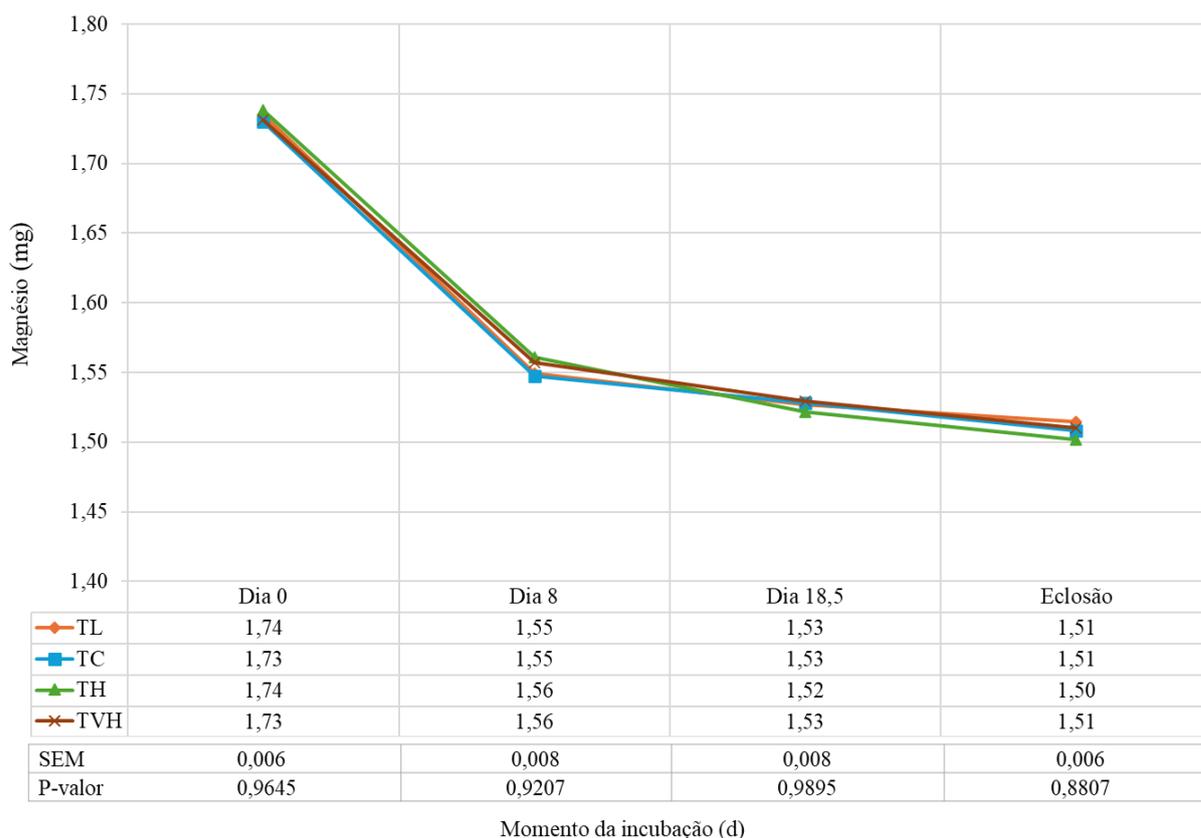
n= 14 por tratamento

A análise do teor de magnésio da gema (figura 25) ao longo da incubação demonstrou uma redução geral nos valores. Desde o dia 0 até a eclosão, os teores de magnésio caíram cerca de 1,74 mg para aproximadamente 1,50 mg, sem diferenças estatisticamente significativas entre

TL, TC, TH e TVH ($p > 0,05$). Esses resultados indicam que a temperatura de incubação não influenciou significativamente a mobilização do magnésio na gema.

Nos estágios iniciais da incubação, o embrião é dependente das reservas de cálcio presentes na gema, que são absorvidas através da MSV. Esse processo é de vital importância, uma vez que, até o 8º dia, a MCA ainda não é funcional, tornando o cálcio da gema a principal fonte disponível para o desenvolvimento embrionário (Richards; Steele, 1987; Yair; Uni, 2011). A maior retenção de cálcio na gema no 8º dia nos tratamentos TH e TVH pode ser atribuída à ineficiência metabólica do embrião sob estresse térmico, que reduz a utilização do cálcio da gema (Molenaar *et al.*, 2010). Nesse estágio inicial, o embrião possivelmente ainda não mobilizou o cálcio de forma adequada, levando a uma maior concentração residual na gema.

Figura 25 – Teor de magnésio (mg) da gema ao longo da incubação em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta - TH (38,9 °C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º 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
n= 14 por tratamento

A partir da segunda semana de incubação, a MCA torna-se funcional, permitindo que o cálcio da casca seja absorvido pelo embrião. Nos tratamentos com temperaturas elevadas (TH

e TVH), foi constatada uma menor extração de cálcio da casca, o que está de acordo com estudos que indicam que altas temperaturas prejudicam a absorção de minerais (Li *et al.*, 2014; Yair *et al.*, 2015). Como consequência, menos cálcio foi transferido para a gema e os tecidos embrionários, resultando em uma maior retenção de cálcio na casca e em menores níveis de cálcio disponíveis na gema (Oliveira *et al.*, 2015).

As temperaturas mais elevadas (TH e TVH) resultaram em maior retenção de fósforo na gema durante a incubação, com diferenças evidentes já no 8º dia e mais pronunciadas na eclosão. Isso está de acordo com Yair *et al.* (2015), que relataram que temperaturas acima de 38,9°C diminuíram a mobilização de fósforo para os tecidos embrionários, aumentando sua retenção na gema. Como o fósforo presente no ovo é depositado durante sua formação (Angel, 2007; Wilson, 1997), a sua disponibilidade para o embrião depende diretamente da eficiência de mobilização da gema.

As maiores concentrações de manganês na gema nos tratamentos TL e TC até o 8º dia são devido à menor demanda metabólica do embrião, que retarda a mobilização dos minerais. Com o avanço da incubação, o embrião ajusta seu metabolismo e aumenta a eficiência na utilização dos minerais (Molenaar *et al.*, 2010). O manganês, assim como o fósforo, é fornecido quase exclusivamente pela gema ao embrião (Li *et al.*, 2014), e sua mobilização depende da eficiência metabólica durante a incubação. Nos tratamentos com TCO elevadas, no 18,5º dia e na eclosão, observou-se maiores valores de manganês residual na gema, indicando que menos desse mineral foi absorvido pelo embrião.

Embora houvesse uma redução gradual nos teores de magnésio da gema do ovo ao longo do processo de incubação, essa diminuição ocorreu de maneira semelhante em todos os grupos, sugerindo que a temperatura de incubação inicial não teve impacto substancial sobre a mobilização desse mineral. Vale destacar que a casca do ovo é a principal fonte de magnésio para o embrião, conforme apontado por Yair e Uni (2011), reforçando que a absorção desse nutriente ocorre predominantemente a partir da casca.

Diferentemente do presente estudo, Azevedo (2022) observaram que os teores de magnésio foram afetados pelas temperaturas baixa (36,7°C) e alta (39,4°C), tanto na casca quanto na gema. Segundo os autores, essa variação pode ter ocorrido devido ao comprometimento da utilização da gema pela alteração da TCO. As divergências nos resultados podem estar associadas ao período experimental, que no estudo de Azevedo (2022) foi realizado entre o 8º e o 18,5º dia de incubação.

Temperaturas elevadas durante a incubação comprometem a mobilização de cálcio, fósforo e manganês, levando a uma maior retenção desses minerais na gema. Esse efeito,

associado a alterações no metabolismo embrionário e à redução da eficiência na utilização dos nutrientes da gema, resulta em maiores valores de gema residual e menor YFBM (Molenaar *et al.*, 2010; Yair; Uni, 2011; Yair *et al.*, 2015), como visto em nossos resultados.

4.3 Parâmetros fisiológicos dos pintos de um dia

Os valores estimados de temperatura retal (figura 26) variaram de 38,29°C (para o tratamento TL) a 38,76°C (para o tratamento TVH). Mesmo com essa variação numérica, o teste de Tukey não identificou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p \leq 0,05$), sinalizando que o aumento da temperatura de incubação, embora tenha mostrado uma tendência de elevação na temperatura retal dos pintos, não foi suficiente para produzir diferenças expressivas.

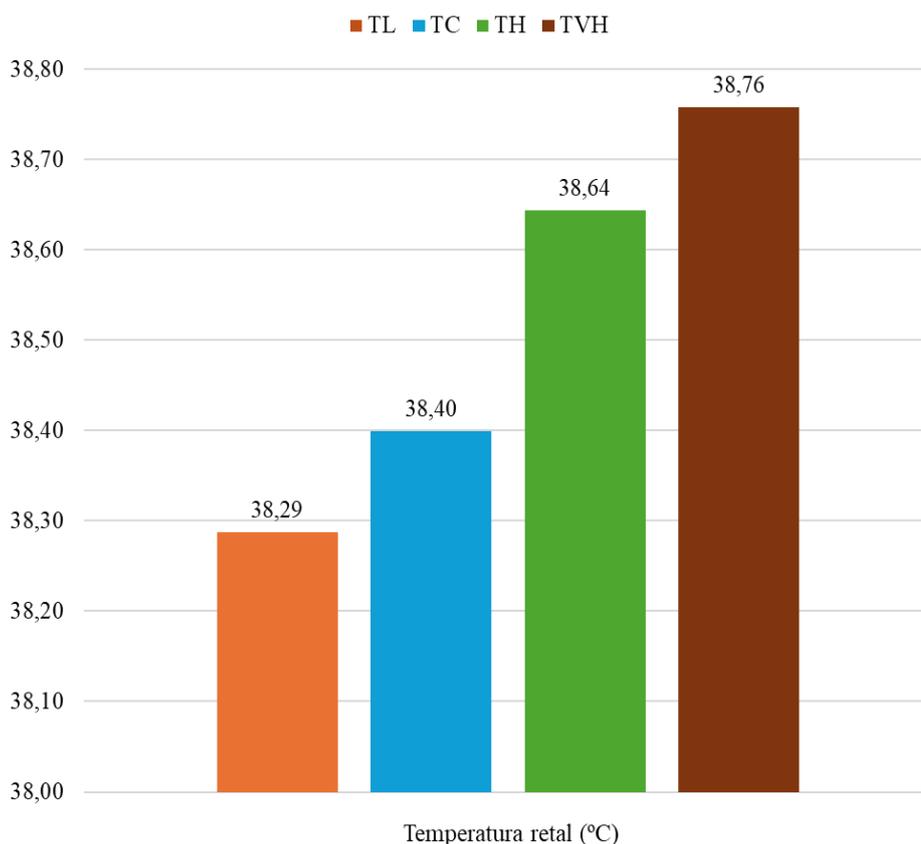
A ausência de diferenças significativas entre os grupos pode ser atribuída aos mecanismos termorregulatórios dos pintos recém-eclodidos, que foram capazes de compensar as variações nas condições de incubação, resultando em temperaturas corporais semelhantes. Entretanto, Lourens *et al.* (2005) demonstraram que a incubação a temperaturas mais baixas (36,7°C) durante a primeira semana resultou em pintos com temperaturas retais estatisticamente mais baixas ao nascimento (38,3°C; $p < 0,05$). Os autores citados, sugerem que a taxa metabólica dos embriões foi reduzida, levando a um desenvolvimento embrionário mais lento. Como consequência, os sistemas fisiológicos, incluindo os mecanismos responsáveis pela termorregulação, podem não se desenvolver plenamente.

Por outro lado, ao analisarmos elevadas TCOs, observamos uma aceleração do metabolismo embrionário, o que aumenta a produção de calor endógeno nos pintos recém-nascidos. Essas altas TCOs podem prejudicar os mecanismos de dissipação de calor, que são fundamentais para a termorregulação (Lourens *et al.*, 2005; Yalçin *et al.*, 2010). Por conseguinte, os pintos incubados nessas condições podem ter dificuldade em dissipar o calor, resultando em temperaturas retais mais altas após a eclosão (Molenaar *et al.*, 2011).

Nossos achados destacam um equilíbrio entre o metabolismo embrionário e a capacidade termorregulatória dos pintos recém-eclodidos. Embora as variações nas TCOs tenham influenciado a taxa metabólica durante o desenvolvimento embrionário, os pintos demonstraram uma notável capacidade de compensação térmica, ajustando de maneira eficaz os mecanismos de dissipação de calor. No entanto, a necessidade de um controle preciso das condições de incubação permanece evidente, já que desvios extremos podem sobrecarregar

esses mecanismos, afetando negativamente a termorregulação e, conseqüentemente, o desempenho pós-eclosão dos pintos (Lourens *et al.*, 2005; Oviedo-Rondón *et al.* 2008; Meijerhof, 2009; Yalçin *et al.*, 2010; Molenaar *et al.*, 2010, 2011a).

Figura 26 – Temperatura retal (°C) de pintos incubados em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia



SEM	0,069
P-valor	0,0576

^{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

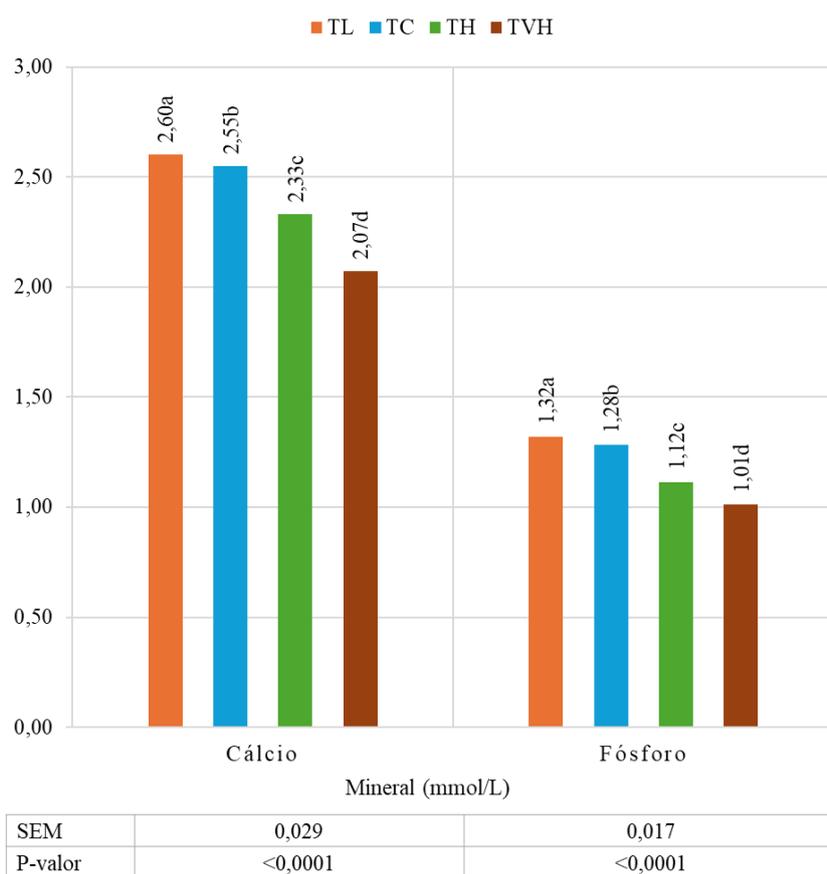
n= 14 por tratamento

Quanto aos resultados dos minerais sanguíneos (figura 27), o tratamento TL apresentou os níveis mais altos de cálcio e fósforo, enquanto TVH registrou os menores valores ($p \leq 0,05$). O cálcio em TL foi 1,96% superior ao de TC, 11,59% maior que em TH e 25,60% acima do valor em TVH. Para o fósforo, o padrão foi semelhante: TL apresentou um aumento de 3,13% em comparação a TC, 16,81% em relação a TH e 30,69% maior que TVH.

Os dados indicam que temperaturas mais baixas (TL e TC) no início da incubação favorecem uma maior mobilização e absorção de cálcio da casca do ovo, resultando em

melhores concentrações deste mineral no embrião. Um padrão semelhante foi observado para o fósforo, o que pode ser explicado pela maior eficiência na sua mobilização da gema sob essas condições, conforme apontado por Yair e Uni (2011), que destacam a importância da membrana do saco vitelínico na absorção e disponibilização de minerais. Essa interpretação é sustentada pelos resultados de Muir e Groves (2019), que avaliaram um tratamento de início lento, no qual os ovos foram incubados inicialmente a 36,75°C, com aumento gradual até 37,8°C. Embora os níveis de cálcio no soro dos pintinhos não tenham diferido significativamente em relação ao grupo controle, os níveis de fósforo inorgânico foram significativamente maiores.

Figura 27 – Minerais sanguíneos (mmol/L) de pintos de um dia incubados em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º 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
n= 14 por tratamento

Em contraste, a diminuição nos níveis de cálcio e fósforo observada nos tratamentos TH e TVH pode estar associada à menor utilização desses minerais, com o cálcio proveniente da

casca e o fósforo da gema, indicando uma possível alteração no metabolismo embrionário em condições de temperaturas elevadas. Estudos demonstram que altas temperaturas comprometem o metabolismo mineral, reduzindo a eficiência da absorção de cálcio e fósforo (Lourens *et al.*, 2007; Yair *et al.*, 2015). Nossos resultados estão em concordância com os de Azevedo *et al.* (2023), que também observaram níveis significativamente menores de cálcio e fósforo em pintos de um dia submetidos a altas TCOs entre os dias 8 e 18,5 de incubação ($p \leq 0,05$).

Esses resultados corroboram a hipótese de que o controle preciso da temperatura de incubação é fundamental para otimizar a absorção de minerais essenciais, como cálcio e fósforo, tanto da casca quanto da gema. A redução da mobilização mineral observada nas altas temperaturas reforça a importância de temperaturas controladas e adequadas ao longo do processo de incubação para garantir uma mineralização óssea eficiente e, conseqüentemente, uma melhor qualidade dos pintinhos ao eclodirem.

A análise dos hormônios sanguíneos de pintos de um dia (figura 28) revelou que a TCO teve um impacto significativo em alguns parâmetros, enquanto outros permaneceram inalterados. Para os níveis de GH, o tratamento com TCO baixa (TL) apresentou os maiores valores, com reduções de 8% (TC), 18% (TH), e 31% (TVH) ($p \leq 0,05$). Os níveis de vitamina D₃ também foram afetados pela variação de temperatura, com TL registrando os valores mais elevados e TVH apresentando a menor concentração, correspondendo a uma diferença de 32% ($p \leq 0,05$). O PTH no grupo TVH foi 69,42% superior ao do grupo TL. Já a calcitonina no grupo TVH apresentou uma concentração 34,31% inferior em comparação ao TL ($p \leq 0,05$). Para os hormônios tireoidianos T₃ e T₄, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ($p > 0,05$).

A ausência de diferenças significativas nos níveis de T₃ e T₄ entre os tratamentos pode ser explicada pela capacidade do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide de regular e manter a produção hormonal dentro de uma faixa homeostática, mesmo frente às variações na temperatura de incubação. Os hormônios tireoidianos (T₃ e T₄), são fundamentais para o metabolismo basal e a transição do metabolismo embrionário para a respiração pulmonar, além de participarem do crescimento ósseo e desenvolvimento esquelético (Lewinson *et al.*, 1989; Robson *et al.*, 2002; Van der Eerden *et al.*, 2003; Decuypere; Bruggeman, 2005; Shao *et al.*, 2006; Shokraneh *et al.*, 2020). As temperaturas avaliadas neste estudo, contudo, parecem não ter atingido níveis capazes de provocar um impacto significativo e consistente na função tireoidiana. Diferentemente, Babacanoglu (2018) e Azevedo (2022) relataram reduções nos níveis de T₃ e T₄ sob diferentes condições térmicas durante a incubação. Babacanoglu (2018)

observou essa diminuição em embriões expostos a temperaturas mais elevadas (38,5°C) entre os dias 0 e 11 de incubação. Azevedo (2022) constataram que temperaturas baixas (36,7°C), altas (38,9°C) e muito altas (39,4°C) entre o 8º e o 18,5º dia de incubação também resultaram em menores níveis de T₃ e T₄, evidenciando que alterações nas temperaturas podem, de fato, comprometer a função tireoidiana.

Podemos relacionar os níveis de T₃ e T₄ com os resultados de temperatura retal porque ambos os hormônios exercem um papel central na regulação do metabolismo energético e da termorregulação nos pintos recém-eclodidos. Esses hormônios são fundamentais na transição para a termorregulação interna, garantindo que os pintos mantenham uma temperatura corporal estável após a eclosão (Darras *et al.*, 2000; Yalçin *et al.*, 2009). Dessa forma, a relação entre T₃, T₄ e a temperatura retal dos pintos reflete uma resposta metabólica robusta e eficaz, ajustando o metabolismo energético para garantir a manutenção da temperatura corporal após a eclosão.

O aumento significativo dos níveis de GH no tratamento TL indicou que essa condição favoreceu uma melhor regulação do eixo somatotrófico, associada a uma maior eficiência no desenvolvimento celular e tecidual do embrião. Em temperaturas mais baixas, o metabolismo embrionário ajustou-se para equilibrar a demanda energética e a produção de hormônios essenciais, como o GH. Esse hormônio estimulou a síntese de IGF-I, promovendo a proliferação e diferenciação celular nos ossos. Assim, a maior disponibilidade de GH no tratamento TL favoreceu um crescimento ósseo mais robusto e uma utilização mais eficiente de nutrientes. De outro modo, temperaturas elevadas aumentaram a taxa metabólica, o que sobrecarregou a glândula pituitária e comprometeu sua capacidade de manter níveis adequados de secreção de GH. Esse estresse metabólico reduz a eficiência dos mecanismos endócrinos, resultando em uma secreção insuficiente de GH, prejudicando o crescimento embrionário e o desenvolvimento adequado dos pintos (Robson *et al.*, 2002; Kühn *et al.*, 2005; De Groef *et al.*, 2008; Güz *et al.*, 2020).

Os resultados observados para os hormônios PTH, calcitonina e vitamina D₃ indicaram uma interação de mecanismos compensatórios e ajustes fisiológicos que o embrião tentou realizar em resposta às variações de temperatura durante a incubação. Em tratamentos com altas temperaturas (TH e TVH), os níveis sanguíneos de cálcio na eclosão estavam reduzidos, o que normalmente desencadearia uma elevação nos níveis de PTH e vitamina D₃, acompanhada de uma queda nos níveis de calcitonina (Pizauro Júnior *et al.*, 2017).

No entanto, os resultados mostraram um padrão inesperado, com níveis de vitamina D₃ baixos em TH e TVH, enquanto o PTH foi elevado, indicando que o embrião tentou compensar

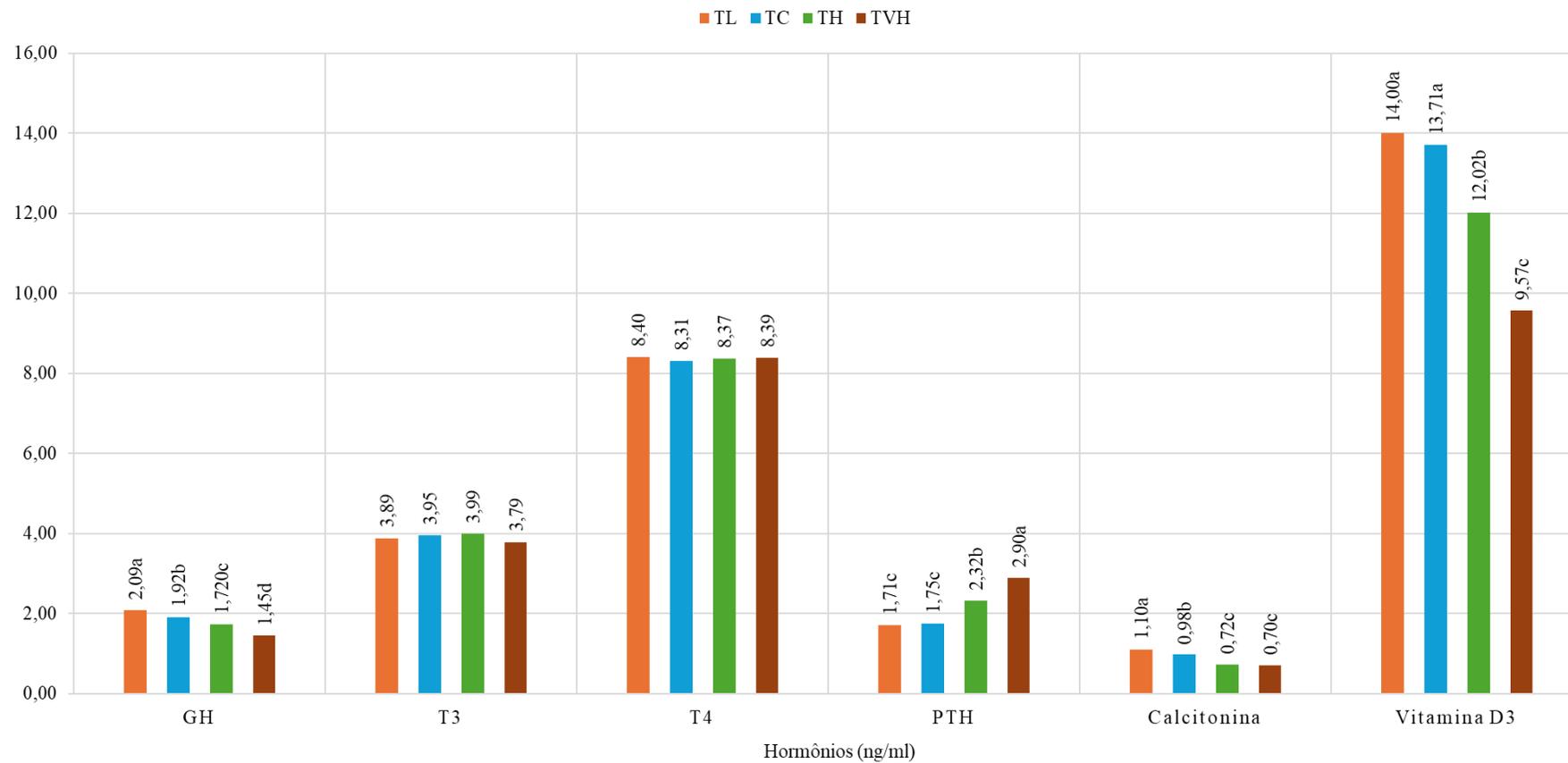
a hipocalcemia por meio da elevação da secreção de PTH. O PTH, ao atuar nos ossos e nos rins, estimula a reabsorção de cálcio, estimula a produção de 1,25-di-hidroxitamina D₃ (a forma ativa da vitamina D₃) nos rins e, conseqüentemente, eleva a absorção intestinal de cálcio e fósforo (Moe, 2008; Shanmugasundaram; SelVaraj, 2012; Pizauro Júnior *et al.*, 2017; Tinawi, 2021). Contudo, a baixa concentração de vitamina D₃ observada em TH e TVH sugere que a capacidade de conversão da forma inativa (25OHD₃) para a forma ativa (1,25OHD₃) pode ter sido comprometida por fatores relacionados à temperatura.

Altas temperaturas de incubação podem afetar o desenvolvimento e a qualidade dos órgãos, impactando indiretamente suas funções (Lourens *et al.*, 2007; Molenaar *et al.*, 2010b; Maatjens *et al.*, 2017). No presente estudo, isso foi evidente nas temperaturas de casca mais elevadas, especialmente no tratamento de temperatura muito alta (TVH), que resultou em um desenvolvimento inferior dos órgãos dos pintos. O comprometimento das funções renal e hepática, pode ter prejudicado a ativação da vitamina D₃ e, conseqüentemente, a absorção eficiente de cálcio. Logo, o estresse térmico afeta negativamente os processos endócrinos e metabólicos (Belnap *et al.*, 2019), incluindo a síntese e ativação da vitamina D₃, o que pode explicar o baixo nível observado mesmo com o aumento do PTH.

Outro aspecto importante é a redução da calcitonina nos tratamentos de temperaturas extremas (TH e TVH), o que indica uma tentativa de limitar a inibição da reabsorção óssea e permitir maior liberação de cálcio dos ossos para o sangue. A calcitonina, produzida na glândula ultimobranquial, normalmente reduz a reabsorção de cálcio ósseo e aumenta a excreção renal de cálcio (Pizauro Junior *et al.*, 2017). No entanto, o estresse térmico parece ter diminuído a eficácia desse hormônio, talvez como um mecanismo compensatório para permitir uma maior mobilização de cálcio em resposta à hipocalcemia induzida pelas altas temperaturas.

A redução dos níveis de calcitonina observada nos tratamentos com altas temperaturas de incubação (TH e TVH) denota uma resposta compensatória do organismo dos embriões à hipocalcemia induzida pelo estresse térmico. A calcitonina, normalmente responsável por limitar a reabsorção óssea de cálcio e aumentar sua excreção renal (Malgaroli *et al.*, 1989; Proszdowiec-Weglarz; Angel, 2013; Pizauro Júnior *et al.*, 2017), pode ter tido sua ação inibida, permitindo maior mobilização de cálcio dos ossos para o sangue. Esse mecanismo teria buscado restaurar o equilíbrio de cálcio em resposta à baixa absorção intestinal, potencialmente causada por disfunções metabólicas associadas ao estresse térmico.

Figura 28 – Hormônios sanguíneos (ng/mL) de pintos de um dia incubados em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia



SEM	0,037	0,049	0,094	0,068	0,025	0,248
P-valor	<0,0001	0,4734	0,9877	<0,0001	<0,0001	<0,0001

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

GH: hormônio do crescimento. T₃: triiodotironina. T₄: tiroxina. PTH: paratormônio.

SEM: erro padrão da média

n= 14 por tratamento

Diferentemente, nos tratamentos com temperaturas mais baixas (TL e TC), os níveis mais elevados de vitamina D₃ e calcitonina indicam um ambiente mais favorável para a homeostase do cálcio. Nessas condições, a ativação da vitamina D₃ parece ter ocorrido de maneira eficaz, promovendo uma melhor absorção intestinal de cálcio e fósforo e, em conjunto com a ação da calcitonina, favorecendo a deposição óssea adequada. O PTH nesses tratamentos permaneceu dentro de uma faixa controlada, refletindo uma menor necessidade de mobilização de cálcio ósseo, uma vez que a vitamina D₃ manteve os níveis plasmáticos de cálcio adequados.

Dessa maneira, enquanto o tratamento com temperaturas mais baixas favoreceu uma regulação hormonal equilibrada entre PTH, calcitonina e vitamina D₃, os tratamentos com temperaturas elevadas provocaram um desequilíbrio que forçou o embrião a ativar mecanismos compensatórios, como o aumento de PTH. No entanto, no momento da mensuração, é possível que o embrião estivesse em processo de tentar compensar o desequilíbrio, mas as limitações no processo de ativação enzimática da vitamina D₃, em condições de estresse térmico, poderiam estar retardando essa resposta. Assim, o embrião provavelmente ainda estava ajustando suas funções metabólicas para restaurar a homeostase.

A análise dos níveis de fosfatase alcalina (figura 29) revelou que TL e TC apresentaram valores elevados e semelhantes. Enquanto TH e TVH, que também foram similares entre si, mostraram reduções consideráveis. Especificamente, o nível em TVH foi 43,02% menor em comparação ao controle, destacando que temperaturas mais altas de incubação resultam em uma significativa diminuição da atividade da fosfatase alcalina ($p \leq 0,05$).

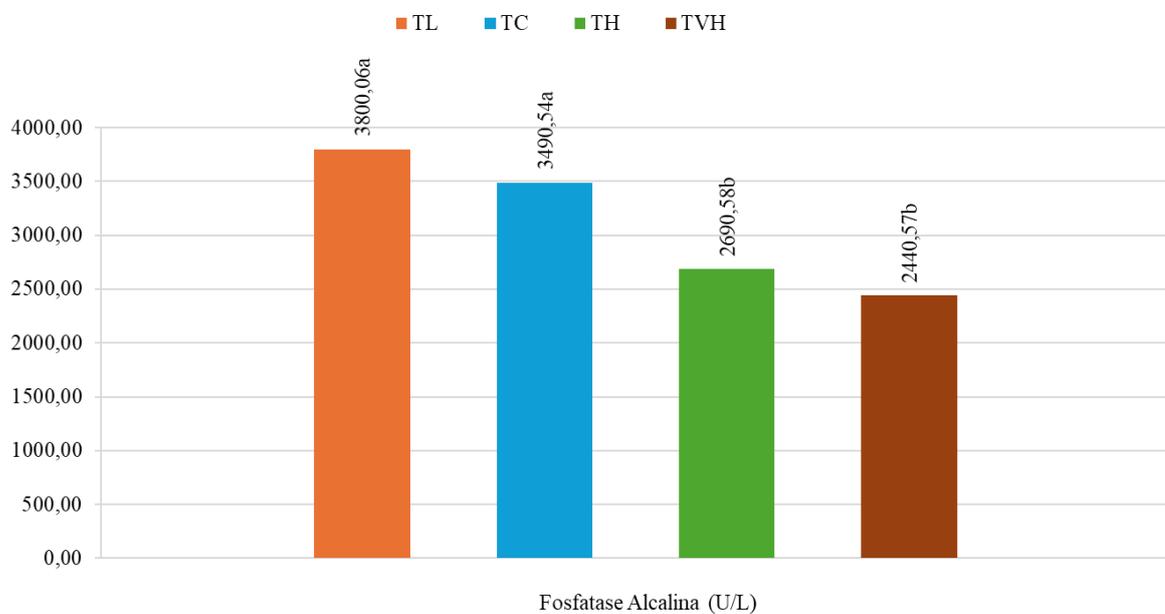
Os resultados da fosfatase alcalina (FA) nos pintos recém-eclodidos indicam uma redução significativa nos grupos expostos a temperaturas elevadas. Essa redução pode ser explicada pelas funções da FA no processo de mineralização óssea e pela relação desse processo com as condições de incubação.

Em condições normais, o aumento nos níveis de FA no sangue indica maior atividade osteoblástica e formação óssea. A enzima hidrolisa fosfatos orgânicos, liberando fosfato inorgânico, que, junto com o cálcio, é utilizado para formar cristais de hidroxiapatita. Esses cristais se depositam na matriz óssea, fortalecendo a estrutura esquelética em desenvolvimento (Anderson, 1989; Kirsch *et al.*, 1997; Pizauro Júnior *et al.*, 2002). No entanto, nos grupos incubados sob altas temperaturas, observou-se uma diminuição nos níveis circulantes de FA. Em concordância com nossos resultados, Sözcü *et al.* (2022) também observaram uma redução significativa nos níveis de fosfatase alcalina e fósforo sanguíneo em embriões submetidos a altas TCOs. Em contrapartida, os resultados de Azevedo (2022) mostraram um aumento significativo de 32% nos níveis de FA em pintos submetidos a temperaturas de casca muito

altas (TVH). A autora justifica que essa elevação não resultou em uma mineralização óssea proporcional, apontando para algum mecanismo desconhecido que pode ter interferido na função adequada da FA.

Altas temperaturas durante a incubação alteram a homeostase térmica e o metabolismo dos embriões, intensificando as demandas energéticas para a regulação da temperatura e manutenção do desenvolvimento embrionário (Lourens *et al.*, 2006). Esse aumento nas demandas metabólicas pode desviar recursos importantes para o metabolismo ósseo, prejudicando a deposição de Ca e P e reduzindo, assim, a atividade da FA (Piestun *et al.*, 2009).

Figura 29 – Fosfatase alcalina sanguínea (U/L) de pintos de um dia incubados em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia



SEM	88,980
P-valor	<0,0001

^{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

n= 14 por tratamento

Temperaturas de incubação muito altas também podem alterar a absorção dos minerais do saco vitelino e da casca do ovo, resultando em uma menor disponibilidade dos minerais para o embrião (Molenaar *et al.*, 2010). Esse cenário impacta diretamente o processo de mineralização, já que o cálcio e o fósforo são essenciais para a formação óssea, e sua absorção inadequada leva a uma menor atividade de FA (Yair; Uni, 2011).

Além disso, temperaturas elevadas podem acelerar o desenvolvimento embrionário, levando à conclusão prematura da mineralização, o que resulta em menos tempo disponível para a formação óssea adequada e, conseqüentemente, em níveis mais baixos de FA. Por fim, a temperatura pode inibir diretamente a atividade enzimática, afetando a produção de FA e refletindo-se em níveis sanguíneos reduzidos (Kamanli *et al.*, 2021).

Na figura 30, são apresentados os resultados dos teores sanguíneos de glicose, ácido úrico, lactato e glicogênio hepático. Os resultados obtidos para os níveis de glicose plasmática e glicogênio hepático indicam uma redução significativa nos grupos expostos a temperaturas mais elevadas (TH e TVH) ($p \leq 0,05$), em comparação aos tratamentos TL e TC, evidenciando o impacto do estresse térmico sobre a disponibilidade de energia e a mobilização das reservas glicogênicas. Em contrapartida, os valores médios de lactato e ácido úrico apresentaram um aumento expressivo nos grupos TH e TVH ($p \leq 0,05$), em relação a TL e TC, sugerindo maior estresse metabólico e uma adaptação ao metabolismo anaeróbico. O tratamento TL apresentou resultados estatisticamente similares e/ou melhores ao grupo controle, indicando que essas condições térmicas foram adequadas para o desenvolvimento embrionário, com manutenção de parâmetros fisiológicos dentro dos níveis ideais.

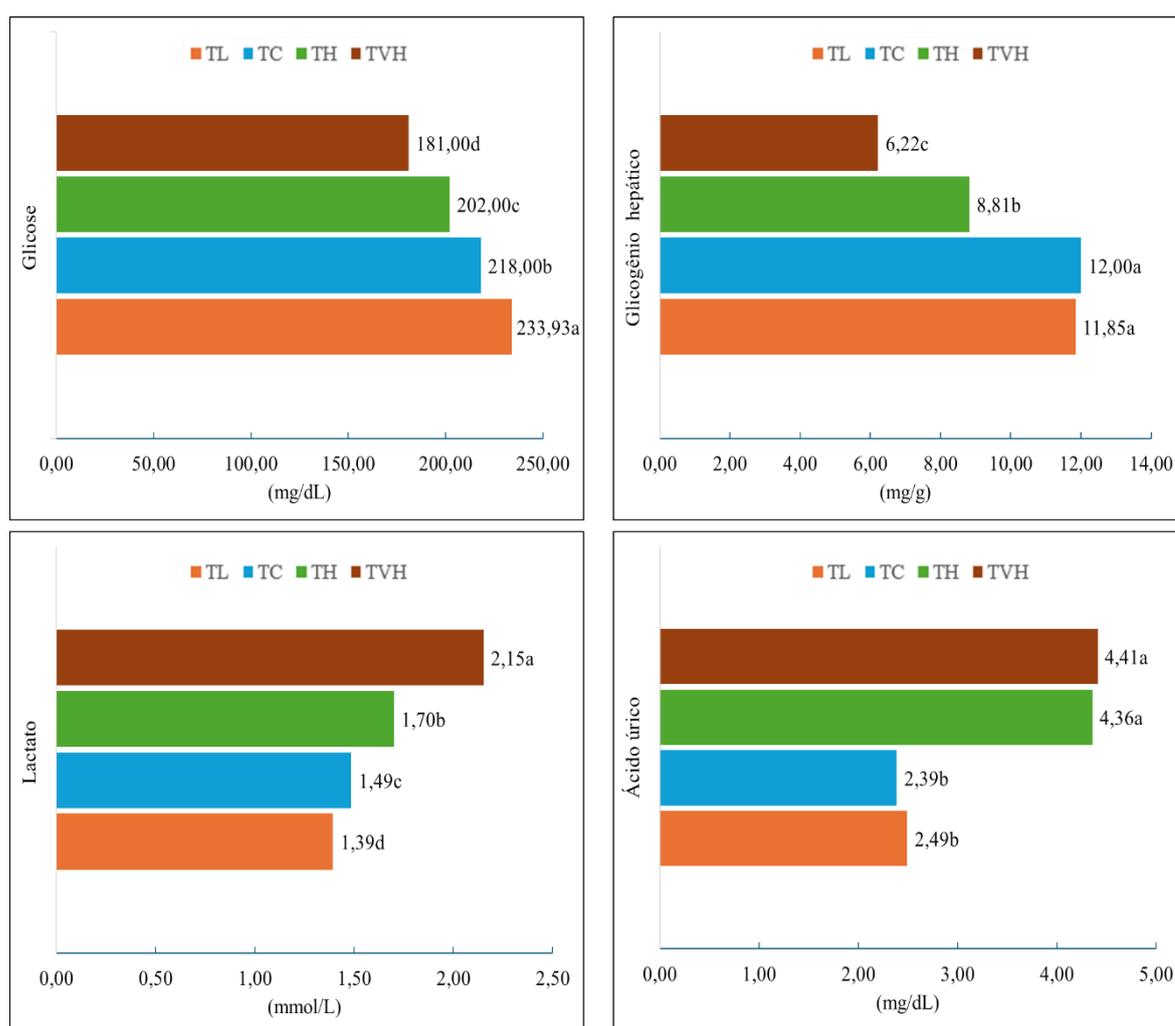
A glicose, essencial para o metabolismo embrionário, é estocada principalmente na forma de glicogênio hepático e utilizada especialmente nos momentos críticos, como o processo de eclosão (Christensen *et al.*, 2001). Durante os primeiros dias de incubação, a imaturidade dos vasos sanguíneos e o suprimento limitado de oxigênio aumentam a importância da glicose para a produção de energia. No entanto, à medida que a incubação avança, as reservas de glicose diminuem, refletindo no baixo aporte de carboidratos disponíveis no ovo (Moran Jr, 2007).

A redução dos níveis de glicose é ainda mais acentuada em condições de estresse térmico, como observado nos grupos TH e TVH, onde a menor disponibilidade de glicose pode impactar negativamente o metabolismo embrionário e o desenvolvimento pós-eclosão. Em tais situações, o estresse térmico compromete o processo de absorção da gema, resultando em uma menor transferência de nutrientes, incluindo a glicose, para a corrente sanguínea. Esse comprometimento afeta diretamente os níveis de glicose disponíveis para o metabolismo embrionário e está associado a um menor YFBM (Moran Jr, 2007).

Em relação a diminuição do glicogênio hepático nos grupos TH e TVH pode ser atribuída à maior mobilização das reservas energéticas para suprir às demandas metabólicas geradas pelo estresse térmico. Essa redução é consistente com outros estudos (Willemsen *et al.*, 2010; Molenaar *et al.*, 2013; Maatjens *et al.*, 2014a; Franca *et al.*, 2019). O glicogênio é o principal polissacarídeo de reserva energética nos organismos animais, sendo utilizado para

fornecer glicose de forma rápida e eficiente. Em condições de temperaturas extremas, como as observadas neste experimento, a diminuição da glicose estimula a mobilização do glicogênio hepático para suprir essa necessidade por meio da glicogenólise (Molenaar *et al.*, 2011; Molenaar *et al.*, 2013; Maatjens *et al.*, 2014b; Maatjens *et al.*, 2017).

Figura 30 - Teores sanguíneos de glicose (mg/dL), ácido úrico (mg/dL), lactato (mmol/L) e glicogênio hepático (mg/g) de pintos de um dia incubados em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º ao 8º dia



	Glicose	Ácido úrico	Lactato	Glicogênio hepático
SEM	3,005	0,153	0,041	0,336
P-valor	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

^{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

n= 14 por tratamento

Pode-se destacar que, embora os ácidos graxos sejam a principal fonte de energia durante a maior parte da incubação, na fase de bicagem interna a glicose torna-se indispensável para a produção de ATP (De Oliveira *et al.*, 2008). Em situações de desgaste térmico e hipóxia, como as observadas nas temperaturas elevadas, ocorre um aumento na oxidação da glicose (Molenaar *et al.*, 2013), o que eleva a demanda por glicogênio hepático. Essa maior utilização do glicogênio resulta em sua depleção, explicando os baixos níveis observados no presente estudo, que podem ser atribuídos tanto à menor síntese quanto ao aumento no uso de glicose sob condições de calor (O'Dea *et al.*, 2004).

Os altos níveis de lactato observados nos grupos expostos a temperaturas elevadas (TH e TVH) indicam uma intensificação do metabolismo anaeróbico, resultante da hipóxia celular causada pelo desbalanço térmico durante a incubação. Em temperaturas elevadas, a limitada disponibilidade de oxigênio leva ao acúmulo de piruvato, que é convertido em lactato, sinalizando glicólise anaeróbica (Burgdorf-Moisuk *et al.*, 2012). Esse aumento reflete a necessidade de compensação energética rápida, especialmente durante a eclosão, quando as reservas de glicogênio são esgotadas e o embrião mobiliza proteínas para suprir suas demandas energéticas (Moran Jr, 2007; De Oliveira *et al.*, 2008). Portanto, o estresse térmico promove a elevação do lactato, evidenciando a resposta metabólica ao aumento da demanda energética sob condições adversas. Os dados de Babacanoglu (2018), que avaliou os efeitos da alta temperatura de incubação (38,5°C) nos primeiros 11 dias em embriões de frangos COBB 500 e observou um aumento nos níveis de lactato, contribuem para a compreensão dos resultados deste estudo. O aumento do lactato, como indicado por Babacanoglu, reforça a ideia de que o estresse por calor leva à hipóxia e à intensificação do metabolismo anaeróbico.

Os níveis elevados de ácido úrico observados nos grupos TH e TVH indicam uma sobrecarga metabólica, possivelmente causada pela sobrecarga térmica durante a incubação. Esse aumento sugere que os embriões desses grupos mobilizaram mais proteínas como fonte de energia, resultando em maior degradação de ácidos nucleicos, conforme descrito por Sakomura *et al.* (2014). De forma semelhante, Molenaar *et al.* (2013) também apontaram que o aumento da concentração de ácido úrico plasmático está associado à mobilização proteica para a produção de glicose, reforçando a hipótese de que o estresse térmico exigiu a utilização de proteínas para atender às demandas energéticas dos embriões.

Em suma, altas temperaturas de incubação esgotaram as reservas de glicose e glicogênio hepático, forçando o embrião a adotar vias metabólicas compensatórias, como o aumento dos níveis de ácido úrico e lactato, o que reflete a intensificação do metabolismo anaeróbico e da mobilização proteica. Esse mecanismo, além de comprometer a eficiência energética do

embrião, resultou em uma maior degradação de proteínas musculares para suprir as demandas energéticas. Conseqüentemente, essa mobilização proteica contribuiu para a redução do peso do corpo sem gema (YFBM), uma vez que menos proteínas foram direcionadas para o crescimento e mais foram utilizadas como fonte de energia, comprometendo o desenvolvimento dos pintos recém-eclodidos.

Os resultados dos parâmetros hemogasométricos (tabela 8) mostraram que os tratamentos TL e TC foram estatisticamente superiores ($p \leq 0,05$), apresentando melhores condições de equilíbrio ácido-base e níveis adequados de iCa e HCO_3^- , o que implica em regulação mais eficiente dos processos fisiológicos durante a incubação. De maneira oposta, os tratamentos com temperaturas mais elevadas (TH e TVH), apresentaram resultados desfavoráveis, evidenciando que o estresse térmico prejudicou a homeostase dos pintos.

Tabela 8 – Parâmetros hemogasométricos de pintos incubados em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0^o ao 8^o dia

Temperatura	Parâmetros hemogasométricos									
	pH	PCO ₂	PO ₂	HCO ₃ ⁻	Na ⁺	K ⁺	SO ₂	Hct	Hb	iCa
TL	7,36 ^a	40,11 ^b	30,29 ^a	23,98 ^a	136,57	3,99	49,07 ^a	18,93	6,39	1,80 ^a
TC	7,23 ^b	40,39 ^b	29,66 ^a	23,68 ^a	136,57	4,14	48,93 ^a	18,93	6,29	1,67 ^b
TH	7,16 ^{bc}	49,97 ^a	22,72 ^b	20,96 ^b	136,64	3,99	36,64 ^{ab}	18,71	6,17	1,35 ^c
TVH	7,11 ^c	49,82 ^a	22,69 ^b	20,31 ^b	134,79	4,06	34,93 ^b	18,86	5,93	1,33 ^c
SEM	0,016	0,975	0,871	0,275	0,394	0,06	1,984	0,293	0,100	0,029
P-valor	<0,0001	<0,0001	0,0002	<0,0001	0,2706	0,8076	0,0076	0,9936	0,4092	<0,0001

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

pH: Potencial hidrogeniônico; pCO₂: Pressão parcial de gás carbônico; pO₂: Pressão parcial de oxigênio; HCO₃⁻: Bicarbonato; Na⁺: Sódio; K⁺: Potássio; SO₂: Saturação de oxigênio; Hct: Hematócrito; Hb: Hemoglobina; iCa: Cálcio ionizado.

SEM: erro padrão da média.

n= 14 por tratamento.

O pH sanguíneo reduziu à medida que a temperatura aumentou, com pintos expostos a TH e TVH apresentando os valores mais baixos, apontando para uma acidose respiratória. O intervalo de normalidade de pH sanguíneo das aves situa-se entre 7,20 e 7,36 (Borges, 2001) Esse efeito está relacionado ao aumento da produção de dióxido de carbono (CO₂) em condições de alta temperatura, elevando os níveis de pCO₂. A maior pCO₂ reflete uma menor eliminação de CO₂, que, ao se combinar com a água no sangue, forma ácido carbônico (H₂CO₃), responsável pela redução do pH (Furlan *et al.*, 2002).

A relação entre o pH reduzido e o aumento da pCO₂ em embriões submetidos a TH e TVH também pode ser explicada pelo aumento do metabolismo anaeróbico, principalmente nas fases finais da incubação. O estresse térmico, combinado com a sobrecarga da membrana corioalantoide, leva à hipóxia, forçando o embrião a recorrer ao metabolismo anaeróbico e

aumentar a produção de lactato (Moran Jr, 2007; De Oliveira, 2009). Os níveis elevados de lactato observados confirmam essa tendência, indicando uma maior dependência do metabolismo anaeróbico.

Além disso, a conversão de piruvato em lactato durante a glicólise anaeróbica aumenta a concentração de íons H^+ no sangue. Esses íons, normalmente tamponados pelo bicarbonato (HCO_3^-), encontraram menor suporte nos embriões incubados a altas temperaturas, sugerindo que a capacidade tamponante foi insuficiente para evitar uma acidose metabólica (De Oliveira *et al.*, 2008). O acúmulo de CO_2 , combinado com o esforço muscular para a eclosão, agravou ainda mais essa condição.

Os pintos em TH e TVH apresentaram níveis menores de HCO_3^- , reforçando a tentativa de compensar tanto a acidose respiratória quanto a metabólica. O bicarbonato atua como tampão primário, e sua redução em situações de estresse térmico reflete um esforço do organismo para manter o pH em níveis aceitáveis (Gomes, 1997). No entanto, mesmo com esse mecanismo compensatório, a acidose não foi totalmente neutralizada, como evidenciado pelos níveis reduzidos de pH (DiBartola, 2000; Barbosa; Gamba, 2011).

A redução da pO_2 sob altas temperaturas pode inicialmente ser um estímulo para a bicagem interna, permitindo o acesso à câmara de ar do ovo e facilitando a transição para a respiração pulmonar (Rowlett; Simkiss, 1989). Entretanto, embriões em TH e TVH enfrentam uma hipóxia mais intensa devido à maior taxa metabólica e menor eficiência na troca gasosa (Lourens *et al.*, 2007), comprometendo a oxigenação dos tecidos (Christensen, 1995). A baixa pO_2 e a redução da SO_2 refletem a insuficiência na oxigenação da hemoglobina, reduzindo as chances de sobrevivência e a qualidade dos pintos eclodidos (Gomes, 1997; DiBartola, 2000).

O estudo de Rowlett e Simkiss (1989) sobre gases respiratórios e equilíbrio ácido-base em embriões de aves mostra como limitações na troca gasosa e ajustes metabólicos influenciam o desenvolvimento embrionário. Esses achados podem ser relacionados aos resultados de maior número de bicadas e redução na duração da incubação sob temperaturas elevadas (TH e TVH). As altas temperaturas aceleram o metabolismo, resultando em maior demanda de oxigênio, levando ao início precoce da bicagem e à redução do tempo de incubação devido ao estresse respiratório.

O iCa representa o cálcio livre no plasma, sob a forma inativa: ligado a compostos orgânicos, e biodisponível: cálcio iônico (Vieites *et al.*, 2004). Os valores de cálcio ionizado em aves variam entre 0,99 e 1,59 mmol/L (Maatjens *et al.*, 2014b; Sgavioli *et al.*, 2016), mas podem alcançar até 2,83 mmol/L em galinhas poedeiras devido à maior demanda de cálcio para a formação da casca do ovo (Parsons; Comb, 1981).

Os pintos incubados sob baixa temperatura (TL) exibiram concentrações superiores de iCa, demonstrando que essa condição favoreceu a manutenção do equilíbrio ácido-base e a eficiente captação de cálcio. Esses resultados sugerem que, em temperaturas mais amenas, os mecanismos fisiológicos de absorção e regulação do cálcio permanecem eficientes. Segundo, Abbas *et al.* (1985) existe uma correlação positiva entre o cálcio ionizado e a calcitonina, no qual o aumento do cálcio ionizado está associado a um aumento nos níveis de calcitonina durante o desenvolvimento embrionário, assim como foi observado nesta pesquisa.

Em comparação, pintos incubados sob altas temperaturas (TH e TVH) apresentaram os piores resultados de iCa. Esse declínio pode ser atribuído ao comprometimento das funções renal e hepática, já que o estresse térmico afeta a capacidade desses órgãos de regular a absorção de cálcio, prejudicando sua disponibilidade para a mineralização óssea. A deficiência de cálcio sob essas condições pode comprometer a formação do esqueleto, resultando em uma pior qualidade dos pintos após a eclosão (Sgavioli *et al.*, 2016; Babacanoglu, 2018).

Nossos resultados estão em linha com os de Sgavioli *et al.* (2016), que também relataram uma queda significativa nos níveis de cálcio ionizado em pintinhos incubados a 39,0°C, em comparação com aqueles incubados a 37,5°C. Da mesma forma que neste estudo, a diminuição do iCa foi atribuída ao estresse térmico, indicando que as altas temperaturas interferem na regulação do cálcio, prejudicando o desenvolvimento ósseo dos embriões.

A avaliação do cálcio total no soro e do cálcio ionizado (iCa) no plasma é essencial para entender o metabolismo mineral no pinto de um dia. Enquanto o cálcio total reflete a reserva geral, o iCa mostra a fração ativa e biodisponível (Bouillon *et al.*, 2003; Proszdowiec-Weglarz; Angel, 2013). Em temperaturas mais baixas (TL e TC), houve maior mobilização de cálcio da casca, resultando em melhores concentrações no embrião. Já temperaturas elevadas (TH e TVH) reduziram a absorção de cálcio, prejudicando o desenvolvimento ósseo (Lourens *et al.*, 2007; Yair *et al.*, 2015).

A ausência de alterações nos níveis de Na⁺, K⁺, Hb e Hct entre os tratamentos pode ser explicada pela maior estabilidade desses indicadores frente ao estresse térmico. O sódio e o potássio desempenham papéis fundamentais no equilíbrio hídrico e na função celular, o que pode ter contribuído para a manutenção de seus níveis mesmo sob condições de estresse. Da mesma forma, hemoglobina e hematócrito, embora sensíveis a mudanças no transporte de oxigênio, são regulados por mecanismos homeostáticos robustos que mantêm a osmolaridade e a distribuição de líquidos corporais (Gomes, 1997). Franca *et al.* (2019) destacaram que pintos incubados a 38,9°C entre o oitavo e o 18º dia de incubação apresentaram valores

hemogasométricos semelhantes ao tratamento controle (37,8°C; $p > 0,05$), indicando que o equilíbrio ácido-básico foi mantido de forma eficiente mesmo sob alta temperatura.

De maneira oposta, Babacanoglu (2018) observou um aumento nos níveis de hemoglobina e hematócrito em embriões de frangos de corte COBB 500 incubados a 38,5°C entre os dias 0 e 11 de incubação, sugerindo uma resposta adaptativa ao estresse térmico nessas condições específicas. A diferença nos resultados pode ser atribuída ao período de exposição ou à temperatura utilizada, considerando a variação entre a temperatura da máquina incubadora e a temperatura do embrião.

Os resultados indicam que o uso de perfis de temperatura alta no início da incubação (TH e TVH) prejudica a eficiência respiratória e a capacidade de tamponamento do organismo, particularmente nas fases finais da incubação, comprometendo a oxigenação tecidual e a homeostase do cálcio. Em contraste, embriões incubados em temperaturas mais baixas (TL) apresentaram parâmetros hemogasométricos mais estáveis, promovendo um desenvolvimento embrionário adequado e uma melhor qualidade dos pintos.

4.4 Análises ósseas

Nas Tabelas 9, 10 e 11 estão apresentados os resultados relacionados às variáveis ósseas. Aos 18,5 dias de incubação e no momento da eclosão, observou-se que, conforme a TCO aumentava, ocorria uma redução nos níveis de todos os minerais analisados na tíbia (tabela 9). O tratamento TL resultou predominantemente nos maiores níveis dos minerais avaliados, enquanto o tratamento TVH apresentou os menores valores ($p \leq 0,05$).

Tabela 9 – Composição mineral da tíbia dos embriões aos 18,5 dias e dos pintos recém-eclodidos incubados em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0^o e o 8^o 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
TL	30,01 ^a	34,90 ^a	16,77 ^a	17,88 ^a	0,016 ^a	0,016 ^a	0,74 ^a	0,83 ^a
TC	29,02 ^b	31,59 ^b	14,99 ^b	16,42 ^b	0,015 ^b	0,016 ^a	0,70 ^b	0,77 ^b
TH	24,58 ^c	29,56 ^b	12,75 ^c	13,36 ^c	0,014 ^c	0,014 ^b	0,60 ^c	0,68 ^c
TVH	22,09 ^d	26,99 ^c	11,60 ^d	12,69 ^c	0,011 ^d	0,013 ^c	0,52 ^d	0,62 ^d
SEM	0,439	0,481	0,272	0,320	0,000	0,000	0,011	0,011
P-valor	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

^{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.

n= 14 por tratamento.

As temperaturas elevadas (TH e TVH) promoveram uma menor utilização dos minerais provenientes da casca, gema e sangue, resultando em uma deposição insuficiente desses elementos na tíbia. Isso pode comprometer o processo de ossificação, gerando uma matriz óssea menos mineralizada e de menor qualidade (Vieira, 2007; Yair *et al.*, 2015).

A menor deposição de cálcio observada no tratamento TVH (39,4°C) pode ser atribuída ao transporte limitado de cálcio da casca para os ossos. Temperaturas elevadas comprometem o funcionamento MCA, responsável pela absorção de cálcio a partir da segunda semana de incubação (Romanoff, 1960; Tuan; Ono, 1986).

Li *et al.* (2014) e Yair *et al.* (2015) demonstraram que temperaturas superiores a 38,5°C prejudicam essa mobilização, resultando em ossos com menor mineralização. Em contraste, Yalçin *et al.* (2007) relataram um aumento significativo de cálcio na tíbia de embriões incubados a 36°C por 6 horas diárias até o 8º dia, favorecendo a absorção de cálcio e o desenvolvimento da CAM. No presente estudo, o tratamento TL (36,7°C) apresentou os maiores níveis de cálcio, indicando que o aumento linear e controlado da temperatura contribuiu para uma deposição mais eficiente desse mineral nos ossos.

A redução do fósforo da tíbia no tratamento TVH também pode ser explicada pela menor eficiência na sua absorção e transporte, resultando em menor deposição desse mineral nos ossos. A exposição a altas temperaturas pode prejudicar a formação de cristais de hidroxiapatita, processo que depende da liberação de fosfato pela fosfatase alcalina (Anderson, 1989; Pizauro Júnior *et al.*, 2017). Com a atividade dessa enzima reduzida, como foi visto neste experimento, a nucleação de fosfato e cálcio nos ossos é afetada, comprometendo a mineralização óssea. Além disso, esse impacto prejudica as funções fisiológicas do fósforo, como o transporte de energia e a regulação enzimática (Bilezikian *et al.*, 2019).

As altas temperaturas (TH e TVH) também prejudicaram a deposição do manganês na tíbia, mineral importante para a síntese de mucopolissacarídeos e proteoglicanos, componentes fundamentais da matriz extracelular dos ossos. O manganês atua como cofator de enzimas envolvidas na produção de cartilagem hialina, e sua deficiência pode reduzir significativamente a atividade da fosfatase alcalina (Bhagavan, 2002; Palacios, 2006). Além disso, o manganês influencia o metabolismo do IGF-1, um fator de crescimento que regula o desenvolvimento ósseo, e sua deficiência pode retardar o crescimento e a ossificação (Pizauro Júnior *et al.*, 2017).

A diminuição de magnésio observada no tratamento TVH reflete o comprometimento das funções metabólicas e da osteogênese em temperaturas elevadas. O magnésio está intimamente ligado ao metabolismo do cálcio e fósforo e à função das células ósseas, sendo

essencial para a mineralização óssea adequada (Rude *et al.*, 1998; Martini, 1999; Morii, 2007). No tratamento TVH, as altas temperaturas reduziram a eficiência da absorção de magnésio pelo embrião, uma vez que o estresse térmico compromete o transporte de minerais e a função das membranas celulares, prejudicando a capacidade do embrião de utilizar esse mineral para manter a densidade e resistência óssea.

Al-Musawi *et al.* (2012) apontaram que as variações na temperatura de incubação influenciam diretamente o metabolismo mineral, e nossos resultados sugerem que temperaturas mais baixas, como as aplicadas no tratamento TL, permitiram uma absorção mais eficiente dos minerais analisados, contribuindo para uma melhor qualidade óssea.

Contrariamente, Azevedo *et al.* (2023) observaram que todos os minerais avaliados na tíbia foram afetados de maneira similar pelos tratamentos, com reduções em qualquer alteração na temperatura, tanto aos 18,5 dias quanto na eclosão ($p \leq 0,05$). Os menores teores de Ca, P, Mn e Mg foram encontrados com a utilização da TCO muito alta (39,4°C), seguidos pela alta (38,9°C), e posteriormente pela baixa (36,7°C). As variações observadas foram mais pronunciadas possivelmente devido à metodologia aplicada, que manteve essas temperaturas entre o 8º e o 18,5º dia de incubação.

Os resultados obtidos revelaram que os embriões e pintos recém-eclodidos incubados em temperatura baixa (TL) apresentaram as melhores características morfométricas, biofísicas e mecânicas da tíbia (tabela 10; $p \leq 0,05$). O tratamento controle (TC) mostrou desempenho intermediário, enquanto as temperaturas mais elevadas (TH e TVH) resultaram em ossos menos desenvolvidos e com menor resistência mecânica. Notou-se uma clara tendência de que temperaturas acima das recomendadas comercialmente durante a incubação comprometem o desenvolvimento ósseo, sendo o tratamento TVH o mais prejudicial em ambos os momentos avaliados.

Os resultados das características morfométricas, biofísicas e mecânicas do fêmur (tabela 11), seguiram um padrão semelhante ao observado para a tíbia. TL temperatura baixa (TL) foi novamente o mais eficiente, apresentando o melhor desempenho. O tratamento controle (TC) mostrou resultados intermediários. Em contrapartida, os tratamentos com temperaturas elevadas (TH e TVH) prejudicaram o desenvolvimento ósseo, com o TVH apresentando os piores resultados.

Tabela 10 – Características morfométricas, biofísicas e mecânicas da tíbia dos embriões aos 18,5 dias e dos pintos recém-eclodidos incubados em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º e o 8º 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							
TL	254,68 ^a	9,09 ^a	29,38 ^b	2,15 ^c	47,03 ^a	61,06 ^a	0,98 ^a
TC	246,93 ^b	7,23 ^b	29,03 ^b	2,18 ^b	46,88 ^a	59,31 ^b	0,93 ^a
TH	195,15 ^c	5,83 ^c	30,46 ^a	2,26 ^a	45,33 ^b	57,02 ^c	0,82 ^b
TVH	171,20 ^d	5,13 ^d	30,97 ^a	2,27 ^a	42,80 ^c	55,09 ^d	0,71 ^c
SEM	4,802	0,207	0,135	0,007	0,265	0,375	0,017
P-valor	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Eclusão							
TL	315,73 ^a	7,60 ^a	32,54 ^b	2,30 ^d	50,92 ^a	67,99 ^a	1,09 ^a
TC	306,98 ^b	7,40 ^b	32,15 ^b	2,35 ^c	50,88 ^a	66,23 ^b	1,08 ^a
TH	258,87 ^c	6,85 ^c	33,74 ^a	2,50 ^b	49,05 ^b	64,52 ^c	0,91 ^b
TVH	236,84 ^d	6,59 ^d	33,82 ^a	2,59 ^a	47,06 ^c	62,36 ^d	0,79 ^b
SEM	4,509	0,059	0,132	0,016	0,253	0,321	0,023
P-valor	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

^{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.

n= 14 por tratamento.

Tabela 11 – Características morfométricas, biofísicas e mecânicas do fêmur dos embriões aos 18,5 dias e dos pintos recém-eclodidos incubados em temperatura de casca baixa – TL (36,7°C), controle – TC (37,8°C), alta – TH (38,9°C) e muito alta – TVH (39,4°C) do 0º e o 8º 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							
TL	166,26 ^a	5,93 ^a	22,90 ^a	2,41 ^b	49,89 ^a	64,01 ^a	0,91 ^a
TC	160,54 ^a	4,70 ^b	22,78 ^a	2,43 ^a	49,80 ^a	63,15 ^a	0,89 ^{ab}
TH	127,70 ^b	3,81 ^c	21,06 ^b	2,26 ^c	48,01 ^b	60,53 ^b	0,82 ^b
TVH	112,37 ^c	3,37 ^d	19,69 ^c	2,05 ^d	46,15 ^c	59,01 ^c	0,72 ^c
SEM	3,152	0,135	0,192	0,021	0,232	0,300	0,014
P-valor	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Eclusão							
TL	208,52 ^a	5,02 ^a	26,01 ^a	2,82 ^a	53,74 ^a	69,83 ^a	1,12 ^a
TC	199,23 ^b	4,80 ^b	26,00 ^a	2,79 ^b	53,50 ^a	69,20 ^a	1,16 ^a
TH	173,42 ^c	4,59 ^c	23,68 ^b	2,57 ^c	52,32 ^b	67,18 ^b	1,01 ^{ab}
TVH	161,15 ^d	4,48 ^c	21,86 ^c	2,21 ^d	50,06 ^c	66,02 ^b	0,92 ^b
SEM	2,644	0,032	0,242	0,033	0,241	0,256	0,020
P-valor	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0004

^{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.

n= 14 por tratamento.

As condições de incubação exercem um impacto significativo no desenvolvimento dos ossos, incluindo o fêmur e a tíbia, com efeitos que podem persistir ao longo da vida das aves, influenciando a saúde e a força das pernas (Yalçin *et al.*, 2007). O tratamento TL apresentou os maiores pesos absolutos e relativos da tíbia e do fêmur, enquanto os tratamentos com temperaturas mais altas (TH e TVH) resultaram em ossos significativamente mais leves. Esses dados estão alinhados com a literatura, indicando que temperaturas elevadas durante a incubação podem prejudicar o desenvolvimento ósseo, reduzindo o peso e a calcificação dos ossos (Hammond *et al.*, 2007; Oviedo-Rondón *et al.*, 2009a; Van der Pol *et al.*, 2014).

Os resultados deste trabalho são consistentes com os achados de Van der Pol *et al.* (2014), os quais relataram que temperaturas extremamente elevadas durante a incubação (39,4°C) reduziram o peso de ossos como fêmur e tíbia, em comparação com as demais temperaturas analisadas (36,9°C, 37,8°C e 38,6°C). De forma similar, Yalçin *et al.* (2007) observaram uma diminuição no peso da tíbia de pintinhos expostos a aquecimentos intermitentes de 39,0°C por 6 horas diárias, entre os dias 0 e 8 de incubação, quando comparados aos incubados a 37,8°C.

Sözcü *et al.* (2022) relataram que o tratamento com alta TCO (38,9°C) entre os dias 4 e 7 de incubação, resultou em comprimentos menores do fêmur, tíbia e metatarso aos 18 dias de incubação. Yalçin e Siegel (2003) observaram que embriões expostos a temperaturas elevadas durante a primeira semana de incubação apresentaram ossos mais curtos, reforçando a relação entre o comprimento ósseo e as condições térmicas. Esses autores sugerem que o calor excessivo interfere no desenvolvimento dos condrócitos e na formação da cartilagem de crescimento, impactando negativamente o alongamento dos ossos. Esses achados estão em concordância com os resultados desta pesquisa em relação ao comprimento do fêmur.

O aumento no comprimento da tíbia em TH e TVH pode ser atribuído ao impacto das temperaturas elevadas na ossificação endocondral, que altera a densidade celular e a expressão de proteínas essenciais para o processo. Apesar do crescimento ósseo em comprimento seja favorecido, a mineralização e a densidade óssea podem ser comprometidas, resultando em ossos mais longos, porém menos densos e com menor peso (Oviedo-Rondón *et al.*, 2008a, 2009). Em relação ao aumento da largura da tíbia (TH e TVH), a variação pode estar associada a uma resposta negativa ao estresse térmico. Essa alteração na largura não necessariamente reflete um crescimento saudável, mas sim uma resposta ao desgaste térmico, que pode aumentar a curvatura óssea e prejudicar a simetria e a integridade estrutural dos ossos. O estresse ao calor e a menor mineralização óssea podem comprometer a qualidade e a resistência dos ossos,

resultando em estruturas mais longas, porém mais frágeis e menos densas (Van der Pol *et al.*, 2014).

Toscano *et al.* (2013) observaram que a largura aumentada da tíbia aos 35 dias de idade estava associada a piores pontuações de marcha, sugerindo uma maior incidência de problemas nas pernas em frangos de corte com ossos mais largos. Os autores especularam que essa relação se deve à maior curvatura da tíbia, resultando em uma distribuição de carga mecânica subótima no osso, o que pode predispor os frangos a problemas locomotores. Dessa forma, é possível inferir que os ossos das pernas mais largos observados em temperaturas de casca excessivamente altas no presente estudo possam aumentar o risco de problemas locomotores ao longo da vida das aves.

Nos tratamentos TH e TVH, observou-se uma menor concentração de minerais no sangue, acompanhada por reduções na calcificação, força óssea e porcentagem de cinzas. Isso indica que as altas temperaturas comprometeram a deposição de cálcio e fósforo nos ossos, resultando em ossos menos densos e mais frágeis.

Azevedo *et al.* (2023) relataram que a TCO muito alta (39,4°C), aplicada entre o 8º e o 18,5º dia de incubação, resultou em menores percentuais de cinzas, calcificação e resistência óssea, refletindo uma deposição insuficiente de minerais. Os autores associaram a redução no peso, comprimento e largura dos ossos ao menor YFBM e ao efeito inibitório da alta temperatura sobre os processos de ossificação e a atividade dos osteoblastos, provavelmente devido ao aumento da corticosterona e à síntese de proteínas de choque térmico. Além disso, discutiu-se que as alterações nos níveis de PTH e vitamina D₃, hormônios cruciais para a osteogênese, podem ter contribuído para as mudanças observadas na mineralização e no desenvolvimento ósseo.

O tratamento TL, que utilizou um perfil de "início lento", apresentou os melhores resultados em termos de mineralização óssea, com maior teor de cinzas, calcificação e força óssea. Esses resultados indicam que temperaturas mais baixas no início da incubação favorecem a deposição de minerais e a qualidade óssea dos embriões. Essa observação é apoiada por estudos anteriores, como os de Yalçın *et al.* (2007) e Groves e Muir (2018), que demonstram os efeitos positivos de perfis de incubação com início lento ou resfriamento controlado sobre o desenvolvimento ósseo.

Yalçın *et al.* (2007) observaram que pintinhos expostos a incubação sob baixa temperatura (36,9°C) entre os dias 0 e 8 de incubação apresentaram maior teor de cinzas na tíbia. Da mesma forma, Groves e Muir (2018) mostraram que temperaturas mais baixas (36,75°C) no início da incubação, com aumento gradual até 37,8°C, promoveram maior teor de

cinzas ósseas e melhor força das pernas em frangos Cobb 500. Esses autores destacam que um maior teor de cinzas óssea está correlacionado com ossos mais saudáveis e menor incidência de discondroplasia tibial, reforçando a importância de otimizar as condições térmicas de incubação para promover a saúde óssea.

Além disso, as baixas temperaturas promoveram uma maior eficiência no transporte de minerais, como cálcio e fósforo para o osso em desenvolvimento. Kerschnitzki *et al.* (2016) apontam que esses minerais são armazenados e transportados pelo sangue até as áreas de formação óssea, onde contribuem para a mineralização e o fortalecimento do tecido ósseo. Esse mecanismo é particularmente afetado por altas temperaturas, que podem reduzir a eficiência desse transporte e, conseqüentemente, prejudicar a mineralização e a força dos ossos.

Cabe ressaltar também que em temperaturas mais baixas, como no tratamento TL, as células osteoprogenitoras, foram mais eficazes na formação de osteoblastos, o que promove uma mineralização óssea mais eficiente (Clarke, 2008; Yair *et al.*, 2012). Isso resulta em uma matriz óssea com maior deposição de cálcio e fósforo, elementos críticos para a rigidez e resistência dos ossos, como observado nos resultados de maior calcificação e força óssea.

5. CONCLUSÕES

Um perfil de temperatura da casca mais baixa, aplicado de forma gradual (TL: 36,7°C), do 0º ao 8º dia de incubação, mostrou-se eficiente, apresentando resultados estatisticamente similares ou superiores ao tratamento controle (TC: 37,8°C) em todas as variáveis analisadas.

Esse resultado indica que a modulação térmica gradual na primeira semana de incubação pode ser uma estratégia eficaz para otimizar o rendimento de incubação, a qualidade dos pintos, o desenvolvimento ósseo e dos órgãos vitais, além da mobilização e utilização de minerais da casca e da gema, bem como os parâmetros fisiológicos e ósseos de pintos recém-eclodidos.

Contrariamente, temperaturas elevadas (TH: 38,9°C e TVH: 39,4°C), especialmente TVH, não são recomendadas, pois afetam negativamente os parâmetros avaliados.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES

A janela de eclosão e a duração da incubação foram diretamente influenciadas pelas variações de temperatura. O tratamento TL prolongou significativamente o período de incubação, sugerindo um desenvolvimento mais gradual, porém eficiente, que favoreceu o crescimento e a qualidade dos embriões. Em contraste, temperaturas elevadas (TH e TVH) resultaram em uma eclosão de menor duração e comprometeram a qualidade dos pintos, destacando a importância de um controle térmico rigoroso.

O tratamento TL promoveu uma utilização mais eficiente dos nutrientes da casca e da gema e conseqüentemente o desenvolvimento saudável dos órgãos vitais e sistemas fisiológicos. Isso também foi demonstrado pelos níveis superiores de cálcio e fósforo no sangue dos pintos recém-eclodidos. Por outro lado, as temperaturas elevadas prejudicaram esses processos, resultando em menor mobilização de minerais e maior retenção de gema residual.

As análises ósseas confirmaram a relevância do controle térmico, com o tratamento TL apresentando ossos de maior resistência mecânica e melhores características biofísicas e morfométricas. Em comparação, os tratamentos com temperaturas elevadas (TH e TVH) comprometeram o desenvolvimento ósseo, produzindo ossos menos resistentes e com menor conteúdo mineral.

A TCO baixa (TL) apresentou resultados superiores, com os maiores níveis de GH e vitamina D₃. Em contrapartida, temperaturas mais elevadas (TH e TVH) foram prejudiciais,

com TVH registrando os menores níveis de vitamina D₃ e as maiores concentrações de PTH, refletindo um esforço compensatório para absorver cálcio. A redução da calcitonina em TVH indicou um desequilíbrio hormonal que comprometeu a mineralização óssea. Adicionalmente, os parâmetros hemogasométricos mostraram que as temperaturas elevadas (TH e TVH) afetaram negativamente a eficiência respiratória, causando desequilíbrios ácido-base e prejudicando a oxigenação tecidual nas fases finais da incubação. Esse desequilíbrio, associado ao esgotamento de glicose e glicogênio, e ao aumento de ácido úrico e lactato, evidenciou um metabolismo anaeróbico que comprometeu o crescimento muscular e a formação óssea. Em contraste, temperaturas mais baixas (TL) mantiveram uma homeostase fisiológica estável, favorecendo o desenvolvimento adequado dos embriões.

Este trabalho apresenta uma contribuição inédita ao investigar, de forma pioneira, a influência da temperatura de incubação nas fases iniciais, explorando detalhadamente o impacto do estresse térmico sobre o desenvolvimento ósseo. Pela primeira vez, foi analisada a relação entre a temperatura inicial de incubação e a mobilização de minerais provenientes da casca e da gema, bem como a deposição mineral nos ossos, além de estudar o papel fundamental dos hormônios calciotrópicos nesse processo. A análise engloba uma diversidade de parâmetros, fornecendo novas perspectivas sobre os efeitos das variações térmicas durante a incubação.

Recomenda-se a realização de pesquisas futuras que avaliem, durante a criação, os impactos desses resultados no sistema locomotor dos frangos. Esse acompanhamento é fundamental para entender como as condições iniciais de incubação influenciam o desenvolvimento locomotor ao longo da vida das aves.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, S. K.; FOX, J.; CARE, A. D. Calcium homeostasis in the chick embryo. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, v. 81B, n. 4, p. 975-979, 1985.
- ABDEL-SALAM, Z. A.; ABDU, A. M.; HARITH, M. A. Elemental and ultrastructural analysis of the eggshell: Ca, Mg and Na distribution during embryonic development via LIBS and SEM techniques. **International Journal of Poultry Science**, v.5, n.1, p.35-42, 2006.
- ALVES, A. P. **Desenvolvimento Embrionário: das Células ao Coração**. 2011. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Física, Universidade Federal de Minas Gerais, [S.L.], 2011.
- AL-MUSAWI, S. L.; 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**, London, v. 215, p. 1594-1604, 2012.
- ANDE, T. B.; WILSON, H. R. Hatchability of chicken embryos exposed to acute high temperature stress at various ages. **Poultry Science**, v. 60, p. 1561-1566, 1981.
- ANDERSON, H. C. Mechanism of mineral formation in bone. **Laboratory investigation**, v. 60, p. 320-330, 1989.
- ANGEL, R. Metabolic disorders: limitations to growth of and mineral deposition into the broiler skeleton after hatch and potential implications for leg problems. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 16, p. 138-149, 2007.
- APPLEGATE, T. J.; LILBURN, M. S. Growth of the femur and tibia of a commercial broiler line. **Poultry Science**, v. 8, p. 1289-1294, 2002.
- ARAÚJO, W. A. G.; ALEBRANTE, L.; CASTRO, A. D. Fatores capazes de afetar os índices de eclosão. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.6, n.5, p.1072-1087, 2009.
- ARAÚJO, W. A. G.; ALBINO, L.F.T. **Embriodiagnóstico**. In: ARAÚJO, W. A. G.; ALBINO, L.F.T. Comercial Incubation. Kerala: Transworld Research Network, 2011. Cap. 3, p. 29-67.
- 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.
- ATALGIN, S. H.; KURTUL, I. A morphological study of skeletal development in turkey during the pre-hatching stage. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 38, p. 23-30, 2009.
- AVSAR, K. O.; UCAR, A.; ÖZLÜ, S.; ELIBOL, O. Effect of high eggshell temperature

during the early period of incubation on hatchability, hatch time, residual yolk, and first-week broiler performance. **Applied Poultry Research**, v.31, 2022.

AYGÜN, Ali; NARİNÇ, Doğan. The effects of thermal manipulations during embryogenesis of broiler chicks on growth of embryo and skeletal traits. **AIP Conference Proceedings**, v. 1726, p. 020015, 2016.

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

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

BABACANOĞLU, E. Manipulated incubation conditions at hypoxia. **Archives of Animal Breeding**, v. 61, p. 337-349, 2018.

BAHR, J. M.; JOHNSON, P. A. Reproduction in poultry. *In*: Cupps PT (Ed.). **Reproduction in domestic animals**. 3. ed. New York: Academic Press, 1991. p. 555-575.

BARBOSA, V. M. Desenvolvimento embrionário. *In*: BARBOSA, V. M. **Fisiologia da incubação e desenvolvimento embrionário**. Belo Horizonte: FEP - MVZ, 2011. 124p. Cap. 5 p. 85-124.

BARBOSA, V. M.; BAIÃO, N. C. Formação e estrutura do ovo incubável. *In*: BARBOSA, V. M. **Fisiologia da incubação e desenvolvimento embrionário**. Belo Horizonte: FEP - MVZ, 2011. 124p. Cap. 1. p. 1-9.

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.

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.

BAROTT, H. G. Effects of temperature, humidity and other factors on hatch of eggs and on energy metabolism of chick embryos. **Technical Bulletin**, n. 553, p. 1-45, 1937.

BELLAIRS, R.; OSMOND, M. **The Atlas of Chick Development**. Londres: Elsevier Academic Press, 2005. 470 p.

BELNAP, Starlie C.; CURREA, John P.; LICKLITER, Robert. Prenatal incubation temperature affects neonatal precocial birds' locomotor behavior. **Physiology & Behavior**, v. 206, p. 51-58, 2019.

BERENDSEN, A.; OLSEN, B.R. Bone development. **Bone**, v. 80, p. 14-18, 2015.

BESSEI, W. Welfare of broilers: A review. **World's Poultry Science Journal**, v. 62, n. 3, p. 455-466, 2006.

BIDINOTTO, P. M.; SOUZA, R. H. S.; MORAES, G. Hepatic glycogen in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinations of microsamples. **Boletim técnico CEPTA**. 10: p.53-60, 1998.

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.

BURGDORF-MOISUK, A.; ZICCARDI, M.; LARSEN, R. S.; HOPPER, K. Validation of lactate measurement in american flamingo (*phoenicopterus ruber*) plasma and correlation with duration and difficulty of capture. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 43, n. 3, p. 450-458, 2012.

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

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.

BOERJAN, M. **Economics of a short hatch window**. The poultry site, June 2006. Disponível em: <http://www.thepoultrysite.com/articles/594/the-economics-of-a-short-hatch-window>. Acesso em: 01 ago. 2024.

BORGES, S. A. **Balço eletrolítico e sua interrelação com o equilíbrio ácido-básico em frangos de corte submetidos a estresse calórico**. 2001. 97f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2001.

BRADSHAW, R. H.; KIRKDEN, R. D.; BROOM, D. M. A review of the aetiology and pathology of leg weakness in broilers in relation to welfare. **World's Poultry Science Journal**, v. 58, n. 3, p. 269-281, 2002.

BRITO, A. B. Problemas Microbiológicos na Incubação Artificial. Artigo técnico **POLI-NUTRI**, 2006. Disponível em: <<http://www.polinutri.com.br/upload/artigo/199.pdf>>. Acesso em: 22 jul 2024.

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

BRONNER-FRASER, M. **Methods in avian embryology**. 1996. 369p.

BROOKES, M.; MAY, K. U. The influence of temperature on bone growth in the chick. **Journal of Anatomy**, v. 111, n. Pt 3, p. 351, 1972.

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

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.

BUSHINSKY, D. A.; MONK, R. D. Calcium. **The Lancet**, v. 352, p. 305-11, 1998.

CASTRO, T. F. **Hemogasometria e equilíbrio eletrolítico pré-operatório em manga-larga marchador acometido de síndrome cólica**. 2013. 65f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2013.

CALIL, T. A. C. O controle da janela de nascimento. **A revista do Avisite**, n. 40, p. 1983-0017, 2007.

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

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.

COBB. **Guia de Manejo de Incubação da Cobb-Vantress**, São Paulo: Cobb-Vantress, 2008. 46p

CESARIO, M. D. Desenvolvimento embrionário pré e pós postura-períodos críticos. *In*: MACARI, M.; GONZALES, E.; PATRÍCIO, I. S.; NÄÄS, I. A.; MARTINS, P. C. **Manejo de incubação**. 3. ed., Campinas: FACTA, 2013. 465p. cap.1.3 p.47-63.

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 vitamina D3 metabolism. **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 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, p. 1038-1043, 2002.

CHRISTENSEN, V. L. Factors affecting hatchability of turkey embryos. **Poultry and Avian Biology Reviews**, v. 6, n. 1, p. 71-82, 1995.

CHRISTENSEN, V. L.; DONALDSON, W. E.; NESTOR, K. E. Effect of supplemental oxygen on blood plasma organic acids within embryos from selected lines of turkeys. **Poultry Science**, v. 78, p. 1601-1605, 1999.

CHRISTENSEN, V.L. Factors associated with early embryonic mortality. **World's Poultry Science Journal**, v.57, p.359-372, 2001.

CHRISTENSEN, V. L.; ORT, D. T.; GRIMES, J. L. Physiological factors associated with weak neonatal poult (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, 118593, 2020.

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

CLARKE, B. Normal bone anatomy and physiology. **Clinical journal of the American Society of Nephrology**, v. 3, n. 3, p. 131-139, 2008.

CRUZ, M. R. D.; FAYLON, W.; LAGLIVA, A.; MAGARRO, A.; PARUNGAO, A.; MAGPANTAY, V. Effects of lowering incubation temperature on hatch of fertile and post-hatch performance and correlation between egg and chick weights of Banabang Kalabaw Philippine Native Chicken. **Philippine Journal of Veterinary and Animal Science**, v. 46, n. 1, p. 69-75, 2020.

DARRAS, V. M.; VAN DER GEYTEN, S.; KÜHN, E. R. Thyroid hormone metabolism in poultry. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v. 4, n. 1, p. 13-20, 2000.

DAY, T. K. **Blood gas analysis**. The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice, Philadelphia, v. 32, n. 5, p. 1031-1048, 2002

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.

DE MATOS, R. Calcium metabolism in birds. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 11, p. 59-82, 2008.

DE OLIVEIRA, J. Effects of in ovo feeding on turkey embryos development, energy status, intestinal maturation, gene expression and post-hatch development. 2007. Tese (Doutorado) - North Carolina State University, Raleigh, 2007.

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.

DECUYPERE, E.; BUYSE, J. Endocrine control of postnatal growth in poultry. **Journal of Poultry Science**, v. 42, p. 1-13, 2005.

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

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.

DEEMING, D. C.; FERGUSON, M. W. Physiological effects of incubation temperature on embryonic development in reptiles and birds. *In*: DEEMING, D. G.; FERGUSON, M. J. W. (Ed.). **Egg incubation**. Cambridge: University Press, 1991. p. 147-172.

DIAS, P. F.; MÜLLER, Y. M. R. Características do desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus domesticus*, em temperaturas e períodos diferentes de incubação. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, p. 233-235, 1998.

DIBARTOLA, S. P. **Fluid therapy in small animal practice**. 2ed. Saunders Company: Philadelphia, 2000. 720p

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.

EDWARDS, C. L. The Physiological Zero and the Index of Development for the Egg of the Domestic Fowl, *Gallus domesticus*. **Science New Series**, v. 15, n. 379, p. 521-522, 1902.

ETCHES, R. J. Desarrollo embrionario. *In*: **Reproducción aviar**. España: Editorial Acribia, 1998. p. 43-52.

EYAL-GILADI, H.; KOCHAV, S. From cleavage to primitive streak formation: A complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick: I. General morphology. **Developmental Biology**, v.49, p.321-337, 1976.

EYAL-GILADI H. The early embryonic development of the chick, as an epigenetic process. **Critical Reviews in Poultry Biology**, v.3, p.143-166, 1991.

EVERAERT, N.; DECUYPERE, E. Fisiologia do embrião. *In*: MACARI, M.; GONZALES, E.; PATRÍCIO, I. S.; NÄÄS, I. A.; MARTINS, P. C. **Manejo da incubação**. 3. ed., Campinas: FACTA, 2013. 465p Cap.1.2 p.32-43.

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.

FLORIANO, L. S. **Anatomia e fisiologia das aves domésticas**. Urutaí: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano (If Goiano), 2013.

FRANCA, T. N.; SILVA, T. P. B.; MARTINS, L. K. S. A.; SOUZA, V. H. B.; MORITA, V. S.; BARBOSA, V. M. Efeitos da alta temperatura de incubação sobre o peso de órgãos vitais e a qualidade de pintos recém-eclodidos. *In: CONFERÊNCIA FACTA WPSA-Brasil, 2019, Campinas. Anais [...].* Campinas: FACTA WPSA-Brasil, 2019.

FRANCA, T. N.; SILVA, T. P. B.; MARTINS, L. K. S. A.; MERCES, N. B.; OLIVEIRA FILHO, A. A.; AYRES, M. C. C.; BARBOSA, V. M. Parâmetros hemogasométricos de pintos incubados em alta temperatura. *In: CONFERÊNCIA FACTA WPSA-Brasil, 2019, Campinas. Anais [...].* Campinas: FACTA WPSA-Brasil, 2019.

FRANCA, T. N.; SILVA, T. P. B.; MARTINS, L. K. S. A.; MERCES, N. B.; CHAVES, N. M.; MORITA, V. S.; BARBOSA, V. M. Efeitos da alta temperatura de incubação sobre os parâmetros sanguíneos de pintos recém-eclodidos. *In: CONFERÊNCIA FACTA WPSA-Brasil, 2019, Campinas. Anais [...].* Campinas: FACTA WPSA-Brasil, 2019.

FRANDSON, R. D.; WILKE, W. L.; FAILS, A. D. **Anatomia e fisiologia dos animais de fazenda**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

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**, v. 76, p. 124-133, 1997.

FROST, H. M. **Bone remodeling dynamics**. Springfield: Thomas C. Company, 1963. 175 p.

FURLAN, R. L.; SILVA, A. V. F.; BORGES, S. A. e MACARI, M. Equilíbrio Ácido-básico. *In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte*. 2.ed., Jaboticabal: FUNEP, 2002. cap. 4, p. 51-73.

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

GABRIELLI, M. G.; MATERAZZI, G.; COX, J. V.; MENGHI, G. Specialised cell types in the chorioallantoic membrane express carbonic anhydrase during chick embryogenesis. **Journal of Anatomy**, v. 198, p. 229-238, 2001.

GASPAROTTO, O. C.; SIEBERT, M. N.; HENNEMANN, M. C.; COELHO, C. M. R.; GRANUCCI, N.; SILVA, B. L. da; SILVA, F. C. M. da. **Fisiologia Animal Comparada**. Florianópolis: Biologia/Ead/Ufsc, 2011. 238 p.

GAMBA, J. P. **Uso estratégico do equilíbrio eletrolítico para minimizar os efeitos do estresse térmico em frangos de corte**. 2011. 92f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – FCAV/UNESP. Jaboticabal, 2011.

GIL, A.; PLAZA-DIAZ, J.; MESA, M. D. Vitamin D: classic and novel actions. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 72, p. 87-95, 2018.

GILBERT, S. F. **Developmental Biology**. 8. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2006.

GIVISIEZ, P. E. N.; MOREIRA FILHO, A. L. B.; SANTOS, M. R. B.; OLIVEIRA, H. B.; FERKET, P. R.; OLIVEIRA, J. B.; MALHEIROS, R. D. Chicken embryo development: Metabolic and morphological basis for in ovo feeding technology. **Poultry Science**, v. 99, n. 12, p. 6774-6782, 2020.

GOMES, O. M. **Interpretação clínicas das alterações ácido-básicas e distúrbio da oxigenação**. Belo Horizonte: Edictor, 1997, 254p.

GONZALES, E. Análise de problemas de eclodibilidade e fertilidade de plantéis avícolas por métodos de embriodiagnóstico. *In*: X CONGRESSO NACIONAL DE ZOOTECNIA – ZOOTEC. **Anais eletrônicos**. Campo Grande, 2005.

GONZALES, E. E.; CESARIO, M. D. Desenvolvimento embrionário. *In*: MACARI, M.; GONZALES, E. E. (Org.). **Manejo da incubação**. 2. ed. Jaboticabal, SP: Facta, 2003. p. 51-64.

GRIFFIN, H. D.; PERRY, M. M.; GILBERT, A. B. Yolk formation. *In*: BELL, D.J.; FREEMAN, B. M. **Physiology and biochemistry of the domestic fowl**. London: Academic Press, 1984, v.5, p. 345-380.

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. 326 f. Tese (Doutorado em Ciências Animais) - Graduate School of Wageningen Institute of Animal Sciences (WIAS), Wageningen, 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.

HASHIMOTO, S.; YAMAZAKI, K.; OBI, T.; TAKASE, K. Relationship between severity of footpad dermatitis and carcass performance in broiler chickens. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, p. 1547-1548, 2013.

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

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

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.

HENRY, H. L. H. Regulation of vitamin D metabolism. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 25, p. 531-541, 2011.

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

HODGETTS, B. Successfully closing the hatch window. **International hatchery Practice**, v. 20, n. 5, p. 23, 2006.

HOUILLON, C. **Embriologia**. São Paulo: USP Editora, 1972, 160p.

HUETTNER, A.F. **Fundamentals of comparative embryology of the vertebrates**. New York: The Macmillan Company, 1959.

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.

IPEK, A.; SAHAN, U.; BAYCAN, S. C.; SOZEU, A. The effects of different eggshell temperatures on embryonic development, hatchability, chick quality, and first-week broiler performance. **Poultry Science**, v. 93, p. 464-472, 2014.

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.

JOSEPH, N. S.; LOURENS, A.; MORAN JR., E. T. The effects of suboptimal eggshell temperature during incubation on broiler chick quality, live performance, and further processing yield. **Poultry Science**, v. 85 p. 932-938, 2006.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KARAPLIS, A. C. Embryonic development of bone and the molecular regulation of intramembranous and endochondral bone formation. In: BILEZIKIAN, J. P.; RAISZ, L. G.; RODAN, G. A. (Org.). **Principles of bone biology**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2002. v. 1, p. 87-104.

KAMANLI, S.; YALÇIN, Z. S.; TASDEMİR, A. N.; TARIM, B.; TİLEK, E.; AYGÖREN, H.; MERAL, O.; KARSLI, B.; ANSAL BALCI, T.; BOZKURT, M. Effect of eggshell temperatures on hatching performance, egg production, and bone morphology of laying hens. **Turkey Journal Veterinary Animal Science**, v.45, p.11- 20, 2021.

KIRSCH, T.; NAH, H.; SHAPIRO, I. M.; PACIFICI, M. Regulated production of mineralization-competent matrix vesicles in hypertrophic chondrocytes. **The Journal of Cell Biology**, v. 137, n. 5, p. 1149-1160, 1997.

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.

KETTRUKAT, T.; GROCHOWSKA, E.; THERKILDSEN, M. The effect of incubation temperature on the development of the locomotory system and welfare in broiler chickens: A review. **Livestock Science**, v. 276, p. 105326, 2023.

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.

KÖNIG, H. E. **Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

KUBOTA, M.; ABE, E.; SHINKI, T.; SUDA, T. Vitamin D metabolism and its possible role in the developing chick embryo. **Biochemical Journal**, v. 194, p. 103-109, 1981.

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

LAKATOS, P.; SZILI, B.; BAKOS, B.; TAKACS, I.; PUTZ, Z.; ISTENES, I. Thyroid hormones, glucocorticoids, insulin, and bone. **Handbook of Experimental Pharmacology**. v. 262, p. 93-120, 2019.

LEFEBVRE, V.; BHATTARAM, P. Vertebrate skeletogenesis. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 90, p. 291-317, 2010.

- 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.
- LILLIE, F. R. **Development of the chick**. 3.ed. New York: Henry Holt, 1952. 624p.
- LIN, H.; ZHANG, H. F.; JIAO, H. C.; ZHAO, T.; SUI, S. J.; ZHANG, Z. Y.; BUYS, J.; DECUYPERE, E. Thermoregulation responses of broiler chickens to humidity at different ambient temperatures. I. One week of age. **Poultry Science**, v. 84, n. 8, p. 1166-1172, 2005.
- 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, 2013.
- LORENTE, L. P.; RAMINELLI, G.; SILVA, D. F. "Tecido Ósseo", p. 61 -68. *In: Manual Teórico e Prático de Histologia*. São Paulo: Blucher, 2019.
- LOURENS, A.; MOLENAAR, R.; VAN DEN BRAND, H.; HEETKAMP, M.; J. W.; MEIJERHOF, R.; KEMP, B. Effect of egg size on heat production and the transition of energy from egg to hatchling. **Poultry Science**, v. 85, p. 770-776, 2006.
- LOURENS, A.; VAN DEN BRAND, H.; HEETKAMP, M. J. W.; MEIJERHOF, R.; KEMP, B. Effect of eggshell temperature and oxygen concentration on embryo growth and metabolism during incubation. **Poultry Science**, v.86, p. 2194-2199, 2007.
- LOURENS, A.; VAN DER BRAND, H.; MEIJERHOF, R.; KEMP, B. Effects of eggshell temperature during incubation on embryo development, hatchability, and posthatch development. **Poultry Science**, v. 84, p. 914-920, 2005.
- LUENGO, M.; PICADO, C.; PIERA, C.; GUANABENS, N.; MONTSERRAT, J. M.; RIVERA, J.; SETOAIN, J. Intestinal calcium absorption and parathyroid hormone secretion in asthmatic patients on prolonged oral or inhaled steroid treatment. **European Respiratory Journal**, v. 4, p. 441-444, 1991.

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

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

MAATJENS, C. M.; REIJRINK, I. A. M.; MOLENAAR, R.; VAN DER POL, C. W.; KEMP, B.; VAN DEN BRAND, H. Temperature and 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.

MALTBY, V. E.; STICKLAND, N. C. Muscle development and growth during avian embryogenesis. **Journal of Anatomy**, v. 36, n. 3, p. 395-404, 2003.

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.

MARKS, S. C.; ODGREN, P. R. Structure and development of the skeleton. *In*: BILEZIKIAN, J. P.; RAISZ, L. G.; RODAN, G. A. **Principles of bone biology**. 2. ed. v. 1. 2002.

MARTINI, L. A. Magnesium supplementation and bone turnover. **Nutrition Reviews**, v. 57, n. 7, 1999.

MATUSZEWSKI, A.; LUKASIEWICZ, M.; NIEMIEC, J. Calcium and phosphorus and their nanoparticle forms in poultry nutrition. **World's Poultry Science Journal**, v. 76, n. 2, p. 328-345, 2020.

MAULDIN, J. M.; BUHR, R. J. What is really happening in your incubation? **International Hatchery Practice**, v. 9, n. 5, p. 19-22, 1995.

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

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

MEYER, T. N.; DA SILVA, A. L. Resposta celular ao estresse. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 181-188, 1999.

MENDONÇA JÚNIOR, C. X.; FURLAN, R. L.; AMOROSO, L.; ALMEIDA, E. A. Fisiopatologia do sistema locomotor. In: ANDREATTI FILHO, R. L.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; BACK, A.; FABIO, J.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. 3. ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciências e Tecnologia Avícolas, 2020. p. 245-267.

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.; HULET, R.; MEIJERHOF, C. M.; KEMP, B.; VAN DEN BRAND, H. High eggshell temperatures during incubation decrease growth performance and increase the incidence of ascites in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 90, p. 624-632, 2011b.

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, 2011a.

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.

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

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

MORII, H. Overview of skeletal diseases and calcium metabolism in relation to magnesium. In: NISHIZAWA, Y.; MORII, H.; DURLACH, J. (Eds.). **New Perspectives in Magnesium Research**. London: Springer-Verlag, 2007. p. 263-265.

MROCZEK-SOSNOWSKA, N.; LUKASIEWICZ, M.; ADAMEK, D.; KAMASZEWSKI, M.; NIEMIEC, J.; WNUK-GNICH, A.; SCOTT, A.; CHWALIBOG, A.; SAWOSZ, E. Effect of copper nanoparticles administered in ovo on the activity of proliferating cells and on the resistance of femoral bones in broiler chickens. **Archives of Animal Nutrition**, v. 71, n. 4, p. 327–332, 2017

MUIR, W. I.; GROVES, P. J. The leg strength of two commercial strains of meat chicken subjected to different incubation profiles. **Poultry Science**, v. 98, n. 1, p. 1-9, 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.

OKSBJERG, N.; HENCKEL, P.; HANSEN, A. C.; HENRIKSEN, A.; HANSEN, T. F.; HENCKEL, J. Effects of incubation temperature on growth and bone strength in broilers. **European Poultry Science**, v. 83, 2019.

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.

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.

O'DEA, E. E.; FASENKO, G. M.; FEDDES, J. J. R.; ROBINSON, F. E.; SEGURA, J. C.; OUELLETTE, C. A. e VAN MIDDELKOOP, J. H. Investigating the Eggshell Conductance and Embryonic Metabolism of Modern and Unselected Domestic Avian Genetic Strains at Two Flock Ages. **Poultry Science**, v. 83, p. 2059-2070, 2004.

OMEDE, A.A.; BHUIYAN, M.M.; LSLAM, A. F.; IJI, P.A. Physico-chemical properties of late-incubation egg amniotic fluid and a potential in ovo feed supplement. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 30, n. 8, p. 1124, 2017.

OPPENHEIM, R. W.; LEVIN, H. L. Short-term changes in incubation temperature: behavioral and physiological effects in the chick embryo from 6 to 20 days. **Developmental Psychobiology**, v. 8, p. 103-115, 1975.

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.

OVIEDO-RONDÓN, E. O.; FERKET, P. R. Nutritional factors that affect leg problems in meat poultry: A Review. In: 32nd Annual Carolina Poultry Nutrition Conference, 2005, Raleigh. **Anais [...]**. Raleigh: Carolina Feed Industry Association, 2005.

OVIEDO-RODÓN, E. O.; WINELAND, M. J.; SMALL, J.; CUTCHIN, H.; MCELROY, A.; BARRI, A.; MARTIN, S. Effect of incubation temperatures and chick transportation Conditions on bone development and leg health. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 18, p. 671-678, 2009.

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.; 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.

OZAYDIN, T.; CELIK, I. Effects of High Incubation Temperature on the Body Weight and Yolk Consumption of two Commercial Broiler Strain. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 42, p. 1253, 2014.

PALACIOS, C. The role of nutrients in bone health, from A to Z. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, n. 8, p. 621-628, 2006.

PATTEN, B. M. **Early embryology of the chick**. 4 ed. London: Lewis, 1951,244p.
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.

PEEBLES, E. D.; BURNHAM, M. R.; GARDNER, C. W.; BRAKE J.; BRUZUAL J.J.; GERARD, P.D. Effects of incubational humidity and hen age on embryo composition in broiler hatching eggs from young breeders. **Poultry Science**, v.80, p.1299-1304, 2001.

PARSONS, A. H.; COMBS, G. F. Blood ionized calcium cycles in the chicken. **Poultry Science**, v. 60, p. 1520-1524, 1981.

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

PINES, M.; HURWITZ, S. The role of the growth plate in longitudinal bone growth. **Poultry Science**, v. 70, p. 1806-1814, 1991.

PINES, M.; RESHEF, R. Poultry bone development and bone disorders. *In: Sturkie's Avian Physiology*, **Elsevier Inc.**, 2015.

PIZAURO JUNIOR, J. M.; GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J. Regulação do metabolismo ósseo por hormônios e íons inorgânicos. *In: MACARI, M.; MAIORKA, A. Fisiologia das aves comerciais*. Jaboticabal: Funep, 2017. 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, 2017. p. 492-513.

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

PROENEM. **Tecidos cartilaginoso e ósseo**. [s.d.]. Disponível em: <https://proenem.com.br/enem/biologia/tecidos-cartilaginoso-e-osseo/#nav>. Acesso em: 12 fev. 2024.

PLANETA BIOLOGIA. **Tecido ósseo**. [s.d.]. Disponível em: <https://planetabiologia.com/tecido-osseo/>. Acesso em: 11 jun. 2024.

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.

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

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.

RICKARD, D.; HARRIS, S. A.; TURNER, R.; KHOSLA, S.; SPELSBURG, T. C. Estrogens and Progestins. *In*: BILEZIKIAN, J. P.; RAISZ, L. G.; RODAN, G. A. (ed.). **Principles of bone biology**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2002. p. 1-23.

RICKLEFS, R. E. Community diversity: relative roles of local and regional processes. **Science**, v. 235, p. 167-171, 1987.

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.

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

ROMANOFF, A. L.; ROMANOFF, A. J. **Biochemistry of the Avian Embryo: A Quantitative Analysis of Prenatal Development**. New York: John Wiley & Sons, 1967.

ROSA, P. S.; AVILA, V. S. Variáveis relacionadas ao rendimento da incubação de ovos em matrizes de frangos de corte. **Comunicado Técnico Embrapa Suínos e Aves**, n. 246, p. 1-3, 2000.

ROSS, M. H.; REITH, E. J.; ROMRELL, L. J. **Histologia texto e atlas**. São Paulo: Editora Manole, 1993. p. 779.

ROWLETT, K.; SIMKISS, K. Respiratory gases and acid-base balance in shell-less avian embryos. **Journal of Experimental Biology**, v. 143, p. 529-536, 1989.

RUDE, R. K.; KIRCHEN, M. E.; GRUBER, H. E.; STASKY, A. A.; MEYER, M. H. Magnesium deficiency induces bone loss in the rat. *Mineral and Electrolyte Metabolism*, v. 24, n. 5, p. 314-320, 1998.

RUTZ, F.; ANCIUTI, M. A.; PAN, E. A. **Fisiologia e manejo reprodutivo de aves**. Pelotas: UFPel, 1996.

SANTANA, M. H. M.; GIVISIEZ, P. E. N.; FIGUEREDO JR., J. P.; SANTOS, E. G. Incubação: principais parâmetros que interferem no desenvolvimento embrionário de aves. **Revista Eletrônica Nutritme**, v. 11, p. 3387-3398, 2014.

SAKOMURA, N. K.; DA SILVA, J. H. V.; COSTA, F. G. P.; FERNANDES, J. B. K. E; HAUSCHILD, L. Digestão e Absorção de Lipídeos. In: DA SILVA, J. H. V.; LIMA, R. B.; LACERDA, P. B e OLIVEIRA, A. C. **Nutrição de não ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP. 2014. cap 2. p. 62-76.

SCANES, C. G. Ontogeny of the Hypothalamic-Pituitary (Growth Hormone)-Insulin-Like Growth Factor-I Axis in Birds. **American Zoologist**, v. 37, p. 524-535, 1997.

SHANMUGASUNDARAM, R.; SELVARAJ, R. K. Vitamin D-1 α -hydroxylase and vitamin D-24-hydroxylase mRNA studies in chickens. **Poultry Science**, v. 91, p. 1819–1824, 2012.

SHASTAK, Y.; RODEHUTSCORD, M. A review of the role of magnesium in poultry nutrition. **World's Poultry Science Journal**, v. 71, 2015.

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.

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

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.

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.

SGAVIOLI, S.; SANTOS, E. T.; DOMINGUES, C. H. F.; QUADROS, T. C. O.; CASTIBLANCO, D. M. C.; ANDRADE-GARCIA, G. M.; AMOROSO, L.; NÄAS, I. A.; GARCIA, R. G.; BARALDI-ARTONI, S. M. Effect of high incubation temperature on the

blood parameters of layer chicks. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 18, n. 4, p. 045-052, 2016.

SOARES JR, J. H. Calcium Metabolism and Its Control — A Review. **Poultry Science**, v. 63, p. 2075-2083, 1984.

SOLOMON, S. E. **Egg and Eggshell Quality**. London: Wolfe Publishing, 1991. 149 p.
SOLOMON, S. E. Oviduct. In: BELL, D. J.; FREEMAN, B. M. *Physiology and biochemistry of the domestic fowl*. London: Academic Press, 1984. p. 380-417.

SÖZCÜ, A.; İPEK, A. Incubation conditions affect chick quality and broiler performance. **Journal of Agricultural Faculty of Uludag University**, p. 139-146, 2013.

SÖZCÜ, A.; İPEK, A.; VAN DEN BRAND, H. Eggshell temperature during early and late incubation affects embryo and hatchling development in broiler chicks. *Journal of Applied Poultry Research*, v. 31, n. 1, p. 1-9, 2022.

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.

STANFORD, M. Calcium metabolism. In: HARRISON, G. J.; LIGHTFOOT, T. L. (Ed.). **Clinical avian medicine**. v. 1. Palm Beach (FL): Spix Publishing, 2006. p. 141–151.

STEWART, M. E.; TEREPKA, A. R. Transport functions of the chick chorio-allantoic membrane. I. Normal histology and evidence for active electrolyte transport from the allantoic fluid, in vivo. **Experimental Cell Research**, v. 58, p. 93-106, 1969.

SUAREZ, M. E.; WILSON, H. R.; MCPHERSON, B. N.; MATHER, F. B. E.; WILCOX, C. J. Low temperature effects on embryonic development and hatch time. **Poultry Science**, v. 75, p. 924-932, 1996.

TINAWI, M. Disorders of Calcium Metabolism: Hypocalcemia and Hypercalcemia. **Cureus**, v. 13, n. 1, 2021.

TONG, Q.; ROMANINI, C.E; EXADAKTYLOS, V.; BAHR, C.; BERCKMANS, D. BERGOUG, H.; ETERRADOSSI, N.; ROULSTON, N.; VERHELST.; McGONNELL, I.M.; DEMMERS, T. Embryonic development and the physiological factors that coordinate hatching in domestic chickens. **Poultry Science**, v. 92, n. 3, p. 620-628, 2013.

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.

TOSCANO, M. J.; NASR, M. A. F.; HOTHERSALL, B. Correlation between broiler lameness and anatomical measurements of bone using radiographical projections with assessments of consistency across and within radiographs. **Poultry Science**, v. 92, p. 2251-2258, 2013.

TUAN, R. S.; ZRIKE, J. Functional involvement of carbonic anhydrase in calcium transport of the chick chorioallantoic membrane. **Biochemical Journal**, v. 176, p. 67-74, 1978.

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

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

UNIFAL-MG. Tecido Ósseo. [s.d.]. Disponível em: <https://www.unifal-mg.edu.br/histologiainterativa/tecido-osseo/>. Acesso em: 12 fev. 2024.

VANDERLEY, E. P.; SANTANA, L. P. **Histologia e Embriologia Animal Comparada**. São Paulo: Editora Científica, 2015. 188p.

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 DER POL, C.; MAAJENS, M.; NIETEN, M.; SMITS, S. Effects of eggshell temperature on bone development and chick quality in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 93, n. 12, p. 2878-2883, 2014. DOI: 10.3382/ps.2014-04210.

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

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

VAN DER WAGT, I.; DE JONG, I. C.; MITCHELL, M. A.; MOLENAAR, R.; VAN DEN BRAND, H. A review on yolk sac utilization in poultry. **Poultry Science**, v. 99, n. 4, p. 2162-2175, 2020.

VEUM, T. L. Phosphorus and calcium nutrition and metabolism. *In*: VITTI, D. M. S. S.; KEBREAB, E. **Phosphorus and Calcium Utilization and Requirements in Farm Animals**. Oxfordshire: CAB International, 2010. p. 94–111.

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

VIEIRA, S. L.; MORAN Jr, E. T. Effects of delayed placement and used litter on broiler yields. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 8, p. 75-81, 1999.

VIEITES, F. M; MORAES, G. H. K; ALBINO, L. F. T.; ROSTAGNO, H. S.; SANTIAGO, H.; DONZELE, J. L.; VARGAS JUNIOR, J. G.; ATENCIO, A. Balanço eletrolítico e níveis de proteína bruta sobre o desempenho de pintos de corte de 1 a 21

dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n.6, p. 2076-2085, 2004.

WALSTRA, I.; TEN NAPEL, J.; KEMP, B.; VAN DEN BRAND, H. Adaptive response to *Eimeria acervulina* in rearing hens is affected by suboptimal incubation temperature and heat exposure in later life. **Animal**, v. 6, n. 1, p. 137-144, 2012.

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.

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

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

WILSON, H. R. Inter-relationships of egg size, chick size, posthatching growth and hatchability. **World's Poultry Science Journal**, v. 47, p. 5-20, 1991.

WITSCHI, E. **Avian oogenesis in development of vertebrates**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1956. Cap. 3. p. 33-39.

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.

WOLPERT, L.; BEDDINGTON, R. **Princípios de Biologia do Desenvolvimento**. Porto Alegre: Artmed, 2000. 484 p.

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, n. 1, p. 1-15, 2014.

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.

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.

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.

YALCIN, S.; SIEGEL, P. B. Exposure to cold or heat during incubation on developmental stability of broiler embryos. **Poultry Science**, v. 82, n. 9, p. 1388-1392, 2003.

YALÇIN, S.; ÖZKAN, S.; ÇABUK, M.; BUYSE, J.; DECUYPERE, E.; SIEGEL, P. B. Influence of early incubation temperature on tibial dyschondroplasia in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 86, n. 8, p. 1772-1783, 2007.

YAHAV, S.; COLLINS, A.; SHINDER, D.; PICARD, M. The effect of thermal manipulations during embryogenesis of broiler chicks (*Gallus domesticus*) on hatchability, body weight and thermoregulation after hatch. **Poultry Science**, v. 83, n. 12, p. 1959-1963, 2004.

ZHENG, J.; NAKAMURA, K.; MASEKI, Y.; GEELISSEN, S. M.; BERGHMAN, L. R.; SAKAI, T. Independent differentiation of mammatropes and somatotropes in the chicken embryonic pituitary gland. Analysis by cell distribution and attempt to detect somatomammatropes. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 125, p. 429–439, 2006.

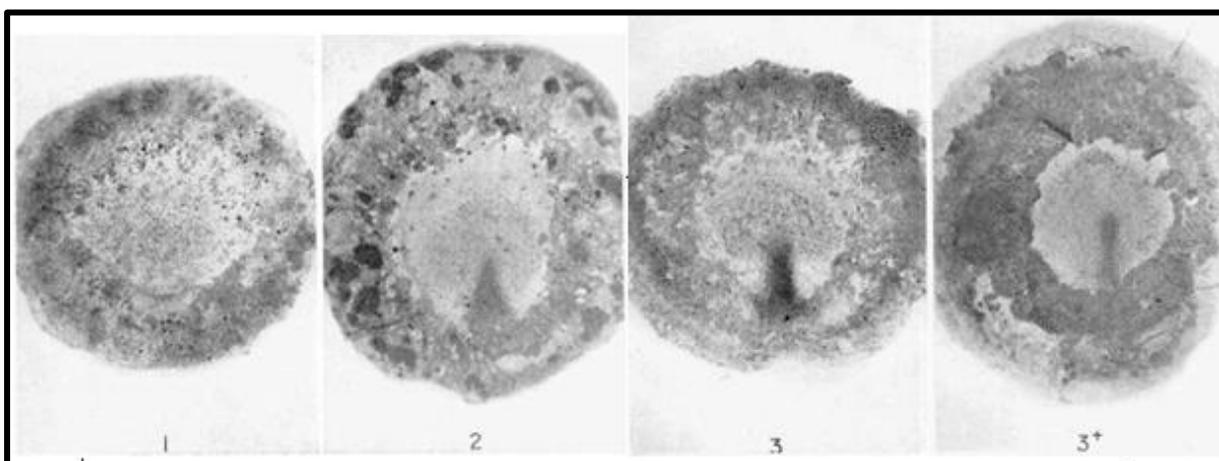
ZUIDHOF, M. J.; SCHNEIDER, B. L.; CARNEY, V. L.; KORVER, D. R.; ROBINSON, F. E. Growth, efficiency, and yield of commercial broilers from 1957, 1978, and 2005. **Poultry Science**, v. 93, n. 12, p. 2970-2982, 2014.

ANEXO

Tabela normal de Hamburger e Hamilton (1951)

Neste anexo, estão contidas informações que demonstram uma série de estágios normais no desenvolvimento do embrião de galinha desde o momento da postura do ovo até o nascimento do pintainho, a partir de um mapeamento desenvolvido por Hamburger e Hamilton em 1951. Os autores classificaram o progresso embrionário em 45 estágios, subdividindo-os em três fases distintas: estágios iniciais de 1 a 6, caracterizados pelo desenvolvimento da linha primitiva. Estágios intermediários, de 7 a 14, englobando principalmente o número de somitos. E por fim, os estágios de desenvolvimento tardios (15 a 45) identificados por várias características morfológicas.

Estágio embrionário	Modificações estruturais
Estágio 1. Pré-linha	Um “escudo embrionário” pode ser visível, indicando a acumulação de células em direção à metade posterior do blastoderma.
Estágio 2. Linha inicial (6-7 horas de incubação)	Neste estágio, a linha primitiva aparece curta e cônica, cerca de 0.3-0.5 mm de comprimento.
Estágio 3. Linha intermediária (12-13 horas de incubação)	A linha primitiva estende-se da margem posterior até aproximadamente o centro da área pelúcida.

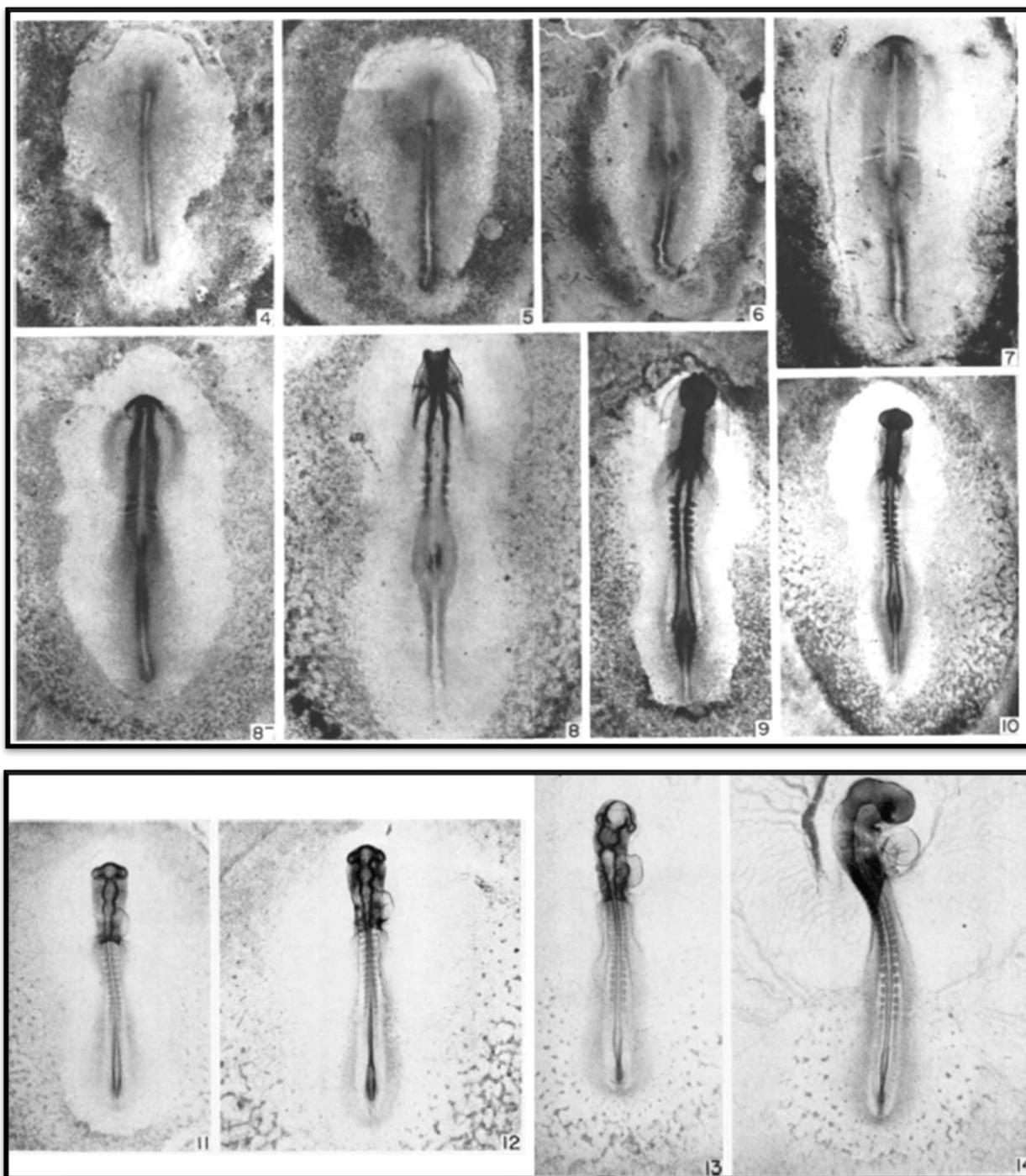
Ilustração 1. Estágios embrionários 1-3’.

Fonte: Hamburger e Hamilton (1951)

Estágio embrionário	Modificações estruturais
Estágio 4. Linha definitiva (18-19 horas de incubação)	A linha primitiva atingiu seu comprimento máximo (1.88 mm). Sulco primitivo e o nó de Hensen estão presentes. A área pelúcida encontra-se em forma de pêra. É possível observar o início do processo da cabeça.
Estágio 5. Processo da cabeça (19-22 horas de incubação)	A notocorda ou processo da cabeça é visível e se estende para frente a partir da borda anterior do nó de Hensen.
Estágio 6. Dobra da cabeça (23-25 horas de incubação)	Uma dobra definida do blastoderma anterior à notocorda agora marca a extremidade anterior do embrião. Nenhum somito ainda apareceu no mesoderma lateral à notocorda.
<u>Estágios 7 a 14: baseados principalmente nos números de pares de somitos visíveis</u>	
Estágio 7. Um par de somito (23-26 horas de incubação)	Este é, na verdade, o segundo par de somitos da série, o primeiro ainda não está claramente definido. As dobras neurais são visíveis na região da cabeça.
Estágio 8. Quatro pares de somitos (26-29 horas de incubação)	As pregas neurais se encontram no nível do mesencéfalo. As ilhas de sangue estão presentes na metade posterior do blastoderma.
Estágio 9. Sete pares de somitos (29-33 horas de incubação)	As vesículas ópticas primárias estão presentes. Os primórdios emparelhados do coração começam a se fundir. Ouvido interno começando a se formar.
Estágio 10. Dez pares de somitos (33-38 horas de incubação).	Primeira indicação de flexão craniana. Coração ligeiramente dobrado para a direita. Inicia-se a síntese de hemoglobina.
Estágio 11. Treze pares de somitos (40-45 horas de incubação).	Leve flexão craniana. Cinco neurômeros do rombencéfalo são distintos. As vesículas ópticas são contraídas nas bases. Coração dobrado para a direita. Formação da bolsa de Rathke.
Estágio 12. Dezesesseis pares de somitos (45-49 horas de incubação)	A cabeça está virando para o lado esquerdo. Telencéfalo indicado. Vesículas ópticas primárias e haste óptica bem estabelecidas. A fossa auditiva é profunda, mas bem aberta. O coração é ligeiramente em formato de S. Desenvolvimento do sistema circulatório.
Estágio 13. Dezenove pares de somitos (48-52 horas de incubação)	A cabeça está parcialmente ou totalmente virada para o lado esquerdo. Aumento do telencéfalo. Canal atrioventricular indicado por constrição. A dobra da cabeça do âmnio cobre o prosencéfalo, o mesencéfalo e a parte anterior do rombencéfalo. Proventrículo e moela diferenciam-se.
Estágio 14. Vinte e dois pares de somitos (50-53 horas de incubação)	Os eixos do prosencéfalo e do rombencéfalo formam um ângulo quase reto. Rotação do corpo para atrás. A vesícula óptica começa a invaginar. Abertura da fossa ótica constricta. A bolsa de Rathke pode ser reconhecida. O âmnio estende-se aos somitos 7-10.

Além do estágio 14, o número de somitos torna-se cada vez mais difícil de determinar com precisão.

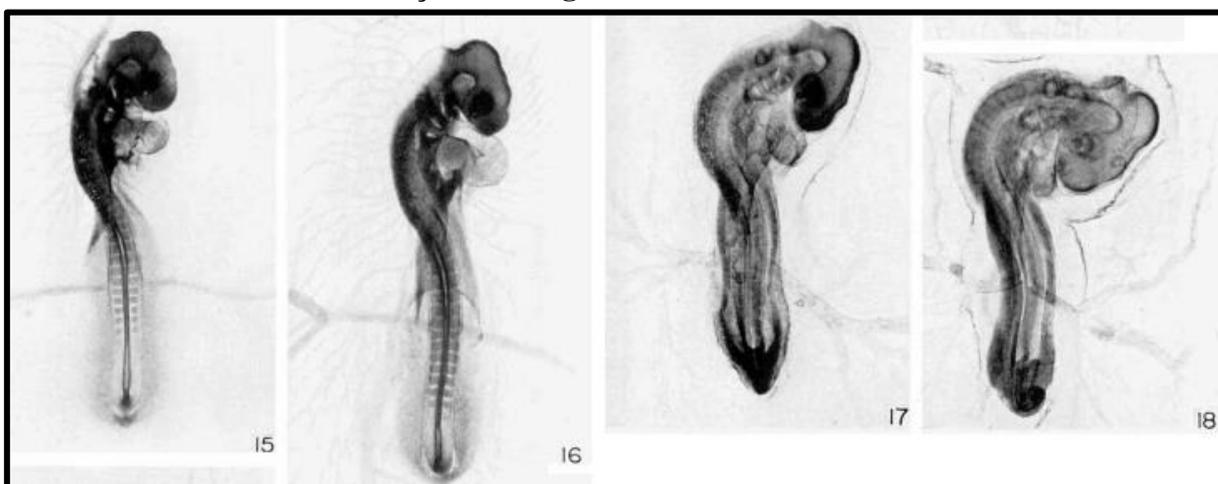
Ilustração 2. Estágios embrionários 4-14.



Fonte: Hamburger e Hamilton (1951)

Estágio embrionário	Modificações estruturais
Estágio 15. (50-55 horas de incubação)	Princípios de membros: condensações imperceptíveis de mesoderma para broto de asa. 24-27 pares de somitos. O âmnio se estende até o nível dos somitos 7-14. Os eixos do prosencéfalo e do rombencéfalo formam o ângulo agudo. A flexão cervical é uma curva ampla. Os primórdios do pulmão diferenciam-se da faringe.
Estágio 16. (51-56 horas de incubação)	As dobras laterais do corpo estendem-se até o nível dos somitos 17-20, entre os níveis das asas e das pernas. As asas são levantadas do blastoderma. 26-28 pares de somitos. Todas as flexões estão mais acentuadas. A rotação se estende aos somitos 14-15. O broto da cauda é um cone curto e reto. Epífise encontra-se em desenvolvimento.
Estágio 17. (52-64 horas de incubação)	As dobras laterais do corpo estendem-se por toda a circunferência de corpo. 29-32 pares de somitos. O âmnio tem visibilidade considerável e variável em extensão. A flexão craniana permanece inalterada e a rotação estende-se até o nível dos somitos 17-18. A pineal é um botão distinto. O alantoide ainda não está formado.
Estágio 18. (65-69 horas de incubação)	Os botões dos membros estão aumentados. 30-36 pares de somitos. O âmnio, geralmente fechado. A rotação agora se estende para a parte posterior do corpo. Arcos viscerais (faríngeos): processo maxilar ausente ou imperceptível. Broto da cauda: virado para a direita. O alantoide é uma bolsa curta e de paredes grossas. Os primeiros movimentos passivos podem ser detectados.

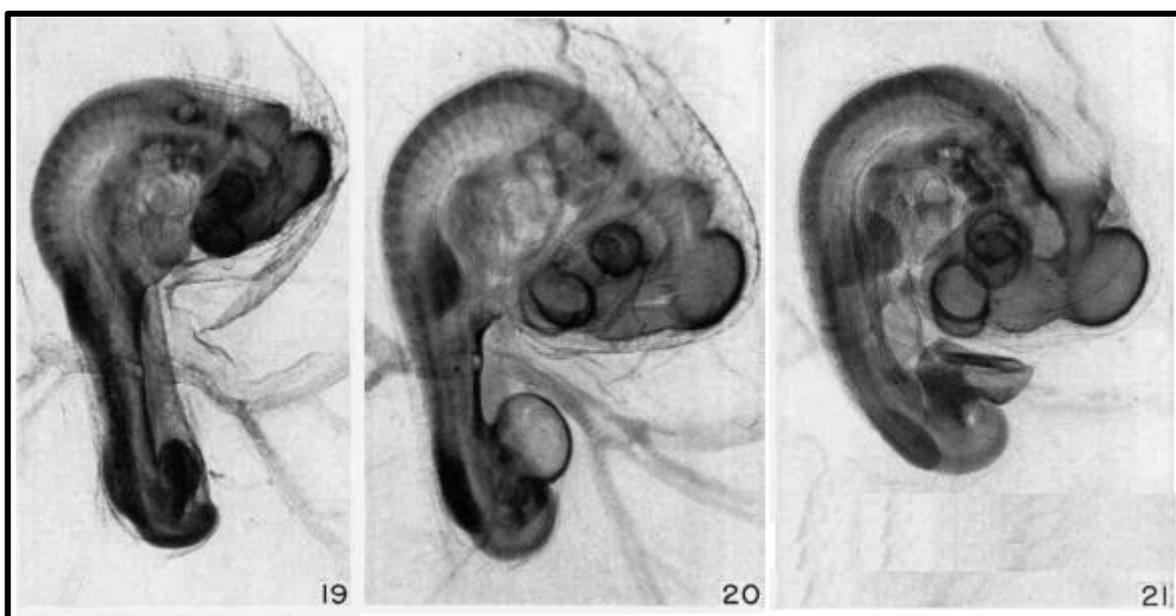
Ilustração 3. Estágios embrionários 15-18.



Fonte: Hamburger e Hamilton (1951)

Estágio embrionário	Modificações estruturais
<p>Estágio 19. (68-72 horas de incubação)</p>	<p>Os botões dos membros estão alargados, simétricos. 37-40 pares de somitos, estendem-se até a cauda. O contorno da parte posterior do tronco é direto para a cauda. O alantóide é um pequeno bolso de tamanho variável. Os olhos, não pigmentados. Os arcos aórticos se formam, o esquerdo logo degenera; ductos néfricos unem-se com a cloaca.</p>
<p>Estágio 20. (70-72 horas de incubação)</p>	<p>Os botões das pernas são distintamente maiores a partir de agora do que os botões das asas. Os botões das asas ainda são aproximadamente simétricos. Os botões das pernas são ligeiramente assimétricos. A flexão cervical é mais acentuada do que no estágio 19. A curvatura na região da cauda começa a se estender para frente na região lombosacral. Rotação concluída. O processo maxilar é distinto, igual ou superior em comprimento ao processo mandibular. O alantóide é vesicular, de tamanho variável. Há pigmento ocular, um leve tom acinzentado. Há também, formas do arco pulmonar; canal arterial; embrião cercado por âmnio.</p>
<p>Estágio 21. (3,5 dias de incubação)</p>	<p>Processo maxilar mais longo que o mandibular. Alantóide de tamanho variável, podendo estender-se até a cabeça. 43-44 pares de somitos. A Pigmentação dos olhos é fraca. Ocorrem os primeiros movimentos ativos de cabeça e pescoço; fibras motoras mais precoces entram em contato com os músculos anteriores do tronco.</p>

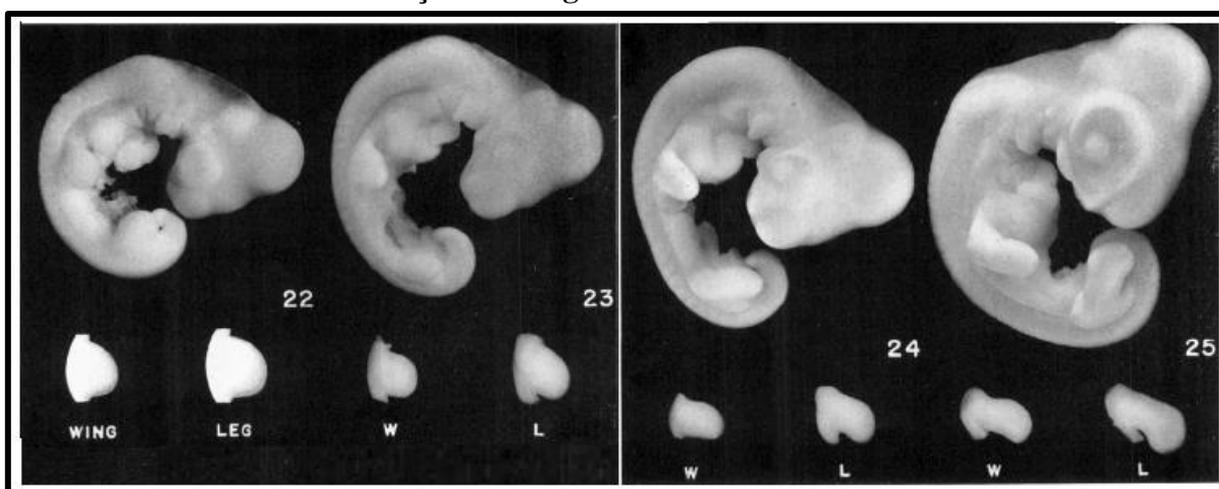
Ilustração 4. Estágios embrionários 19-21.



Fonte: Hamburger e Hamilton (1951)

Estágio embrionário	Modificações estruturais
Estágio 22. (3,5 dias de incubação)	Pigmentação dos olhos é distinta. Os somitos se estendem até a ponta da cauda. As células corticais e medulares adrenais se diferenciam; inicia-se a síntese de insulina; começa a síntese de estrogênio.
Estágio 23. (4 dias de incubação)	Os membros são mais longos que no estágio 22. O processo maxilar é ainda mais alongado. A primeira fenda visceral é representada por uma linha tracejada. Sua parte dorsal é uma fenda distinta. O contorno dorsal do rombencéfalo à cauda é uma linha curvada.
Estágio 24. (4,5 dias de incubação)	Os botões das asas e das pernas são mais compridos do que largos. Córion e alantóide se fundem para dar cório-alantoide; metanefro começa a diferenciar.
Estágio 25. (4,5-5 dias de incubação)	Articulações de cotovelo e joelho distintas. Placa digital na asa distinta, mas sem demarcação de dígitos. O baço se diferencia.

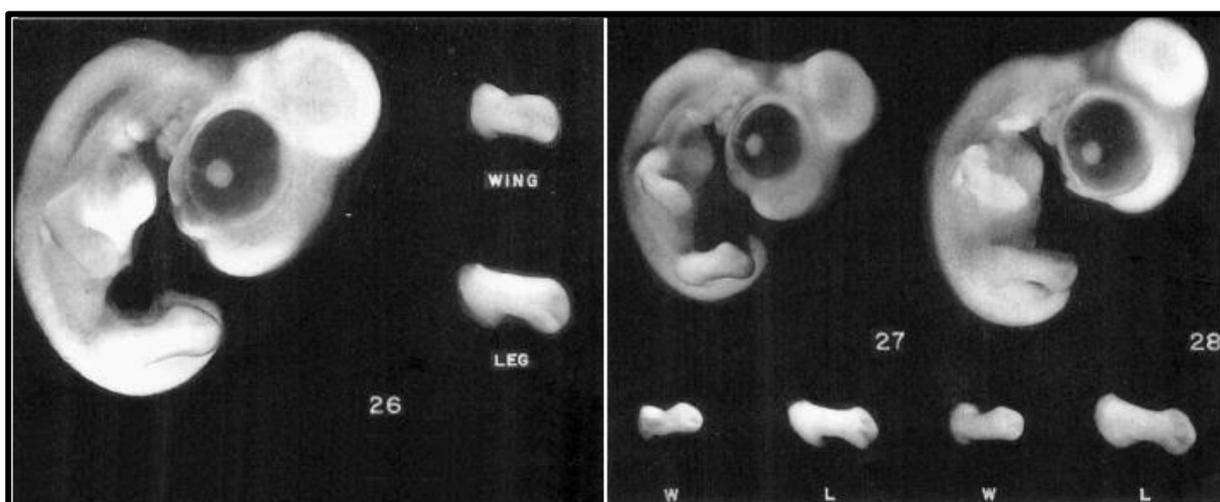
Ilustração 5. Estágios embrionários 22-25.



Fonte: Hamburger e Hamilton (1951)

Estágio embrionário	Modificações estruturais
Estágio 26. (5 dias de incubação)	Membros estão mais longos. Contorno da placa digital arredondado. Demarcação dos três primeiros dedos distintos. Processo mandibular alongado ventralmente. Mesonefro torna-se funcional; começa a produção de eritrócitos definitivos; hemoglobina sintetizada; primeiros movimentos ativos do tronco; inicia-se a síntese de corticosteróides; o duodeno começa a se diferenciar; primeiros movimentos da boca; a bolsa de Fabricius começa a se diferenciar; coração é formado.
Estágio 27. (5-5,5 dias de incubação)	Ranhas distintas entre os dedos. Contorno do processo maxilar é uma linha curva e quebrada. O processo mandibular se alargou ventralmente e cresceu para a frente. Formação de bicos; o âmnio começa a se contrair ritmicamente.
Estágio 28. (5,5-6 dias de incubação)	Segundo dedo e terceiro dedo do pé mais longos que os outros. O bico é uma protuberância distinta e visível de perfil. Os primeiros reflexos são estabelecidos.

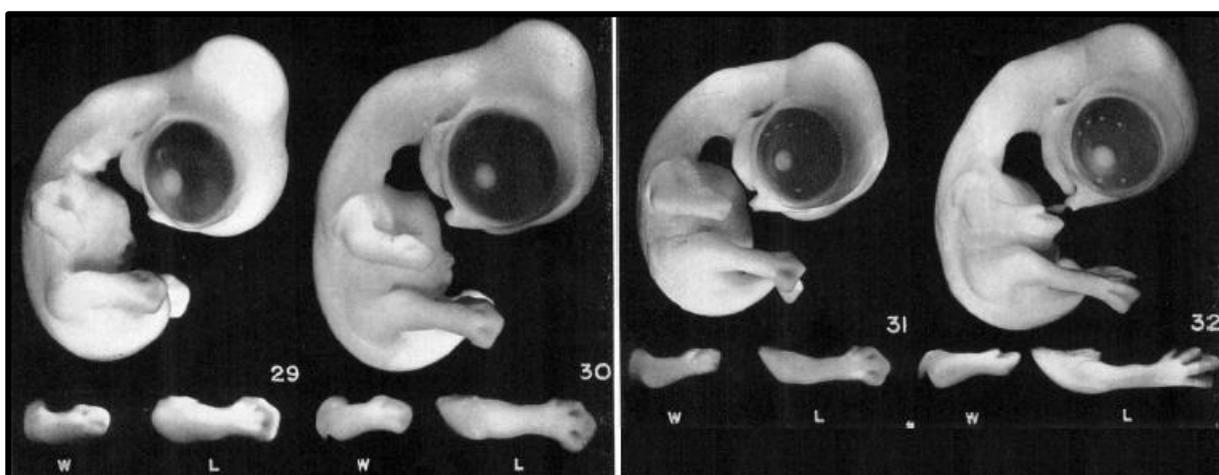
Ilustração 6. Estágios embrionários 26-28.



Fonte: Hamburger e Hamilton (1951)

Estágio embrionário	Modificações estruturais
Estágio 29. (6 dias de incubação)	Asa dobrada no cotovelo. Sulcos rasos entre o primeiro, segundo e terceiro dígitos. O processo mandibular e o segundo arco estão amplamente fundidos. Paratireoides se diferenciam; sacos aéreos começam a se diferenciar; primeira pálpebra e movimentos independentes dos membros.
Estágio 30. (6,5 dias de incubação)	Asa dobrada no cotovelo e perna dobrada no joelho. Ranhuras distintas entre o primeiro e o segundo dígitos. Pescoço é alongado. Duas fileiras dorsais de cada lado da medula espinhal no nível braquial, três fileiras no nível das pernas. Dente de ovo: distinto. Tireoide concentra iodo; começa a diferenciação sexual; começa a produção de testosterona começa no macho.
Estágio 31. (7 dias de incubação)	Na superfície dorsal, contínuos do nível braquial ao lombo-sacro. Aproximadamente sete fileiras ao nível lombo-sacral. Papilas de penas distintas na coxa. Os primeiros movimentos do globo ocular começam; tireóide é capaz de sintetizar monoiodotirosina; começa a secreção de ACTH.
Estágio 32. (7,5 dias de incubação)	Diferenças no tamanho de dedos individuais e dedos dos pés são visíveis.

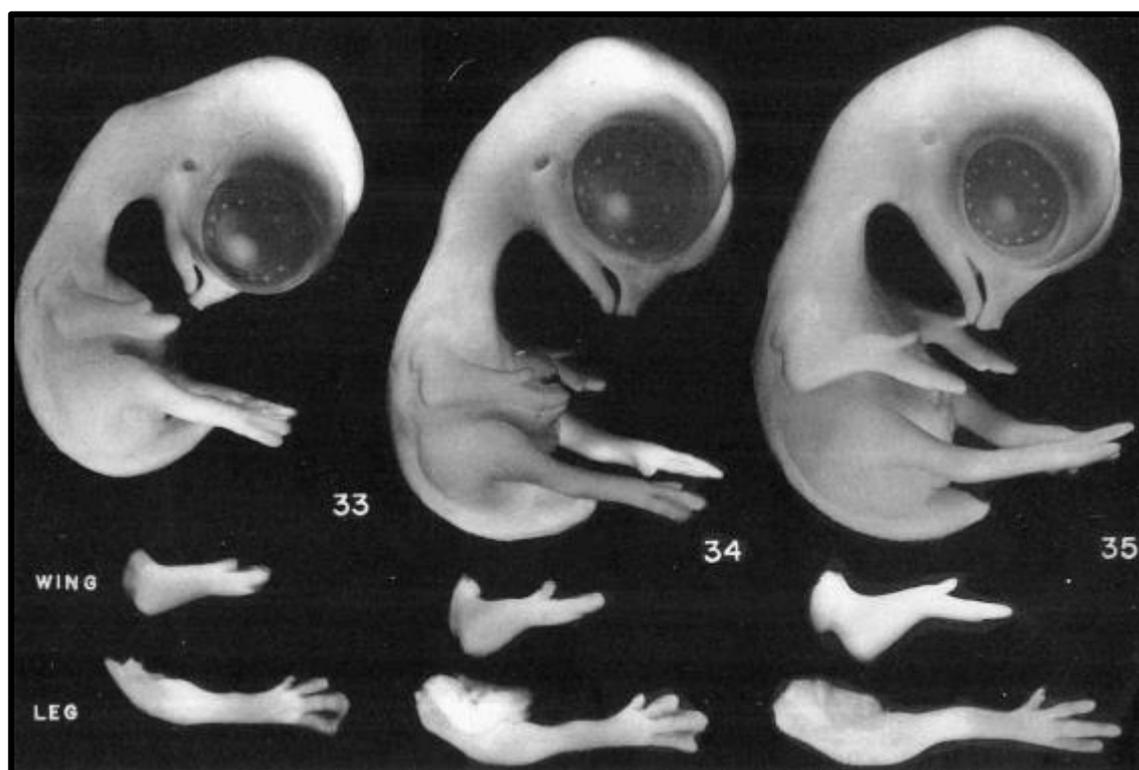
Ilustração 7. Estágios embrionários 29-32



Fonte: Hamburger e Hamilton (1951)

Estágio embrionário	Modificações estruturais
Estágio 33. (7,5-8 dias de incubação)	Inicia-se a mineralização do osso; o desenvolvimento do ducto de Muller direito cessa na fêmea e do esquerdo e direito no macho.
Estágio 34. (8 dias de incubação)	Crescimento diferencial de segundo dígito. Terceiro dedo é visível. Membrana nictitante estende-se a meio caminho entre a borda externa do olho e a papila escleral
Estágio 35. (8-9 dias de incubação)	O bico é alongado. Membrana nictitante aproxima-se das papilas esclerais externas. As pálpebras estenderam-se em direção ao bico e começaram a crescer no globo ocular. Tireóide é capaz de sintetizar diiodotirosina; os ductos mullerianos dos machos regridem; A corioalantoide fixa-se em relação à casca.

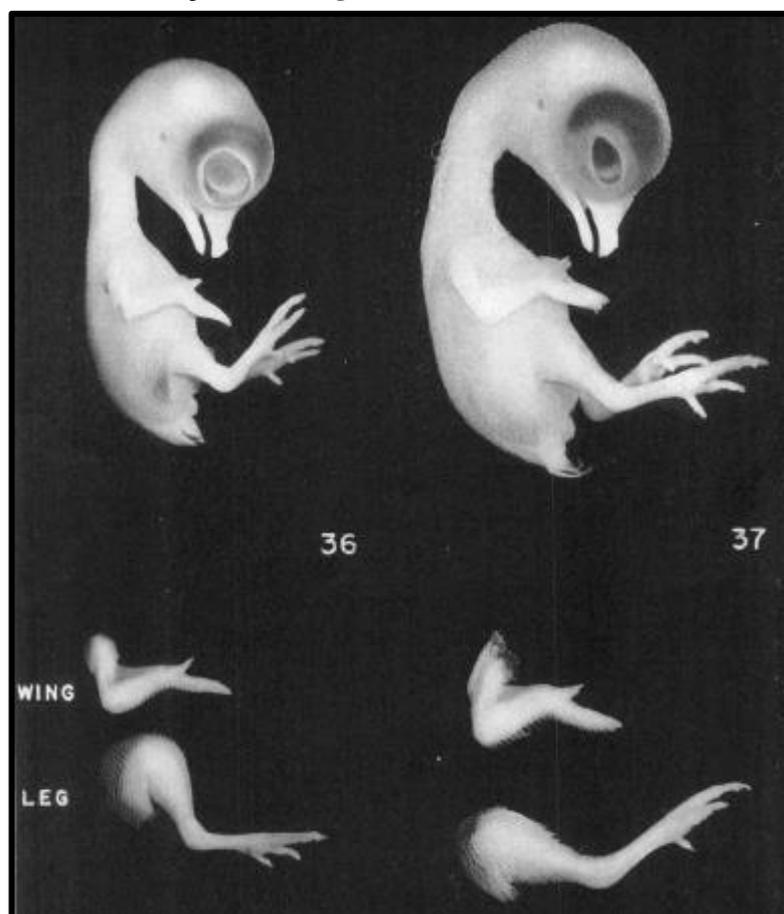
Ilustração 8. Estágios embrionários 33-35.



Fonte: Hamburger e Hamilton (1951)

Estágio embrionário	Modificações estruturais
Estágio 36. (10 dias de incubação)	Membros: primórdios afilados das garras apenas visíveis nas extremidades dos dedos. Os primórdios da crista são visíveis com borda levemente serrilhada. Tratos esternais proeminentes. A pálpebra inferior cresceu até o nível de córnea. Os movimentos de todo o corpo tornam-se aleatórios; a tireoide secreta tiroxina; a secreção de TSH começa; inicia-se a secreção de paratormônio.
Estágio 37. (11 dias de incubação)	Crista mais proeminente e claramente serrilhada. Germes de penas alongados em cones longos e afilados ao longo do dorso e da cauda. A pálpebra inferior cobre um terço a metade da córnea. A pálpebra superior atingiu a borda dorsal da córnea. O metanefro começa a funcionar.

Ilustração 9. Estágios embrionários 36-37



Fonte: Hamburger e Hamilton (1951)

Estágio embrionário	Modificações estruturais
Estágio 38. (12 dias de incubação)	Esterno coberto com penas. Pálpebra superior coberta com penas recém-formadas. Início da absorção do albúmen; mesonefro degenera; começa a absorção de cálcio da casca.
Estágio 39. (13 dias de incubação)	Mandíbula e maxila cornificadas (opacas) até o fundo como nível proximal do dente do ovo. Abertura entre as pálpebras reduzidas. Aumento do transporte de lipídios pelo saco vitelino; cessam as contrações amnióticas; rupturas de conexão sero-amniótica; a neuro-hipófise torna-se ativa; células glandulares do proventrículo iniciam a secreção.

Ilustração 10. Estágios embrionários 38-39

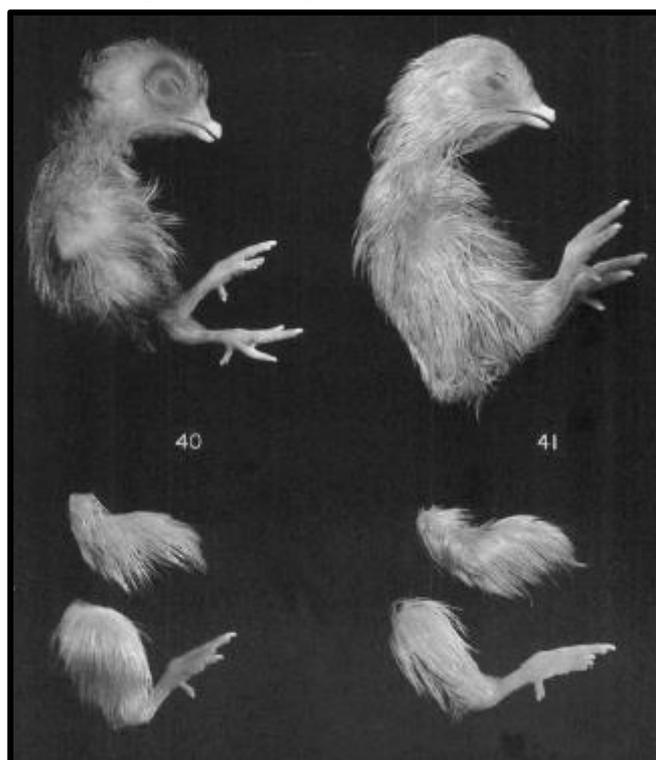


Fonte: Hamburger e Hamilton (1951)

Os estágios 40-44 são baseados principalmente no comprimento do bico e no comprimento do terceiro dedo.

Estágio embrionário	Modificações estruturais
Estágio 40. (14 dias de incubação)	Comprimento do bico da borda anterior da narina até a ponta do bico = 4,0 mm. Comprimento do terceiro dedo do pé = $12,7 \pm 0,5$ mm. Começa a maturação do pâncreas exócrino; a síntese de estriol começa na fêmea; atividade elétrica esporádica no cérebro.
Estágio 41. (15 dias de incubação)	Comprimento do bico do ângulo anterior da narina até a ponta do bico superior = 4,5 mm. Comprimento do terceiro dedo do pé = $14,9 \pm 0,8$ mm. O estômago começa a contrair; atividade elétrica nos lobos ópticos.

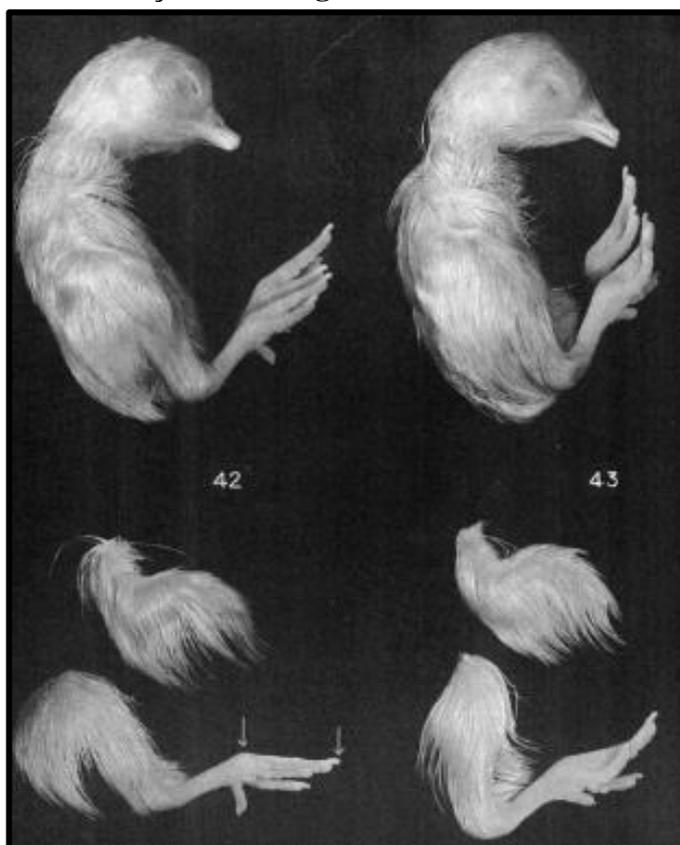
Ilustração 11. Estágios embrionários 40-41



Fonte: Hamburger e Hamilton (1951)

Estágio embrionário	Modificações estruturais
Estágio 42. (16 dias de incubação)	Comprimento do bico do ângulo anterior da narina até a ponta do bico superior = 4,8 mm. Comprimento do terceiro dedo = $16,7 \pm 0,8$ mm. Embrião é capaz de realizar movimentos respiratórios; primeira atividade elétrica no cerebelo.
Estágio 43. (17 dias de incubação)	Comprimento do bico do ângulo anterior da narina até a ponta do bico superior = 5,0 mm. Comprimento do terceiro dedo = $18,6 \pm 0,8$ mm. Movimentos coordenados e estereotipados começam.

Ilustração 12. Estágios embrionários 42-43



Fonte: Hamburger e Hamilton (1951)

Estágio embrionário	Modificações estruturais
<p>Estágio 44. (18 dias de incubação)</p>	<p>Comprimento do bico do ângulo anterior da narina até a ponta do bico superior = 5,7 mm. Comprimento do terceiro dedo = $20,4 \pm 0,8$ mm. O bico fica dobrado sob a asa direita; a sensibilidade máxima ao som aumenta para 800 Hz. O duodeno começa a maturação; começa a secreção de calcitonina; primeiras respostas comportamentais à luz.</p>
<p>Estágio 45. (19-20 dias de incubação)</p>	<p>O saco vitelino é meio fechado no corpo. Absorção de fluido alantóide completada; o músculo de eclosão amadurece; estoques de glicogênio hepático mobilizados; reflexos posturais totalmente desenvolvidos; começa a retirada do saco vitelino. No dia 20 o embrião começa a respirar e vocalizar; a membrana interna é perfurado; canal arterial fechado; forames interatriais fechados; ectoderma corioalantóico degenera; circulação corioalantóica reduzida; absorção do saco vitelino é concluída.</p>

Ilustração 13. Estágios embrionários 44-45



Fonte: Hamburger e Hamilton (1951)