

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**REMODELAMENTO ESTRUTURAL DO TECIDO  
PARABRONQUIAL DE PINTINHOS EM RESPOSTA À  
HIPÓXIA DURANTE O DESENVOLVIMENTO FETAL**

**Lara do Amaral Silva**

Zootecnista

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**REMODELAMENTO ESTRUTURAL DO TECIDO  
PARABRONQUIAL DE PINTINHOS EM RESPOSTA À  
HIPÓXIA DURANTE O DESENVOLVIMENTO FETAL**

**Lara do Amaral Silva**

**Orientadora: Prof. Dra Kênia Cardoso Bicego**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Zootecnia (Bioquímica e Fisiologia Animal)

**2016**

Silva, Lara do Amaral  
S586r Remodelamento estrutural do tecido parabrônquial de pintinhos em  
resposta à hipóxia durante o desenvolvimento fetal / Lara do Amaral  
Silva. -- Jaboticabal, 2016  
v, 44 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientadora: Kênia Cardoso Bicego

Banca examinadora: Wilfried Klein, Glauber dos Santos Ferreira da  
Silva

Bibliografia

1. Estrutura Pulmonar. 2. Hipóxia. 3. Plasticidade de  
Desenvolvimento. 4. Capilares aéreos. 5 Capilares sanguíneos.I.  
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 6365.5:612

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: REMODELAMENTO ESTRUTURAL DO TECIDO PARABRÔNQUIAL DE PINTINHOS EM RESPOSTA À HIPÓXIA DURANTE O DESENVOLVIMENTO FETAL.

**AUTORA: LARA DO AMARAL SILVA**

**ORIENTADORA: KÊNIA CARDOSO BÍCEGO**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. KÊNIA CARDOSO BÍCEGO  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. WILFRIED KLEIN  
Departamento de Biologia / USP - Ribeirão Preto/SP

Pesquisador GLAUBER DOS SANTOS FERREIRA DA SILVA  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 15 de fevereiro de 2016

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**Lara do Amaral Silva-** filha de Uilson Roberto Silva e Marcia Maria do Amaral, nasceu no dia 20 de agosto de 1991 na cidade de São Paulo- SP. Ingressou no curso de Zootecnia da Universidade do Oeste Paulista em 2009 e concluiu este como melhor aluna da turma em 2012. Durante o período de graduação realizou iniciação científica sob orientação da professora Dra. Lilian Francisco Arantes de Souza onde foi bolsista PROBIC nos anos de 2010 e 2011. Em março de 2014 iniciou o Mestrado pelo programa de pós graduação em Zootecnia (Área de concentração: Bioquímica e Fisiologia Animal) pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista- UNESP, campus de Jaboticabal, sob orientação da professora Dra. Kênia Cardoso Bicego, onde foi bolsista CNPq durante quatro meses e bolsista FAPESP até a finalização do curso, submetendo-se à defesa da dissertação em fevereiro de 2016 para obtenção do título de Mestre.

## EPÍGRAFE

Deus, se um dia eu perder as esperanças, ajude-me a lembrar que os teus planos são melhores que os meus.

Chico Xavier

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pela vida, saúde, bênçãos e condições para que também este trabalho fosse exercido e por colocar as pessoas certas nos momentos certo do caminho.

À professora Kênia Cardoso Bicego, pela confiança, ensinamentos, exemplo, apoio, parceria e amizade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela Bolsa de Estudos (processo 2014/01861-2).

Ao professor Fernando Zara pelo apoio total em todas as fases do projeto, e a todo pessoal de seu laboratório.

Ao professor Wilfried Klein, pela ajuda com a idéia inicial do projeto.

À professora Lilian Francisco Arantes de Souza, que acreditou em mim, me apoiou em todos os sentidos para que eu pudesse estar aqui hoje, minha amiga, sem você nada disso seria possível!

À professora Luciane Gargaglione Batalhão pelo apoio e orientação no início do mestrado.

À todos os parceiros de laboratório: Elisa, Carol Scarpellini, Carol Silva, Vitor, Lays, Jolene, Luis Gustavo, Carlos, Leonardo, Jaime, Camila, Vivian, Valter, Bruno, Mariane, Danuzia, Kassia, Giuliana, Gabriela e Tiago, pelo ensinamento de várias técnicas, me ajudarem e me apoiarem, especialmente ao Lucas que me ajudou com conselhos e traduções inclusive sábados à noite e a Paula que me ajudou a fazer o curso de estereologia no início do mestrado.

À técnica Márcia por me ensinar e ajudar com as técnicas de microscopia eletrônica de transmissão.

À todos os amigos mais que especiais que tornam minha vida mais florida e a caminhada mais fácil e prazerosa.

À toda minha família, muito especialmente à minha mãe Marcia e meu pai Uilson, pelo esforço por meus estudos, dedicação, apoio, incentivo e amor desde sempre.

E ao meu noivo João Batista, pelo carinho, companheirismo e apoio emocional e no trabalho, inclusive me acompanhando todas as noites para checar a hipóxia das incubadoras, obrigada!



## SUMÁRIO

	Página
Certificado da comissão de ética no uso de animais.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
<b>CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS</b>	
Introdução e revisão da literatura.....	1
Avicultura e contextualização.....	1
Desenvolvimento embrionário de Gallus gallus.....	3
Sistema pulmonar de aves e seu desenvolvimento.....	4
Hipóxia durante o desenvolvimento pré natal em aves.....	8
Hipóxia e estruturas de trocas gasosas.....	10
Objetivo.....	11
Referências Bibliográficas.....	12
<b>CAPÍTULO 2- STRUCTURAL REMODELING OF PARABRONCHIAL TISSUE OF CHICKS IN RESPONSE TO HYPOXIA DURING FETAL DEVELOPMENT</b>	
Abstract.....	21
Introduction.....	22
Material and Methods.....	24
Results.....	27
Discussion.....	28

References.....33



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JULIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Jaboticabal



## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 024166/13 do trabalho de pesquisa intitulado **"Exposição à hipóxia durante a incubação e sua influência nos parâmetros morfofisiológicos de *Gallus gallus* pós-eclosão"**, sob a responsabilidade da Prof.ª Dr.ª Kênia Cardoso Bicego está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 05 de novembro de 2013.

Jaboticabal, 05 de novembro de 2013.

  
Prof. Dr. Andriego Barboza De Nardi  
Coordenador - CEUA

## REMODELAMENTO ESTRUTURAL DO TECIDO PARABRONQUIAL DE PINTINHOS EM RESPOSTA À HIPÓXIA DURANTE O DESENVOLVIMENTO FETAL

**Resumo-** O oxigênio é essencial para o desenvolvimento e a funcionalidade celular nos organismos aeróbicos. A exposição de embriões à hipóxia pode alterar a trajetória de desenvolvimento geneticamente estabelecida e gerar alterações morfofisiológicas em diversos órgãos e sistemas. Em aves precoces, a hipóxia durante a incubação é conhecida por alterar tamanho dos órgãos, taxa metabólica e ventilação em pintinhos recém-eclodidos. Nestes animais o desenvolvimento das estruturas parabrônquiais envolvidas em trocas gasosas e condução de ar, ocorre principalmente durante a segunda metade da incubação. Baseados nos fatos expostos, nós hipotetizamos que a hipóxia durante esta fase de desenvolvimento pode induzir um remodelamento nestas estruturas, favorecendo as trocas gasosas na vida pós-natal. Para testar esta hipótese, os embriões foram expostos à normóxia durante toda a incubação, ou à 15% O<sub>2</sub> (dia 12 ao 18 de incubação) e as estruturas parabrônquiais, incluindo capilares aéreos, capilares sanguíneos, infundíbulo, átrio, lúmen parabronquial, vasos sanguíneos maiores que capilares, e tecido interparabronquial, foram analisados através de método estereológico em pintinhos com 1 e 10 dias de idade. A hipóxia aumentou os volumes relativos das estruturas diretamente relacionadas com trocas gasosas, como capilares aéreos e sanguíneos, enquanto não afetou o volume dos pulmões, e o volume relativo de infundíbulo, vasos sanguíneos maiores que capilares e tecido interparabronquial em pintinhos de 1 e 10 dias. A menor concentração de oxigênio, diminuiu o volume relativo dos átrios em ambas idades e o lúmen parabronquial nos pintinhos mais velhos. Concluimos que a hipóxia durante a fase embrionária de desenvolvimento parabronquial pode trazer um remodelamento morfológico, caracterizado por aumento de estruturas responsáveis diretamente por trocas gasosas em detrimento de regiões que participam da condução de ar em pintinhos até o décimo dia pós eclosão.

Palavras chaves: estrutura pulmonar, hipóxia, plasticidade de desenvolvimento, capilares aéreos, capilares sanguíneos.

## STRUCTURAL REMODELING OF PARABRONCHIAL TISSUE OF CHICKS IN RESPONSE TO HYPOXIA DURING FETAL DEVELOPMENT

**Abstract-** Oxygen is essential for cell development and function in aerobic organisms. Exposure of embryos to hypoxia can change the genetically established developmental trajectory and generate morphological and physiological changes of several organs and systems. In precocious birds, hypoxia during incubation is known to change size of organs, metabolic rate and ventilation in hatchlings. In these animals, embryonic development of the parabronchial structures, involved in gas exchange and conduction, occurs mainly during the second half of incubation time. Based on the above facts, we can hypothesize that hypoxia during this phase of development can induce a remodeling of such structures, favoring gas exchange, later in post-hatch life. To test this hypothesis, embryos were exposed to normoxia for the entire incubation or to 15% O<sub>2</sub> (from day 12 to 18 of incubation) and their parabronchial structures, including air capillaries, blood capillaries, infundibula, atria, parabronchial lumen, blood vessels larger than capillaries and interparabronchial tissue, were analyzed by stereological method in 1 and 10-day old chicks. Hypoxia increased the relative volume of structures directly involved in gas exchange such as air and blood capillaries, while did not change total lung volume and relative volumes of infundibula, blood vessels larger than capillaries and interparabronchial tissue of 1 and 10 days-old chicks. The lower concentration of oxygen decreased the relative volume of atria in both groups of chicks, and parabronchial lumen in the older ones. It can be concluded that hypoxia during the embryonic phase of parabronchial development can lead to a morphological remodeling characterized by increase of structures responsible directly for gas exchange at the expense of regions that participate in the conduction of air in chicks up to 10 days after hatch.

**Keywords:** lung structure, hypoxia, developmental plasticity, air capillaries, blood capillaries

## **CAPÍTULO 1 – Considerações gerais**

### **Introdução e revisão de literatura**

A trajetória de desenvolvimento dos órgãos e sistemas corporais é geneticamente programada e pode ser perturbada por fatores ambientais, assim sendo desviada da programação inicial e atingindo um novo estado morfofisiológico (BURGGREN, 1998 e 1999). Tendo em vista que o fornecimento adequado de oxigênio é um requisito absoluto não só para a manutenção como para o desenvolvimento dos sistemas de organismos aeróbios, a hipóxia pode ser considerada um fator ambiental capaz de alterar a trajetória de desenvolvimento do embrião. Frente à hipóxia ocorre uma regulação de genes com função de aumentar a disponibilidade de oxigênio (SEMENZA, 2000), equiparando a oferta à demanda. Após o nascimento, a captação de oxigênio nas aves passa a ser função dos pulmões, ou parabrônquios. Assim, no presente estudo foi abordada a possibilidade de rearranjo morfológico em consequência da hipóxia durante o desenvolvimento fetal, nas estruturas pulmonares pós eclosão em pintinhos de *Gallus gallus* com 1 e 10 dias de idade.

### **Avicultura e contextualização**

A população mundial atingiu 7,3 bilhões em meados de 2015, o que revela um acréscimo de aproximadamente um bilhão de pessoas nos últimos 12 anos, tem perspectiva de aumento para 8,5 bilhões de pessoas em 2030 e 9,7 bilhões de pessoas em 2050 (UNITED NATIONS, 2015). Em decorrência do crescimento populacional é requerido sempre um aumento da produção de alimentos, segundo a OECD/FAO (2015), o consumo de carne mundial vai crescer a uma média anual de 1,4%, cerca de um consumo adicional de 54 milhões de toneladas até 2024. Frente a isso o setor avícola apresenta destaque dentre as produções de carnes por ser uma fonte de proteína de qualidade (FLETCHER, 2002) mais acessível, mais saudável e com menores impedimentos religiosos; assim apresentando previsão de ser a carne mais consumida pelo mundo até 2024 (OECD/FAO, 2015).

O Brasil está muito bem inserido a este contexto, em 2015, foram obtidos avanços internacionais, onde a produção avícola ultrapassou a produção chinesa e

o Brasil foi colocado como o segundo maior produtor de carne de frango do mundo (USDA, 2015). Além de avanços dentro do contexto de exportações, onde já é estabelecido como o maior exportador de carne de frango desde 2004 (USDA, 2006) e em 2015, a carne de frango subiu na hierarquia dos produtos exportados pelo Brasil, alcançando a marca do quarto produto mais exportado, atrás apenas de soja em grão, minério de ferro e petróleo em bruto (AVISITE, 2016).

Porém, frequentes desafios vêm de encontro com estes avanços produtivos crescentes, sendo de suma importância conhecimentos morfológicos e fisiológicos da ave.

O trato respiratório das aves recebe pouca atenção da comunidade científica voltada à produção de aves domésticas, embora seja um sistema fascinante e diferenciado, desenvolvido como em nenhuma outra classe de vertebrados (DUNCKER, 1972) além de ter papel essencial de trocas gasosas e estar envolvido em patologias e desordens metabólicas que representam perdas significativas para a produção.

Patologias, desordens metabólicas, além de técnicas de manejo estão altamente relacionadas ao trato respiratório e ocasionalmente a hipóxia, o que evidencia ainda mais a importância do estudo do sistema respiratório das aves e o efeito da hipóxia sobre este sistema.

A exemplo disso a bronquite infecciosa é uma das doenças mais importantes da avicultura, ela gera lesões significantes nos sistemas respiratório, urinário e reprodutor de aves de todas as idades, tendo consequência de perdas econômicas consideráveis para a indústria (CAVANAGH; NAQI, 2003). Técnicas de manejo onde são usadas campânulas e fornhalhas para aquecimento de aves durante o inverno (ABREU, 2003) podem consumir o oxigênio do galpão e proporcionar hipóxia às aves; também a reutilização de camas aumenta ainda mais os níveis de amônia no galpão de criação das aves trazendo irritação e prejuízos para o trato respiratório, como perda de cílios da traqueia, paralisia ciliar e necrose do epitélio da mucosa da traqueia, fatores que podem ainda trazer infecções bacterianas secundárias (AZIZ; BARNES, 2010). Também desordens metabólicas são frequentes em frangos de corte que tem crescimento rápido, como a ascite, que é causada por uma

insuficiência valvular do coração, seguida por uma insuficiência do ventrículo direito, dilatação secundária e hipertensão pulmonar (JULIAN, 2005).

### **Desenvolvimento embrionário em *Gallus gallus***

A embriogênese de *Gallus gallus* ocorre de maneira relativamente rápida, cerca de 21 dias em condições ambientais consideradas ideais; no final deste período a ave está totalmente desenvolvida. Considerando que pertence ao grupo de aves precoces, no primeiro dia pós-eclosão já apresenta uma grande independência sendo capaz de deixar o ninho e se alimentar sozinha (IWANIUK; NELSON, 2003).

O ovo é fertilizado no infundíbulo e em seguida passa pelo oviduto, onde o albúmen e a casca são secretados em torno do vitelo (GILBERT, 2000; EYAL-GILADI, 1984); então o útero passa por um período de 20 horas de rotação e contrações peristálticas e durante este período começa o desenvolvimento embrionário, onde são realizadas a clivagem e diferenciação até a postura (EYAL-GILADI; KOCHAV, 1976; EYAL-GILADI 1984).

Antes do fim do primeiro dia pós-postura já são observados a dobra cranial e a notocorda que são estruturas primárias importantes para o desenvolvimento de diversos tecidos embrionários. No segundo dia de incubação, ocorrem vários eventos de desenvolvimento: surgem as primeiras vesículas oculares, uma glândula da tireóide primordial, desenvolve-se o pronephros que se transforma em mesonephros (rim primitivo), o coração começa a se desenvolver e a hemoglobina começa a ser formada. No final do segundo dia o sistema circulatório é desenvolvido, ductos venosos e um fígado primordial surgem, e começa a diferenciação do telencéfalo (HAMBURGER; HAMILTON, 1951; BELLAIRS; OSMOND, 2014).

No terceiro dia são observados mesencéfalo, prosencéfalo e rombencéfalo além de vesículas cerebrais, neuromeres (segmentos do tubo neural que estabelecem o encéfalo embrionário) e uma vértebra rudimentar ligada a uma cauda. Também é formado o arco aórtico e são diferenciados vários órgãos como proventrículo, moela, pâncreas primitivo, pulmões primitivos; também se inicia a glândula pineal e os ductos dos néfron se ligam à cloaca, bem como começam a se



desenvolver os membros a partir do blastoderme, o âmnio cerca todo o embrião e o alantóide começa a se desenvolver. Com três dias e meio o embrião tem os primeiros movimentos de cabeça e pescoço, as células adrenais são diferenciadas, começa a síntese de insulina, gônadas primitivas se formam, começa a eritropoiese no vitelo e inicia a síntese de estrogênio e estradiol (HAMBURGER; HAMILTON, 1951; BELLAIRS; OSMOND, 2014).

No quarto dia o cório se une ao alantoide formando a membrana cório-alantoide. Com 5 dias o mesonefro se torna funcional e começa a produção definitiva de eritrócitos, hemoglobina de adulto começa a ser sintetizada, tem-se os primeiros movimentos do tronco, começa a síntese de corticosteroides, o duodeno começa a se diferenciar, forma-se a Bursa de Fabrícus, um coração de 4 câmaras, o timo e o bico. No dia seis, os sacos aéreos começam a se diferenciar, as paratireoides também; começam movimentos dos olhos e membros, começam a aparecer germes de penas, e é visível o dente do bico. No dia 7 começa a secreção de monoiodotirosina pela tireóide e também a secreção de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico), tem início a mineralização dos ossos e o desenvolvimento dos ductos de Müller que dão origem ao útero nas fêmeas (HAMBURGER; HAMILTON, 1951; BELLAIRS; OSMOND, 2014).

É interessante notar que ainda na primeira semana embrionária já existem todos os órgãos necessários para sustentar a sua vida até a eclosão, além de ter muitas características da ave, assim, ele passa a ser chamado de feto. Os eventos posteriores são de crescimento e maturação (HAMBURGER; HAMILTON, 1951) até cerca do décimo nono dia de incubação, quando o pintinho está em posição de eclosão, o saco vitelino está sendo internalizado e o bico penetra na célula de ar, o que é denominado bicagem interna. Nesse momento o ar já entra nos pulmões e a ventilação pulmonar é iniciada. Algumas horas mais tarde ocorre a bicagem externa, quando uma abertura da casca é conseguida e o ar ambiente é aspirado pela primeira vez e o pintinho finalmente eclode (HAMBURGER; HAMILTON, 1951; VILLAMOR, et al., 2002).

### **Sistema pulmonar de aves e seu desenvolvimento.**

O sistema respiratório das aves é o mais estruturalmente complexo e funcionalmente eficiente dentre os vertebrados terrestres (Figura 1 - MAINA, 2006), sendo anatômica e fisiologicamente singular (DUNCKER, 1972). Trata-se do único sistema em que os pulmões não sofrem alteração de volume durante a ventilação pulmonar, sendo que nove sacos aéreos funcionam como fole para ventilar os pulmões, mas não participam diretamente da troca gasosa (Figura 1A - DUNCKER 1972, POWELL, 2000).

Assim, o ar passa dos sacos aéreos para os brônquios primários e secundários, que por sua vez tem função somente de condução de ar até os parabônquios não participando das trocas gasosas (Figura 1A - DUNCKER, 1974).

Os parabônquios (ou brônquios terciários) são a unidade funcional de trocas gasosas no pulmão (Figura 1B- DUNCKER, 1974, POWELL, 2000). O ar segue do brônquio secundário para o lúmen do parabônquio que, por sua vez, irradia através dos átrios e infudíbulos (Figura 1B, C) até chegar aos capilares aéreos que são as estruturas que entram em contato com os capilares sanguíneos e efetivamente fazem troca gasosa (Figura 1C - DUNCKER, 1974, MAINA 2006). As trocas gasosas ocorrem pelo sistema de corrente cruzada, pois o fluxo de ar no parabônquio é perpendicular ao fluxo de sangue pelos capilares sanguíneos (PIIPER; SCHEID, 1975).

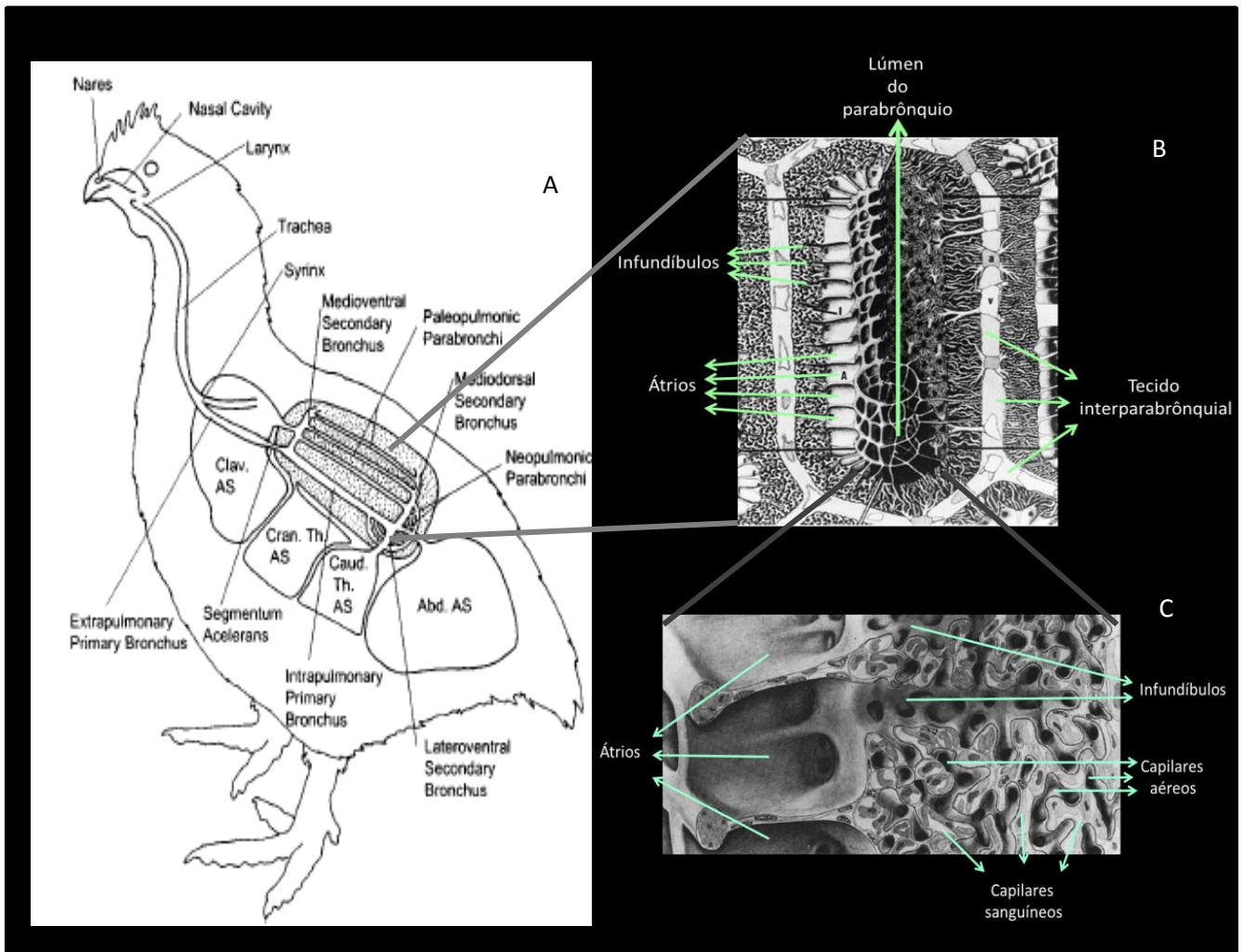


Figura 1A. Organização geral do sistema respiratório em ave doméstica. Clav. AS = saco aéreo clavicular; cran. th. AS = saco aéreo cranial-torácico; caud. th. AS = saco aéreo torácico-caudal; Abd. AS = saco aéreo abdominal (FEDDE, 1998). Figura 1 B Detalhamento do parabônquio em desenho; Figura 1 C Desenho da parede do parabônquio. Ambos adaptados de Duncker (1974).

Nas aves, assim como nos mamíferos, o desenvolvimento do sistema respiratório inicia-se na fase embrionária quando as trocas gasosas são realizadas por órgãos não pulmonares (aves- membrana córioalantóide), e permanece se desenvolvendo ainda por algum tempo depois do nascimento, quando o pulmão é efetivamente o único meio de proporcionar oxigênio ao organismo aeróbico (SZDZUY; MORTOLA, 2007).

John Maina (MAINA, 2003) descreveu todo o processo de desenvolvimento dos pulmões em *Gallus gallus*. No terceiro dia de incubação já é possível observar os brotos pulmonares em desenvolvimento; no quinto dia tais brotos dividem-se em dois pulmões primários à esquerda e à direita e se alongam caudal e dorsolateralmente na cavidade celomática. Ao atingirem suas localizações topográficas definitivas (no sexto dia), os pulmões começam a se encaixar nas cavidades das costelas. Cada pulmão se desenvolve em um cordão de células epiteliais mesenquimais em que se inicia a formação de canais revestidos por células colunares proeminentes, dando origem ao brônquio primário intrapulmonar. Na sequência, aparecem os brônquios secundários que se irradiam no eixo craniocaudal e se estendem para fora atingindo a periferia do pulmão (dia 8). Ao mesmo tempo, a partir de aglomerados de células epiteliais, os parabônquios (ou brônquios terciários) começam a se desenvolver, criam um lúmen, proliferam e conectam-se aos brônquios secundários. Os átrios são visíveis no dia 15, o infundíbulo no dia 16, e capilares aéreos no dia 18. Na eclosão (dia 21), os capilares de ar e de sangue estão completamente formados e funcionais e a barreira sangue-ar torna-se extremamente fina. O pulmão é bem desenvolvido e funcionalmente competente no final da vida fetal.

Alguns autores analisaram a morfometria dos pulmões de *Gallus gallus*. O volume pulmonar apresentou valores entre 25,02 e 27 cm<sup>3</sup> para pulmões de animais domésticos com massa corporal de 1,839 a 2,483 quilos (ABDALLA, 1977 apud VIDYADARAN et al. , 1988 p. 233; ABDALLA et al., 1982; MAINA, 1982 apud VIDYADARAN et al. , 1988 p. 233; VIDYADARAN; KING; KASSIM, 1987 apud MAINA, 2006, p. 130; VIDYADARAN et. al., 1988), também foi analisado a densidade de lumen parabronquial mostrando que estes ocupam cerca de 30 a 39,7 % do pulmão de aves com massa média de 2 quilos (ABDALLA, 1977 apud VIDYADARAN et al., 1988, p. 233; ABDALLA et. al, 1982; VIDYADARAN; KING; KASSIM, 1987, apud MAINA, 2006, p. 130). Além disso as estruturas de troca foram analisadas através de estereologia em alguns trabalhos, sendo estimados a porcentagem que cada estrutura ocupa dentre as próprias estruturas de trocas gasosas através de microscopia eletrônica de transmissão, mostrando valores ~55.5-64.8% de capilares sanguíneos e 21,3-33,8% de capilares aéreos em aves

domésticas e selvagens de 478 a 2141 quilos(DUNCKER 1972 ; DUNCKER, 1973 apud MAINA, 2006, p. 135; ABDALLA, 1977 apud VIDYADARAN et al. , 1988 p. 233; ABDALLA; MAINA, 1981 apud MAINA, 2006, p. 135; ABDALLA et al.,1982; VIDYADARAN; KING; KASSIM, 1987 apud MAINA, 2006, p. 135).

### **Hipóxia durante o desenvolvimento pré-natal em aves**

As aves podem encontrar hipóxia em ambientes naturais como altas altitudes, tocas, mergulho e em condições patológicas (RAMIREZ; FOLKOW; BLIX, 2007). Hipóxia também pode ocorrer mesmo durante o desenvolvimento normal, ao final da incubação quando o embrião tem 60% de aumento da taxa metabólica e a difusão de oxigênio através da casca do ovo torna-se limitante, não atendendo a tal demanda (VISSCHEDIJK, 1968; FREEMAN; MISSON, 1970; SZDZUY; FONG; MORTOLA, 2008). Isso é mais evidente quando o pintinho despende um tempo maior entre a bicagem interna e a bicagem externa (DECUYPERE; DEWIL; KÜHN, 1991).

A hipóxia durante as fases de desenvolvimento embrionário e fetal em aves gera alterações morfofisiológicas evidentes como menor massa corporal (WANGENSTEEN et al., 1974; DZIALOWSKI et al., 2002; GIUSSANI et al., 2007; AZZAM; MORTOLA, 2007; AZZAM; SZDZUY; MORTOLA, 2007; ZHANG; BURGGREN, 2012) acompanhada por uma redução proporcional de vários órgãos tais como encéfalo, fígado, estômago, rins e intestinos (CHAN; BURGREN, 2005; AZZAM; MORTOLA, 2007; ZHANG; BURGREN 2012), menor taxa metabólica (BJØNNES; AULIE; HØIBY, 1987; AR; GIRARD; RODEAU, 1991; TAZAWA et al., 1992; MORTOLA; LABBE, 2005; AZZAM; SZDZUY; MORTOLA, 2007; MORTOLA; COONEY, 2008), menor produção de calor (LOURENS, et al., 2007, AZZAM; SZDZUY; MORTOLA, 2007) aumento das concentrações plasmáticas de hormônios tireoideanos, corticosterona e ácido láctico (HASSANZADEH et al., 2004); menor resistência vascular sistêmica generalizada (ADAIR et al., 1987; ADAIR; MONTANI; GUYTON, 1988), maior afinidade da hemoglobina ao oxigênio (BAUMANN et al., 1983), além de aumento da concentração de hemoglobina e hematócrito (TAZAWA; MIKAMI; YOSHIMOTO, 1971; RUIJTENBEEK et al., 2000).

Porém as respostas morfofisiológicas à hipóxia não estão presentes somente durante a fase de desenvolvimento embrionário/fetal, mas podem ocorrer também na vida pós eclosão em pintinhos que receberam hipóxia durante a incubação (MORTOLA, 2009), o que atraiu maior interesse da comunidade científica nos últimos anos, inclusive de nosso grupo de pesquisa.

Em resposta à hipóxia na incubação foi reportado menor massa corporal (DZIALOWSKI et al., 2002, HASSANZADEH et al., 2004, AMARAL-SILVA et al. não publicado) e maior temperatura corporal (AMARAL-SILVA et al. não publicado) em recém eclodidos; aumento da taxa metabólica de pintinhos aos 10 dias de idade (AMARAL-SILVA et al. não publicado), diferenças na taxa metabólica frente a uma nova hipóxia tanto em recém-eclodidos (SZDZUY; MORTOLA, 2007; AMARAL-SILVA et al. não publicado) como em animais de 10 dias de idade (AMARAL-SILVA et al. não publicado) e menor ventilação e hipometabolismo (VE/VO<sub>2</sub>) frente a hipercapnia pós natal (SZDZUY; MORTOLA, 2007; FERNER; MORTOLA, 2009).

A fase de desenvolvimento embrionário/fetal que o pintinho recebe a hipóxia é altamente relevante, pois durante a trajetória de desenvolvimento podem ocorrer fases mais ou menos sensíveis a cada estímulo ambiental, que são chamadas janelas críticas (BURGGREN, 1998). A hipóxia usada como estímulo ambiental durante a incubação gera diferentes respostas morfofisiológicas em janelas críticas de desenvolvimento específicas (DZIALOWSKI, et al., 2002; CHAN; BURGGREN 2005;). Zhang e Burggren (2012) concluíram que a primeira metade do desenvolvimento embrionário contém a janela crítica de efeitos prejudiciais da hipóxia, como mortalidade, e na segunda metade da incubação fica a janela de respostas compensatórias à hipóxia em órgãos chaves, provavelmente porque órgãos chaves como os corpos carotídeos amadurecem e se tornam funcionais somente na última semana de incubação. (FERNER; MORTOLA, 2009).

Para o nosso trabalho a fase de desenvolvimento embrionário/fetal que o animal é exposto à hipóxia é um fator ainda mais importante, pois, como mencionado no “desenvolvimento do sistema pulmonar em aves” as áreas que constituem o tecido parabronquial e que são estudadas por nós neste trabalho se desenvolvem em maior parte no terço final da incubação (MAINA, 2003).

## Hipóxia e estruturas de trocas gasosas

Antes da bicagem interna, as trocas gasosas são feitas pela membrana cório alantoide (CAM), ela começa a se formar no quarto dia embrionário e continua a crescer até o dia 12 (MORTOLA; AWAM, 2010), quando está completamente formada (AZZAM; MORTOLA, 2007). Trabalhos muito interessantes foram feitos, analisando a resposta de membrana córioalantóide à hipóxia, onde relatam um aumento da angiogênese em resposta à hipóxia e uma capilaridade mais modesta quando o embrião é exposto à hiperóxia (STRICK et al. 1991). Além disso, muitos autores relatam um aumento da massa da CAM que ocorre principalmente na fase mais tardia da incubação (WAGNER-AMOS; SEYMOUR, 2003; CHAN; BURGREN, 2005; AZZAM; MORTOLA, 2007; ZHANG; BURGREN, 2012) e que chega a 60%(CHAN; BURGREN, 2005). Então a estrutura primordial para as trocas gasosas embrionárias é altamente estimulada pela hipóxia, que exerce um efeito positivo sobre a mesma e proporciona um aumento da área de superfície funcional (CHAN; BURGREN, 2005) e, conseqüente, aumento da capacidade de difusão de oxigênio (AZZAM; MORTOLA, 2007).

Os pulmões também podem ser afetados morfofisiologicamente pela hipóxia antes ou depois da eclosão. Quanto aos embriões, os trabalhos divergem sobre o efeito da hipóxia durante a incubação sobre a massa pulmonar. Xu e Mortola (1989), expondo os embriões a hipóxia do dia 14 ao 18 da incubação observaram maior massa pulmonar nos embriões que receberam hipóxia, ao contrário dos pulmões dos embriões incubados em hiperóxia. Azzam e Mortola (2007), usando hipóxia a partir do dia 5 de incubação encontraram menor massa dos pulmões no dia embrionário 19 (E19), mas não nos outros dias (E14, E17 e E20). Chan e Burggren (2005), que utilizaram hipóxia no começo, meio e fim da incubação e Lewallen e Burggren (2015) que expuseram os embriões a hipóxia do dia 1 ao 16 da incubação não encontraram diferença na massa dos pulmões em nenhum momento da incubação e Zhang e Burggren (2012) usaram hipóxia no início, final ou durante a incubação inteira encontraram massa dos pulmões proporcional à massa do embrião.

A hipóxia muitas vezes também é relacionada a uma resposta de hipertensão do sistema respiratório, que provocaria ascite (síndrome da hipertensão pulmonar). Em resposta à hipóxia crônica, alguns autores afirmam que animais adultos podem

sofrer alterações morfológicas nos pulmões por causa de um remodelamento estrutural, que aumentaria a espessura das paredes arteriais dos pulmões (HISLOP; REID, 1976; RABINOVITCH et al., 1979; RABINOVITCH, 1999; RABINOVITCH, 2012) e diminuiria a quantidade de pequenos vasos não capilares (HISLOP; REID, 1976; RABINOVITCH et al., 1979; STENMARK; MCMURTRY, 2005), fazendo com que ocorra um aumento de resistência pulmonar. Porém pintinhos que foram incubados sob hipóxia apresentam menor incidência de ascite desde jovens até o abate (BAHADORAN; HASSANZADEH; ZAMANIMOGHADDAM, 2010). Além disso, os resultados que mostram um efeito negativo da hipóxia sobre as estruturas pulmonares são contestados por evidências da ocorrência de angiogênese; tanto morfológicas, pelo aumento de densidade e tamanho de vasos pulmonares de animais adultos expostos à hipóxia crônica (HOWELL; PRESTON; MCLOUGHLIN, 2003), quanto por evidências fisiológicas, com maior concentração de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) nos pulmões de embriões de galinhas incubados em hipóxia. Em mamíferos, o VEGF não está ligado somente ao desenvolvimento de vasos sanguíneo, mas também ao desenvolvimento de vias aéreas nos pulmões (LEWALLEN; BURGGREN, 2015).

Ainda sobre a influência da hipóxia sobre as estruturas de trocas gasosas é interessante lembrar que em aves que passam por hipóxia durante seu percurso migratório de altas altitudes, como o ganso de cabeça listrada (SCOTT, 2011) são relatadas adaptações que facilitam as trocas gasosas, como maior afinidade da hemoglobina ao oxigênio (PETSCHOW et al., 1977; BLACK; TENNEY, 1980), menor barreira de difusão sangue-ar (MAINA; KING, 1982), maior densidade capilar e número de mitocôndrias (FEDDE et al., 1985) e baixíssimo ou nenhum aumento na resistência vascular (FARACI; KILGORE; FEDDE, 1984).

## **Objetivo**

Diante do exposto acima, o objetivo do presente trabalho foi testar a hipótese de que a hipóxia durante o desenvolvimento fetal de *Gallus gallus* induz remodelamento das estruturas parabronquiais, e se este permanece após a eclosão. Assim, foi utilizado o método de estereologia para a análise das estruturas



parabronquiais de pintainhos recém-eclodidos e de dez dias de idade que foram expostos a 15% O<sub>2</sub> entre os dias 12 e 18 de incubação.

### Referências bibliográficas

ABDALLA, M. A.; MAINA, J. N.; KING, A. S.; KING, D. Z.; HENRY, J. Morphometrics of the avian lung. 1-The domestic fowl, *Gallus domesticus*. **Respiration Physiology**. v. 47, p. 267–278, 1982.

ABDALLA, M. A. Morphometry of the avian lung. **Journal of Anatomy**. v.123, p. 262, 1977.

ABDALLA, M. A.; MAINA, J. N. Quantitative analysis of the exchange tissue of the avian lung (Galliformes). **Journal of Anatomy**. v.134, p. 677–680, 1981.

ABREU, P. G. Modelos de aquecimento. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 4., 2003, Chapecó. **Anais eletrônicos**, Chapecó: EMBRAPA Suínos e Aves, 2003. Disponível em: <[https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/modelos\\_de\\_aquecimento\\_000fze3s7qt02wx5ok0cpoo6arpz5ii1.pdf](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/modelos_de_aquecimento_000fze3s7qt02wx5ok0cpoo6arpz5ii1.pdf)> acesso em 11, jan, 2016.

ADAIR, T. H.; GUYTON, A. C.; MONTANI, J. P.; LINDSAY, H. L.; STANEK, K. A. Whole body structural vascular adaptation to prolonged hypoxia in chick embryos. **American Journal of Physiology**. v. 252 (Heart Circ. Physiol. 21), p.1228 - 1234, 1987.

ADAIR, T. H.; MONTANI, J. P.; GUYTON, A. C. Effects of intermittent hypoxia on structural vascular adaptation in chick embryos. **American Journal of Physiology**. v. 254 (Heart Circ. Physiol. 23), p. 94 - 99, 1988.

AR, A.; GIRARD, H.; RODEAU, J. L. Oxygen uptake and chorioallantoic blood flow changes during acute hypoxia and hyperoxia in the 16 day chicken embryo **Respiration Physiology**. v.83, p. 295-312, 1991.

AVISITE, Campinas, 08 de Janeiro de 2016. Disponível em <<http://www.avisite.com.br/noticias/index.php?codnoticia=16534>>. Acesso em 11 jan. 2016.

AZZAM, M. A.; SZDZUY, K.; MORTOLA, J. P. Hypoxic incubation blunts the development of thermogenesis in chicken embryos and hatchlings. **American Journal of Physiology**. v. 292, p. 2373-2379, 2007.

AZZAM M. A.; MORTOLA J. P. Organ growth in chicken embryos during hypoxia: implications on organ “sparing” and “catch-up growth”. **Respiratory Physiology and Neurobiology**. V. 159, p. 155–162, 2007.

AZIZ, T; BARNES, H. J. Harmful effects of ammonia od birds. World poultry, 25 de outubro de 2010. Disponível em: <<http://chickfliccoop.com/wp-content/uploads/2015/05/Harmful-effects-of-ammonia-on-birds.pdf>>. Acesso em: 11 jan. 2016.

BAHADORAN, S.; HASSANZADEH, M.; ZAMANIMOGHADDAM, A. K. Effect of chronic hypoxia during the early stage of incubation on prenatal and postnatal parameters related to ascites syndrome in broiler chickens. **Iranian Journal of Veterinary Research**. v. 11, n. 1, p. 64 – 71, 2010.

BAUMANN, R.; PADEKEN, S.; HALLER, E.; BRILMAYER, T. Effects of hypoxia on oxygen affinity, hemoglobin pattern, and blood volume of early chicken embryos. **American Journal of Physiology**, v. 244 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 13) p. R733-R741, 1983.

BELLAIRS, R.; OSMOND, M. **The Atlas of Chick Development, Third Edition**. Academic Press, 2014. P. 603 a 605.

BJØNNES, P. O.; AULIE, A.; HØIBY, M. Effects of hypoxia on the metabolism of embryos and chicks of domestic fowl. **Journal of Experimental Zoology**. v. 1, p. 209 - 212, 1987.

BLACK, C. P.; TENNEY, S. M. Oxygen transport during progressive hypoxia in high-altitude and sea-level waterfowl. **Respiration Physiology**. v. 39, p. 217 - 239, 1980.

BURGGREN, W. W. Genetic, environmental and maternal influences on embryonic cardiac rhythms. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 124, n. 4, p. 423 - 427, 1999. Disponível em:< [http://dx.doi.org/10.1016/S1095-6433\(99\)00134-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1095-6433(99)00134-8)>.

BURGGREN, W. W. Studying Physiological Development: Past, Present and Future. **The Biological Bulletin**. v. 33(2), p. 71 - 84, 1998.

CAVANAGH, D.; NAQI, S. Infectious Bronchitis. In: Calnek, B.W.; Barnes, H. J.; Beard, C. W. 11 ed. **Diseases of poultry**. Iowa State University Press, 2003. p.101-119.

CHAN, T.; BURGGREN, W. W. Hypoxic incubation creates differential morphological effects during specific developmental critical windows in the embryo of the chicken (*Gallus gallus*). **Respiratory Physiology & Neurobiology**. v. 145, p. 251–263, 2005.

DECUYPERE, E.; DEWIL, E.; KÜHN, R. The hatching process and the role of hormones. **Avian incubation**. p. 239-256, 1991.

DUNCKER, H. R. Structure of the avian lung. **Respiration Physiology**. v. 14, p. 4 – 63, 1972.

DUNCKER, H. R. Der quantitative Aufbau des Lungenluftsacksystems der Vögel. **Verhandlungen der anatomischen gesellschaft**. v. 67, p. 197–204 ,1973

DUNCKER, H. R. Structure of the avian respiratory tract. **Respiration Physiology**. v. 22, p. 1 – 19, 1974.

DUNCKER, H. R. The lung air sac system of birds. **Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology**. v. 45, p. 7 – 171, 1971.

DZIALOWSKI, E.; PLETTENBERG, D.; ELMONOUFY, N. A.; BURGGREN, W. W. Chronic hypoxia alters the physiological and morphological trajectories of developing chicken embryos. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 131, p.713 – 724, 2002.

EYAL-GILADI, H. The gradual establishment of cell commitments during the early stages of chick development. **Cell Differentiation**, v. 14, p. 245 - 255, 1984. Disponível em:< [http://dx.doi.org/10.1016/0045-6039\(84\)90013-7](http://dx.doi.org/10.1016/0045-6039(84)90013-7)>.

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, n. 2, p. 321-337, 1976. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0012-1606\(76\)90178-0](http://dx.doi.org/10.1016/0012-1606(76)90178-0)>.

FARACI, F. M.; KILGORE, D. L. JR.; FEDDE, M. R. Attenuated pulmonary pressor response to hypoxia in bar-headed geese. **American Journal of Physiology**. v. 247 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 16), p. 402 - 403, 1984.

FEDDE, M. R. **Relationship of structure and function of the avian respiratory system to disease susceptibility. Poultry Science**. v. 77, p. 1130 - 1138, 1998.

FEDDE, M. R., FARACI, F. M., KILGORE, D. L., CARDINET, G. H., CHATTERJEE, A. Cardiopulmonary adaptations in birds for exercise at high altitude. In: Gilles, R. (Ed.), **Circulation, Respiration, and Metabolism**. Berlin, 1985, p. 49 - 163.

FERNER, K.; MORTOLA, J. P. Ventilatory response to hypoxia in chicken hatchlings: A developmental window of sensitivity to embryonic hypoxia. **Respiratory Physiology and Neurobiology**. v. 165, p. 49 - 53, 2009.

FLETCHER, D. L. Poultry meat quality. **World's Poultry Science Journal**. Ithaca, v. 58, n. 2, p. 131 – 145, 2002.

FREEMAN, B. M.; MISSON, B. H. Ph, pO<sub>2</sub>, and pCO<sub>2</sub> of blood from the foetus and neonate of *Gallus domesticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 33, p. 763 - 772, 1970.

GILBERT, S. F. Early Development in Birds. **Developmental Biology, 6th edition**. Sunderland, 2000. Disponivel em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10070/>>.

GIUSSANI, D. A.; SALINAS, C. E.; VILLENA, M.; BLANCO, C. E. The role of oxygen in prenatal growth: studies in the chick embryo. **The Journal of Physiology**. v. 585, n. 3, p. 911 – 917, 2007.

HASSANZADEH, M.; FARD, M. H. B; BUYSE, J.; BRUGGEMAN, V.; DECUYPERE, E. Effect of chronic hypoxia during embryonic development on physiological functioning and on hatching and post-hatching parameters related to ascites syndrome in broiler chickens. **Avian Pathology**. v. 33, n. 6, p. 558 – 564, 2004.

HISLOP, A.; REID, L. New findings in pulmonary arteries of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. **British Journal of Experimental Pathology**. v. 57, p. 542 – 554, 1976.

HOWELL, K.; PRESTON, R. J.; MCLOUGHLIN, P. Chronic hypoxia causes angiogenesis in addition to remodelling in the adult rat pulmonary circulation. **The Journal of Physiology**. v. 547, n. 1, p. 133 – 145, 2003.

IWANIUK, A. N.; NELSON, J. E. Developmental differences are correlated with relative brain size in birds: a comparative analysis. **Canadian Journal of Zoology**, v. 81, n. 12, p. 1913 – 1928, 2003.

JULIAN, R. J. Production and growth related disorders and other metabolic diseases of poultry – A review. **The Veterinary Journal**. v. 169, n. 3, p. 350 - 369, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.04.015>>.

LEWALLEN, M. A.; BURGGREN, W. W. Chronic hypoxia and hyperoxia modifies morphology and VEGF concentration of the lungs of the developing chicken (*Gallus gallus* variant domesticus). **Respiratory Physiology and Neurobiology**. v. 219, p. 85 – 94, 2015.

LOURENS, A.; BRAND, H.; HEETKAMP, M. J. W.; MEIJERHOF, R.; KEMP, B. Effects of Eggshell Temperature and Oxygen Concentration on Embryo Growth and Metabolism During Incubation. **Poultry Science**. v. 86, p. 2194 – 2199, 2007.

MAINA, J. N.; KING, A. S. Morphometrics of the avian lung. 2. The wild mallard (*Anas platyrhynchos*) and greylag goose (*Anseranser*). **Respiration Physiology**. v. 50, p. 299 – 310, 1982.

MAINA, J. N. Development, structure, and function of a novel respiratory organ, the lung-air sac system of birds: to go where no other vertebrate has gone. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**. v. 81, p. 545 - 579, 2006.

MAINA, J. N. A systematic study of the development of the airway (bronchial) system of the avian lung from days 3 to 26 of embryogenesis: a transmission electron microscopic study on the domestic fowl, *Gallus gallus* variant domesticus. **Tissue and Cell**. v. 35, n. 5, p. 375 - 391, 2003. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0040-8166\(03\)00058-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-8166(03)00058-2)>.

MORTOLA, J. P. Gas exchange in avian embryos and hatchlings. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**. v. 153, p. 359 – 377, 2009.

MORTOLA, J. P.; AWAM, K. A. Growth of the chicken embryo: Implications of egg size. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A. v. 156, p. 373 – 379, 2010.

MORTOLA, J. P.; COONEY, E. Cost of growth and maintenance in chicken embryos during normoxic or hypoxic conditions. **Respiratory Physiology and Neurobiology**. v. 162, p. 223 – 229, 2008.

MORTOLA, J. P.; LABBE, K. Oxygen consumption of the chicken embryo: interaction between temperature and oxygenation. **Respiratory Physiology and Neurobiology**. v. 146, p. 97 – 106, 2005.

OECD-FAO - OECD/FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS,. **Agricultural Outlook 2015**. Paris: OECD Publishing, 2015. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1787/agr\\_outlook-2015-en](http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2015-en).

PETSCHOW, D.; WÜRDINGER, I.; BAUMANN, R.; DUHM, J.; BRAUNITZER, G. BAUER, C. Causes of high blood O<sub>2</sub> affinity of animals living at high altitude. **Journal of Applied Physiology**. v. 42, p. 139 - 143, 1977.

PIIPER, J.; SCHEID, P. Gas transport efficacy of gills, lungs and skin. Theory and experimental data. **Respiration Physiology**. v. 32, p. 209 – 221, 1975.

POWELL, F. L. Respiration. In: CAUSEY, W. G 5° ed. **Sturkie`s Avian Physiology**. 2000, p. 233 - 342.

RABINOVITCH, M.; GAMBLE, W.; NADAS, A. S.; MIETTINEN, O. S.; REID, L. Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features. **American Journal of Physiology**. v. 236, p. 818 – 827, 1979.

RABINOVITCH, M. EVE and beyond, retro and prospective insights. **American Journal of Physiology**. v. 277, p. 5–12, 1999.

RABINOVITCH, M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 122, n. 12, p. 4306 – 4313, 2012.

RAMIREZ, J-M; FOLKOW, L. P.; BLIX, A. S. Hypoxia tolerance in mammals and birds: From the wilderness to the clinic. **Annual Review of Physiology** .v. 69, p. 113 – 43, 2007.

RUIJTENBEEK, K., LE NOBLE, F. A. C; JANSEEN, G. M. J.; KESSELS, C. G. A.; FAZZI, G. E.; BLANCO, C. E.; DE MEY, J. G. R. Chronic hypoxia stimulates periarterial sympathetic nerve development in chicken embryos. **Circulation**. v. 102, p. 2892 – 2897, 2000.

SCOTT, G. R. Elevated performance: the unique physiology of birds that fly at high altitudes. **The Journal of Experimental Biology**. v. 214, p. 2455 – 2462, 2011.

SEMENZA, G. L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. **Journal of Applied Physiology**. v. 88, p. 1474 – 1480, 2000.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, v. 88, n. 1, 1951. Reprinted by **Developmental Dynamics**. v. 195, p. 231 - 272, 1992.

STENMARK, K. R.; MCMURTRY, I. F. Vascular Remodeling Versus Vasoconstriction in Chronic Hypoxic Pulmonary Hypertension A Time for Reappraisal ? **Circulation Research**. v. 97, p. 95-98, 2005.

STRICK, D. M.; WAYCASTER, R. L.; MONTANI, J. P.; GAY, W. J.; ADAIR, T. H. Morphometric measurements of chorioallantoic membrane vascularity: effects of hypoxia and hyperoxia. **American Journal of Physiology**. v. 260 (Heart Circ. Physiol. 29), p. 385 - 389, 1991.

SZDZUY, K.; MORTOLA, J. P., Ventilatory chemosensitivity of the 1-day-old chicken hatchling after embryonic hypoxia. **American Journal of Physiology**. v. 293, p. 1640 – 1649, 2007.

SZDZUY, K.; FONG, L. M.; MORTOLA, J. P. Oxygenation and establishment of thermogenesis in the avian embryo. **Life Sciences**. v. 82, p. 50–58, 2008.

TAZAWA, H.; HASHIMOTO, Y.; NAKAZAWA, S.; WHITTOW, G. C. Metabolic responses of chicken embryos and hatchlings to altered O<sub>2</sub> environments. **Respiration Physiology**. v. 88, p. 37 – 50, 1992.

TAZAWA, H.; MIKAMI, T.; YOSHIMOTO, C. Effect of reducing the shell area on the respiratory properties of chicken embryonic blood. **Respiration Physiology**. v. 13, p. 352–360, 1971.

UNITED NATIONS, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. **World Population Prospects: The 2015 Revision, Key Findings and Advance Tables**. 2015, p. 241.

USDA - FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE/USDA. **Livestock and poultry: World markets and Trade. Production and Trade of All Meats to Expand in 2016**. United States Department of Agriculture Foreign Agricultura, 2015. Disponível em: <[http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock\\_poultry.PDF](http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.PDF)>, acesso em 11, jan. 2016.

USDA FINDING: INTERNATIONAL MARKETS & TRADE. Brazil Emerges As Major Force in Global Meat Markets. 2006. Disponível em: <<<http://www.ers.usda.gov/amber-waves/2006-april/brazil-emerges-as-major-force-in-global-meat-markets.aspx#.VpgGdfkrLIU>>.

VIDYADARAN, M. K.; KING, A. S.; KASSIM, H. Deficient anatomical capacity for oxygen uptake of the developing lung of the female domestic fowl when compared with red-jungle fowl. **Schweischr Arch Tiere**. v. 129, p. 225–237, 1987.

VIDYADARAN, M. K.; KING A. S; KASSIM, H. Quantitative Studies of the Lung of the Domestic Fowl (*Gallus gallus* var. *domesticus*). **Pertanika**. v. 11, n. 2, p. 229-238, 1988.

VILLAMOR, E.; RUIJTENBEEK, K.; PULGAR, V.; DE MEY, J. G. R.; BLANCO, C. E. Vascular reactivity in intrapulmonary arteries of chicken embryos during transition to ex ovo life. **American Journal of Physiology**. v. 282, p. 917 – 927, 2002.

VISSCHEDIJK, A. H. J. The air space and embryonic respiration. **British Poultry Science**, v. 9, n. 2, p. 197 - 210, 1968.

WAGNER-AMOS, K.; SEYMOUR, R. S. Effect of local shell conductance on the vascularisation of the chicken chorioallantoic membrane. **Respiratory Physiology and Neurobiology**. v. 134, p. 155 – 167, 2003.



WANGENSTEEN, O. D.; RAHN, H.; BURTON, R. R.; SMITH, A. H. Respiratory gas exchange of high altitude adapted chick embryos. **Respiration Physiology**. v. 21, p. 61 - 70, 1974.

XU, L.; MORTOLA, J. Effects of hypoxia or hyperoxia on the lung of the chick embryo. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. v. 67, p. 515 - 519, 1989.

ZHANG H.; BURGGREN W. W. Hypoxic level and duration differentially affect embryonic organ system development of the chicken (*Gallus gallus*). **Poultry Science**. v. 91, p. 3191 – 3201, 2012.

## **CHAPTER 2 - Structural remodeling of parabronchial tissue of chicks in response to hypoxia during fetal development**

**Abstract-** Oxygen is essential for cell development and function in aerobic organisms. Exposure of embryos to hypoxia can change the genetic development trajectory established and generate morphological and physiological changes of several organs and systems. In precocious birds, hypoxia during incubation is known to change size of organs, metabolic rate and ventilation in hatchlings. In these animals, embryonic development of the parabronchial structures, involved in gas exchange and conduction, occurs mainly during the second half of incubation time. Based on the above facts, we can hypothesize that hypoxia during this phase of development can induce a remodeling of such structures, favoring gas exchange later in post-hatch life. To test this hypothesis, embryos were exposed to normoxia for the entire incubation or to 15% O<sub>2</sub> (from day 12 to 18 of incubation) and their parabronchial structures, including air capillaries, blood capillaries, infundibula, atria, parabronchial lumen, blood vessels larger than capillaries and interparabronchial tissue, were analyzed by stereological methods in 1 and 10-day old chicks. Hypoxia increased the relative volume of structures directly involved in gas exchange such as air and blood capillaries, while did not change total lung volume and relative volumes of infundibula, blood vessels larger than capillaries and interparabronchial tissue of 1 and 10 days-old chicks. The lower concentration of oxygen decreased the relative volume of atria in both groups of chicks, and parabronchial lumen in the older ones. It can be concluded that hypoxia during the embryonic phase of parabronchial development can lead to a morphological remodeling characterized by an increase of structures responsible directly for gas exchange at the expense of regions that participate in the conduction of air in chicks up to 10 days after hatch.

**Keywords:** air capillaries, blood capillaries, developmental plasticity, hypoxia, lung structure

## Introduction

The adequate supply of oxygen is an absolute requirement for aerobic animals survival. Birds may face oxygen levels below normal (hypoxia) in natural environments such as high altitude, burrows, during diving, and pathological conditions (Ramirez et al., 2007). It is also demonstrated that at the end of incubation, a chicken embryo shows a 60% increase in metabolic rate and a deficit in oxygen delivery occurs because gas exchange through the egg shell is not enough to supply oxygen demand (Visschedijk, 1968; Freeman and Misson, 1970; Szdzyu et al., 2008), especially when there is an extended time interval between internal and external pipping (Decuypere et al., 1991).

During hypoxia, transcriptional activators involved in oxygen homeostasis can induce responses of genes, which may promote adaptations in order to increase oxygen delivery or facilitating metabolic adaptation to hypoxia (Semenza, 2000; 2012). On the other hand, it also can be related to morphological changes in the respiratory system involving some diseases such as ascites (pulmonary hypertension), for example. In this case, there are conflicting data showing hypoxia to induce structural remodeling in pulmonary vasculature, including arterial wall thickening (Hislop and Reid, 1976; Rabinovitch et al., 1979; Rabinovitch, 1999; Rabinovitch, 2012) and loss of non-capillary small vessels (Hislop and Reid, 1976; Rabinovitch et al., 1979; Stenmark and McMurtry, 2005), but also increase in density and size of blood vessels (Howell et al., 2003).

Chicken embryos show significant morphological and physiological changes when exposed to chronic hypoxia, characterized by a general reduction in organs mass, proportional to reduced body mass (Azzam and Mortola, 2007; Chan and Burggren, 2005; Zhang and Burgreen, 2012), and lower metabolic rate (Bjønnes et al., 1987; Ar et al., 1991; Tazawa et

al., 1992; Mortola and Labbe, 2005; Azzam et al. 2007; Lourens et al., 2007; Mortola and Cooney, 2008). On the other hand, O<sub>2</sub> transport in blood may be increased because of higher hemoglobin-O<sub>2</sub> affinity (Baumann et al., 1983), hematocrit and hemoglobin concentration (Tazawa et al., 1971; Ruijtenbeek et al., 2000).

The effects of hypoxia during embryonic development are not restricted to this phase, but they seem to persist even after hatch in normoxia (Mortola, 2009), including lower body mass (Dzialowski et al. 2002; Hassanzadeh et al., 2004; Amaral-Silva et al. unpublished data), reduced O<sub>2</sub> ventilatory sensitivity and air convection requirement during a new hypoxia or hypercapnia (Szdzyu and Mortola, 2007; Ferner and Mortola, 2009). Nevertheless, because only hatchlings have been used in the studies showing changes after hatch, it is not known if the post-hatch effects of embryonic hypoxia have a long lasting duration.

It is important to emphasize that the phase of embryonic development that the bird is exposed to hypoxia is very relevant to systems plasticity. A ‘critical developmental window’ means that a stressor, such as hypoxia, may have greater or lesser influence on postnatal morphology and physiology depending on the incubation phase in which it occurs (Chan and Burggren, 2005; Ferner and Mortola, 2009). The first half of embryonic development is a critical window for the damaging effects of hypoxia, like mortality; and the second half of incubation is the window for compensatory responses to hypoxia in key organs, which can be explained by their final development during this phase (Ferner and Mortola, 2009; Zhang and Burgreen, 2012).

The structures involved in gas exchange in precocious birds can only be observed in the last third of incubation (Maina, 2003). The parabronchi begin to develop from the eighth day when a lumen starts to be created and proliferates connecting the secondary bronchi. The

atria are visible on day 15, while the infundibula on day 16, and air capillaries on day 18. At the day of hatching hatch day (21<sup>st</sup>), air and blood capillaries are fully formed and functional and the blood gas barrier becomes extremely thin. The lungs are well developed and functionally competent at the end of fetal life (Maina, 2003). Thus, we hypothesize that hypoxia exposure during this specific phase of embryonic development of lungs can affect gas exchange structures inducing long lasting changes (plasticity) after hatch in chicken.

Based on the above considerations, we hypothesized that hypoxia during the critical phase of embryonic parabronchial development can induce a remodeling of such structures, favoring gas exchange, later in post-hatch life. To test this hypothesis, embryos were exposed to normoxia for the entire incubation or to 15% O<sub>2</sub> (from day 12 to 18 of incubation) and their parabronchial structures were analyzed by stereological methods in hatchlings and 10-day old chicks.

## **Material and Methods**

### *Animals*

Fertile eggs from chicken *Gallus gallus* variant *domesticus* (Coob500®) were incubated (incubator Premium Ecologica®, Belo Horizonte, Brazil) at 37.5° C, relative humidity of about 60% and turned every two hours. The eggs were submitted to two treatments: normoxia (Nx; 21% O<sub>2</sub> throughout incubation) and late hypoxia (Hx; 21% O<sub>2</sub> until day 11 and 15% O<sub>2</sub> from day 12 to day 18). For exposure to hypoxia, eggs were transferred to a hypoxic incubator kept at 14.5-15.5% O<sub>2</sub> by leaking a small stream of N<sub>2</sub> from a pressurized tank controlled by a flowmeter (White Martins, Osasco – Brazil, pure N<sub>2</sub>). The O<sub>2</sub> concentration within the

incubator was monitorized continuously by a O<sub>2</sub> analyzer (Sensepoint XCD, Honeywell, USA).

At day 19, all eggs (Nx and Hx) were taken to the same hatcher where hatched together under the same environmental conditions. After hatching, animals remained in room air until the day for lung sampling (day 1 or 10). The protocol was approved by the local Animal Care and Use Committee (CEUA, FCAV-UNESP, protocol number 024166/13).

#### *Tissue sampling and histological procedure*

Five 1- and 10-day-old chicks were used for each treatment. After euthanasia (ketamine, 90 mg/kg + xylazine, 4.5 mg/kg) a buffered fixative (glutaraldehyde 2.5%) solution was driven by gravity into the trachea for fixation of lungs for 24 hours still inside the coelomic cavity (adapted from Maina et al., 1989). After this period, the coelomic cavity was opened, both whole lungs were withdrawn from the rib cage and the lungs volumes were measured by Cavalieri's principle. To this end, both lungs of each animal were systematic cut into pieces of 2 mm each and the slices were arranged randomly plane in a plate; a spreadsheet containing several points separated by the same distance was placed covering the plate. To estimate lung volume, the number of points exclusively on the slices was multiplied by the known volume between points (Michel and Cruz-Orive, 1988). Twelve lung samples were collected from both whole lungs (neopulmo and paleopulmo) using systematic random sampling. The sites in the lungs chosen for histological processing were randomly determined using a translucent sheet marked with Cavalieri's points covering all slices, a similar method as used with a biopsy plate.

The pieces of lung remained from 15 to 20 hours immersed in glutaraldehyde and then they were processed for transmission electron microscopy by standard laboratory techniques.

Briefly, the tissue was washed in phosphate buffer three times, followed by post fixation in osmium tetroxide for three hours, and underwent a dehydration battery through increasing concentrations of acetone, from 30% to absolute (100%), remaining for five hours in resin/acetone and in vacuo overnight in pure resin. Tissue samples were then properly identified and included in resin epon/araldite remaining in a stove for 72 hours.

Semithin sections (500nm) stained with toluidine blue for light microscopy, were photographed with a magnitude of 20x (Zeiss, Axio Image Z2 and camera AxioCam MRC5). Photos generated were assembled by using Mosai X function of the microscopes' software. Over the picture were overlapping frames and probes in order to estimate the structures volume using stereological techniques (Howard and Reed, 1998; Ochs, 2014; Mühlfeld and Ochs, 2014). Point counting was used to estimate the volume densities (% of each structure) of parabronchial structures. It is based on a point counting of each structure and the relation of it with the point counting of the total parabronchial tissue. We also estimated the absolute volumes (Table 3, Appendix), which were calculated from the relation between the structures volume densities (% of parabronchi) and the total lung volume, i.e., for a component (a) of which the volume density is  $V_{va}(\%)$  and the total volume of the lung  $V_L$ , the absolute volume of the component (a) in the lung is  $V_{va} \times V_L$  (Maina, 1984). For the analysis of results, however, only the relative values of parabronchial structures were used.

Using this method, we studied the parabronchial tissue and its components, such as lumen of air capillaries, blood capillaries, atria, infundibula, parabronchial lumen, interparabronchial tissue and blood vessels larger than capillaries (Fig. 1).

### *Statistical analyses*

Data were subjected to two-way analysis of variance (ANOVA; factors: age and incubation treatment) and, in case of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ), means were compared by Tukey's test, 5 % probability.

## Results

General characteristics of chicks and lungs utilized, such as number of chicks, body weight, lung volume and lung volume/body weight are presented in Table 1. No significant difference between treatments (Nx and Hx) was observed in the above variables. Body weight and lung volume were higher while relative volume of lungs was lower in the oldest animals.

Normoxic animals had 22.90% of parabronchi occupied by blood capillaries with 1 day old and 20.80 % with 10 days old. Hypoxia during incubation increased blood capillaries volume density in both 1- (20.08% increase) and 10-days (13.30% increase) old chicks (Tukey's test,  $p < 0.001$ ). Older chicks that were incubated under hypoxia, but not in normoxia, showed significant lower blood capillaries volume than younger ones of the same treatment (Fig. 2 -Tukey's test,  $p = 0.027$ ).

Air capillaries of normoxic animals occupied 14.50% with 1 day old and 15.70% with 10 days old. Hypoxia caused an increase of 23.44% and 42.03% on the air capillaries volume density in 1- and 10-day old chicks, respectively (Tukey's test  $p < 0,001$ ). Air capillaries volume was significantly higher in 10-days than in 1-day-old chicks incubated in hypoxia, but not in normoxia (Fig. 3 - Tukey's test  $p < 0.001$ ).

The relative volumes of each parabronchial structure that is not directly involved in gas exchange but in air conduction are given in Table 2. The atria volume densities of 1 and



10-days-old animals incubated in hypoxia were lower than those of animals incubated in normoxia (Tukey's test: 1-day-old,  $p < 0.001$ ; 10-days-old,  $p = 0.002$ ); the atria volume decreased with age in chicks incubated in normoxia, but not in hypoxia (Tukey's test,  $p < 0.001$ ). In control chicks, the parabronchial lumen volume was higher in older compared to younger animals, an effect that was inhibited by hypoxic incubation (Tukey's test,  $p < 0.001$ ). Regarding the other structures assessed, such as infundibula, blood vessels larger than capillaries and interparabronchial tissue, no effect of incubation condition was observed.

## **Discussion**

This study showed that hypoxia during a critical window of lung development can induce morphological remodeling of parabronchial tissue in chicks up to 10 days after hatching. This response was characterized by increasing volume densities of blood and air capillaries involved in gas exchange, over a decrease in air conduction structures. Such changes in lung morphology may facilitate environmental oxygen extraction in chicks that were submitted to low  $O_2$  concentration during incubation.

It is known that hypoxia affects the expression of genes associated with metabolic adaptation to low oxygen (Semenza, 2000). In this context, reduction in tissue oxygen supply can often lead to neovascularization to match the needs of the tissues (Adair et al., 1990), which can be observed in some disturbs such as hypertrophic cardiomyopathy, myocardial infarction, healing of skin wounds and ocular disorders (Heinl-Green et al., 2005; Mace et al., 2007; Sano et al., 2007; Liu et al., 2008; Botusan et al., 2008; Jiang et al., 2009; Yoshida et al., 2010). Angiogenesis in response to hypoxia is indeed reported in tissues such as brain, heart, (Miller and Hale, 1970), skeletal muscle (Miller and Hale, 1970; Cassin et al., 1971;

Snyder et al., 1984) and lungs (Howell et al., 2003). In adult rats exposed to hypoxia during 2 weeks, an angiogenic response has been observed in the pulmonary circulation, increasing the length of pulmonary vessels and surface area of the capillary endothelium (Howell et al., 2003). High altitude birds (*Fulica americana peruviana*), which live in a hypobaric hypoxia situation, have greater capillarity in the flight muscles compared to lowland species (Léon-Velarde et al., 1993). It is interesting to note that this seems not to be a response to longtime genetic selection because Snyder et al. (1984), studying Canadian geese (*Branta canadensis*) and bar headed geese (*Anser indicus*), showed that increases in capillarity in flight muscles can also be stimulated in birds from low altitudes exposed to hypoxia during embryonic/fetal development. Regarding embryos, increase in blood vessels improving functional surface for gas exchange after hypoxia exposure, especially during the late stage of incubation, has been demonstrated by a 40 to 60% mass increment and angiogenesis of the chorioallantoic membrane (Strick et al., 1991; Wagner-Amos and Seymour, 2003; Chan and Burggren, 2005; Azzam and Mortola, 2007; Zhang and Burgreen, 2012), a critical structure for O<sub>2</sub> uptake and CO<sub>2</sub> release in avian embryos. Interestingly, an increasing expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), a protein that stimulates angiogenesis and vasculogenesis, has been reported in the lung of chicken embryos incubated in hypoxia (Lewallen and Burggren, 2015). This could be a mechanism by which the higher volume density of blood capillaries observed by us in 1 to 10 days after hatch in our chicks incubated in hypoxia could be explained.

Besides blood capillaries, the volume of the air capillaries of chicks incubated in hypoxia was also increased (Fig. 3). This implicates in an enlarged contact between blood and air, which indicates that whole exchange tissue suffers alterations to increase gas exchange in response to hypoxia. This effect of hypoxia favoring gas exchange seems to be similar in other species. Young and adult hypoxic rats have heavier lungs (Cunningham et al., 1974) and

increased lung volume (Bartlett and Remmers, 1971; Mortola et al., 1986; Sekhon and Thurlbeck, 1996), surface area (Bartlett and Remmers, 1971; Cunningham et al., 1974), number of alveoli (Sekhon and Thurlbeck, 1996), alveolar density (Bartlett and Remmers, 1971; Cunningham et al., 1974; Sekhon and Thurlbeck, 1996) and diffusion capacity (Howell et al., 2003). Guinea pigs also show higher alveolar surface and lung volume in hypoxia (Lechner and Banchemo, 1980). In addition, dogs exposed to hypoxia since puppies had air volume, surface area and pulmonary diffusion capacity increased (Johnson et al., 1985). Hypoxic chicken embryos have increased parabronchial tissue (Lewallen and Burggren, 2015) and birds evolutionarily habituated to hypoxic exposures (*Anser indicus*) show lower blood-gas diffusion barriers (Maina and King, 1982). Even ectothermic vertebrates, such as hypoxic tadpoles, show gill hypertrophy, thinner skin (lower blood - water barrier) and increased capillary bed (Burggren and Mwalukoma, 1983).

Studies using transmission microscopy that applied the stereology technique to estimate relative volumes of blood and air capillaries in *Gallus gallus*, show values of ~55.5 - 64.8% of air capillaries and 21.3 - 33.8% of blood capillaries (Abdalla, 1977 as cited in Vidyadaran et al., 1988; Abdalla et al 1982, Duncker, 1972; Duncker, 1973 as cited in Maina, 2006; Vidyadaran, 1987 as cited in Maina, 2006; Abdalla and Maina, 1981 as cited in Maina, 2006). As for calculation of these relative volumes it was considered only the gas exchange structures (air capillaries, blood capillaries, blood-gas barrier), the values are higher than ours, since these later are relative to the entire parabronchial structure (light microscopy).

What is interesting regarding our results is that even after 10 post-hatch days in normoxia, the morphological remodeling of lungs induced by hypoxia during incubation has been preserved. This indicates that lung development was affected by low oxygen supply and these morphological changes remained after the end of the hypoxic stimulus. In agreement,

Okubo and Mortola (1989) exposed neonate mice to 10% hypoxia from the 1st to the 6th day of post-natal life and then returned them to normoxia until 50 days of life resulting in mice with larger chest, antero-posterior diameter and diaphragm surface area, as well as heavier and expanded lungs, suggesting that structural changes induced by neonatal hypoxia are not reversed even for a long time after they returned to normoxia.

We suggest that the increase in the structures involved in gas exchange, i.e., blood (Fig. 2) and air (Fig. 3) capillaries, is related to the reduction in volume density of atria, infundibula and lumen of parabronchi (Table 2) in our chicks incubated in hypoxia, as the total lung volume was not changed by hypoxia (Table 1). This would indicate a tissue rearrangement in the lung that favors gas exchange at the expense of air flow conduction areas. The same pattern of changes was observed in normoxic hatchlings and became more pronounced in the 10-days old chicks, which corroborates the idea of a remodeling of lung tissue based on an anatomical limitation related to growth. Indeed, in guinea pigs acclimated to hypoxia, Lechner and Banchemo (1980) reported an increase in lung size and alveolar surface, but found anatomical limitations related to animal growth.

To our knowledge, this is the first study to show the development of pulmonary structures in young precocious birds. After normoxic incubation, the volume density of atria decreased in older animals, a pattern that was not observed in chicks incubated in hypoxia, because they already showed reduced atria in the first day after hatching. As to the parabronchial lumen, it occupied a larger space in the lung in older animals incubated in normoxia, but this was not observed in the hypoxia group. Age did not affect air and blood capillaries in chicks incubated in normoxia, but hypoxia changed this pattern inducing higher volume of blood capillaries in younger animals and of air capillaries in older animals. Thus, it

seems that hypoxia not only changes lung structures but also affects the anatomical design during early development after hatching.

Hypoxia during incubation did not affect body weight of both groups of chicks (Table 1), which corroborates previous studies in hatchlings (Azzam et al., 2007; Lourens et al. 2007; Ferner and Mortola, 2009) but differs from others showing smaller (Hassanzadeh, et al. 2004; Dzialowski, et al. 2002; Amaral-Silva et al. unpublished) or bigger chicks (Bahadoran et al. 2010). We have noticed in our laboratory that the effect of hypoxia during incubation on body weight is much variable, and may only be possible to observe a main effect on reduced body weight in hatchlings when a larger sample of animals is being used (Amaral- silva et al. unpublished data). Ten-days-old (Amaral- silva et al. unpublished data) or 14-days-old (Bahadoran et al., 2010) chicks incubated in hypoxia showed no body weight differences compared with control group.

Absolute and relative lung volumes were also not affected by hypoxic incubation, but by age. Absolute lung volume was bigger in older chicks, regardless of treatment, but when we compared lung volume relative to body weight, younger chicks had larger lungs. Compelling our results with others from literature in *Gallus gallus* (Fig. 4) it is possible to observe a negative correlation between relative lung volumes and body weight, which means that bigger animals possess smaller lungs. Thus, the relative volume of our 10 days old chicks is probably smaller because they are heavier. Indeed, a reduction in lung volume with increase in body weight is observed in *Gallus gallus* from different lineages, including Red Junglefowl (Fig. 4). It can be noticed that our 10-days-old chicks show a sharp decline in lung volume as compared to the others. It is demonstrated that the relative lung volume of a domestic fowl is around 20-33% smaller than the Red Junglefowl, without showing much change in gas exchange because their increased surface area and thinner blood-gas barrier (Vidyadaran, et

al., 1990). Furthermore, lungs of fast-growing birds (like our broilers) are smaller than those of slow-growing poultry at earlier age (Al-Masri and Hassanzadeh, 2010) and the relative lung volume decreases in broilers while increases in laying hens and Red Junglefowl during aging (Hassanzadeh et al. 2005).

In conclusion our results indicate that hypoxia during a critical window of embryonic development of lungs can induce remodeling of parabronchial structures, favoring gas exchange structures at expenses of non-gas exchange areas later in post-hatch life in chicken. Nevertheless, the confirmation that gas exchange is favored in our chicks exposed to hypoxia during incubation will be possible when the surface area and thickness of air-blood barrier are determined, which is currently under investigation in our laboratory.

## References

- ABDALLA, M. A. Morphometry of the avian lung. **Journal of Anatomy**. v.123, p. 262, 1977.
- ABDALLA, M. A.; MAINA, J. N.; KING, A. S.; KING, D. Z.; HENRY, J. Morphometrics of the avian lung. 1-The domestic fowl, *Gallus domesticus*. **Respiration Physiology**. v. 47, p. 267–278, 1982.
- ABDALLA, M. A.; MAINA, J. N. Quantitative analysis of the exchange tissue of the avian lung (Galliformes). **Journal of Anatomy**. v.134, p. 677–680, 1981.
- ADAIR, T. H.; GAY, W. J.; MONTANI, J. P. Growth regulation of the vascular system: evidence for a metabolic hypothesis. **American Journal of Physiology**. v. 259, p. 393 - 404, 1990.
- AL-MASRI, F.; HASSANZADEH, M. Anatomical parameters of cardiopulmonary system, venous blood pCO<sub>2</sub> and pO<sub>2</sub> tensions and the development of ascites syndrome in two genetic line chickens that are differing in their growth rate. **Iranian Journal of Veterinary Research**. v. 11, n. 3, p. 214 - 221, 2010.
- AR, A.; GIRARD, H.; RODEAU, J. L. Oxygen uptake and chorioallantoic blood flow changes during acute hypoxia and hyperoxia in the 16 day chicken embryo **Respiration Physiology**. v. 83, p. 295 - 312, 1991.

AZZAM, M. A.; SZDZUY, K.; MORTOLA, J. P. Hypoxic incubation blunts the development of thermogenesis in chicken embryos and hatchlings. **American Journal of Physiology**. v. 292, p. 2373-2379, 2007.

AZZAM, M. A.; MORTOLA, J. P. Organ growth in chicken embryos during hypoxia: implications on organ “sparing” and “catch-up growth”. **Respiratory Physiology and Neurobiology**. v. 159, p. 155 – 162, 2007.

BAHADORAN, S.; HASSANZADEH, M.; ZAMANIMOGHADDAM, A. K. Effect of chronic hypoxia during the early stage of incubation on prenatal and postnatal parameters related to ascites syndrome in broiler chickens. **Iranian Journal of Veterinary Research**. v. 11, n. 1, p. 64 – 71, 2010.

BARTLETT, D. JR.; REMMERS, J. E. Effects of high altitude exposure on the lungs of young rats. **Respiration Physiology**. v. 13, p.116 – 125, 1971.

BAUMANN, R.; PADEKEN, S.; HALLER, E.; BRILMAYER, T. Effects of hypoxia on oxygen affinity, hemoglobin pattern, and blood volume of early chicken embryos. **American Journal of Physiology**. v.244, p. 733 - 741, 1983.

BJØNNES, P. O.; AULIE, A.; HØIBY, M. Effects of hypoxia on the metabolism of embryos and chicks of domestic fowl. **Journal of Experimental Zoology**. v.1, p. 209 -212, 1987.

BOTUSAN, I. R.; SUNKARI, V. G.; SAVU. O.; CATRINA, A. I.; GRUNLER, J.; LINDBERG, S.; PEREIRA, T.; YLA<sup>-</sup>HERTTUALA, S.; POELLINGER, L.; BRISMAR, K. Stabilization of HIF-1a is critical to improve wound healing in diabetic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 105, p. 19426 – 19431, 2008.

BURGGREN, W.; MWALUKOMA, A. Respiration during chronic hypoxia and hyperoxia in larval and adult bullfrogs (*Rana catesbeiana*). Morphological responses of lungs, skin and gills. **Journal of Experimental Biology**. v. 105, p. 191 - 203, 1983.

CASSIN, S.; GILBERT, R. D.; BUNNELL, C. E.; JOHNSON, E. M. Capillary development during exposure to chronic hypoxia. **American Journal of Physiology**. v. 220, p. 448 – 451, 1971.

CHAN, T.; BURGGREN W. W. Hypoxic incubation creates differential morphological effects during specific developmental critical windows in the embryo of the chicken (*Gallus gallus*). **Respiratory Physiology & Neurobiology**. v. 145, p. 251–263, 2005.

CUNNINGHAM, E. L.; BRODY, J. S.; JAIN, B. P. Lung growth induced by hypoxia. **Journal of Applied Physiology**. v. 37, p. 362 – 366, 1974.

DECUYPERE, E.; DEWIL, E.; KÜHN, R. The hatching process and the role of hormones. **Avian incubation**. p. 239 - 256, 1991.

DUNCKER, H. R. Structure of the avian lung. **Respiration Physiology**. v. 14, p. 4 – 63, 1972.

DUNCKER, H. R. Der quantitative Aufbau des Lungenluftsacksystems der Vögel. **Verhandlungen der anatomischen gesellschaft**. v. 67, p. 197–204, 1973

DZIALOWSKI, E.; PLETTENBERG, D.; ELMONOUFY, N. A.; BURGGREN, W. W. Chronic hypoxia alters the physiological and morphological trajectories of developing chicken embryos. **Comparative and Biochemistry Physiology**. v. 131, p. 713 – 724, 2002.

FERNER, K.; MORTOLA, J. P. Ventilatory response to hypoxia in chicken hatchlings: A developmental window of sensitivity to embryonic hypoxia. **Respiratory Physiology and Neurobiology**. v. 165, p. 49 - 53, 2009.

FREEMAN, B. M.; MISSON, B. H. PH, pO<sub>2</sub>, and pCO<sub>2</sub>, of blood from the foetus and neonate of *Gallus domesticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 33, p. 763 - 772, 1970.

HASSANZADEH, M.; FARD, M. H. B.; BUYSE, J.; BRUGGEMAN, V.; DECUYPERE, E. Effect of chronic hypoxia during embryonic development on physiological functioning and on hatching and post-hatching parameters related to ascites syndrome in broiler chickens. **Avian Pathology**. v. 33, n. 6, p. 558 - 564, 2004.

HASSANZADEH, M.; GILANPOUR, H.; CHARKHKAR, S.; BUYSE, J.; DECUYPERE, E. Anatomical parameters of cardiopulmonary system in three different lines of chickens: further evidence for involvement in ascites syndrome. **Avian Pathology**. V. 34, n. 3, p. 188 - 193, 2005.

HEINL-GREEN, A.; RADKE, P. W.; MUNKONGE, F. M.; FRASS, O.; ZHU, J.; VINCENT, K.; GEDDES, D. M.; ALTON, E. W. The efficacy of a 'master switch gene' HIF-1 $\alpha$  in a porcine model of chronic myocardial ischaemia. **European Heart Journal**. v. 26, p. 1327–1332, 2005.

HISLOP, A.; REID, L. New findings in pulmonary arteries of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. **British Journal of Experimental Pathology**. v. 57, p. 542 – 554, 1976.

HOWARD, C. V.; REED, M. G. **Unbiased Stereology: Three Dimensional Measurement in Microscopy**. New York, 1998.

HOWELL, K.; PRESTON, R. J.; MCLOUGHLIN, P. Chronic hypoxia causes angiogenesis in addition to remodelling in the adult rat pulmonary circulation . **The Journal of Physiology**. v. 547, n. 1, p. 133–145, 2003.

JIANG, J.; XIA, X.; XU, H.; XIONG, Y.; SONG, W.; XIONG, S.; LI, Y. Inhibition of retinal neovascularization by gene transfer of small interfering RNA targeting HIF-1 $\alpha$  and VEGF. **Journal of Cellular Physiology**. v. 218, p. 66–74, 2009.



JOHNSON, R. L. JR.; CASSIDY, S. S.; GROVER, R. F.; SCHUTTE, J. E.; EPSTEIN, R. H. Functional capacities of lungs and thorax in beagles after prolonged residence at 3,100 m. **Journal of Applied Physiology**. v. 59, p. 1773–1782, 1985.

LECHNER, A. J.; BANCHERO, N. Lung morphometry in guinea pigs acclimated to hypoxia during growth. **Respiration Physiology**. v. 42, p. 155 - 169, 1980.

LEÓN-VELARDE, F.; SANCHEZ, J.; BIGARD, A. X.; BRUNET, A.; LESTY, C.; MONGE, C. High altitude tissue adaptation in Andean coots: capillarity, fiber area, fiber type and enzymatic activities of skeletal muscle. **Journal of Comparative Physiology**. v. 163, p. 52 - 58, 1993.

LEWALLEN, M. A.; BURGGREN, W. W. Chronic hypoxia and hyperoxia modifies morphology and VEGF concentration of the lungs of the developing chicken (*Gallus gallus* variant domesticus). **Respiratory Physiology and Neurobiology**. v. 219, p. 85 – 94, 2015.

LIU, L.; MARTI, G. P.; WEI, X.; ZHANG, X.; ZHANG, H.; LIU, Y. V.; NASTAI, M.; SEMENZA, G. L.; HARMON, J. W. Age-dependent impairment of HIF-1alpha expression in diabetic mice: correction with electroporation-facilitated gene therapy increases wound healing, angiogenesis, and circulating angiogenic cells. **Journal of Cellular Physiology**. v. 217, p. 319 – 327, 2008.

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

MACE, K. A.; YU, D. H.; PAYDAR, K. Z.; BOUDREAU, N.; YOUNG, D. M. Sustained expression of HIF-1alpha in the diabetic environment promotes angiogenesis and cutaneous wound repair. **Wound Repair and Regeneration**. v. 15, p. 636 – 645, 2007.

MAINA, J. N.; KING, A. S.; SETTLE, G. An Allometric Study of Pulmonary Morphometric Parameters in Birds, with Mammalian Comparisons. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**. v. 326, p.1-57, 1989.

MAINA, J. N.; KING, A. S. Morphometrics of the avian lung. 2. The wild mallard (*Anas platyrhynchos*) and greylag goose (*Anseranser*). **Respiration Physiology**. v. 50, p. 299 – 310, 1982.

MAINA, J. N. Morphometrics of the avian lung. 3. The structural design of the passerine lung. **Respiration Physiology**. v. 55, p. 291 – 307, 1984.

MAINA, J. N. A systematic study of the development of the airway (bronchial) system of the avian lung from days 3 to 26 of embryogenesis: a transmission electron microscopic study on the domestic fowl, *Gallus gallus* variant domesticus, **Tissue and Cell**. v. 35, n.5, p. 375 - 391, 2003.

MAINA, J. N. Development, structure, and function of a novel respiratory organ, the lung-air sac system of birds: to go where no other vertebrate has gone. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**. v. 81, p. 545 - 579, 2006.

MICHEL, R. P.; CRUZ-ORIVE, L. M. Application of the Cavalieri principle and vertical sections method to lung: estimation of volume and pleural surface area. **Journal of Microscopy**. v. 150, p. 117 – 136, 1988.

MILLER, A. T. JR.; HALE, D. M. Increased vascularity of brain, heart, and skeletal muscle of polycythemic rats. **American Journal of Physiology**. v. 219, n. 3, p. 702 - 704, 1970.

MORTOLA, J. P. Gas exchange in avian embryos and hatchlings. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 153 p. 359 – 377, 2009.

MORTOLA, J. P.; COONEY, E. Cost of growth and maintenance in chicken embryos during normoxic or hypoxic conditions. **Respiratory Physiology and Neurobiology**. v. 162, p. 223 – 229, 2008.

MORTOLA, J. P.; LABBE, K. Oxygen consumption of the chicken embryo: interaction between temperature and oxygenation. **Respiratory Physiology and Neurobiology**. v. 146, p. 97–106, 2005.

MORTOLA, J. P.; MORGAN, C. A.; VIRGONA, V. Respiratory adaptation to chronic hypoxia in newborn rats. **Journal of Applied Physiology**. v. 61, n. 4, p. 1329-1336, 1986.

MÜHLFELD, C.; OCHS, M. Measuring structure – What’s the point in counting? **Annals of Anatomy**. v. 196, p. 1-2, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aanat.2013.09.002>>.

OCHS, M. Estimating structural alterations in animal models of lung emphysema. Is there a gold standard? **Annals of Anatomy**. v. 196, n. 1, p. 26-33, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aanat.2013.10.004>>.

OKUBO, S.; MORTOLA, J. P. Respiratory mechanics in adult rats hypoxic in the neonatal period. **Journal of Applied Physiology**. v. 66, n. 4, p. 1772 - 1778, 1989.

RABINOVITCH, M.; GAMBLE, W.; NADAS, A. S.; MIETTINEN, O. S.; REID, L. Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features. **American Journal of Physiology**. v. 236, p. 818 – 827, 1979.

RABINOVITCH, M. EVE and beyond, retro and prospective insights. **American Journal of Physiology**. v. 277, p. 5–12, 1999.

RABINOVITCH, M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 122, n. 12, p. 4306 – 4313, 2012.

RAMIREZ, J-M; FOLKOW, L. P.; BLIX, A. S. Hypoxia tolerance in mammals and birds: From the wilderness to the clinic. **Annual Review of Physiology**. v. 69, p. 113–143, 2007.

RUIJTENBEEK, K., LE NOBLE, F. A. C.; JANSEEN, G. M. J.; KESSELS, C. G. A.; FAZZI, G. E.; BLANCO, C. E.; DE MEY, J. G. R. Chronic hypoxia stimulates periarterial sympathetic nerve development in chicken embryos. **Circulation**. v. 102, p. 2892 – 2897, 2000.

SANO, M.; MINAMINO, T.; TOKO, H.; MIYAUCHI, H.; ORIMO, M.; QIN, Y.; AKAZAWA, H.; TATENO, K.; KAYAMA, Y.; HARADA, M. Induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. **Nature**. v. 446, p. 444 – 448, 2007.

SEMENZA, G. L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. **Journal of Applied Physiology**. v. 88, p. 1474 – 1480, 2000.

SEMENZA, G. L. Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. **Cell**. v.148, n. 3, p. 399 – 408, 2012.

SEKHON, S. H.; THURLBECK, W. M. Lung morphometric changes after exposure to hypobarica and/or hypoxia and undernutrition. **Respiration Physiology**. v. 106, p. 99-107, 1996.

SNYDER, G. K.; BYERS, R. L.; KAYAR, S. R. Effects of hypoxia on tissue capillarity in geese. **Respiration Physiology**. v. 58, p. 151 – 160, 1984.

STENMARK, K. R.; MCMURTRY, I. F. Vascular Remodeling Versus Vasoconstriction in Chronic Hypoxic Pulmonary Hypertension A Time for Reappraisal? **Circulation Research**. v. 97, p. 95-98, 2005.

STRICK, D. M.; WAYCASTER, R. L.; MONTANI, J.-P.; GAY, W. J.; ADAIR, T. H. Morphometric measurements of chorioallantoic membrane vascularity: effects of hypoxia and hyperoxia **American Journal of Physiology**. v. 260, p. 385-389, 1991.

SZDZUY, K., MORTOLA, J. P., Ventilatory chemosensitivity of the 1-day-old chicken hatchling after embryonic hypoxia. **American Journal of Physiology**. v. 293, p. 1640 – 1649, 2007.

SZDZUY, K.; FONG, L. M.; MORTOLA, J. P. Oxygenation and establishment of thermogenesis in the avian embryo. **Life Sciences**. v. 82, p.50 – 58, 2008.

TAZAWA, H.; MIKAMI, T.; YOSHIMOTO, C. Effect of reducing the shell area on the respiratory properties of chicken embryonic blood. **Respiration Physiology**. v. 13, p. 352 – 360, 1971.

TAZAWA, H.; HASHIMOTO, Y.; NAKAZAWA, S.; WHITTOW, G. C. Metabolic responses of chicken embryos and hatchlings to altered O<sub>2</sub> environments. **Respiration Physiology**. v. 88, p. 37 – 50, 1992.

VIDYADARAN, M. K.; KING, A. S.; KASSIM, H. Deficient anatomical capacity for oxygen uptake of the developing lung of the female domestic fowl when compared with red-jungle fowl. **Schweizer Archiv für Tierheilkund.** v. 129, p. 225–237, 1987.

VIDYADARAN, M. K.; KING, A. S.; KASSIM, H. Quantitative Studies of the Lung of the Domestic Fowl (*Gallus gallus* var. *domesticus*). **Pertanika.** v. 11, n. 2, p. 229-238, 1988.

VIDYADARAN, M. K.; KING, A. S.; KASSIM, H. Quantitative comparisons of lung structure of adult domestic fowl and red jungle fowl, with reference to broiler ascites. **Avian Pathology.** v. 19, n.1, p. 51 - 58, 1990.

VISSCHEDIJK, A. H. J. The air space and embryonic respiration. **British Poultry Science.** v. 9, n. 2, p. 197 – 210, 1968.

WAGNER-AMOS, K.; SEYMOUR, R. S. Effect of local shell conductance on the vascularisation of the chicken chorioallantoic membrane. **Respiratory Physiology and Neurobiology.** v.134, p. 155 – 167, 2003.

YOSHIDA, T.; ZHANG, H.; IWASE, T.; SHEN, J.; SEMENZA, G.L.; CAMPOCHIARO, P. A. Digoxin inhibits retinal ischemia-induced HIF-1{alpha} expression and ocular neovascularization. **The FASEB Journal. J.** v. 24, p. 1759–1767, 2010.

ZHANG, H.; BURGGREN, W. W. Hypoxic level and duration differentially affect embryonic organ system development of the chicken (*Gallus gallus*). **Poultry Science.** v. 91, p. 3191 – 3201, 2012.

**Table 1-** Characteristics of 1 day- and 10 days-old chicks and their lungs after exposure to normoxic (Nx) or hypoxic (Hx; 15% O<sub>2</sub>) incubation.

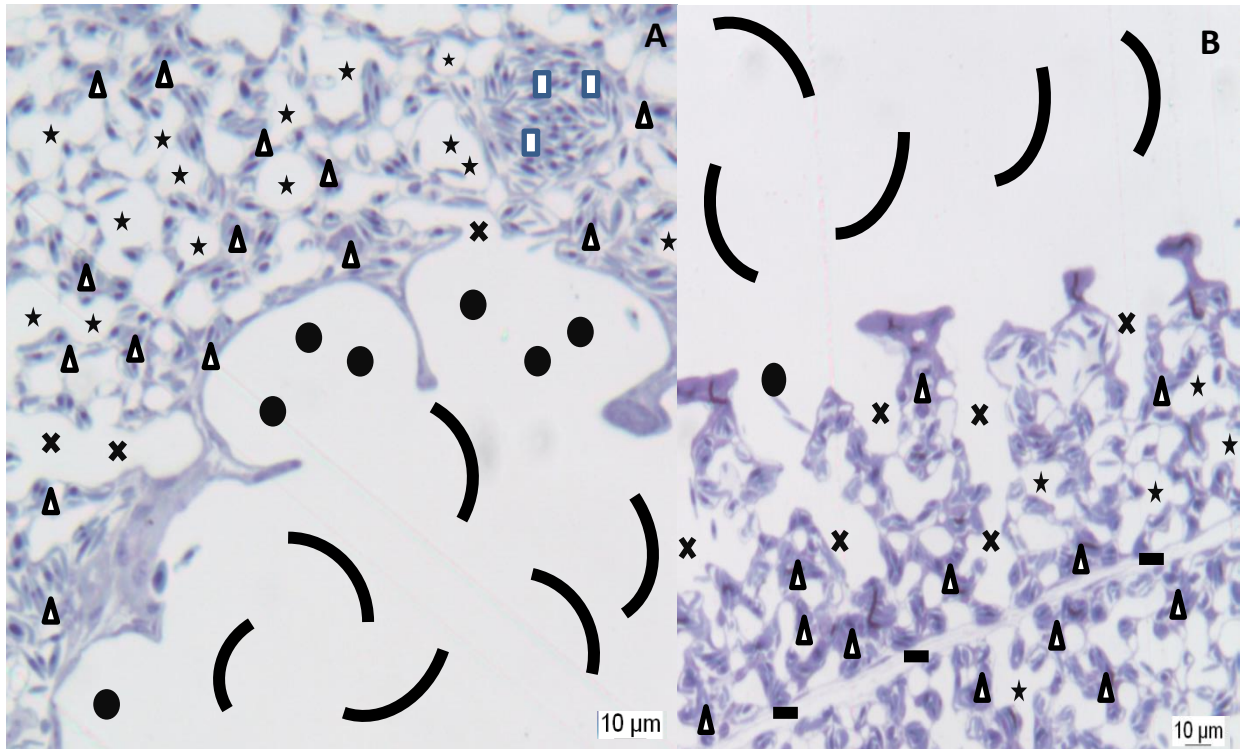
	1 day		10 days	
	Nx	Hx	Nx	Hx
Number of chicks	5	5	5	5
Body weight (g)	43.83±0.61b	43.04±0.58b	167.94±8.60a	151.56±11.04a
Lung volume (cm <sup>3</sup> )	0.98±0.03b	1.01±0.05b	2.58±0.19a	2.09±0.24a
Lung volume/BW (cm <sup>3</sup> /g)	0.0225±0.001a	0.0236±0.001a	0.0155±0.001b	0.0138±0.001b

Data are means±1 SEM. No significant differences are observed in the different oxygen conditions during incubation. Different letters mean statistical difference to 1 and 10-days old in normoxia or hypoxia. (Tukey's test,  $p < 0.01$ ). BW, body weight.

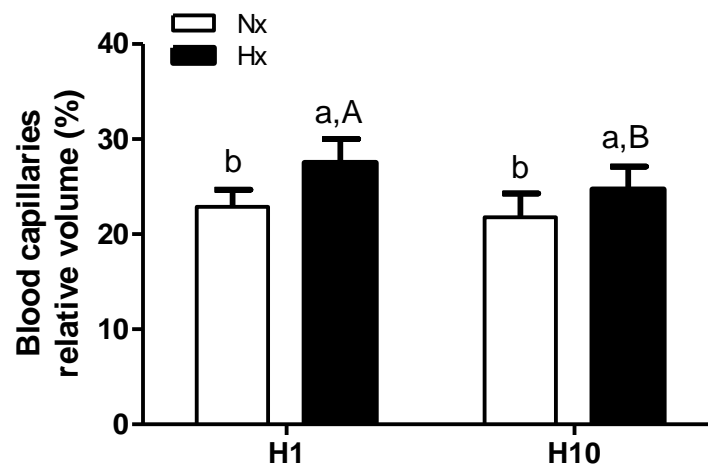
**Table 2.** percentage of non-gas exchange parabronchial structures in 1 and 10 days-old chicks that were submitted to hypoxia (15% O<sub>2</sub>) during the last third of incubation or normoxia (20,9% O<sub>2</sub>). Atria, Infundibula, Parabronchial lumen, Blood vessels (blood vessels larger than capillaries) and Interparabronchial tissue.

	1 day		10 days	
	Nx	Hx	Nx	Hx
<b>Atria</b>	12.43±5.4 <sup>a,A</sup>	6.46±2.8 <sup>b</sup>	8.4±4.1 <sup>a,B</sup>	6.1±4.2 <sup>b</sup>
<b>Infundibula</b>	5.3±3.2	5.5±2.3	5.5±2.3	5.1±1.7
<b>Parabronchial lumen</b>	34.5±7.1 <sup>B</sup>	32.4±9.6	39.5±11.0 <sup>a,A</sup>	29.6±10.6 <sup>b</sup>
<b>Blood Vessels</b>	8.8±10.6	7.9±6.1	7.9±9.7	8.8±8.5
<b>Interparabronchial tissue</b>	2.6±2.1	2.9±2.6	3.5±3.9	5.2±6.9

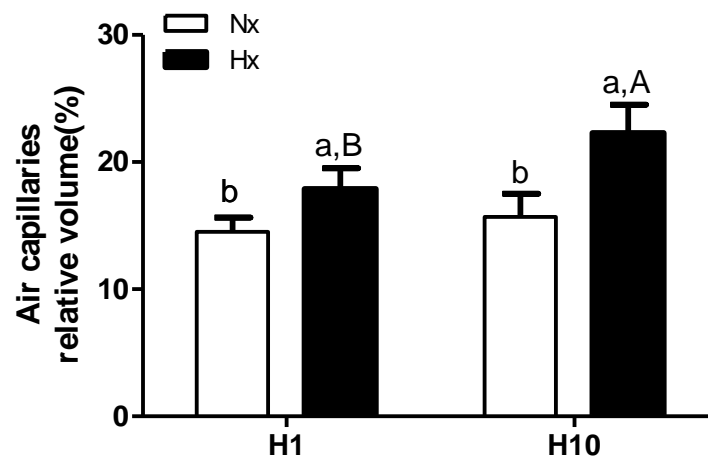
Data are means±1 SEM. Different letters mean significant difference (Tukey;  $p \leq 0.05$ ); lowercase letters are given as difference between treatments within the same age; uppercase letters represent differences between ages in the same treatment.



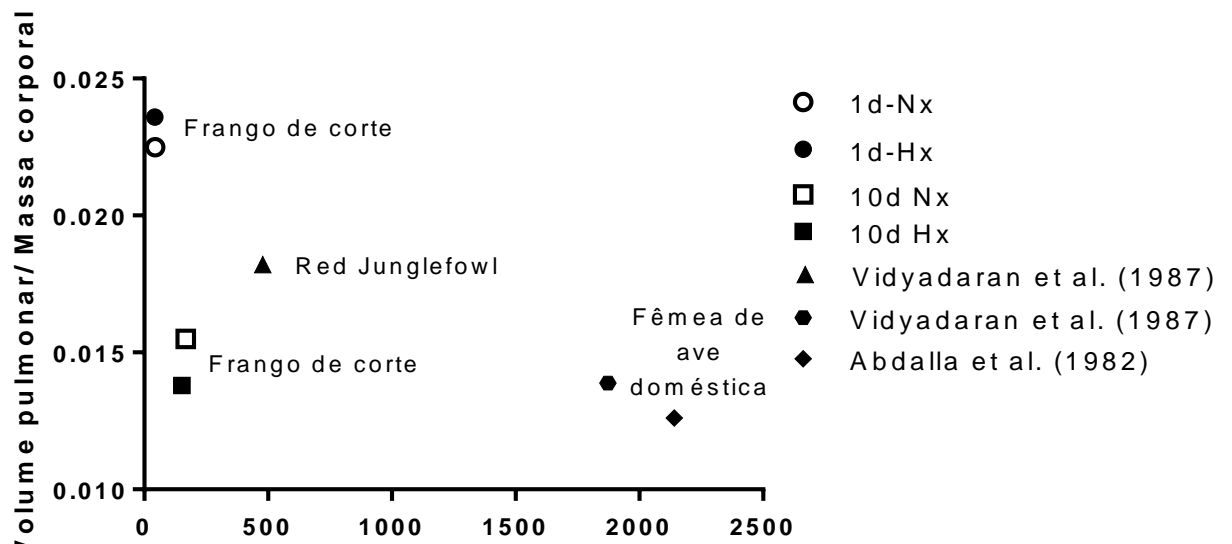
**Fig1**-Photomicrographies showing functional parabronchial structures. The figure A is a 1 day old chick and figure B, a 10 days old chick. In both micrographies it can be seen parabronchial lumen (curves-  $\curvearrowright$ ), atria (circles-  $\bullet$ ), infundibula (axes-  $\times$ ), air capillaries (stars- $\star$ ), blood capillaries (triangles-  $\Delta$ ), interparabronchial tissue (bars-  $\text{—}$ ) and blood vessels larger than capillaries (squares-  $\square$ ). Magnification, 20x.



**Fig. 2.** Effect of hypoxia (Hx; 15% O<sub>2</sub>) during the last third of incubation on the blood capillaries relative volume (%) in 1 day- (H1) and 10 days- (H10) old chicks. Nx= incubation in normoxia. Lowercase letters are given as difference between treatments within the same age; uppercase letters represent differences between ages in the same treatment. Significant difference for  $p \leq 0.05$  (Tuckey's test).



**Fig. 3.** Effect of hypoxia (Hx15% O<sub>2</sub>) during the last third of incubation on the air capillaries relative volume (%) in 1 day- (H1) and 10 (H10) days-old chicks. Nx= incubation in normoxia. Lowercase letters are given as difference between treatments within the same age; uppercase letters represent differences between ages in the same treatment. Significant difference for  $p \leq 0.05$  (Tuckey's test).



**Fig. 4.** Relative Lung Volume ( $\text{ml/g}$ ) in *Gallus gallus* of different body weight. Last three data are collected from literature (data compiled in Maina 2005) and others were obtained in this study, with 1 and 10 –days-old incubated under hypoxia (Hx) or normoxia (NX).



## Appendix

**Table 3.** Effect of hypoxia (15% O<sub>2</sub>) at the last third of incubation on the absolute volume (cm<sup>3</sup>) of parabronchial structures in 1 day and 10 days-old chicks. Air capillaries (AC) Blood capillaries (BC) Atria (AT), infundibula (IF), parabronchi lumina (PB), blood vessels larger than capillaries (BV) and interparabronchial tissue (IT)

	1 day		10 days	
	Nx	Hx	Nx	Hx
<b>Air capillaries</b>	0.14 ± 0.01 <sup>b.B</sup>	0.18 ± 0.01 <sup>a.B</sup>	0.42 ± 0.05 <sup>A</sup>	0.46 ± 0.05 <sup>A</sup>
<b>Blood capillaries</b>	0.23 ± 0.02 <sup>b.B</sup>	0.28 ± 0.02 <sup>a.A</sup>	0.58 ± 0.08 <sup>A</sup>	0.52 ± 0.08 <sup>A</sup>
<b>Atria</b>	0.12 ± 0.01 <sup>a.B</sup>	0.07 ± 0.01 <sup>b.B</sup>	0.22 ± 0.04 <sup>a.A</sup>	0.14 ± 0.05 <sup>b.A</sup>
<b>Infundibula</b>	0.05 ± 0.01 <sup>B</sup>	0.06 ± 0.01 <sup>B</sup>	0.14 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.10 ± 0.01 <sup>A</sup>
<b>Parabronchial lumen</b>	0.34 ± 0.04 <sup>B</sup>	0.33 ± 0.03 <sup>B</sup>	1.02 ± 0.12 <sup>a.A</sup>	0.60 ± 0.10 <sup>b.A</sup>
<b>Blood Vessels</b>	0.09 ± 0.04 <sup>B</sup>	0.08 ± 0.02 <sup>B</sup>	0.19 ± 0.10 <sup>A</sup>	0.17 ± 0.06 <sup>A</sup>
<b>Interparabronchial tissue</b>	0.02 ± 0.009	0.03 ± 0.01 <sup>B</sup>	0.05 ± 0.03	0.09 ± 0.07 <sup>A</sup>

Data are means ± 1 SEM. Different letters mean significant difference (Tuckey;  $p \leq 0.05$ ); lowercase letters are given as difference between treatments within the same age; uppercase letters represent differences between ages in the same treatment.