

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITO DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO NO
METABOLISMO, TERMORREGULAÇÃO E
QUIMIOSENSIBILIDADE DE FRANGOS**

Aline Cristina Gonçalves Rocha

Zootecnista

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITO DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO NO
METABOLISMO, TERMORREGULAÇÃO E
QUIMIOSENSIBILIDADE DE FRANGOS**

Aline Cristina Gonçalves Rocha

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Zootecnia

Novembro de 2020

R672e Rocha, Aline Cristina Gonçalves
Efeito da temperatura de incubação no metabolismo,
termorregulação e quimiossensibilidade de frangos / Aline
Cristina Gonçalves Rocha. -- Jaboticabal, 2021
72 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
Jaboticabal
Orientadora: Luciane Helena Gargaglioni Batalhão

1. Aves. 2. Plasticidade de Desenvolvimento. 3. Ventilação.
4. Quimiorreceptores. 5. Idades. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo
autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITO DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO NO METABOLISMO,
TERMORREGULAÇÃO E QUIMIOSENSIBILIDADE DE FRANGOS

AUTORA: ALINE CRISTINA GONÇALES ROCHA

ORIENTADORA: LUCIANE HELENA GARGAGLIONI BATALHÃO

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

Profa. Dra. LUCIANE HELENA GARGAGLIONI BATALHÃO (Participação Virtual)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. CAMILA LINHARES TAXINI (Participação Virtual)
Universidade do Estado de Minas Gerais/UEMG / Passos/MG

Prof. Dr. GUILHERME DE CAMARGO FERRAZ (Participação Virtual)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 16 de novembro de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Aline Cristina Gonçalves Rocha – nascida em 29 de junho de 1990, na cidade de Jaboticabal - SP, filha de Cristiano Rocha e Maria Aparecida Gonçalves Rocha, ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Estadual Paulista na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, campus de Jaboticabal em fevereiro de 2013. Durante o período da graduação a aluna participou do grupo PET Zootecnia por 2 anos e meio, com bolsa de estudo financiada pelo MEC. A aluna ainda realizou estágio no Laboratório de Nutrição de Cães e Gatos e no Setor de Forragicultura sendo que, no último, realizou projeto de iniciação científica que resultou em seu Trabalho de Conclusão de Curso e foi contemplada com bolsas de estudo de diferentes empresas. O estágio curricular foi realizado junto a empresa Agropastoril Campanelli em Altair, São Paulo. Colou grau em fevereiro de 2018 e recebeu duas premiações por ser a primeira aluna da turma. Em agosto de 2018 iniciou o curso de Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da mesma instituição, onde foi bolsista CAPES, submetendo-se ao Exame Geral de Qualificação em 28 de setembro de 2020 e Defesa em 16 de novembro de 2020.

A Deus, pelo Dom da vida.

A meus pais Cristiano e Cidinha e minha irmã Kelly Cristina pela dedicação, confiança, compreensão e grande amor. Obrigada pelos grandes esforços destinados à minha formação intelectual e de vida, vocês são meus poderosos modelos, pois me ensinaram o amor e a bondade.

A vocês, dedico!

AGRADECIMENTOS

A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP e o Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pelo ensino e estrutura necessários para a execução do meu trabalho;

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001;

A Deus, Nossa Senhora Aparecida e São Francisco de Assis, por sempre me guiarem por caminhos de luz e por concederem sabedoria e força em momentos difíceis;

A minha família, pelo apoio incondicional, amor, pelas orações e palavras amigas sempre que precisei;

Aos meus animais, que deram a vida para que meu mestrado fosse possível;

A minha querida orientadora Luciane Helena Gargaglioni Batalhão, pela paciência, incentivo, dedicação, ensinamentos e principalmente pela amizade, os quais jamais vou me esquecer;

Aos funcionários do departamento, em especial a Ângela e Euclides pela amizade e toda ajuda;

A minha querida amiga Alini Mari, por todo apoio, paciência e risadas compartilhadas;

Aos meus amigos Welex, Carlos, Camila, Lívia, Gabriel e Mari, pela ajuda e pelo carinho. Vocês foram luz no meu caminho e estarão sempre no meu coração;

Aos meus parceiros de laboratório Luis Gustavo, Elisa, Leonardo, Carol, Lara, Lucas, Mariane, Tiago, Gabriela, Ane e Letícia, pela ajuda e companhia durante essa importante fase;

E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
Resumo	III
Abstract	V
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
Introdução	1
Objetivo	9
Revisão da Literatura	9
Referência Bibliográfica	19
CAPÍTULO 2 - EMBRYONIC THERMAL MANIPULATION AFFECTS VENTILATION, METABOLISM AND THERMAL CONTROL IN NEWLY HATCHED AND JUVENILE BROILER CHICKS	28
Introduction.....	29
Methods	31
Results:	35
Discussion	39
References	45
Figure Legends	51
Table 1	53
Figure 1	54
Figure 2	55
Figure 3	56
Figure 4	57
Figure 5	58
Figure 6	59
Figure 7	60
Resumo dos dados	61



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Efeito da temperatura de incubação no metabolismo, termorregulação e quimiossensibilidade de frangos"**, protocolo nº 011955/18, sob a responsabilidade da Profª Drª Luciane Helena Gargaglioni Batalhão, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 06 de setembro de 2018.

Vigência do Projeto	15/01/2019 a 10/06/2019
Espécie / Linhagem	<i>Gallus gallus domesticus</i> / Cobb
Nº de animais	± 60 animais
Peso / Idade	± 64g – 2,626Kg / 2 – 42 dias
Sexo	Ambos os sexos
Origem	Empresa Globoaves, Itirapina-SP

Jaboticabal, 06 de setembro de 2018.


Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil
tel 16 3209 7100 www.fcav.unesp.br

EFEITO DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO NO METABOLISMO, TERMORREGULAÇÃO E QUIMIOSENSIBILIDADE DE FRANGOS

RESUMO - O primeiro terço da incubação é determinante para o desenvolvimento embrionário, sendo que a temperatura é considerada um dos fatores mais importantes, pois pequenas flutuações deste parâmetro podem afetar a qualidade e a taxa de sobrevivência dos embriões. Desta forma, objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da manipulação térmica durante a incubação sobre o consumo de oxigênio, temperatura corporal, respostas ventilatórias à hipóxia e hipercapnia em pintainhos machos e fêmeas de 3 e 14 dias de idade (d). Foram incubados ovos férteis de matrizes da linhagem Cobb®, classificados de acordo com o peso, provenientes de matrizes com idade entre 48 a 52 semanas, procedentes de incubatório comercial, de acordo com os seguintes tratamentos: Controle (*Control*) - ovos incubados a 37,5°C (durante todo o período incubatório); Frio (*Cold*) - ovos incubados a 36°C (6 horas/ dia, por 5 dias); Quente (*Hot*) - ovos incubados a 39°C (6 horas/ dia, por 5 dias). Após os 5 primeiros dias de incubação, os ovos dos tratamentos *Frio* e *Quente* permaneceram em temperatura de 37,5°C até a eclosão. Após a eclosão os animais foram sexados e os seguintes parâmetros foram avaliados: massa do pulmão e coração; temperatura corporal; consumo de O₂ e ventilação em condições basais, e após a exposição à hipóxia (10%O₂) ou à hipercapnia (7%CO₂). Os dados foram avaliados quanto ao atendimento das pressuposições de homogeneidade das variâncias e normalidade dos erros estudantizados e submetidos à análise de variância de duas vias e em caso de diferença significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A massa corpórea dos animais incubados a 36°C, em ambas idades, foi maior comparada aos grupos quente (machos e fêmeas) e controle (exceto os machos 3d). A temperatura de incubação não influenciou no peso do coração dos animais 3d ($p>0,05$). No entanto, animais 14d incubados a 39°C apresentaram o peso do coração superior aos animais do grupo controle. Não houve diferença significativa no peso dos pulmões, em ambas as idades e sexo. Não houve diferença significativa entre os tratamentos na $\dot{V}_E$, $\dot{V}O_2$ e $\dot{V}_E / \dot{V}O_2$ dos animais 3d, durante a exposição ao ar ambiente. No entanto, fêmeas 14d incubadas a 39°C apresentaram uma diminuição de $\dot{V}_E$. Ambos machos e fêmeas 14d incubados a 39°C apresentaram menor $\dot{V}O_2$ e um aumento na T_b comparados ao grupo controle. Além disso, fêmeas 14d incubadas a 36°C apresentaram menor T_b comparadas aos animais incubados a 37,5 e 39°C. Sob exposição ao CO₂, a resposta hiperventilatória ($\dot{V}_E / \dot{V}O_2$) foi atenuada nas fêmeas 3d e machos 14d incubados a 36°C e nos machos e fêmeas 14d incubadas a 39°C, principalmente afetando $\dot{V}_E$. Frente à hipóxia, fêmeas 3d incubadas a 36°C apresentaram uma hiperventilação atenuada modulada por uma menor resposta hipometabólica, comparadas ao grupo controle. No entanto, em fêmeas 14d incubadas a 36°C, o aumento de $\dot{V}_E$ sob hipóxia foi maior e a resposta hipometabólica foi atenuada em comparação com o grupo controle, o que resultou em nenhuma alteração no equivalente ventilatório. Não houve efeito

do tratamento na Tb dos animais machos e fêmeas 3d, frente hipercapnia e hipóxia. No entanto, fêmeas 14d incubadas a 36°C apresentaram uma queda atenuada na Tb comparada ao grupo controle (7% CO₂) e grupos controle e quente (10% O₂). Com relação a Tb dos machos 14d, o único efeito do tratamento foi observado frente hipóxia, onde machos 14d apresentaram uma queda acentuada comparada ao grupo controle. Em conclusão, a manipulação térmica afeta mais a hiperventilação induzida pela hipercapnia comparado ao desafio hipóxico. Em ambas idades, as fêmeas são mais afetadas pela manipulação térmica do que os machos.

Palavras-chave: frango, hipercapnia, hipóxia, incubação, temperatura, ventilação, machos, fêmeas

EFFECT OF INCUBATION TEMPERATURE ON METABOLISM, THERMOREGULATION AND CHEMOSENSITIVITY IN CHICKENS

Abstract: The first third of the incubation is crucial for embryonic development, and temperature is considered one of the most important factors, as small fluctuations in this parameter can affect the quality and survival rate of embryos. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effects of thermal manipulation during incubation on oxygen consumption, body temperature, ventilatory responses to hypoxia and hypercapnia in male and female chicks aged 3 and 14 days old (d). Fertile eggs from breeders of the Cobb® line, incubated according to weight, from breeders aged 48 to 52 weeks, from a commercial hatchery, were incubated, according to the following treatments: Control - eggs incubated at 37.5 °C (during the entire incubation period); Cold - eggs incubated at 36°C (6 hours/ day, for 5 days); Hot - eggs incubated at 39°C (6 hours/ day, for 5 days). After the first 5 days of incubation, the eggs of the Cold and Hot treatments remained at a temperature of 37.5°C until hatching. After hatching, the animals were sexed and the following parameters were evaluated: lung and heart weight; body temperature; consumption of O₂ and ventilation in baseline conditions, and after exposure to hypoxia (10% O₂) or hypercapnia (7% CO₂). The data were evaluated for compliance with the assumptions of homogeneity of variances and normality of the student errors and submitted to the Two-way ANOVA analysis and in case of significant difference, the means were compared using the Tukey test at 5% probability. The body mass of the animals incubated at 36°C, in both ages, was higher compared to the hot groups (males and females) and control groups (except the 3d males). The incubation temperature did not influence the heart weight of the 3d animals ($p>0.05$). However, 14d animals incubated at 39°C had a higher heart weight than animals in the control group. There was no significant difference in lung weight at both ages and sex. There was no significant difference between treatments in the $\dot{V}_E$, $\dot{V}O_2$ and $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ of the 3d animals, during exposure to ambient air. However, 14d females incubated at 39°C showed a decrease in $\dot{V}_E$. Both 14d males and females incubated at 39°C showed lower $\dot{V}O_2$ and an increase in Tb compared to the control group. In addition, the 14d females incubated at 36°C showed lower Tb compared to animals incubated at 37.5 and 39°C. Under exposure to CO₂, the hyperventilatory response ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$) was attenuated in the 3d females and 14d males incubated at 36°C and in the 14d males and females incubated at 39°C, mainly affecting $\dot{V}_E$. Facing hypoxia, the 3d females showed an attenuated hyperventilation modulated by a lower hypometabolic response, compared to the control group. However, in 14d females incubated at 36°C, the increase in $\dot{V}_E$ under hypoxia was greater and the hypometabolic response was attenuated

compared to the control group, which resulted in no change in the ventilatory equivalent. No effect of the treatment was observed in 3d male and female animals Tb, during hypercapnia and hypoxia. However, 14d females incubated at 36°C showed an attenuated drop in Tb compared to the control group (7% CO₂ and 10% O₂) and hot group (10% O₂). Regarding 14d males, the only significant difference was observed during hypoxia, where males incubated at 39°C showed a sharp drop in Tb compared to the control group. In conclusion, thermal manipulation affects hypercapnia-induced hyperventilation more than hypoxic challenge. At both ages, females are more affected by thermal manipulation than males.

Keywords: chicken, Hypercapnia, Hypoxia, incubation, temperature, ventilation, male, female

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Introdução

O Brasil destaca-se entre os maiores produtores e exportadores mundiais de carne de frango, atraindo cada vez mais investimentos para o setor. Dados do relatório anual da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), referente ao ano de 2019, revelam que a produção nacional superou 13 milhões de toneladas, mantendo o Brasil no terceiro lugar no ranking mundial de produção de carne de frango e o primeiro lugar com relação às exportações, registrando um total de 4,212 milhões de toneladas de frangos.

A demanda de proteína de origem animal de qualidade fez com que a avicultura de corte passasse por mudanças consideráveis nas últimas décadas, desde o melhoramento genético, nutrição até o manejo, o que resultou em uma redução significativa no número de dias necessários para que o animal alcance peso de abate (Lin et al., 2017).

A incubação tem se tornado um dos setores da avicultura de extrema importância e uma etapa estratégica dentro de todo o complexo avícola, devido ao fato de que o frango de corte passa mais de 30% de sua vida dentro de uma máquina incubadora (Tzschentke e Tatge, 2013). O desenvolvimento ontogenético *in ovo*, de muitas aves precoces domésticas, ocorre em torno de 3 semanas, sendo o primeiro terço da incubação correspondente ao desenvolvimento embrionário e os dois últimos ao fetal. Ao final desse período, inicia-se o processo de eclosão dos pintainhos, que pode ocorrer a partir de 480 horas de incubação, aproximadamente (Vieira e Pophal, 2000; Morita et al., 2010).

Durante o processo de incubação, o embrião é continuamente afetado pelo ambiente. Incubadoras artificiais devem assegurar controle de temperatura, em torno de 37,5°C, ventilação constante, umidade relativa de 60% e viragem dos ovos, pelo menos, 24 vezes por dia. Desvios desses fatores, durante as “fases críticas”, podem acometer o desenvolvimento embrionário, resultando em um aumento da mortalidade do embrião, diminuindo, conseqüentemente, a eclodibilidade.

A temperatura é apontada como um dos fatores mais importantes que afeta o desenvolvimento embrionário sendo que, altas temperaturas aceleram o desenvolvimento e baixas determinam um atraso no desenvolvimento do embrião (Christensen et al., 1999; Lourens et al., 2005; Mortola and Toro-Velasquez, 2013). Contudo, uma temperatura que exceda a indicada pode influenciar, não apenas massa dos órgãos, especialmente massa do coração (Christensen et al., 2004; Leksrisompong et al., 2007) mas também promover distúrbios metabólicos, como por exemplo, a ascite (Molenaar et al., 2011), afetar o desenvolvimento dos ossos (Oviedo-Rondón et al., 2009) e o sistema imune (Durant et al., 2012; Walstra et al., 2012).

Segundo Lubritz e McPherson (1994), frangos incubados em altas temperaturas podem ter a capacidade vascular pulmonar insuficiente, levando a um aumento da demanda metabólica por O₂, tendo como resultado o desenvolvimento de ascite. Molenaar et al. (2011) observaram que frangos incubados à 38,9°C (a partir do 7º dia de incubação) ocorre uma redução no desenvolvimento corporal na eclosão e no crescimento, e aumento na incidência de mortalidade associada à ascite, o que pode ter relação com a queda no desenvolvimento cardiovascular na eclosão.

As condições de temperatura, durante a incubação, podem afetar o desenvolvimento da maioria dos tecidos. Isto indica o potencial para manipular o desenvolvimento embrionário e pré-condicionar o metabolismo das aves às condições ambientais pós-eclosão (Aksit et al., 2010; Tzschentke, 2011). Estes são os chamados efeitos epigenéticos ou plasticidade fenotípica que tem dado origem a manejos de controle metabólico específico para o desenvolvimento de tecidos ou de adaptação ao calor ou ao frio (Kühn et al., 1982; Boerjan, 2010). Os desafios/insultos ambientais que venham a ocorrer durante fases críticas de desenvolvimento pré- e pós-natal (alterações térmicas, gasosas, disponibilidade de água, agentes tóxicos, infecções/inflamação), podem causar morte ou remodelar dramaticamente o desenvolvimento ontogenético com consequências para aumento do risco de doenças na fase adulta (Burgreen, 2014; Burgreen e Crews, 2014) (Figura 1).

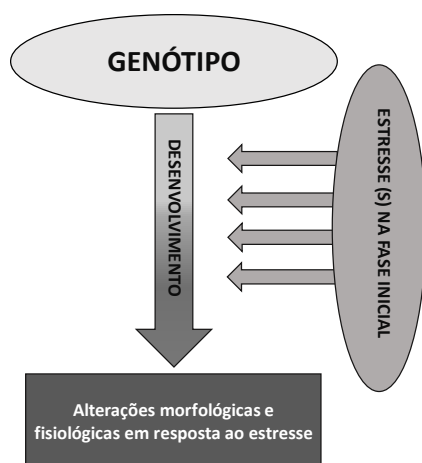


Figura 1: Esquema geral destacando que os eventos da vida, especialmente quando experimentados durante o estágio inicial de desenvolvimento, podem impactar fortemente o desenvolvimento, especialmente em indivíduos geneticamente suscetíveis. Quando não induzem morte, essas interações gene-ambiente durante o desenvolvimento podem desencadear alterações morfológicas e fisiológicas que podem persistir até a idade adulta (Loi et al., 2014).

Estudos sugerem que é possível aumentar a termotolerância em aves de corte expostas à temperaturas acima da indicada durante pré e pós eclosão (Tzschentke e Tatge, 2013; Morita et al., 2016). As fases críticas, quando o embrião está predisposto à adaptação térmica, foram observados durante a fase

inicial de desenvolvimento, quando ocorre a diferenciação de estruturas e, novamente, na fase mais tardia, quando os órgãos e os sistemas fisiológicos amadurecem (Tzschentke e Tatge, 2013). O elemento-chave na indução da adaptação epigenética é encontrar a fase exata, a frequência correta, a duração e a amplitude da manipulação da temperatura (Willemsen et al., 2010).

Neste contexto, Piestun (2009) observou que frangos de corte submetidos à manipulação térmica (39,5°C) contínua na incubação (24 horas/ dia) durante 10 dias, apresentaram efeitos negativos no crescimento e desenvolvimento do embrião. Entretanto, o mesmo estudo revelou que os animais expostos à manipulação térmica intermitente (12 horas/ dia), no mesmo período, apresentaram uma resposta positiva, quando comparado com o grupo controle e o grupo desafiado de forma contínua.

De forma interessante, Lin et al. (2017) avaliaram diferentes temperaturas na fase pré incubatória e no início da incubação, do dia 0 ao dia 5, e verificaram que, os embriões expostos à temperaturas mais elevadas, que a temperatura recomendada, apresentaram maior massa corpórea, maior comprimento, maior difusão de O₂ para o ovo, indicando que o crescimento do embrião é afetado pela temperatura de maneira positiva.

De acordo com Collin (2005), a temperatura corporal de aves expostas à manipulação térmica (39,5°C) com diferentes durações, durante o último terço da incubação, foi menor em todos os tratamentos quando comparado ao grupo controle. Yahav et al. (2004) demonstraram que manipulações térmicas durante os dias 16 a 18 da embriogênese, pode promover melhora significativa na termotolerância, provavelmente relacionada à redução da temperatura corporal

e na concentração plasmática de hormônios tireoidianos, que supostamente reduzem a taxa metabólica.

Poucos estudos relatam a resposta à manipulação térmica no período incubatório inicial, o qual, ocorre a organogênese definitiva. O desenvolvimento do embrião, após a colocação do ovo em condições de incubação, é muito rápido, ocorrendo alterações a cada hora. Estas modificações compreendem a organogênese, isto é, a especialização de grupos celulares constituindo órgãos e sistemas orgânicos. Nesta fase, cada passo é igualmente crítico para a formação do indivíduo como um todo, requerendo todos os cuidados necessários para a preservação da integridade do animal (Cesario, 2013).

O encéfalo e o coração se desenvolvem no início da incubação, podendo serem notados com menos de 48 horas. O sangue começa a circular quando o coração se une ao restante do sistema circulatório. Os sistemas digestório e respiratório se desenvolvem a partir do terceiro dia de desenvolvimento embrionário. A morfogênese continua até dia 12, quando o embrião já está completamente formado (Everaert e Decuypere, 2013).

Durante a incubação inicial, a produção de calor pelo embrião mostra-se limitada, de modo que o embrião se comporta como um organismo poiquilotérmico e depende principalmente da temperatura do ar da máquina para determinar a temperatura do ovo (French, 1997). As estruturas envolvidas na termorregulação, como hipotálamo, tireoide, e glândula pituitária, se desenvolvem durante a fase de crescimento. A maturação final deste sistema, entretanto, ocorre somente nos últimos dias da fase de maturação do embrião e nos dias pós-eclosão (Boerjan, 2010).

De acordo com Piestun (2009), citado anteriormente, as concentrações plasmáticas de hormônios tireoidianos foram significativamente baixas, durante o experimento e na eclosão, nos dois grupos desafiados, quando comparados com o grupo controle. Os embriões expostos a diferentes períodos de manipulação térmica, ainda apresentaram menor concentração plasmática de corticosterona durante o experimento, entretanto mais alta na eclosão.

Um estudo realizado em frangos por Geers et al. (1983), mostrou que a temperatura pode afetar o consumo de oxigênio por unidade de massa seca de embriões. Foram incubados ovos em temperaturas que variaram de 35,8 à 37,8°C, durante os 10 primeiros dias e concluiu-se que, embora a baixa temperatura da incubadora reduza a taxa de crescimento embrionário, uma vez que os embriões retornaram à temperatura normal aos 11 dias, eles cresceram mais rápido que o grupo controle, apresentando um crescimento compensatório. O crescimento mais rápido nos embriões tratados resultou em uma maior produção de calor metabólico por unidade de massa embrionária seca do que o grupo controle.

Em aves, as trocas gasosas no embrião ocorrem por meio do saco de vitelo. A partir da segunda semana até o décimo oitavo dia, as trocas de O₂ e CO₂ começam a ser feitas através de capilares na membrana corioalantoíde (Mortola, 2009). Já na última semana de incubação, juntamente com a formação de vasos capilares, a vascularização pulmonar surge tanto por vasculogênese e como por angiogênese (Hislop, 2005). A passagem da respiração corioalantoíde para a respiração pulmonar se efetua de forma gradativa, iniciando-se entre 18º e 19º dias de idade, no qual o embrião começa a bicar a câmara de ar. Já a total mudança para respiração pulmonar ocorre entre o vigésimo e vigésimo primeiro

dia, instante em que começa a bicagem da casca. Durante esse período, o fornecimento de ar fresco se torna imprescindível para suprir a maior demanda de oxigênio do embrião. Quando essa demanda é baixa ocorre elevada taxa de mortalidade (Gigli, 2007).

Durante a embriogênese, o embrião é sensível à hipóxia e os sensores que detectam as alterações da pressão parcial arterial de oxigênio (PaO_2) são denominados quimiorreceptores periféricos que são localizados principalmente na artéria carótida e são chamados corpos carotídeos. Os corpos carotídeos são órgãos muito pequenos (<1 mm de diâmetro) localizados bilateralmente no tórax entre a artéria carótida e o gânglio nodoso do vago (Hempleman e Warburton, 2013, Kameda, 2002). Além de serem sensíveis à PaO_2 , esses sensores também detectam variações do pH sanguíneo e da pressão parcial arterial de dióxido de carbono (PaCO_2). No embrião de aves, os corpos carotídeos começam a se desenvolver morfológicamente durante o terço inicial de incubação (Murillo-Ferrol, 1967; Kameda, 1994), a última parte de incubação corresponde ao período em que os corpos carotídeos começam a ser funcionais (Mortola, 2009).

As aves também apresentam os quimiorreceptores centrais que são localizados no sistema nervoso central, mas não são tão precisamente identificados anatomicamente e detectam alterações de CO_2 e pH (Milsom et al, 1981; Sèbert, 1979). Nos mamíferos, esses sensores centrais estão localizados na superfície ventrolateral do bulbo, nos núcleos da rafe, locus coeruleus, hipotálamo lateral (Nattie, 1999). Estudo anterior de nosso laboratório demonstrou que em condições basais, não foi observada diferença entre machos e fêmeas nas variáveis cardiorrespiratórias e metabólicas analisadas nos pintos

de 10 e 21 dias, as diferenças de ventilação e frequência cardíaca entre as idades parecem estar relacionadas às distintas demandas metabólicas dessas fases. Pintinhos fêmeas, especialmente com 21 dias de idade após a eclosão, parecem ser mais sensíveis à hipercapnia do que os outros grupos, o que pode estar relacionado às diferenças na secreção de hormônios sexuais, mesmo em idade precoce (Espinha et al., 2014).

Além destes sensores, quimiorreceptores intrapulmonares, que são altamente sensíveis a CO_2 , também são encontrados em aves. Estes sensores do pulmão são estimulados por baixas pressões de CO_2 e podem ser inibidos por níveis elevados de CO_2 pulmonar, e as suas fibras aferentes vagais controlam o volume corrente e a frequência respiratória (Hempleman et al, 2006). De forma interessante, alterações na temperatura podem afetar a quimiossensibilidade e a elevação da temperatura causa um aumento na taxa de disparo dos quimiorreceptores periféricos e centrais, aumentando a resposta ventilatória à hipóxia e hipercapnia, respectivamente (Mortola & Frappel, 2000). Contudo, não é conhecido se a manipulação da temperatura no início da incubação pode afetar a quimiossensibilidade dos animais e causar alterações metabólicas nas aves.

Como os estudos sobre o efeito da temperatura durante a fase inicial da incubação de frangos de corte machos e fêmeas são escassos e pouco se sabe sobre os distúrbios fisiológicos causados por essas alterações, maiores investigações são necessárias para verificar esses efeitos no desenvolvimento embrionário e as implicações fisiológicas no metabolismo, termorregulação e ventilação da ave pós-eclosão.

Pesquisas como respostas respiratórias são escassas na literatura. Como é sabido, as variações na ventilação pulmonar e no metabolismo são fatores que podem alterar a homeostase e influenciar no desempenho do animal, bem como aumentar a susceptibilidade do mesmo às doenças respiratórias. Assim, o presente estudo auxilia no melhor entendimento dos mecanismos fisiológicos respiratórios e como o estresse influencia no desenvolvimento do crescimento do frango de corte.

Objetivo

Este trabalho propõe elucidar os efeitos da manipulação térmica durante a primeira fase da incubação em diferentes níveis de organização, tendo como foco relações respiratórias e metabólicas e avaliar as seguintes variáveis:

- A massa corpórea das aves, massa do pulmão e do coração em aves provenientes de ovos incubados em temperatura padrão (37,5°C), temperatura fria (36°C) ou quente (39°C) de pintos recém-nascidos (2-3 dias) e 14 dias de idade;

- As respostas ventilatórias, metabólicas e térmicas de frangos de corte machos e fêmeas de pintos recém-nascidos (2-3 dias) e com 14 dias de idade, provenientes de ovos incubados em diferentes temperaturas, expostos a normocapnia normóxica, hipóxia e hipercapnia;

Revisão da Literatura

Avicultura

O Brasil destaca-se entre os maiores produtores mundiais de carne de frango, com uma produção de 12,86 milhões de toneladas em 2018, seguindo apenas os Estados Unidos, responsável por produzir quase 20 milhões de toneladas (ABPA, 2019). Dados mostram que o consumo per capita de carne de frango apresentou um aumento de 9,15% em 10 anos (ABPA, 2019), isso se deve, principalmente, ao fato de que essa é uma proteína de origem animal de custo mais acessível, se comparada a carne bovina e suína.

Os grandes avanços na avicultura nas últimas décadas permitiram que a produção de frango se tornasse mais competitiva na indústria de proteína animal. A evolução da avicultura brasileira deu-se principalmente a partir da década de 60 com a importação de materiais genéticos especializados em produção de carne e ovos. Além do melhoramento genético, as áreas de nutrição, bem-estar, sanidade e manejo contribuíram de forma significativa para que resultados positivos fossem alcançados. Em 1920, um frango de corte demorava cerca de 4 meses para atingir o peso de abate, enquanto na década de 90, o animal levava pouco mais de 1 mês para atingir o mesmo peso (Albers, 1998), mostrando a evolução dessa cadeia.

Apesar das melhorias alcançadas pelo incremento genético nas linhagens de frango de corte, os animais ainda não estão adaptados ao estresse por mudanças agudas na temperatura ambiente (Yahav, 2004). Nos últimos anos, as pesquisas têm se concentrado em formas de aumentar a termotolerância desses animais sem alterar o desempenho e os custos de produção. Desta forma, o período de incubação se destacou, não somente por representar um terço da vida toda do animal (Hulet et al., 2007), mas também por permitir que alterações sejam realizadas no desenvolvimento embrionário e fetal, sem o efeito materno.

Incubação e Desenvolvimento embrionário

A incubação artificial é ponto fundamental da avicultura industrial, uma vez que essa prática permite a produção de pintainhos em larga escala. Um desenvolvimento embrionário e fetal ideal depende do controle adequado de uma série de parâmetros dentro da incubadora, que são temperatura, umidade, viragem e ventilação. A temperatura é considerada o fator de maior importância

na incubação, pois é a partir de mudanças na mesma que se inicia o desenvolvimento embrionário, onde pequenas variações podem causar um atraso ou acelerar a eclosão do pintainho (Mortola, 2009).

As máquinas incubadoras foram programadas para atender os requerimentos fisiológicos do embrião, onde os parâmetros, anteriormente citados, são monitorados durante todo o período de incubação e ajustados de acordo com a necessidade do embrião (French, 1997; Bennett, 2010; Molenaar et al., 2011). Segundo Everaert e Decuypere (2013) quando o ovo fecundado é submetido a temperaturas médias de 37,5 a 37,8°C, umidade relativa média de 60% e viragem a cada hora, há uma retomada do desenvolvimento do embrião e sua formação completa se dará em aproximadamente 504 horas (± 21 dias).

O processo de incubação pode ser dividido em três fases, sendo primeiro terço correspondente ao desenvolvimento embrionário (morfogênese) e os dois últimos ao fetal, durante o qual ocorre crescimento e diferenciação morfofuncional sexo-específica e ao final desta fase, inicia-se o processo de eclosão dos pintos (Moran, 2007) (Figura 2). De acordo com Moran (2007), a **primeira fase** (do 1º ao 7º dia) ocorre estabelecimento do germe. Essa fase inclui a primeira semana de incubação, caracterizada pela formação de compartimentos do ovo (âmnion, córion, alantoide e saco vitelino) que sustentam a sobrevivência do embrião em crescimento. O suprimento de oxigênio pode ser limitado devido às células sanguíneas imaturas e a um sistema vascular coriônico subdesenvolvido, de modo que a energia metabólica é fornecida pela glicólise anaeróbica das quantidades limitadas de glicose presentes no ovo (Moran, 2007). A **segunda fase** compreende o desenvolvimento embrionário e é caracterizada por uma corioalantoide totalmente desenvolvida, capaz de garantir a troca adequada de O_2 - CO_2 e suportar o rápido crescimento embrionário (Moran, 2007). O estabelecimento da respiração corioalantóica ocorre por volta do dia 8 do desenvolvimento embrionário em pintos (Baumann e Meuer, 1992), enquanto os vasos sanguíneos extraembrionários cercam completamente toda a superfície da casca interna dos ovos de peru por volta do dia 9 da incubação (Phillips e Williams, 1943). Os embriões de pintos são estruturalmente concluídos em torno de 14 dias de incubação. À medida que o embrião se aproxima da massa corporal total, a capacidade máxima de respiração corioalantóica é atingida no chamado estágio de platô do consumo

de oxigênio (Christensen, et al., 1996). Finalmente, a **terceira fase** é caracterizada pelo consumo oral fluido amniótico pelo embrião, acúmulo de reservas de glicogênio nos tecidos muscular e hepático, início da respiração pulmonar, internalização abdominal da gema restante, estocagem de cálcio e fosfato e emergência (Christensen e Biellier, 1982; Christensen et al., 1982; Donaldson e Christensen, 1991; Donaldson et al., 1991; Christensen et al., 1999; Christensen et al., 2001; Moran, 2007; De Oliveira et al., 2008). Durante esse período, ocorrem grandes mudanças fisiológicas e metabólicas, e quaisquer distúrbios durante esse período podem afetar significativamente a sobrevivência embrionária e o desempenho posterior (Christensen et al., 1999; Collin et al., 2007; Leksrisompong et al., 2007).

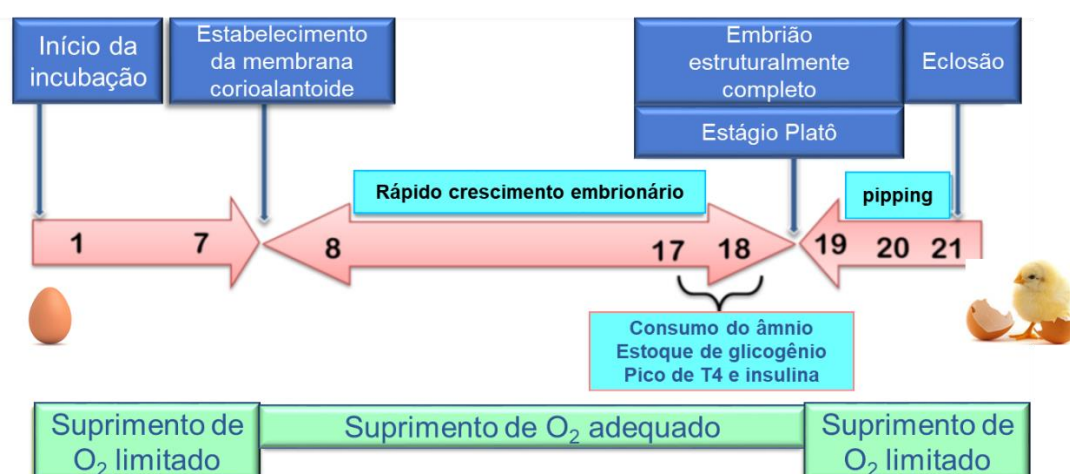


Figura 2: Fase do desenvolvimento de embriões de frango e suas principais alterações fisiológicas e metabólicas. (Adaptado de De Oliveira et al., 2008).

O crescimento embrionário dessa espécie ocorre rapidamente, sendo que após de 72 horas de incubação já é possível identificar os olhos do embrião, tireoide primordial, coração, arco aórtico, mesencéfalo, prosencéfalo e tubo neural, que estabelecem o encéfalo embrionário, pulmão, pâncreas e rins primitivos, dentre outras importantes estruturas (Hamburger e Hamilton, 1951; Deeming, 2002; Do Amaral-Silva, 2016).

Com uma semana, o embrião já possui a membrana corioalantoide (estrutura que atua como órgão respiratório, durante a segunda e terceira

semana de incubação, e possui importante papel no equilíbrio ácido-base do embrião), bico, dente do ovo (estrutura que auxilia a eclosão), germes de penas, os sacos aéreos começam a se diferenciar e se inicia a secreção de alguns hormônios (Hamburger e Hamilton, 1951; Do Amaral-Silva, 2016).

A morfogênese se estende durante a primeira metade da incubação, produzindo um pequeno pintinho formado. Posteriormente, o feto e seus tecidos crescem e amadurecem até o décimo nono dia de incubação, nesta fase o pinto já se encontra em posição de eclosão e com o saco vitelino se internalizando. O processo de eclosão se inicia com a bicagem interna, que é o momento em que o bico perfura a membrana interna da casca e se inicia a respiração pulmonar. Após algumas horas, o pinto rompe a casca do ovo sobre a câmara de ar (bicagem externa) e ocorre a inflação pulmonar com o ar atmosférico e após muito esforço ocorre a emergência do pinto da casca do ovo (Hamburger e Hamilton, 1951; Do Amaral-Silva, 2016).

Sistema Respiratório de Aves

A função do sistema respiratório das aves é basicamente suprir a demanda de oxigênio (O_2) para os processos fisiológicos, bem como, eliminar o dióxido de carbono (CO_2) oriundo das reações metabólicas, além disso esse sistema é de suma importância na termorregulação (perda de calor por evaporação) nessa espécie (Gargaglioni et al., 2017).

O desenvolvimento do sistema respiratório é um processo longo. Inicia-se precocemente durante a incubação, quando as trocas gasosas do embrião são realizadas por órgãos não pulmonares e continua por algum tempo na vida pós-natal, quando a ventilação pulmonar é a única forma de satisfazer as exigências aeróbicas do organismo em crescimento (Szdzyu e Mortola, 2008).

O sistema respiratório das aves é dividido em trato superior, composto pelas narinas, cavidade nasal, boca, laringe, traqueia e siringe, enquanto o trato respiratório inferior é composto pelos sacos aéreos e pulmões (Gargaglioni et al., 2017). O ar adentra nas narinas ou boca, passa pelas conchas nasais, que formam a cavidade nasal, estrutura que possui um epitélio ciliado responsável por reter partículas de sujeira do ar. No trajeto, os gases são aquecidos e umidificados antes de entrar na laringe, estrutura responsável pela filtragem de

corpos estranhos e abertura da glote durante a inspiração. O ar então segue pela traqueia, um longo canal composto de anéis de cartilagem, revestido de um epitélio ciliado, glândulas mucosas e células secretoras de muco. Esta região tem papel importante na termorregulação de aves, uma vez que essa espécie consegue perder calor, de forma evaporativa, ventilando o espaço morto traqueal. O final deste canal bifurca em dois brônquios primários através da siringe, estrutura responsável pela vocalização das aves (Gargaglioni et al., 2017).

A maioria das aves possuem nove sacos aéreos, que atuam como uma câmara receptora do ar, ventilam os pulmões, onde ocorrem as trocas gasosas, e aeram os ossos pneumáticos das mesmas. Os sacos aéreos estão conectados aos brônquios primários ou secundários através dos óstios e promovem ventilação superficial e rápida aos pulmões e aos capilares aéreos (Duncker, 1974). Não promovem troca gasosa visto que são pouco vascularizados pela circulação sistêmica. Por meio dos sacos aéreos, as aves conseguem potencializar a capacidade de oxigenação do sangue através da captura de um volume de ar corrente relativo maior que mamíferos de mesma massa corpórea (BOUVEROT, 1978; DUNCKER, 1978; FARMER, 2006; POWELL, 2015; HARVEY E BEN-TAL, 2016; SANTOS, 2018).

Os brônquios primários intrapulmonares conduzem o ar aos sacos aéreos caudais, ou seja, aos sacos aéreos abdominais e sacos aéreos torácico caudal (Powell et al., 1981). O ar chega aos sacos aéreos abdominais por conexão direta com os brônquios primários mediante afunilamento na porção caudal do mesmo, e pelos brônquios secundários latero-dorsal e médiadorsais, passando pelos parabônquios neopulmonares. Para os sacos aéreos torácicos caudais, o ar é conduzido pelos brônquios secundários latero-ventrais (Cohn e Shannon, 1968). Parte do ar contido nos brônquios secundários médio-dorsal é conduzido aos parabônquios paleopulmonares, principal sítio de troca gasosa (Santos, 2018).

Durante a primeira expiração, o ar sai dos sacos aéreos caudais pelas mesmas vias e é conduzido aos parabônquios paleopulmonares. Na segunda inspiração, a massa de ar resultante sai dos parabônquios paleopulmonares, passa pelos brônquios secundários medioventrais e atinge os sacos aéreos craniais; sacos aéreos torácicos craniais, cervicais e clavicular (Bech e

Johansen, 1980). Finalmente, na segunda expiração, o ar é expelido dos sacos aéreos craniais pelos brônquios secundários medioventrais para os brônquios primários intrapulmonar e traqueia (Cohn e Shannon, 1968; Powell et al., 1981; Santos, 2018).

Controle respiratório e Quimiossensibilidade

Uma inferência comum é que os mecanismos neurais da ritmogênese respiratória em aves é muito similar aos de mamíferos, no entanto, as aves apresentam uma série de diferenças de padrões na ritmogênese respiratória, devido a estrutura do seu sistema respiratório (Maina et al., 2010; Gargaglioni et al., 2017). Diferentemente de mamíferos, aves não possuem diafragma e nervo frênico, assim o preenchimento dos sacos aéreos ocorre com o auxílio de contrações musculares ativas na inspiração e expiração, mesmo em repouso (Bouverot, 1978; Powell, 2015; Gargaglioni et al., 2017).

A regulação da respiração, por sua vez, provém da ação de controladores motores no sistema nervoso central, ativados por neurônios sensitivos mediante estímulos no ambiente interno e externo (Macari e Givisiez, 2002; Santos, 2018). Assim, são modulados por vários reflexos, incluindo o controle por “feedback” negativo, para manter a homeostase da gasometria arterial e do pH. Estes reflexos ventilatórios possuem o componente sensorial ou aferente, componente controlador e integradores do sistema nervoso central e componente motor ou eferente (Powell, 2015; Santos, 2018). O componente controlador do sistema nervoso central (SNC), juntamente com seus integradores, são responsáveis pela formação do padrão respiratório. Segundo Reinke e Wild (1997), registros eletrofisiológicos do núcleo *parambigualis* (PAm), localizado no bulbo, demonstraram neurônios ativos durante a fase inspiratória da respiração em aves mandarim. No entanto, os neurônios do núcleo *retroambigualis* (RAm) estão ativos durante a fase expiratória da respiração (Wild, 1993; Ashmore et al., 2008; Gargaglioni et al., 2017).

Em aves, a atividade respiratória espontânea ativa uma grande população de neurônios e se propaga sobre uma ampla região do sistema nervoso central (Momose-Sato e Sato, 2016; Santos, 2018). Os vertebrados apresentam quimiorreceptores periféricos e centrais capazes de detectar variações nos

gases sanguíneos e promover ajustes na ventilação para a manutenção da pressão parcial de oxigênio (PaO_2) e equilíbrio ácido-base (Gargaglioni et al., 2010; Gargaglioni et al., 2017). Os quimiorreceptores periféricos, localizados principalmente nos corpos carotídeos, são sensíveis às alterações da PaO_2 , PaCO_2 e pH arterial.

Os quimiorreceptores centrais respondem a alterações no PaCO_2 e pH do liquor (Jones e Milsom, 1982; Gargaglioni et al., 2017). Dentre as regiões envolvidas na quimiorrecepção central em mamíferos destacam-se o núcleo do trato solitário (NTS), o locus coeruleus (LC) o núcleo retrotrapezóide (RTN), regiões específicas do hipotálamo e a rafe bulbar (Coates et al., 1993; Nattie e Li, 2009; Da Silva et al., 2012; Nattie e Li, 2012). Peek e colaboradores (1975), observaram uma rede de neurônios bulbares, com projeções à músculos inspiratórios e expiratórios, em frangos adultos. Essa rede estimula a resposta ventilatória à hipercapnia associada à hiperóxia (mistura gasosa de 10% de CO_2 e 90% de O_2), onde a ação dos quimiorreceptores periféricos é praticamente anulada. Santos (2018), observou a participação de neurônios serotoninérgicos da rafe na resposta ventilatória a hipercapnia, em frangos carijós.

Aves ainda possuem quimiorreceptores intrapulmonares, de elevada sensibilidade, que respondem às alterações no CO_2 nos pulmões e controlam a frequência e volume da respiração (Fedde e Scheid, 1976; Banzett et al., 1977; Berger et al., 1980; Milsom et al., 2004; Gargaglioni et al., 2017). Estes são aferentes vagais localizados nos parabrônquios, possuindo terminações nervosas em vários pontos ao longo do comprimento dessas estruturas (Hempleman e Burger, 1984; Santos, 2018), e, por sua vez, detectam mudanças periódicas na PCO_2 próxima da barreira ar-sangue, respondendo a mudanças na liberação de CO_2 para o pulmão e artérias pulmonares (Burger et al., 1974; Banzett e Burger, 1977; Santos, 2018).

Uma questão de interesse tanto biológica quanto zootécnica é se este processo está ou não rigorosamente sob controle genético ou pode ser modulado por eventos externos. Neste último caso, o tempo prolongado para o desenvolvimento estrutural e funcional do sistema respiratório dá a oportunidade de adaptação às alterações pós-natal das necessidades metabólicas. Igualmente, no entanto, ele abre uma janela de tempo potencialmente perigosa para que os fatores ambientais interfiram negativamente no desenvolvimento

normal dos mecanismos de controle respiratório, incluindo alterações na quimiossensibilidade ao CO₂/pH e O₂ (Szdzyt e Mortola, 2008).

Manipulação térmica durante o desenvolvimento embrionário em aves

A temperatura é um dos fatores de maior importância para os organismos vivos. Este fator impulsiona o desenvolvimento e desempenha um papel vital na ontogenia das aves (Romanoff, 1960; Reyna e Burggren, 2012). O desenvolvimento embrionário começa, ou retoma, acima de uma temperatura definida como zero fisiológico (Funk e Biellier, 1944; Miller e Wilson, 1975; Reyna e Burggren, 2012) e para a maioria das aves, o zero fisiológico ocorre entre 24 e 26 ° C (Kosin, 1964; Landauer, 1967; Wilson, 1991; Reyna e Burggren, 2012). Acima do zero fisiológico, o desenvolvimento embrionário aviário aumenta em função do aumento da temperatura, até que se alcance a temperatura ótima, ou seja, a faixa de temperatura que produz a maior sobrevivência de embriões (Romanoff, 1960; Reyna e Burggren, 2012), que, no caso de frangos de corte, é de 37,5 °C.

Estudos recentes mostraram a possibilidade de induzir processos de plasticidade fenotípica por alteração da temperatura de incubação, a questão de interesse é se o desenvolvimento das funções fisiológicas pode ser melhorado pela estimulação pré-natal de temperatura a curto prazo. A plasticidade fenotípica é geralmente interpretada como as interações do genótipo de um organismo com seu ambiente (Burggren e Reyna, 2011; Danchin e Pocheville, 2014; Keller, 2014; Wada e Sewall, 2014; Burggren et al., 2016). Este processo representa a modificação do fenótipo de um organismo em desenvolvimento, podendo ou não ser transportado para a forma adulta do animal (Spicer e Burggren, 2003; Burggren e Reyna, 2011; Domyan e Sun, 2011; Rymer e Pillay, 2012; Burggren et al., 2016).

A manipulação térmica durante a incubação tem sido aplicada com o intuito de obter animais mais adaptados para variações ambientais, sendo que alterações de apenas 1 °C da temperatura ótima têm um grande impacto, não somente no embrião, mas também na vida adulta do animal (Tzschentke e Halle, 2009). A força dessa influência depende da fase (períodos críticos) e da duração

das mudanças na temperatura durante a embriogênese (French, 2000; Tzschentke e Plagemann, 2006; Tzschentke e Halle, 2009).

A identificação do momento ideal para a estimulação térmica durante a incubação demanda um profundo conhecimento do desenvolvimento dos sistemas regulatórios em embriões de galinha (Tzschentke e Halle, 2009). Estudos realizados em frangos de corte demonstraram que a manipulação térmica, efetuada nos últimos quatro dias da incubação, melhorou a robustez dos animais, promovendo um efeito positivo durante toda a vida do animal (Tzschentke e Tatge, 2013). Maltby e colaboradores (2004), observaram que alterações na temperatura de curto prazo, no início ou no final da incubação, promovem o desenvolvimento muscular. Outro estudo demonstrou que frangos de corte expostos a altas temperaturas, do décimo terceiro dia de incubação até eclosão, apresentaram maior vascularização e menor espessura da pele, além de preferirem ambientes com temperaturas mais altas, comparados aos outros tratamentos (Morita et al., 2016).

Mortola e Toro-Velasquez (2013), observaram que frangos da linhagem White Leghorn, incubados a 35 °C, apresentaram uma menor temperatura corporal, comparados ao grupo controle. Um estudo realizado em animais da linhagem Cobb mostrou que a manipulação térmica de longa duração (24 horas por dia, durante toda a incubação) causou efeitos negativos no crescimento e desenvolvimento embrionário (Piestun et al., 2009). No entanto, um estudo realizado em perus, mostrou que os animais que passaram pela manipulação térmica intermitente (39 °C por 6 e 12 horas/ dia), do décimo ao vigésimo segundo dia embrionário, apresentaram temperatura corporal significativamente mais na eclosão, comparada ao grupo controle, sugerindo uma taxa metabólica mais baixa (Piestun et al., 2015). Collin e colaboradores (2007), testaram a manipulação térmica intermitente em diferentes fases da incubação e observaram que a mortalidade animais expostos a altas temperaturas durante a incubação, frente a um estresse térmico na idade de abate, foi maior que dos animais do grupo controle. Lin et al. (2017) verificaram que embriões de frango expostos a temperaturas mais elevadas no início da incubação (dia embrionário 0 ao 5) apresentaram maior peso, maior comprimento, maior difusão de O₂ para o ovo, comparado ao grupo controle, indicando que o crescimento do embrião é afetado pela temperatura de maneira positiva.

Pode-se observar a escassez de estudos que tenham examinado os efeitos da manipulação térmica intermitente durante os primeiros dias de incubação na quimiossensibilidade e metabolismo em frangos de corte. Portanto o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da temperatura de incubação na quimiossensibilidade, metabolismo e temperatura corporal em pintinhos de frango de corte recém eclodidos (2-3 dias de idade) e juvenis (14-15 dias de idade).

Referência Bibliográfica

ABPA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (São Paulo). **Relatório Anual 2017** [online]. Disponível em: < http://abpa-br.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzido.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2018

Aksit, M, Yalçın, S, Yenisey, Ç, Özdemir D (2010) Brooding temperatures for chicks acclimated to heat during incubation: effects on post-hatch intestinal development and body weight under heat stress. **British Poultry Sci.**, Cambridge, v.51, n. 3, p. 444 - 452.

Albers, GAA (1998) Future trends in poultry breeding. In: EUROPEAN POULTRY CONFERENCE, 10, Jerusalem, Israel. Proceedings... Jerusalem: WPSA, p.16-20.

Ashmore, RC, Renk, JA, Schmidt, MF (2008) Bottom-up activation of the vocal motor forebrain by the respiratory brainstem. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 10, p. 2613-2623.

Banzett, RB, Burger, RE (1977) Response of avian intrapulmonary chemoreceptors to venous CO₂, and ventilatory gas flow. **Respiration Physiology**, v. 29, p. 63 – 72.

Baumann, R, Meuer, HJ (1992) Blood oxygen transport in the early avian embryo. **Physiol. Rev.** 72:941–965.

Bech, C, Johansen, K (1980) Ventilation and gas exchange in the mute swan, *Cygnus olor*. **Respiration Physiology**, v. 39, n. 3, p. 285-295.

Bennett, B (2010) The advances of single-stage versus multi-stage incubation. **International Hatchery Practice**. 20:373-384.

Berger, PJ, Tallman Jr, RD, Kunz, AL (1980) Discharge of intrapulmonary chemoreceptors and its modulation by rapid FICO₂ changes in decerebrate ducks. **Respiration physiology**, v. 42, n. 2, p. 123-130.

Boerjan, M (2010) Circadian incubation for robustness. **Proceeding of the XII European Poultry Congress**, Tours, France. <http://epc2010.org/cd/Abstracts/263.pdf>.

Bouverot, P (1978) Control of Breathing in Bird Compared with Mammals. **Physiological Reviews**, v. 55, n. 3, p. 604 – 655.

Burger, R E, J L, O, Banzett, R B (1974) Intrapulmonary oximoreceptors in *Gallus domesticus*: Adequate stimulus and functional localization. **Respiration Physiology**, v. 22, p. 87 – 97.

Burggren, W W, Santin, J Fl, Antich, M R (2016) Cardio-respiratory development in bird embryos: new insights from a venerable animal model. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 45, n. 11, p. 709-728.

Burggren, WW (2014) Epigenetics as a source of variation in comparative animal physiology - or - Lamarck is lookin' pretty good these days. **J Exp Biol**. 217(Pt 5). 682-9.

Burggren, WW, Crews, D (2014) Epigenetics in comparative biology: why we should pay attention. **Integr Comp Biol**. 54(1):7-20.

Burggren, WW, Reyna, KS (2011) Developmental trajectories, critical windows and phenotypic alteration during cardio-respiratory development. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 178, n. 1, p. 13-21.

Cesario, MD (2013) Desenvolvimento embrionário pré e pós-postura – períodos críticos. In: Macari, M, Gonzales, E, Patrício, IS, Nääs, IA, Martins, PC **Manejo da incubação**. Campinas: FACTA. Cap. 1.3, p. 47-63.

Christensen, V L, Wineland, M J, Yildirim, I, Ort, D T, Mann, K M (2004) Incubator temperature and oxygen concentration at the plateau stage affect cardiac health of turkey embryos. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, Pakistan, v. 3, p. 52-65.

Christensen, VL, Biellier, HV and Forward, JF (1982) Physiology of turkey embryos during pipping and hatching III. Thyroid function. **Poultry Sci**. 61: 367-374.

Christensen, VL, Donaldson, WE, Mcmurtry, JP (1996) Physiological differences in late embryos from turkey breeders at different ages. **Poultry Sci**. 75: 172-178.

Christensen, VL, Donaldson, WE, Nestor, KE (1999) Length of the plateau and pipping stages of incubation affects the physiology and survival of turkeys. **British Poultry Sci**. 40: 297-303.

Christensen, VL, Wineland, MJ, Fasenko, GM, Donaldson, WE (2001) Egg storage effects on plasma glucose and supply and demand tissue glycogen concentrations of broiler embryos. **Poultry Sci**. 80: 1729-1735.

Christensen, VL, Biellier, HV (1982) Physiology of turkey embryos during pipping and hatching. IV. Thyroid function in embryos from selected hens. **Poultry Sci.** 61: 2482-2488.

Coates, E L, LI, A, Nattie, E E (1993) Widespread sites of brain stem ventilatory chemoreceptors. **Journal of Applied Physiology**, v. 75, n. 1, p. 5 – 14.

Cohn, J E, Shannon, R (1968) Respiration in unanesthetized geese. **Respiration physiology**, v. 5, n. 2, p. 259-268.

Collin, A, Berri, C, Tesseraud, S, Rodon, F R, Skiba-Cassy, S, Crochet, S, Duclos, M J, Rideau, N, Tona, K, Buyse, J, Bruggeman, V, Decuypere, E, Picard, M, Yahav, S (2007) Effects of thermal manipulation during early and late embryogenesis on thermotolerance and breast muscle characteristics in broiler chickens. **Poultry science**, v. 86, n. 5, p. 795-800.

Collin, A, Picard, M, Yahav, S (2005) The effect of duration of thermal manipulation during broiler chick embryogenesis on body weight and body temperature of post-hatched chicks. **Anim. Res.** 54:105–111.

Da Silva, G S, Moraes, D J, Giusti, H, Dias, M B, Glass, M L (2012) Purinergic transmission in the rostral but not caudal medullary raphe contributes to the hypercapnia-induced ventilatory response in unanesthetized rats. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 184, n. 1, p. 41-7. ISSN 1878-1519.

Danchin, E, Pocheville, A (2014) Inheritance is where physiology meets evolution. **The Journal of physiology**, v. 592, n. 11, p. 2307-2317.

De Oliveira, JE, Uni, Z, Ferket, PR (2008) Important metabolic pathways in poultry embryos prior to hatch. **World Poultry Sci. J.** 64:488- 99.

Deeming, D C (2002) Incubation of eggs from our modern strains of chicken. **Elsevier World Poult**, v. 18, n. 3, p. 22-23.

Do Amaral-Silva, L (2016) Remodelamento estrutural do tecido parabronquial de pintinhos em resposta à hipóxia durante o desenvolvimento fetal. Jaboticabal, 57p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP, Jaboticabal.

Domyan, E T And Sun, X (2011) Patterning and plasticity in development of the respiratory lineage. **Developmental Dynamics** 240:477-485.

Donaldson, WE, Christensen, VL, Krueger KK (1991) Effects of stressors on blood glucose and hepatic glycogen concentrations in turkey poults. **Comparative Biochemistry and Physiology A** 100: 945-947.

Donaldson, WE, Christensen, VL (1991) Dietary carbohydrate level and glucose metabolism in turkey poults. **Comparative Biochemistry and Physiology A** 98: 347-350.

Duncker, HR (1978) General Morphological Principles of Amniotic Lungs. **Journal Piiper**, p. 2 – 3, 1978.

Duncker, HR (1974) Structure of the avian respiratory tract. **Respiration physiology**, v. 22, n. 1-2, p. 1-19.

Durant, SE, Hopkins, WA, Hawley, DM, Hepp, GR (2012) Incubation temperature affects multiple measures of immunocompetence in young wood ducks (*Aix sponsa*). **Biology Letters**; 8(1): 108-111.

Espinha, LP, Souza, FA, Capalbo, AC, Bícigo, KC, Macari, M, Gargaglioni, LH (2014) Age and gender influence the cardiorespiratory function and metabolic rate of broiler chicks during normocapnia and hypercapnia. **Respir Physiol Neurobiol**. 200, 50-56.

Everaert, N, Decuypere, E Fisiologia do embrião. In: Macari, M, Gonzales, E, Patrício, IS, Nääs, IA, Martins, PC, (2013) **Manejo da incubação**. Campinas: FACTA. Cap. 1.2, p. 31-42.

Farmer, C G (2006) On the origin of avian air sacs. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 154, n. 1-2, p. 89-106.

Fedde, M R, Scheid, P (1976) Intrapulmonary CO₂ receptors in the duck: Discharge pattern of the population during a respiratory cycle. **Respiration Physiology**, v. 26, p. 223 – 227.

French, N A (1997) Modeling incubation temperature: The effects of incubator design, embryonic development, and egg size. **Poultry Sci**. 76:124-133.

French, N (2000) Effect of short periods of high incubation temperature on hatchability and incidence of embryo pathology of turkey eggs. **British Poultry Science**, 41: 377–382.

Funk, E M, Biellier, H V (1944) The minimum temperature for embryonic development in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **Poultry Science**, v. 23, n. 6, p. 538-540.

Gargaglioni, LH, Do Amaral-Silva, L, Ferreira Da Silva, G, Bícigo, KC (2017) Fisiologia do Sistema Respiratório. In: Marcos Macari; Alex Maiorka. (Org.). **Fisiologia das aves comerciais**. 1ed. Jaboticabal-SP: FUNEP, v. 1, p. 74-98.

Gargaglioni, LH, Kartzler, LK, Putnam, RW (2010) The locus coeruleus and central chemosensitivity. **Respir Physiol Neurobiol**. 173, 264-273.

Geers, R, Michels H, Nackaerts G, Konings, F (1983) Metabolism and growth of chickens before and after hatch in relation to incubation temperatures. **Poultry Sci**. 62: 1869–1875.

Gigli, ACS (2007) **Monitoramento do ambiente em incubatório visando melhorias na produção**. xv, 103p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola. - Campinas, SP.

Hamburger, V, Hamilton, H L A (1951) series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of morphology*, v. 88, n. 1, p. 49-92.

Harvey, E P, Ben-Tal, A (2016) Robust unidirectional airflow through avian lungs: New insights from a piecewise linear mathematical model. **PLOS Computational Biology**, v. 12, n. 2, p. e1004637. ISSN 1553-7358.

Hempleman, S C, Egan, S X, Pilarski, JQ, Adamson, T P, Solomon, I C (2006) Calcium and avian intrapulmonary chemoreceptor response to CO₂. **Journal of Applied Physiology** 101, 565–1575.

Hempleman, S C, Burger, R E (1984) Receptive fields of intrapulmonary chemoreceptors in the pekin duck. **Respiration Physiology**, v. 57, p. 317 – 330.

Hempleman, SC, Warburton, SJ (2013) Comparative embryology of the carotid body. **Respir Physiol Neurobiol**. 185(1): 3–8.

Hislop, A (2005) Developmental biology of the pulmonary circulation. **Paediatr Respir Rev**. v6(1), p.35-43.

Hulet, RM, Gladys, G, Meijerhof, R, El-Shickh, T (2007) Influence of egg shell embryonic incubation temperature and broiler breeder flock age on posthatch growth performance and carcass characteristics. **Poultry Sci**. 86:408-412.

Jones, DR, Milsom, WK (1982) Peripheral receptors affecting breathing and cardiovascular function in non-mammalian vertebrates. **Journal of Experimental Biology**, v. 100, n. 1, p. 59-91.

Kameda, Y (2002) Carotid body and glomus cells distributed in the wall of the common carotid artery in the bird. **Microscopy Research and Technique** 59:196–206.

Kameda, Y. (1994) Electron microscopic study on the development of the carotid body and glomus cell groups distributed in the wall of the common carotid artery and its branches in the chicken. **Journal of Comparative Neurology**. 348, 544–555.

Keller, M C (2014) Gene x environment interaction studies have not properly controlled for potential confounders: the problem and the (simple) solution. **Biological Psychiatry** 75:18-24.

Kosin, I L (1964) Recent research trends in hatchability—Related problems of the domestic fowl. **World's Poult. Sci. J.** 20:254–268.

Kühn, ER, Decuypere, E, Colen, LM, Michels, H (1982) Posthatch growth and development of a circadian rhythm for thyroid hormones in chicks incubated at different temperatures. **Poultry Sci.**, Raleigh, v.61, n.3, p. 540-549.

Landauer, W (1967) The hatchability of chicken eggs as influenced by environment and heredity. Monograph 1. Storrs Agricultural Experiment Station, Storrs, CT.

Leksrisompong, N, Romero-Sanchez, H, Plumstead, PW, Brannan, K E, Brake, J (2007) Broiler incubation - 1. Effect of elevated temperature during late incubation on body weight and organs of chicks. **Poultry Sci.**, Raleigh, v.86, n. 12 p. 2685- 2691.

- Lin, Y M, Druyan, S, Yahav, S, Brake, J (2017) Thermal treatments prior to and during the beginning of incubation affects development of the broiler embryo and yolk sac membranes, and live performance and carcass characteristics. **Poultry Sci.** 96:1939– 1947.
- Loi, M, Koricka, S, Lucassen, PJ, Joëls, M (2014) Age- and sex-dependent effects of early life stress on hippocampal neurogenesis. **Front Endocrinol.** 5:13.
- Lubritz, D L, Mcpherson B N (1994) Effect of genotype and cold stress on incidence of ascites in cockerels. **J. Appl. Poult. Res.** 3:171–178.
- Macari, M, Givisiez, P E N (2002) Fisiologia respiratória. In: MACARI, M, FURLAN, R L, et al (Ed.). **Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte.** Jaboticabal: UNESP. cap. 3, p.37 – 49.
- Maina, JN, West, JB, Orgeig, S, Foot, NJ, DANIELS, CB, KIAMA, SG, Gehr, P, Mühlfeld, C, Blank, F, Müller, L, Lehmann, A, Brandenberger, C, Rothen-Rutishauser, B (2010) Recent advances into understanding some aspects of the structure and function of mammalian and avian lungs. **Physiol. Biochem. Zool.** 83, 792–807.
- Maltby, V, Somaiya, A, French, NA, Stickland, NC (2004) In ovo temperature manipulation influences post-hatch muscle growth in the turkey. **British Poultry Science**, 45: 491–498.
- Miller, E R, Wilson, H R (1975) The temperature required to initiate blastoderm development of Bobwhite quail eggs. **Poultry Sci.**, 54:901–908.
- Milsom, W K, Chatburn, J, Zimmer, M B (2004) Pontine influences on respiratory control in ectothermic and heterothermic vertebrates. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 143, n. 2-3, p. 263-80.
- Milsom, WK, Jones, DR, Gabbott, GRJ (1981) On chemoreceptor control of ventilatory responses to CO₂ in unanesthetized ducks. **Journal of Applied Physiology.** 50, 1121–1128.
- Molenaar, R, Hulet, M, Meijerhof, R, Maatjens, C M, Kemp, B, Van Den Brand, H (2011) High eggshell temperatures during incubation decrease growth performance and increase the incidence of ascites in broiler chickens. **Poultry Sci.**, Raleigh, v.90, p.624–632.
- Momose-Sato, Y, Sato, K (2016) Development of spontaneous activity in the avian hindbrain. **Frontiers in neural circuits**, v. 10, p. 63.
- Moran Jr, ET (2007) Nutrition of the Developing Embryo and Hatchling. **Poultry Sci.**, 86: 1043–1049.
- Morita, V S, Boleli, I C, Oliveira, J A (2010) Hematological and incubation parameters of chicks from young breeder eggs: variation with sex and incubation temperature. **Poultry Sci.**, Faisalabad, v. 9, n. 6, p. 606-612.
- Morita, VdS, Almeida, VRd, Matos Jr, JB, Vicentini, TI, van den Brand, H, Boleli, IC (2016) Incubation Temperature during Fetal Development Influences

Morphophysiological Characteristics and Preferred Ambient Temperature of Chicken Hatchlings. **PLoS ONE** 11(5): e0154928.

Mortola, J P, Toro-Velasquez, PA (2013) Ventilatory response to hypoxia of the 1-day old chicken hatchling after prenatal cold-induced hypometabolism. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 188, n. 2, p. 161-164.

Mortola, JP, Frappel, PB (1998) On the barometric method for measurement of ventilation, and its use in small animals. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 76, p. 937 – 944.

Mortola, JP, Frappel, PB (2000) Ventilatory responses to changes in temperature in mammals and other vertebrates. **Annu Rev Physiol.** v. 62, p.847-74.

Mortola, JP (2009) Gas exchange in avian embryos and hatchlings. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A 153, 359–377.

Murillo-Ferrol, NL (1967) The development of the carotid body in *Gallus domesticus*. **A descriptive study. Acta Anat.** 68, 102–126.

Nattie, E, (1999) CO₂, Brainstem chemoreceptors and breathing. **Progress in Neurobiology**. 59, 299 – 331.

Nattie, E E, LI, A (2009) Central chemoreception is a complex system function that involves multiple brain stem sites. **Journal of Applied Physiology**, v. 106, n. 4, p. 1464-6.

Nattie, E, LI, A (2012) Central chemoreceptors: Locations and functions. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 1, p. 221-54.

Oviedo-Rondón, EO, Wineland, MJ, Small, J, Cutchin, H, Mcelroy, A, Barri, A, Martin, S (2009) Effect of incubation temperatures and chick transportation conditions on bone development and leg health. **Journal Applied Poultry Research**; 18:671-678.

Peek, F W, Youngren, O M, Phillips, R E (1975) Repetitive vocalizations evoked by electrical stimulation of avian brains. IV. Evoked and spontaneous activity in expiratory and inspiratory nerves and muscles of the chicken (*Gallus gallus*). **Brain, Behavior and Evolution**, v. 12, p. 1 – 41.

Phillips, RE, Williams, CS (1943) External morphology of the turkey during the incubation period. **Poultry Sci.** 22: 270-277.

Piestun, Y, Halevy, O, Yahav, S (2009) Thermal manipulations of broiler embryos – the effect on thermoregulation and development during embryogenesis. **Poultry Sci.** 88: 2677–2688.

Piestun, Y, Zimmerman, I, Yahav, S (2015) Thermal manipulations of turkey embryos: The effect on thermoregulation and development during embryogenesis. **Poultry Science**, v. 94, n. 2, p. 273-280.

Powell, F L Geiser, J, Gratz, R K, Scheid, P (1981) Airflow in the avian respiratory tract: variations of O₂ and CO₂ concentrations in the bronchi of the duck. **Respiration physiology**, v. 44, n. 2, p. 195-213.

Powell, F L (2015) Respiration. In: ELSERVIER (Ed.). **Sturkie's Avian Physiology**. cap. 13, p.301 - 336. ISBN 978-0-12-407160-5.

Reinke, H, Wild, J M (1997) Distribution and connections of inspiratory premotor neurons in the brainstem of the pigeon (*Columba livia*). **Journal of Comparative Neurology**, v. 379, n. 3, p. 347-362.

Reyna, K S, Burggren, WW (2012) Upper lethal temperatures of Northern Bobwhite embryos and the thermal properties of their eggs. **Poultry science**, v. 91, n. 1, p. 41-46.

Romanoff, A L (1960) The avian embryo. Structural and functional development. **The avian embryo**. Structural and functional development.

Rymer, T L, Pillay, N (2012) The development of exploratory behaviour in the african striped mouse rhabdomys reflects a gene x environment compromise. **Behavior Genetics** 42:845-856.

Santos, KM (2018) Serotonina e controle respiratório de frangos (*gallus gallus domesticus*). Jaboticabal. 57p. Tese (Doutorado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP, Jaboticabal.

Scott, GR, Cadena, V, Tattersall, GJ, Milson, WK (2008) Body temperature depression and peripheral heat loss accompany the metabolic and ventilatory responses to hypoxia in low and high altitude birds. **The Journal of Experimental Biology**. 211:1326-1335.

Sébert, P (1979) Evidence for a central action of CO₂ ventilatory stimulus in Pekin ducks (author's transl). **Journal Physiology (Paris)**. 75(8): 901-9.

Spicer, J I, Burggren, W W (2003) Development of physiological regulatory systems: altering the timing of crucial events. **Zoology**, 106:91-99.

Szdzuy, K, Mortola, JP (2008) Ventilatory chemosensitivity and thermogenesis of the chicken hatchling after embryonic hypercapnia. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 162, n. 1, p. 55-62.

Tzschentke, B (2011) Manipulação da temperatura embrionária e impacto na performance dos frangos de corte. In: Conferência Apinco. Santos, SP. **Anais... Conferência FACTA de Ciência e Tecnologia Avícolas**, Campinas, p. 137-152.

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

Tzschentke, B, Tatge, S (2013) Incubação Circadiana® - "Treinamento térmico" embrionário para a robustez em aves. In: Macari, M, Gonzales, E, Patrício, I.S, Nääs, I.A, Martins, P.C. **Manejo da incubação**. Campinas: FACTA. Cap. 2.4, p. 135-141.

Tzschentke, B, Plagemann, A (2006) Imprinting and critical periods in early development. **World's Poultry Science Journal**, 62: 626–637.

Vieira, S L, Pophal, S (2000) Post-hatching nutrition in broiler. **Brazilian Journal of Poultry Sci.**, Campinas, v. 2, n. 3, p. 189-199.

Wada, H, Sewall, K B (2014) Introduction to the Symposium—uniting evolutionary and physiological approaches to understanding phenotypic plasticity.

Walstra, WI, Napelj TEM; Kemp, B, van den Brand, H (2012) Adaptive response to *Eimeria acervulina* in rearing hens is affected by suboptimal incubation temperature and heat exposure in later life. **Animal**, 6:137-144.

Wild, J M (1993) The avian nucleus retroambigualis: a nucleus for breathing, singing and calling. **Brain research**, v. 606, n. 2, p. 319-324.

Willemsen, H, Kamers, B, Dahlke, F, Han, H, Song, Z, Pirsaraei, Ansari, Tona, K, Decuypere, E, Everaert, N (2010) High and low temperature manipulation during late incubation: Effects on embryonic development, the hatching process, and metabolism in broilers. **Poultry Sci.**, Raleigh, v. 89, p. 2678-2690.

Wilson, H R (1991) Physiological requirements of the developing embryo: Temperature and turning. Pages 145–156 in **Avian Incubation**. S. G. Tullett ed. Butterworth-Heinemann Ltd., Cambridge, UK.

Yahav, S, Collin, A, Shinder, D, Picard, M (2004) Thermal manipulations during broiler chick's embryogenesis – the effect of timing and temperature, **Poultry Sci.** 83: 1959–1963.

CAPÍTULO 2 - EMBRYONIC THERMAL MANIPULATION AFFECTS VENTILATION, METABOLISM AND THERMAL CONTROL IN NEWLY HATCHED AND JUVENILE BROILER CHICKS

Abstract: The first third of the incubation is determinant for the embryonic development and the temperature is considered one of the most important factors that can affect the quality and the survival rate of the embryos. The aim of this study was to evaluate the effect of changes in the temperature of incubation (36°C -cold; 37.5°C-control and 39°C-hot) during the first 5 days on ventilation ($\dot{V}_E$), body temperature (T_b), oxygen consumption ($\dot{V}O_2$) and respiratory equivalent ($\dot{V}_E / \dot{V}O_2$) of 3 and 14 days (d) old broiler males and females in basal conditions and under exposition to hypercapnia (7% CO₂) or hypoxia (10% O₂). The body mass of the animals incubated at 36°C, in both ages, was higher compared to the hot groups (males and females) and control groups (except the 3d males). The incubation temperature did not influence the heart weight of the 3d animals ($p > 0.05$). However, 14d animals incubated at 39°C had a higher heart weight than animals in the control group. There was no significant difference in lung weight at both ages and sex. There was no significant difference between treatments in the $\dot{V}_E$, $\dot{V}O_2$ and $\dot{V}_E / \dot{V}O_2$ of the 3d animals in room air conditions. However, 14d females incubated at 39°C showed a decrease in $\dot{V}_E$. Both 14d males and females incubated at 39°C showed lower $\dot{V}O_2$ and an increase in T_b compared to the control group. In addition, the 14d females incubated at 36°C showed lower T_b compared to animals incubated at 37.5 and 39°C. Hypercapnic hyperventilatory response ($\dot{V}_E / \dot{V}O_2$) was attenuated in the 3d females incubated at 36°C and increased in hot-incubated 3d females due to changes in $\dot{V}_E$. Both hot- and cold-incubated 14d males and 14d hot- incubated females presented a lower CO₂ hyperventilatory response compared to control group without changes in $\dot{V}O_2$. During hypoxia, cold-incubated 3d females showed an attenuated hyperventilation modulated by a higher $\dot{V}O_2$, compared to other treatments. In addition, in 14d females incubated at 36°C, the increase in $\dot{V}_E$ under hypoxia was greater and the hypometabolic response was attenuated compared to the control group, which resulted in no change in the ventilatory equivalent. No effect of the treatment was observed in 3d male and female animals T_b , during hypercapnia and hypoxia. However, 14d females incubated at 36°C showed an attenuated drop in T_b compared to the control group (7% CO₂ and 10% O₂) and hot group (10% O₂). Regarding 14d males, the only significant difference was observed during hypoxia, where males incubated at 39°C showed a sharp drop in T_b compared to the control group. In conclusion, thermal manipulation affects hypercapnia-induced hyperventilation more than hypoxic challenge. At both ages, females are more affected by thermal manipulation than males.

Keywords: chicken; hypercapnia; hypoxia; incubation; temperature; ventilation.

Introduction

Incubation represents 30% of the lifetime of chickens and it is a period of high plasticity when the environment experienced by the embryo can alter the physiological systems for the entire post hatch life (Walstra et al., 2010). Many factors, such as temperature, hypoxia, disease, nutrition, can greatly influence the embryonic development and affect, positively or not, the growth of the animal (De Smit et al., 2006; Mortola, 2011; Mortola and Toro-Velasquez, 2013; Morita et al., 2016; do Amaral-Silva et al., 2019; Rocha et al., 2020). Temperature is one of the most important environmental factors on embryonic survival that can induce substantial changes in offspring phenotypes (Deeming, 2004; DuRant et al., 2013; Yahav, 2014; Du et al., 2019). Previous study by Piestun et al. (2013b) suggested that thermal manipulation during the sex determination period of incubation (E0 to E5) had a positive effect on chicken hatchability, live performance, and secondary sexual characteristics of males and females possibly due to a higher plasma testosterone concentration in both males and females.

In fact, changes in embryonic temperature can accelerate or slow down the embryo growth (Christensen et al., 1999; Lourens et al., 2005; Mortola and Toro-Velasquez, 2013) altering the development of vital organs, such as heart and lungs (Molenaar et al., 2011), whose severity level depends on the intensity and the duration of stimulus and the phase of incubation (Webb, 1987; French, 1997). Likewise, intermittent thermal manipulation during the first days of incubation may significantly impact metabolism and ventilatory responses to hypoxia and hypercapnia, once the development of regulatory systems begins early during embryogenesis (Tzschentke, 2007).

The magnitude to which thermal manipulation alter the development of the neural respiratory control and metabolic pathways may depend on the embryonic age and duration of incubation temperature manipulation. Interestingly, previous studies demonstrated that cold challenge during embryogenesis decreased the occurrence of ascites and modified the thermoregulatory mechanisms in chicks, improving the thermal tolerance to low rearing temperatures after hatching (Shinder et al., 2011, Akşit et al., 2013). In this context, alterations on incubation temperature can also affect warm and cold-sensitive neurons proportion in the hypothalamus of hatching and juvenile ducks (Tzschentke and Basta, 2002).

The development of respiratory system in birds is a long process that starts during incubation, supported by 3 gas exchangers: yolk sac membrane (YSM), chorioallantoic membrane (CAM) and lately the lungs. Thermal manipulation at the beginning of incubation can affect the development of YSM and CAM (Lin et al., 2017). For instance, increasing incubation temperature to 38.1°C from E0 to E5 increased both YSM and CAM vasculature, which was coincidental with greater embryo weight, egg weight loss, and embryo length at E15, and ultimately greater chick length and smaller yolk sac weight at hatching (Lin et al., 2017). It is well known that changes in temperature can also affect the respiratory chemosensitivity and cause alterations of peripheral chemoreceptors firing rate at least in cats and cockerels (Barnas et al., 1983; Mortola and Frappel, 2000).. Nevertheless, as far as we know no data is available about the effects of prenatal cold and warm temperatures on postnatal chemosensitivity.

Therefore, little or nothing is known about the phenotypic plasticity of warm and cold incubation temperature on chemosensitivity and thermal responses in newly hatched and juvenile broiler chickens. Given the sensitivity of

embryogenesis to environmental temperature, we hypothesized that chick embryos evolving under different thermal environments will exhibit changes in ventilation, metabolism and thermal responses to hypoxia and hypercapnia; and females and males will be differently affected by treatment. To this end, we assessed here, in 3 and 14 days old chickens (males and females) incubated under different temperatures (36 °C, 37.5 °C and 39 °C) during the first five days of incubation for 6 hours/ day, the ventilation, metabolism and body temperature when they were exposed to hypoxia (10% O₂) and hypercapnia (7% CO₂). The thermal manipulation protocol was applied earlier during the embryonic development (day 0 to day 5 of incubation) since the early stages of the development are known to be highly susceptible to environmental parameters (Tzschentke, 2008).

Methods

Animals:

The protocols were performed according to CONCEA (“Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal”; National Council for Animal Care Control) and approved by the local animal care committee (CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais – FCAV-UNESP; Protocol: 011955/18).

Freshly laid fertilized eggs of Cobb 500® strain from hens 45–50 weeks of age, obtained from a local supplier, were selected by weight (65 ± 5 g) and held at ~18 °C until incubation. The eggs were incubated (incubator Premium Ecologica®, Belo Horizonte, MG Brazil) with an average relative humidity of 60 % and automatic turning every hour. Then the eggs were subjected to one of the three treatments: control (37.5 °C throughout incubation), cold (36 °C from day 0

until day 5, for 6h/day) or hot (39 °C from day 0 until day 5, for 6h/day), at day 6 the eggs of cold and hot treatments were maintained at 37.5 °C until hatch. After hatching, animals were apart in male and female and were housed in a room with controlled environment (Cobb, 2008), 14:10 h light:dark cycle (lights on at 6:00 AM) with free access to water and food.

Determination of pulmonary ventilation:

Measurements of pulmonary ventilation ($\dot{V}_E$) were performed using the whole body plethysmography method (closed system; Mortola and Frappel, 1998; Espinha et al., 2014; Rocha et al., 2020). Freely moving 3- and 14-day-old chickens (3d and 14d) were kept in a 1.5 L and 5 L chamber, respectively and the chambers were ventilated with humidified room air, hypercapnic gas mixture (7% CO₂) or hypoxic gas mixture (10% O₂; Gama Gases, São Bernardo do Campo, Brazil), for 30 minutes each. The environment temperature was controlled to keep the thermal comfort of the animals. During $\dot{V}_E$ measurements, the flow was interrupted, the chamber was sealed for short periods of time (~2 min) and the pressure oscillations caused by breathing were monitored using a differential pressure transducer (TSD 160A, Biopac Systems, Santa Barbara, USA). The signals were fed into a differential pressure signal conditioner (DA 100C, Biopac Systems, USA), passed through an analog-to-digital converter, and digitized on a microcomputer equipped with data acquisition software (MP100A-CE, Biopac Systems, USA). The volume was calibrated during each experiment by injecting 1 mL of air into the animal chamber. The tidal volume (V_T) of 14d animals was calculated using the following formula of Drorbaug e Fenn (1955), adapted by Bartlett and Tenney (1970):

$$V_T = \frac{P_T}{P_K} \cdot V_K \cdot \frac{[T_b(P_{baro} - P_{chH_2O})]}{[T_b(P_{baro} - P_{chH_2O})] - [T_{ch}(P_{baro} - P_{bH_2O})]}$$

Where the P_T is the pressure deflection associated with tidal volume, the P_K is the pressure deflection associated with the air volume injected for calibration, V_K is the air volume injected into the animal's chamber for calibration, the chamber temperature is T_{ch} , the animal body temperature is T_b , the barometric pressure is P_{baro} , the water vapour pressure of the chamber is P_{chH_2O} and that of the animal is P_{bH_2O} . $\dot{V}_E$ and V_T are presented at ambient barometric pressure and T_b and saturated with water vapor at this temperature (BTPS). The P_{baro} , P_{chH_2O} and P_{bH_2O} were calculated indirectly using an appropriate table (Dejours, 1981) assuming that chamber was fully saturated. V_T and consequently $\dot{V}_E$ were corrected by body mass. T_a in the animal chamber was monitored using a thermoprobe (model 8502- 10, Cole Parmer, Chicago, IL).

Regarding 3d animals, some alterations were needed to guarantee the animals were in its comfort ambient temperature and to obtain an accurate V_T . For this, the newly hatched animal was placed individually in a chamber made of two separate compartments connected through a tubing. The animal chamber had the T_a controlled by a water bath (about 30°C) and the second compartment at a lower T_a (about 25°C), to achieve a desirable T_a gradient. In this case, the T_{ch} and P_{ch} relevant are the volume-weighted averages of the two compartments.

Determination of body temperature (T_b):

The cloacal temperature was measured as representative of T_b and e measured using a retal sensor (Thermistor Pod ML 309, ADInstruments®, Australia). The measurements were performed at the onset and end of the stimulus (normoxia, hypercapnia and hypoxia).

Oxygen Consumption:

The O₂ consumption ($\dot{V}O_2$) was measured by the pull mode configuration, using an open respirometry system (Mortola, 1984; Cummings et al. 2011, Patrone et al., 2018). A Mass Flow System (Sable Systems International, Inc.) was coupled to the plethymographic chamber outlet to control the airflow inside the chamber and to direct the outlet gas to the oxygen analyser (ADInstruments). The expired gas was dried over column of Drierite (W.A. Hammond Drierite Co. Ltd, Xenia, OH, USA) before passing through the gas analyzer. As CO₂ was neither analyzed nor scrubbed, oxygen consumption ($\dot{V}O_2$) was calculated using the following equation (Koteja, 1996):

$$\dot{V}O_2 = [FRe (FiO_2 - FeO_2)] / [1 - FiO_2 (1 - RQ)]$$

where FRe is the end flow rate of air through the chamber, FiO₂ is the inlet O₂ fraction, FeO₂ is the end O₂ fraction, and RQ is the respiratory quotient (considered to be 0.85). $\dot{V}O_2$ was corrected for the body weight in kg and values were presented as STPD (standard conditions of temperature, pressure and dry air).

Experimental protocol:

Effect of temperature of incubation on $\dot{V}_E$, $\dot{V}O_2$ and Tb during normocapnia, hypoxia and hypercapnia in male and female broiler chicks (3d and 14d).

The 3d and 14d male and female animals were placed, individually, into the chamber and allowed to move freely. At first 30 min, during acclimation, the chamber was flushed with room air (21% O₂). After the acclimation, $\dot{V}_E$ and $\dot{V}O_2$ were recorded in normocapnic/ normoxic conditions for 10 minutes. Posteriorly, the

animals were exposed, randomly, to a hypercapnic (7% CO₂) or hypoxic (10% O₂) gas mixture, for 30 minutes. The order of mixtures was randomly chosen, with a 1-hour interval in a normoxic normocarbic mixture. The $\dot{V}_E$ and $\dot{V}O_2$ were measured at 30 minutes of gas exposure. During recovery phase the ventilatory parameters were measured at 60 minutes. The body temperature was measured before and after gas exposure.

Statistical analysis:

The results are reported as means $\pm$ SEM. The data were tested for normality of deviation (Cramer Von-Mises criterion) and homoscedasticity (Levene test). The thermal manipulation conditions were analyzed separately to determine the sex and gas mixture effect. The effect of hypercapnia and hypoxia on V_T , f_R , $\dot{V}_E$ and $\dot{V}O_2$ over the time course was evaluated by two-way analysis of variance (repeated measures), in case of significant difference the means were compared by Tukey's test. Values of $P \leq 0.05$ were considered significant.

Results

Body mass (BM) of 0-, 3- and 14-d broilers is presented in Table 1. No sex difference was observed. The BM of hot-incubated hatchling male was lower, compared to control male animals. Cold- incubated 3d females presented a higher body mass compared to control and hot incubated chickens. In 14d cold-incubated males and females, body mass was higher compared to control and hot incubated groups (Table 1). In addition, 14d hot-incubated males presented a lower body mass compared to control and cold-incubated males.

The heart and lungs mass, presented in Table 1 (3d and 14d animals), are expressed as body mass percentage. No significant differences were observed among treatments in heart and lungs mass (3d animals) and lungs (14 days old male and female animals). Both, male and female, 14d animals exposed to hot temperature, during first five days of incubation, presented a higher heart mass, compared to control group (Table 1).

Table 1 also shows the effects of temperature of incubation in Tb under room air conditions. Thermal manipulation did not affect Tb of 3 days old animals. Regarding 14d animals, incubation at high temperature caused an increase in Tb compared to cold and control animals. Cold-incubated females showed a lower Tb compared to other groups.

Ventilatory and Metabolic parameters

Normoxia normocapnia

Figures 1 and 3 shows the ventilatory parameters during normoxia/normocapnia of 3 days old female and male broiler chicks from the experimental groups: control (37.5 °C), cold (36 °C) and hot (39 °C). No significant difference was observed in $\dot{V}_E$, V_T and f_R among groups, in male and female 3d animals (Figures 1 and 3).

Figures 2 and 4 shows the ventilatory parameters during normoxia/normocapnia of 14 days old female and male broiler chicks from the experimental groups. The exposure to hot temperatures during the first five days of incubation affected the $\dot{V}_E$, V_T and f_R in room air conditions. The 14d female animals exposed to hot treatment presented lower $\dot{V}_E$ and V_T compared to control group. The 14d male animals incubated in higher temperatures presented a lower

V_T and a higher f_R , compared to other groups, but no difference was observed in $\dot{V}_E$.

$\dot{V}O_2$ under normoxic/ normocapnic conditions were not influenced by the treatments in 3d animals (Figure 5A), but 14d male and female incubated at high temperature showed a lower metabolic rate compared to the control treatment (Figure 6A). The ventilatory equivalent ($\dot{V}_E / \dot{V}O_2$) in normoxia/normocapnia were not influenced by treatments in both sexes in 3d (Figure 5B) and 14d animals (Figure 6B).

Hypercapnia

Exposure to higher levels of CO_2 caused an increase in $\dot{V}_E$ in all groups of 3d and 14d, male and female animals (Figure 1 and 2). The 3d females incubated at cold temperature presented a lower $\dot{V}_E$, due to a lower V_T , with no changes in f_R , compared to other treatments (Figure 1). None of the ventilatory parameters were affected by treatments in 3d male animals, under hypercapnic condition.

The ventilatory response to CO_2 of 14d hot- incubated females was lower, modulated by a lower V_T , compared to other treatments (Figure 2). On the other hand, 14d cold-incubated males presented a lower $\dot{V}_E$ compared to control group. Despite no significant difference was observed in ventilation of hot-incubated males, the V_T was lower compared to control treatment.

Figure 5A and 6A shows $\dot{V}O_2$ of male and female 3d and 14d chicks, respectively, under hypercapnia (7% CO_2) and hypoxia (10% O_2). Under hypercapnia, no significant difference in $\dot{V}O_2$ was observed among groups, in both sexes. The 14d female animals incubated at cold temperature presented a lower $\dot{V}O_2$ compared to hot-incubated females. The thermal manipulation during

first five days of incubation did not affected the oxygen consumption of 14d male animals, under 7% CO₂.

The ventilatory equivalent ($\dot{V}_E / \dot{V}O_2$) of 3d and 14d, male and female, is shown at Figure 5B and 6B, respectively. For 3d females, hypercapnia caused an increase in $\dot{V}_E / \dot{V}O_2$ in all groups; however, in cold-incubated females this increase was lower compared to other groups (Figure 5B). No significant difference was observed among the treatments in 3d male chicks. The 14d hot-incubated females showed a lower $\dot{V}_E / \dot{V}O_2$ compared to cold and control group. As to 14d male animals, both hot- and cold-incubated animals showed a lower ventilatory equivalent under 7% CO₂ compared to control group (Figure 6B).

Figure 7 shows the effect of thermal manipulation during incubation on body temperature of male and female animals exposed to hypercapnia. Hypercapnia caused a similar decrease of Tb in all groups of 3d and 14d females and males. The only difference was in 14 d cold-incubated females that showed a lower drop in Tb compared to control animals (Figure 7B).

Hypoxia

Hypoxia increased $\dot{V}_E$ in all groups of 3d old females and males due to a higher V_T (Figure 3). As observed in Figure 3, cold-incubated females showed a lower hypoxic ventilatory response compared to hot-incubated animals. The V_T of 3d cold-incubated females was lower compared to control group. No significant difference was observed among treatments in the ventilatory parameters under hypoxia, in 3d male animals.

Figure 4 shows the ventilatory response during hypoxia of 14d male and female animals. Cold-incubated females presented a higher hypoxic ventilatory

response compared to control and hot-incubated animals. This increase in $\dot{V}_E$ was due to a higher V_T . In 14d male animals, no difference among the groups were observed in $\dot{V}_E$, V_T and f_R .

$\dot{V}O_2$ of newly hatched is presented in Figure 5A. Cold-incubated 3d female presented a higher $\dot{V}O_2$ compared to control and hot-incubated groups. Figure 6A shows the $\dot{V}O_2$ of 14d animals under hypoxia. In 14d cold-incubated females, hypoxia caused an attenuated drop in $\dot{V}O_2$ compared to control group. No significant difference in $\dot{V}O_2$ was observed among treatments in male animals of both ages.

The ventilatory equivalent of 3d and 14d animals is shown at Figure 5B and Figure 6B, respectively. Hypoxia increased similarly $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ of males and females of both ages. The only difference observed was in 3d cold-incubated females that presented a lower $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$, compared to control and hot treatment (Figure 5B).

Hypoxia promoted a similar decrease in T_b of 3d male and females (Figure 7A). In 14d animals, hypoxia also promoted a drop in T_b ; however, the reduction in T_b of cold-incubated females was significantly smaller than the drop measured for both hot and control group (Figure 7B). In hot-incubated males, the drop in T_b produced by hypoxia was higher compared to control group (Figure 7B).

Discussion

In the present study, we evaluated the effect of thermal manipulation on ventilation, metabolism and thermal responses to hypercapnia and hypoxia in 3 and 14 days old chickens (males and females). We have demonstrated that

incubation at high temperature during a “critical window” in organogenesis decreases $\dot{V}_E$ (female), $\dot{V}O_2$ (female and male), and increases T_b in 14-d broiler chicks under room air conditions, regardless of sex. In addition, thermal manipulation affects more the hyperventilation induced by hypercapnia compared to hypoxic challenge. In younger animals, females are more affected by thermal manipulation than males.

The 14d animals, male and female, presented a higher heart mass compared to control animals, suggesting a higher effort to pump blood to the tissues, possibly by an inefficiency in gas exchange, since $\dot{V}_E$ was decreases in females and males presented an altered breathing pattern (low V_T and high fR). In addition, these animals presented a higher T_b , despite the drop in $\dot{V}O_2$. Molennar et al (2007) demonstrated that broilers incubated under higher temperatures from E7-E21 presented a greater mortality by ascites. This metabolic disorder is closely associated with pulmonary hypertension and right ventricle hypertrophy (Molenaar et al, 2007).

Cold incubation increased body weight in both males and females at 14 days and in 3d females. In fact, chicken embryos, after periods of growth delay caused by cold, compensated their growth posteriorly (Mortola, 2009). Likewise, Nyuiadzi et al (2020) observed that males exposed to cold temperature of incubation presented a higher body mass, under cold exposure during rearing, while females incubated in cold temperature had a greater growth in normal post-hatch temperature. Possibly, these effects of cold incubation temperature on BM is a result of hormonal differences between sexes in the very early embryo development and in the early growth phases (Dainat et al.; 1991; Kocamis et al.; 1998, Bello et al., 2014; Nyuiadzi et al., 2020). A negative effect of hot incubation

on male body weight was observed at 3 days, with no compensation exhibited during the subsequent 14d growth period. Nevertheless, it was not clear why males were more negatively affected by hot incubation than females. Perhaps different sexual hormonal profiles present since early phases of incubation as recently shown by Wang et al (2019) might be the cause of this sex difference.

None of the treatments caused an effect in 3d animals on ventilation and metabolism under normoxia/ normocapnia. Our data corroborate with the results obtained by Mortola and Toro-Velasquez (2013) carried in 1 day old White Leghorn hatchlings incubated in cold temperature. However, our results suggest that the thermal manipulation during incubation did not affect the Tb of newly hatched animals under normoxia/ normocapnia, in both sexes, unlike the result obtained by Mortola and Toro-Velasquez (2013) that find difference in the body temperature in the same ambient conditions. This difference may be due to a different strain (White Leghorn chickens versus Cobb 500 strain), age, temperature (35°C versus 36°C) and intensity of thermal manipulation, during incubation, used in both studies. In addition, different from the current study, previous studies using thermal manipulation have shown that increasing the temperature of incubation decreases Tb at hatch and up 70 days after hatching (Piestun et al., 2011; 2013a). However, the authors performed thermal manipulation during embryonic days E7–E16.

Under 7% CO₂, cold thermal manipulation during incubation attenuated the hypercapnic hyperventilation in 3d females, but not in males, suggesting that females are more sensitive to changes in temperature during embryogenic period. The reduction in the hyperventilatory response to CO₂ in cold incubated females was due to a lower $\dot{V}_E$. It seems that cold incubation during the first days

of incubation affects the chemosensitivity of newly hatched female animals. The organogenesis of main organs, like brain and heart, occurs very early during incubation and changes in temperature in this critical phase may cause impacts on the normal development of respiratory control mechanisms, including in sensitivity to CO₂ (Szdzyu and Mortola, 2008; Burggren and Reyna, 2011).

Regarding, 14d chickens, hot-incubated male animals presented an attenuation of CO₂-hyperventilation. Despite the fact that no significant changes were observed in $\dot{V}_E$ and $\dot{V}O_2$, there was a tendency of a lower $\dot{V}_E$ and a higher $\dot{V}O_2$ in these animals, which possibly contributed to the lower $\dot{V}_E / \dot{V}O_2$ under hypercapnic exposure. Hot incubated females and cold incubated males presented an attenuation in hypercapnic hyperventilation due to a lower increase in $\dot{V}_E$, with no change or a small effect in $\dot{V}O_2$, suggesting a reduction in respiratory chemosensitivity. This decrease in chemosensitivity is likely due to alteration in central areas, since no change in hypoxic ventilatory response was observed in 14d cold incubated males and hot incubated female. To detect changes in CO₂/pH, birds possess peripheral (located in the carotid bodies), central (located in the central nervous system), and intrapulmonary chemoreceptors that are highly sensitive to CO₂ (Milsom, 2002).

Incubation under cold temperature did not seem to affect the ventilation and metabolism of 14 d female animals. Nevertheless, these animals showed a lower drop in Tb under hypercapnia. Despite the fact that no difference was observed among groups, the male animals incubated in cold temperature had a tendency to have a lower hypercapnia-induced hypothermia. Therefore, we believe that the reduction in ventilatory response to CO₂ is not dependent on its effect on body temperature, but that embryonic temperature caused a change in

chemosensitivity *per se*. We observed that cold incubation only induced changes in juvenile males. In fact, a recent study from our laboratory have demonstrated that pre-exposure to 1 % CO₂ during embryonic development attenuates ventilatory response to hypercapnia, especially in male chicks up to 10 days (Rocha et al., 2020). One could argue that this sexual dimorphic response could be due to sexual hormones. A previous study from our laboratory has found that ventilation under normocapnia and hypercapnia is similar between males and females in 10 days old chickens; however, 21 days old females possess a higher CO₂ ventilatory response compared to males (Espinha et al., 2014). In fact, Camacho-Arroyo et al. (2018) have demonstrated sexual dimorphism in progesterone, estrogen and androgen receptors in the newly hatched chick brain. In addition, female broiler chicks present much higher plasma estradiol levels than males as early as just after hatching, a pattern that is maintained up to 42 days (Gonzales et al., 2003; Wang et al., 2019).

Hypoxia induced hyperventilation in all groups and the only difference observed was in cold-incubated 3d female that presented an attenuated hyperventilatory response to hypoxia, due to a higher $\dot{V}O_2$, compared to control and hot-incubated animals. Therefore, it seems that for newly hatched cold-incubated females to increase $\dot{V}_E$ or to maintain T_b is more costly energetically. Even with a higher $\dot{V}O_2$ during hypoxia observed in cold-incubated animals, T_b dropped in the same magnitude of the other groups, which indicates that cold incubation might have decreased heat conservation/increased heat loss, in comparison to control animals at this age. Since the hypoxic ventilatory response was similar among cold-incubated and control females, this changes in $\dot{V}O_2$ should not depend on the carotid bodies, but possibly a central mechanism that

control metabolism. This results are in agreement with the data obtained by experiments performed on the hatchlings of turkeys, chickens and Muscovy ducks subjected to low temperatures during the last days of incubation, where were observed an increase in heat production compared to controls (Minne and Decuypere, 1984; Tzschentke and Nichelmann, 1999; Nichelmann et al., 2001).

Differently from 3d cold-incubated females, the same treatment 14d females presented a lower drop in Tb under hypoxic conditions compared to other groups. In addition, the hypoxic-hypometabolic response was attenuated in 14d cold-incubated females, indicating that they had a lower metabolic reaction to hypoxia, which seems to be disadvantageous for survival in those conditions (Mortola and Dotta, 1992; Mortola, 2004; Lu et al., 2005). Reductions in Tb should facilitate metabolic depression during hypoxia by reducing temperature-dependent O₂ demands (Scott et al., 2008). This lower depressive effects of hypoxia on Tb and metabolism in thermal manipulated chickens may be necessary for maintaining the high ventilatory response to low O₂ conditions. In fact, these animals presented a higher hypoxic ventilatory response (significant for females and a tendency for males), which may have contributed to the attenuation in hypometabolic response.

In summary, as far as we know, our results, for the first time, point to a phenotypic plasticity of incubation temperature on ventilation, metabolic rate and body temperature of newly hatched and juvenile broiler chicks. Thermal manipulation affects more the hyperventilation induced by hypercapnia compared to hypoxic challenge by changing ventilation, which suggests an effect in central or intrapulmonary chemosensitivity. In younger animals, females are more

affected by thermal manipulation than males indicating a sexual dimorphism already present at this age.

References

- Akşit, M., Yalçın, S., Siegel, P. B., Yenisey, Ç., Özdemir, D., & Özkan, S. E. Z. E. N. (2013). Broilers respond to cooler ambient temperatures after temperature acclimation during incubation and early postnatal age. *Journal of Applied Poultry Research*, 22(2), 298-307.
- Alcayaga, J., Sanhueza, Y., & Zapata, P. (1993). Thermal dependence of chemosensory activity in the carotid body superfused in vitro. *Brain research*, 600(1), 103-111.
- Barnas, G. M., Hempleman, S. C., & Burger, R. E. (1983). Effect of temperature on the CO₂ sensitivity of avian intrapulmonary chemoreceptors. *Respiration physiology*, 54(2), 233-240.
- Baron, M., & Eyzaguirre, C. (1977). Effects of temperature on some membrane characteristics of carotid body cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 233(1), C35-C46.
- Bartlett Jr, D. and Tenney, S. M. (1970) Control of breathing in experimental anemia. *Respiration Physiology*, 10(3), 384-395.
- Bello, A., Hester, P. Y., Gerard, P. D., Zhai, W. & Peebles, E. D., (2014). Effects of commercial in ovo injection of 25-hydroxycholecalciferol on bone development and mineralization in male and female broilers. *Poult. Sci.* 93:2734–2739.
- Burggren, W. W., & Reyna, K. S. (2011). Developmental trajectories, critical windows and phenotypic alteration during cardio-respiratory development. *Respiratory physiology & neurobiology*, 178(1), 13-21.
- Camacho-Arroyo, I., Hansberg-Pastor, V., Gutiérrez-Rodríguez, A., Chávez-Jiménez, J., & González-Morán, M. G. (2018). Expression of sex hormone receptors in the brain of male and female newly hatched chicks. *Animal reproduction science*, 188, 123-129.
- Christensen, V. L., Donaldson, W. E., & Nestor, K. E. (1999). Length of the plateau and pipping stages of incubation affects the physiology and survival of turkeys. *British poultry science*, 40(2), 297-303.

Cobb (2008). Manual de manejo de frangos de corte. (acessed 19 May 2020). <http://wp.ufpel.edu.br/avicultura/files/2012/04/Cobb-Manual-Frango-Corte-BR.pdf>.

Cummings, K.J., Hewitt, J.C., Li, A., Daubenspeck, J.A. & Nattie, E.E., (2011). Postnatal loss of brainstem serotonin neurones compromises the ability of neonatal rats to survive episodic severe hypoxia. *J. Physiol.* 589, 5247–5256. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.214445>.

Dainat, J., Saleh, L., Bressot, C., Marger, L., Bacou, F. & Vigneron, P., (1991). Effects of thyroid state alterations in ovo on the plasma levels of thyroid hormones and on the populations of fibers in the plantaris muscle of male and female chickens. *Reprod. Nutr. Dev.* 31:703–716.

De Smit, L., Bruggeman, V., Tona, J.K., Debonne, M., Onagbesan, O., Arckens, L., De Baerdemaker, J. & Decuypere, E. (2006). Embryonic developmental plasticity of the chick: increased CO₂ during early stages of incubation changes the developmental trajectories during prenatal and postnatal growth. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 145: 166-175.

Deeming, D. C. (2004). Temperature-dependent sex determination in vertebrates.

Dejours, P. (1981). Principle of comparative respiratory physiology, 2nd edn. Elsevier, New York.

Do Amaral-Silva, L., Lambertz, M., Zara, F. J., Klein, W., Gargaglioni, L. H., & Bícigo, K. C. (2019). Parabronchial remodeling in chicks in response to embryonic hypoxia. *Journal of Experimental Biology*, 222(10), jeb197970.

Drorbaugh, J. E. and Fenn, W. (1955) Barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics*, 16, 81-87.

Du, W. G., Shine, R., Ma, L., & Sun, B. J. (2019). Adaptive responses of the embryos of birds and reptiles to spatial and temporal variations in nest temperatures. *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1915), 20192078.

DuRant, S. E., Hopkins, W. A., Hepp, G. R., & Walters, J. R. (2013). Ecological, evolutionary, and conservation implications of incubation temperature-dependent phenotypes in birds. *Biological Reviews*, 88(2), 499-509.

Espinha, L. P., Souza, F. A., Capalbo, A. C., Bícigo, K. C., Macari, M., & Gargaglioni, L. H. (2014). Age and gender influence the cardiorespiratory function and metabolic rate of broiler chicks during normocapnia and hypercapnia. *Respiratory physiology & neurobiology*, 200, 50-56.

French, N. A. (1997). Modeling incubation temperature: the effects of incubator design, embryonic development, and egg size. *Poultry science*, 76(1), 124-133.

Gonzales, E., Kondo, N., Saldanha, E. S., Loddy, M. M., Careghi, C. & Decuypere, E. (2003). Performance and physiological parameters of broiler chickens subjected to fasting on the neonatal period. *Poultry Science*, 82(8), 1250-1256.

Kocamis, H., Kirkpatrick-Keller, D. C., Klandorf, H. & Killefer, J., (1998). In ovo administration of recombinant human insulin-like growth factor-I alters postnatal growth and development of the broiler chicken. *Poult. Sci.* 77:1913–1919.

Koteja, P. (1996). Measuring energy metabolism with open-flow respirometric systems: which design to choose? *Funct. Ecol.* 10, 675. <https://doi.org/10.2307/2390179>.

Lin, Y. M., Druyan, S., Yahav, S., & Brake, J. (2017). Thermal treatments prior to and during the beginning of incubation affects development of the broiler embryo and yolk sac membranes, and live performance and carcass characteristics. *Poultry science*, 96(6), 1939-1947.

Lourens, A., Van den Brand, H., Meijerhof, R., & Kemp, B. (2005). Effect of eggshell temperature during incubation on embryo development, hatchability, and posthatch development. *Poultry science*, 84(6), 914-920.

Lu, G. W., Yu, S., Li, R. H., Cui, X. Y., & Gao, C. Y. (2005). Hypoxic preconditioning. *Molecular neurobiology*, 31(1-3), 255-271.

Malan, A. (1973). Ventilation measured by body plethysmography in hibernating mammals and in poikilotherms. *Respir. Physiol.* 17 (1), 32–44.

Milsom, W. K. (2002). Phylogeny of CO₂/H⁺ chemoreception in vertebrates. *Respiratory physiology & neurobiology*, 131(1-2), 29-41.

Minne, B., & Decuypere, E. (1984). Effects of late prenatal temperatures on some thermoregulatory aspects in young chickens. *Archiv fur experimentelle Veterinarmedizin*, 38(3), 374-383.

Molenaar, R., Hulet, R., Meijerhof, R., Maatjens, C. M., Kemp, B., & Van Den Brand, H. (2011). High eggshell temperatures during incubation decrease growth performance and increase the incidence of ascites in broiler chickens. *Poultry Science*, 90(3), 624-632.

Morita, V.d.S., Almeida, V.R.d., Matos Jr, J.B., Vicentini, T.I., van den Brand, H. & Boleli, I.C. (2016). Incubation temperature during fetal development

influences morphophysiological characteristics and preferred ambient temperature of chicken hatchlings. *PLoS ONE* 11(5): e0154928.

Mortola, J. P. (2004). Implications of hypoxic hypometabolism during mammalian ontogenesis. *Respiratory physiology & neurobiology*, 141(3), 345-356.

Mortola, J. P. (2006). Metabolic response to cooling temperatures in chicken embryos and hatchlings after cold incubation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 145(4), 441-448.

Mortola, J. P. (2009). Gas exchange in avian embryos and hatchlings. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 153(4), 359-377.

Mortola, J. P., & Dotta, A. (1992). Effects of hypoxia and ambient temperature on gaseous metabolism of newborn rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 263(2), R267-R272.

Mortola, J. P., & Frappell, P. B. (2000). Ventilatory responses to changes in temperature in mammals and other vertebrates. *Annual Review of Physiology*, 62(1), 847-874.

Mortola, J. P., & Toro-Velasquez, P. A. (2013). Ventilatory response to hypoxia of the 1-day old chicken hatchling after prenatal cold-induced hypometabolism. *Respiratory physiology & neurobiology*, 188, 161-164.

Mortola, J.P. (1984). Breathing pattern in newborns. *J. Appl. Physiol.* 56, 1533–1540. <https://doi.org/10.1152/jappl.1984.56.6.1533>.

Mortola, J.P. (2011). Respiratory mechanics in 1-day old chicken hatchlings and effects of prenatal hypoxia. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 175, 357–364.

Mortola, J.P.; Frappell, P.B. (1998). On the barometric method for measurement of ventilation, and its use in small animals. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v. 76, p. 937 – 944.

Nichelmann, M., Janke, O., & Tzschentke, B. (2001). Efficiency of thermoregulation in precocial avian species during the prenatal period. *Journal of Thermal Biology*, 26(4-5), 273-280.

Nyuiadzi, D., Berri, C., Dusart, L., Travel, A., Méda, B., Bouvarel, I., Guilloteau, L. A., Chartrin, P., Coustham, V., Praud, C., Le Bihan-Duval, E., Tona, J. K. & Collin, A., (2020). Short cold exposures during incubation and postnatal cold temperature affect performance, breast meat quality, and welfare parameters in broiler chickens. *Poultry science*, 99(2), 857-868.

Paintal, A. S. (1971). The responses of chemoreceptors at reduced temperatures. *The Journal of physiology*, 217(1), 1-18.

Patrone, L.G.A., Biancardi, V., Marques, D.A., Bícago, K.C., Gargaglioni, L.H. (2018). Brainstem catecholaminergic neurones and breathing control during postnatal development in male and female rats. *J. Physiol.* 596, 3299–3325. <https://doi.org/10.1113/JP275731>.

Piestun, Y., Druyan, S., Brake, J., & Yahav, S. (2013a). Thermal manipulations during broiler incubation alter performance of broilers to 70 days of age. *Poultry science*, 92(5), 1155-1163.

Piestun, Y., Druyan, S., Brake, J., & Yahav, S. (2013b). Thermal treatments prior to and during the beginning of incubation affect phenotypic characteristics of broiler chickens posthatching. *Poultry science*, 92(4), 882-889.

Piestun, Y., Halevy, O., Shinder, D., Ruzal, M., Druyan, S., & Yahav, S. (2011). Thermal manipulations during broiler embryogenesis improves post-hatch performance under hot conditions. *Journal of Thermal Biology*, 36(7), 469-474.

Rocha, A. C., Espinha, L.P., Santos, K. M., Almeida, A. R., Macari, M., Bícago, K. C., Gargaglioni, L. H., & da Silva, G. S. (2020). Cardiorespiratory and thermal responses to hypercapnia in chickens exposed to CO₂ during embryonic development. *Respiratory physiology & neurobiology*, 273, 103317.

Scott, G. R., Cadena, V., Tattersall, G. J., & Milsom, W. K. (2008). Body temperature depression and peripheral heat loss accompany the metabolic and ventilatory responses to hypoxia in low and high altitude birds. *Journal of Experimental Biology*, 211(8), 1326-1335.

Shinder, D., Ruzal, M., Giloh, M., Druyan, S., Piestun, Y., & Yahav, S. (2011). Improvement of cold resistance and performance of broilers by acute cold exposure during late embryogenesis. *Poultry science*, 90(3), 633-641.

Szdzuy, K., & Mortola, J. P. (2008). Ventilatory chemosensitivity and thermogenesis of the chicken hatchling after embryonic hypercapnia. *Respiratory physiology & neurobiology*, 162(1), 55-62.

Tzschentke, B. (2007). Attainment of thermoregulation as affected by environmental factors. *Poultry science*, 86(5), 1025-1036.

Tzschentke, B. (2008). Monitoring the development of thermoregulation in poultry embryos and its influence by incubation temperature. *Computers and electronics in agriculture*, 64(1), 61-71.

Tzschentke, B., & Basta, D. (2002). Early development of neuronal hypothalamic thermosensitivity in birds: influence of epigenetic temperature

adaptation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 131(4), 825-832.

Tzschentke, B., & Nichelmann, M. (1997). Influence of prenatal and postnatal acclimation on nervous and peripheral thermoregulation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 813, 87-94.

Tzschentke, B., & Nichelmann, M. (1999). Development of avian thermoregulatory system during the early postnatal period: development of the thermoregulatory set-point. *Ornis Fennica*, 76(4), 189-198.

Walstra, I., Ten Napel, J., Kemp, B., & Van Den Brand, H. (2010). Temperature manipulation during layer chick embryogenesis. *Poultry Science*, 89(7), 1502-1508.

Wang, Y., Jin, G., Ma, M., (2019). Sex differences in serum steroid hormone levels during embryonic development in hen eggs. *Poultry Science*, 98(11), 6053-6062.

Webb, D. R. (1987). Thermal tolerance of avian embryos: a review. *The Condor*, 89(4), 874-898.

Wilsterman, K., Mast, A.D., Luu, T.H., & Haussmann, M.F. (2015). The timing of embryonic exposure to elevated temperature alters stress endocrinology in domestic chickens (*Gallus domesticus*). *General and Comparative Endocrinology*, 212, 10-16.

Yahav, S., & Brake, J. (2014). Chick embryogenesis: a unique platform to study the effects of environmental factors on embryo development. *Journal of stem cells*, 9(1), 17.

Figure Legends

Fig. 1. Ventilatory response during resting and hypercapnia of 3-day-old female and male broiler chicks submitted to the experimental treatments during incubation, i.e. control (37.5 °C), cold (36 °C 6 hours/day, from 0 to 5th day) and hot (39 °C 6 hours/day, from 0 to 5th day). Values are expressed as mean $\pm$ SEM. # indicates that the control treatment differs from cold treatment; + indicates that the control treatment differs from hot treatment; * indicates that the cold treatment differs from hot treatment. Level of significance: $P \leq 0.05$.

Fig. 2. Ventilatory response during resting and hypercapnia of 14-day-old female and male broiler chicks submitted to the experimental treatments during incubation, i.e. control (37.5 °C), cold (36 °C 6 hours/day, from 0 to 5th day) and hot (39 °C 6 hours/day, from 0 to 5th day). Values are expressed as mean $\pm$ SEM. # indicates that the control treatment differs from cold treatment; + indicates that the control treatment differs from hot treatment; * indicates that the cold treatment differs from hot treatment. Level of significance: $P \leq 0.05$.

Fig. 3. Ventilatory response during resting and hypoxia of 3-day-old female and male broiler chicks submitted to the experimental treatments during incubation, i.e. control (37.5 °C), cold (36 °C 6 hours/day, from 0 to 5th day) and hot (39 °C 6 hours/day, from 0 to 5th day). Values are expressed as mean $\pm$ SEM. # indicates that the control treatment differs from cold treatment; + indicates that the control treatment differs from hot treatment; * indicates that the cold treatment differs from hot treatment. Level of significance: $P \leq 0.05$.

Fig. 4. Ventilatory response during resting and hypoxia of 14-day-old female and male broiler chicks submitted to the experimental treatments during incubation, i.e. control (37.5 °C), cold (36 °C 6 hours/day, from 0 to 5th day) and hot (39 °C 6 hours/day, from 0 to 5th day). Values are expressed as mean $\pm$ SEM. # indicates that the control treatment differs from cold treatment; + indicates that the control treatment differs from hot treatment; * indicates that the cold treatment differs from hot treatment. Level of significance: $P \leq 0.05$.

Fig. 5. Oxygen consumption ($\dot{V}O_2$) (A) and air convection requirement ($\dot{V}_E / \dot{V}O_2$) (B) of 3-day-old, female and male broiler chicks submitted to the experimental

treatments during incubation, i.e. control (37.5 °C), cold (36 °C 6 hours/day, from 0 to 5th day) and hot (39 °C 6 hours/day, from 0 to 5th day), during resting, hypercapnic (7% CO₂) and hypoxic (10% O₂) conditions. Values are expressed as mean ± SEM. # indicates that the control treatment differs from cold treatment; + indicates that the control treatment differs from hot treatment; * indicates that the cold treatment differs from hot treatment. Level of significance: P≤0.05.

Fig. 6. Oxygen consumption ($\dot{V}O_2$) (A) and air convection requirement ($\dot{V}_E / \dot{V}O_2$) (B) of 14-day-old, female and male broiler chicks submitted to the experimental treatments during incubation, i.e. control (37.5 °C), cold (36 °C 6 hours/day, from 0 to 5th day) and hot (39 °C 6 hours/day, from 0 to 5th day), during resting, hypercapnic (7% CO₂) and hypoxic (10% O₂) conditions. Values are expressed as mean ± SEM. # indicates that the control treatment differs from cold treatment; + indicates that the control treatment differs from hot treatment; * indicates that the cold treatment differs from hot treatment. Level of significance: P≤0.05.

Fig. 7. Body temperature (T_b) of 3-day-old (A) and 14-day-old (B), female and male broiler chicks submitted to the experimental treatments during incubation, i.e. control (37.5 °C), cold (36 °C 6 hours/day, from 0 to 5th day) and hot (39 °C 6 hours/day, from 0 to 5th day), during resting, hypercapnic (7% CO₂) and hypoxic (10% O₂) conditions. Values are expressed as mean ± SEM. # indicates that the control treatment differs from cold treatment; + indicates that the control treatment differs from hot treatment; * indicates that the cold treatment differs from hot treatment. Level of significance: P≤0.05.

Table 1. Values of body temperature (Tb), heart mass (HM), lung mass (LM) and body mass (BM) of 3d and 14d female and male chicken.

		37.5 °C	36.0 °C	39.0 °C	P
Hatching					
BM (g)	♀	50.7 ± 2.0 ab	51.1 ± 2.3 a	49.5 ± 3.2 b	<0.005
	♂	51.3 ± 2.7 a	51.7 ± 2.3 a	49.3 ± 2.7 b	<0.005
3 days					
Tb (°C)	♀	40.0 ± 0.1	40.0 ± 0.2	39.9 ± 0.1	ns
	♂	40.1 ± 0.1	40.1 ± 0.2	40.0 ± 0.1	ns
HM (% BM)	♀	0.5 ± 0.04	0.6 ± 0.02	0.4 ± 0.03	ns
	♂	0.9 ± 0.04	1.0 ± 0.04	1.0 ± 0.1	ns
LM (% BM)	♀	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.01	ns
	♂	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.02	0.9 ± 0.1	ns
BM (g)	♀	60.2 ± 1.4 b	73.7 ± 3.4 a	55.5 ± 2.7 b	< 0.05
	♂	59.3 ± 1.8 ab	66.8 ± 2.9 a	57.0 ± 3.2 b	< 0.05
14 days					
Tb (°C)	♀	40.3 ± 0.1 b	39.9 ± 0.1 c	41.0 ± 0.1 a	< 0.05
	♂	40.3 ± 0.1 b	40.1 ± 0.1 b	40.8 ± 0.1 a	< 0.05
HM (% BM)	♀	0.7 ± 0.1 b	0.8 ± 0.1 ab	0.9 ± 0.1 a	< 0.05
	♂	0.8 ± 0.1 b	0.9 ± 0.1 ab	1.1 ± 0.03 a	< 0.05
LM (% BM)	♀	0.6 ± 0.03	0.6 ± 0.01	0.6 ± 0.03	ns
	♂	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.02	ns
BM (g)	♀	287.6 ± 11.6 b	372.6 ± 19.2 a	285.7 ± 20.6 b	< 0.05
	♂	334.6 ± 14.1 b	390.4 ± 12.3 a	270.9 ± 12.9 c	< 0.05

Different letters represent statistical differences in comparing chicks of the same sex and parameter. Significance level (P≤0.05).

3D animals

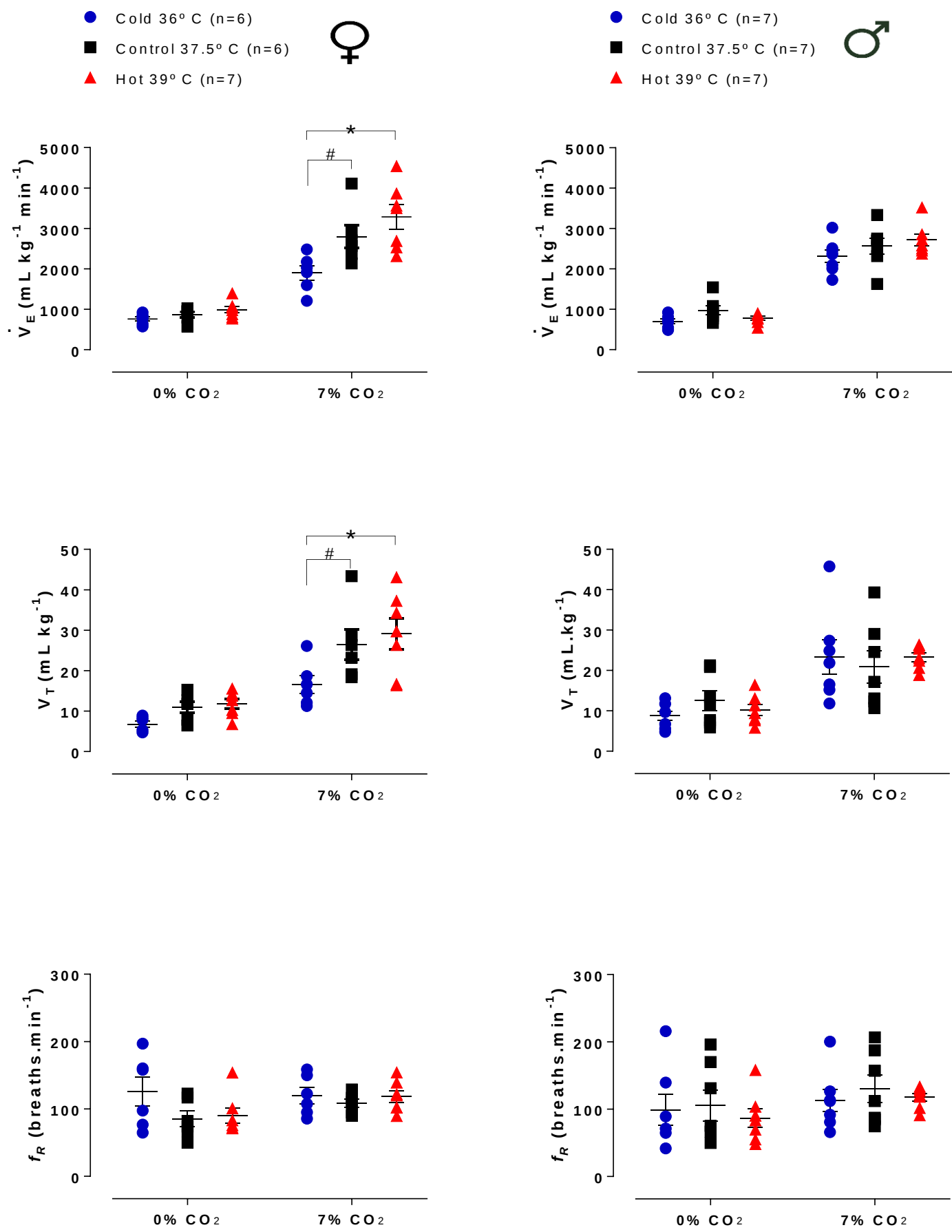


FIGURE 1

14D animals

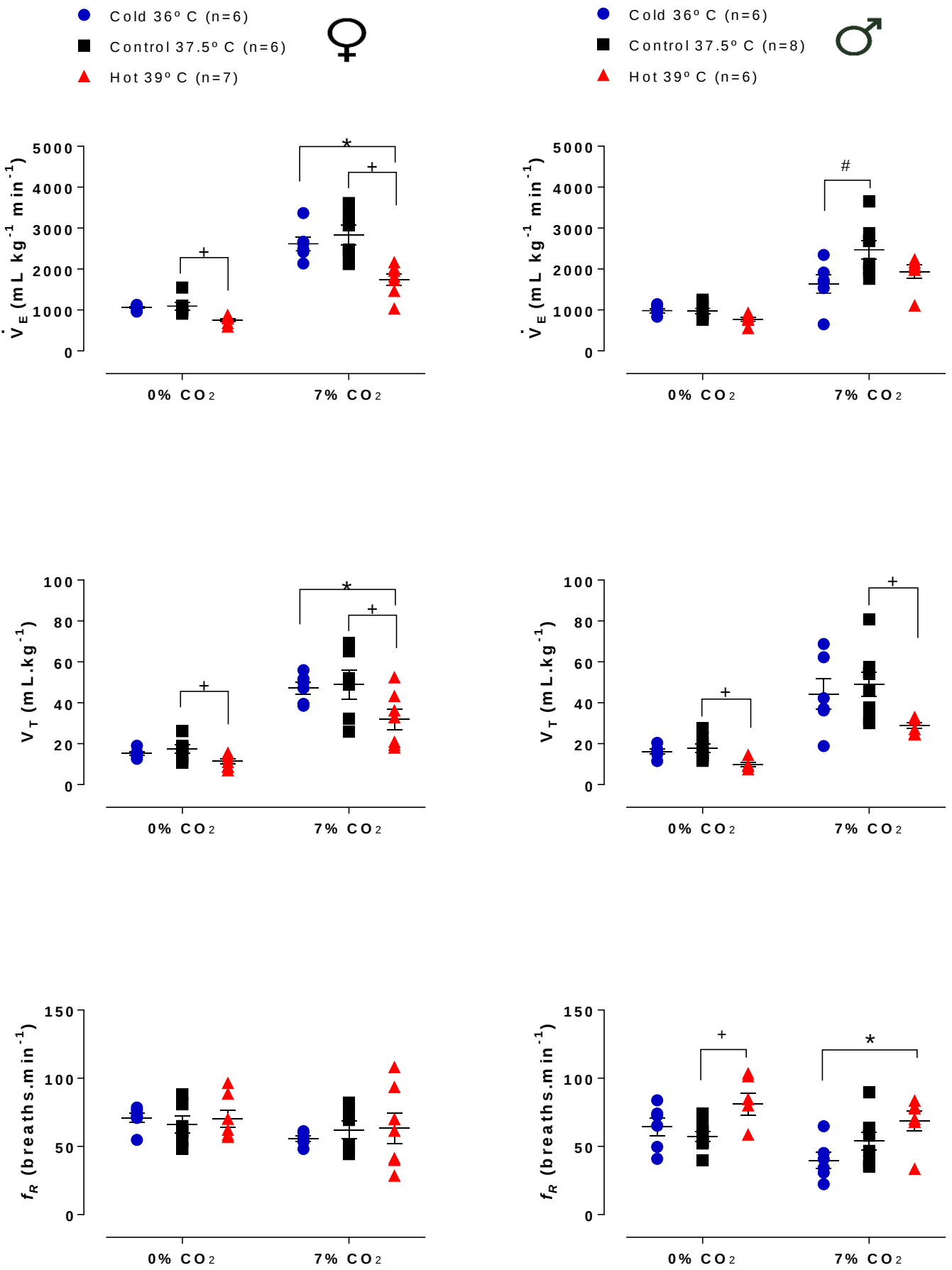


FIGURE 2

3D animals

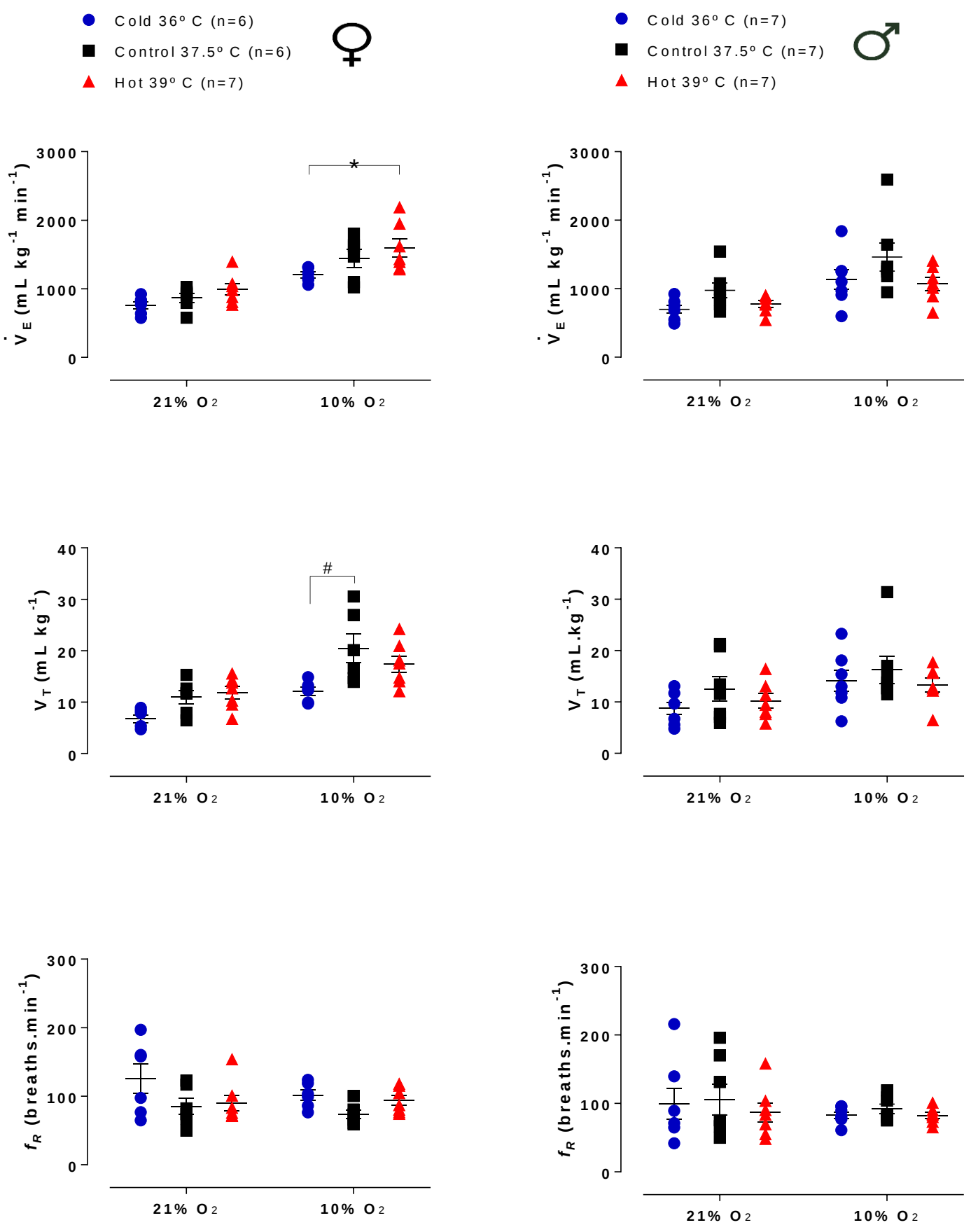


FIGURE 3

14D animals

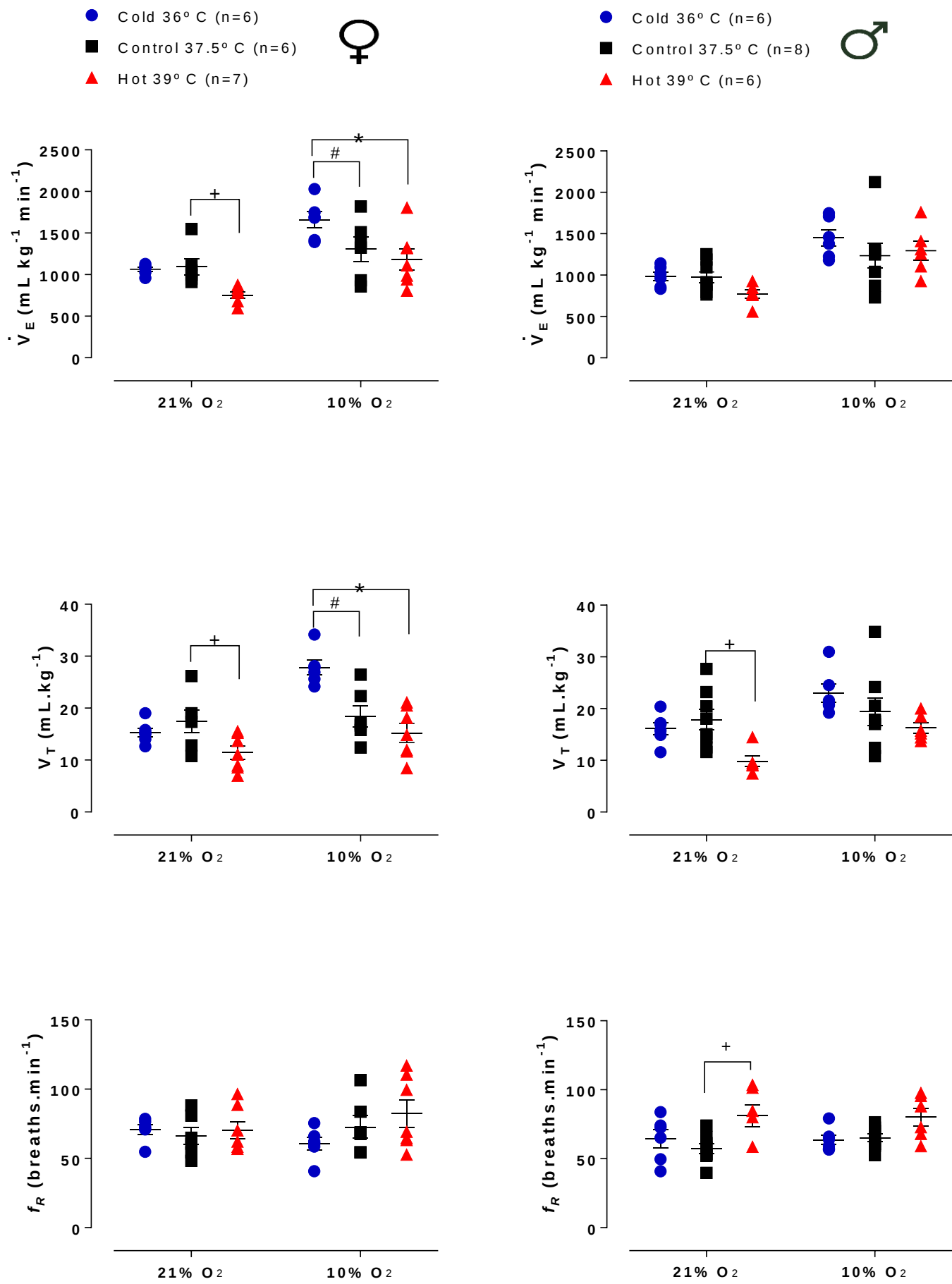
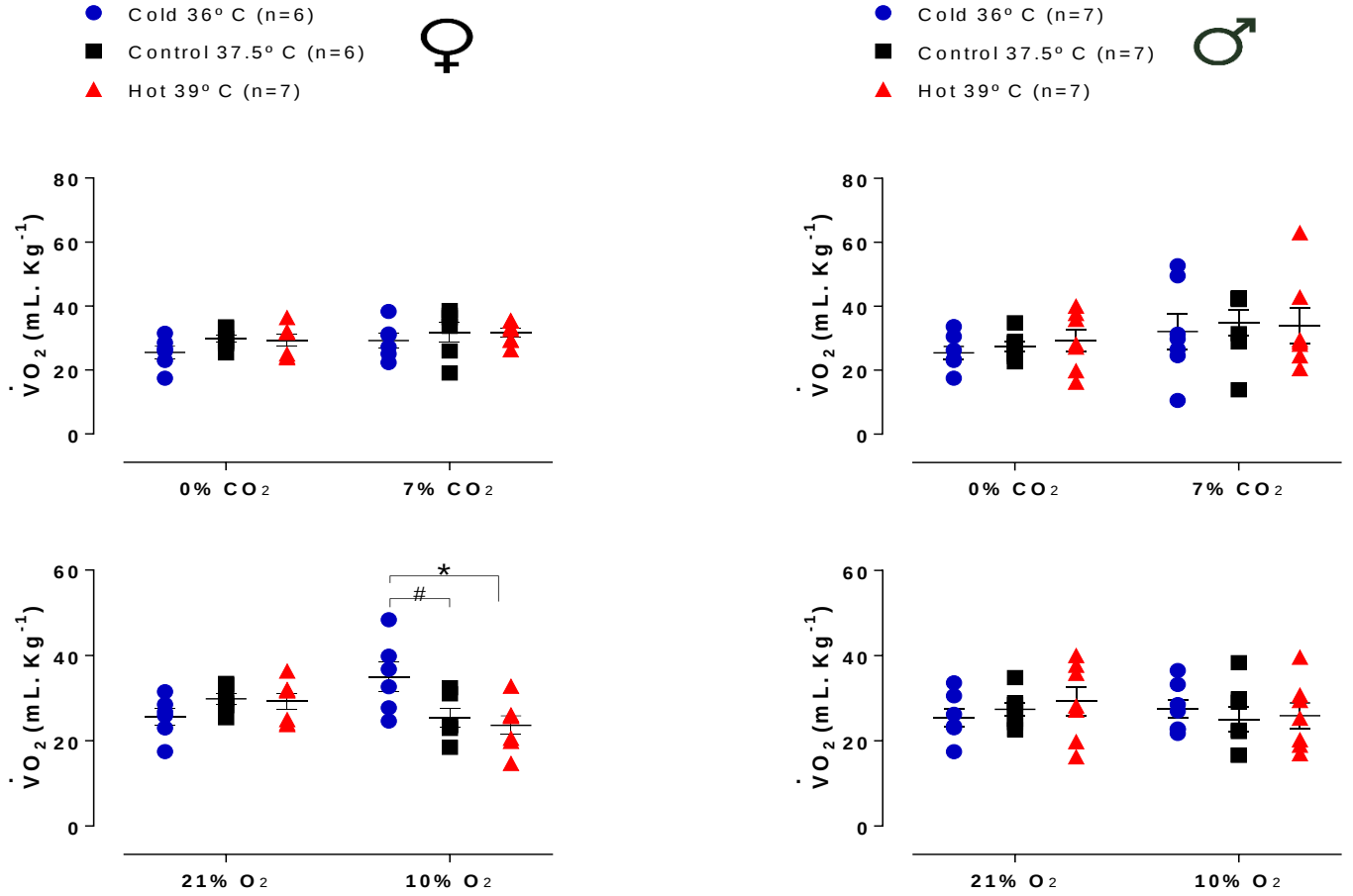


FIGURE 4

3D animals

A



B

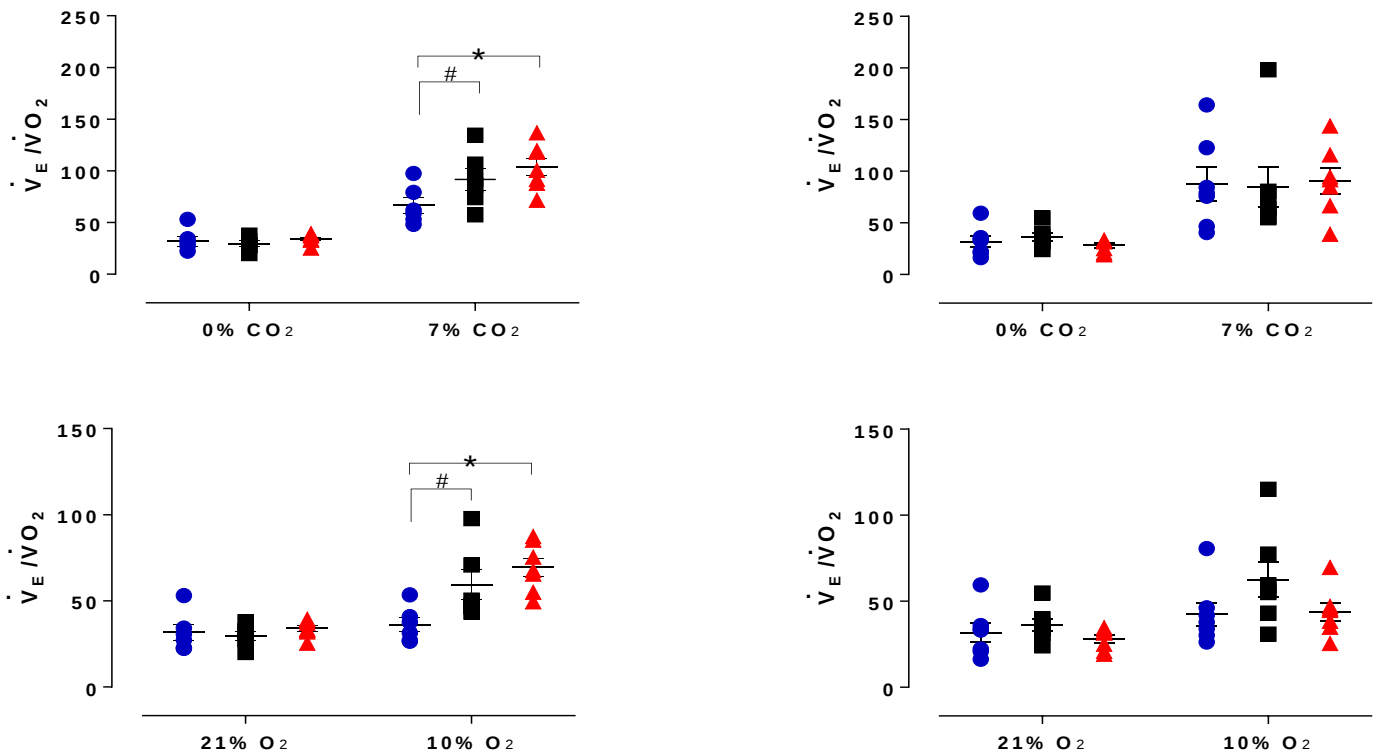


FIGURE 5

14D animals

A

● Cold 36° C (n=6)

■ Control 37.5° C (n=6)

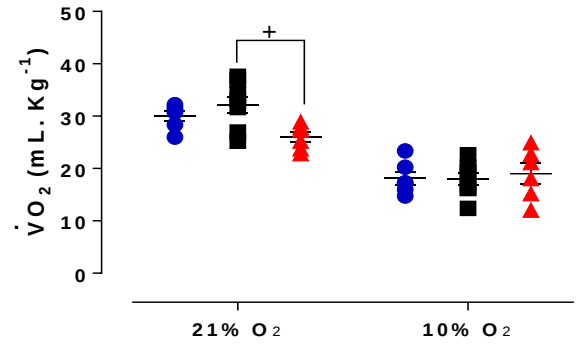
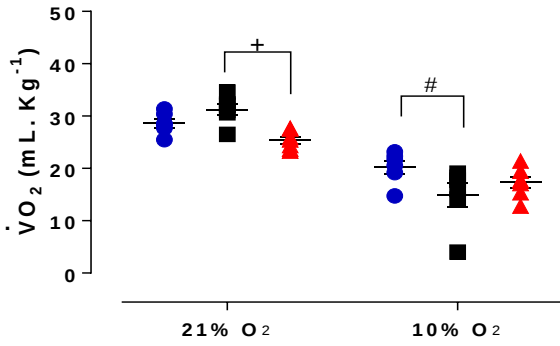
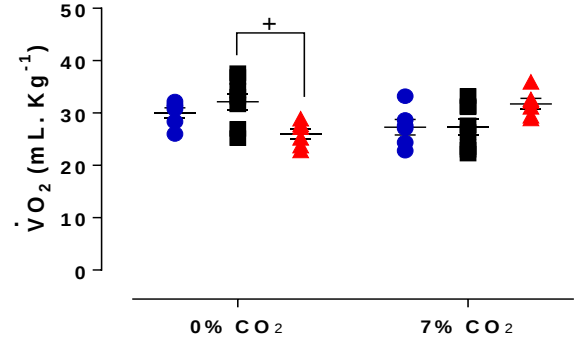
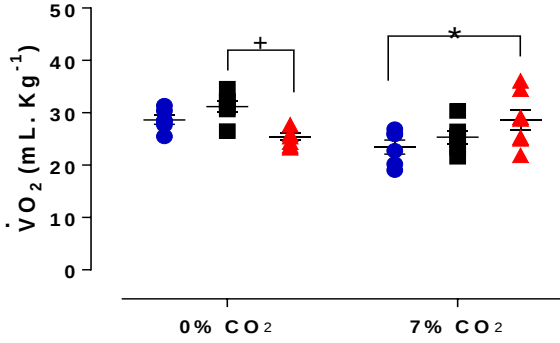
▲ Hot 39° C (n=7)



● Cold 36° C (n=6)

■ Control 37.5° C (n=8)

▲ Hot 39° C (n=6)



B

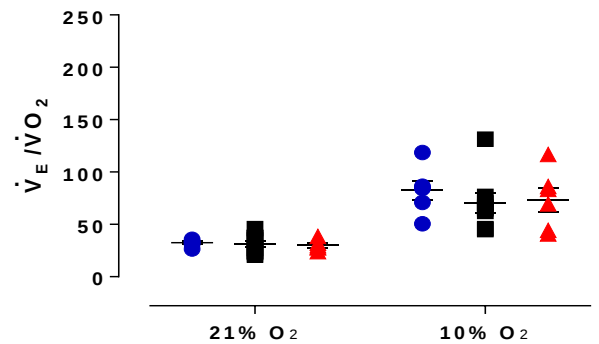
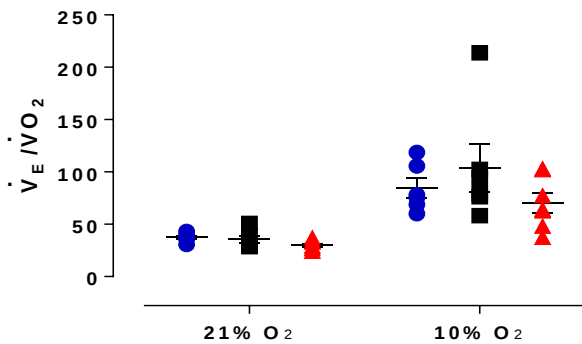
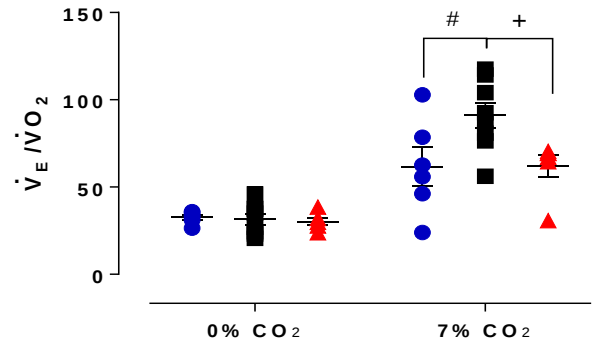
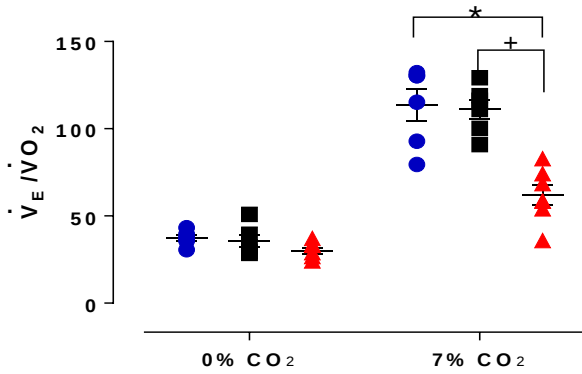
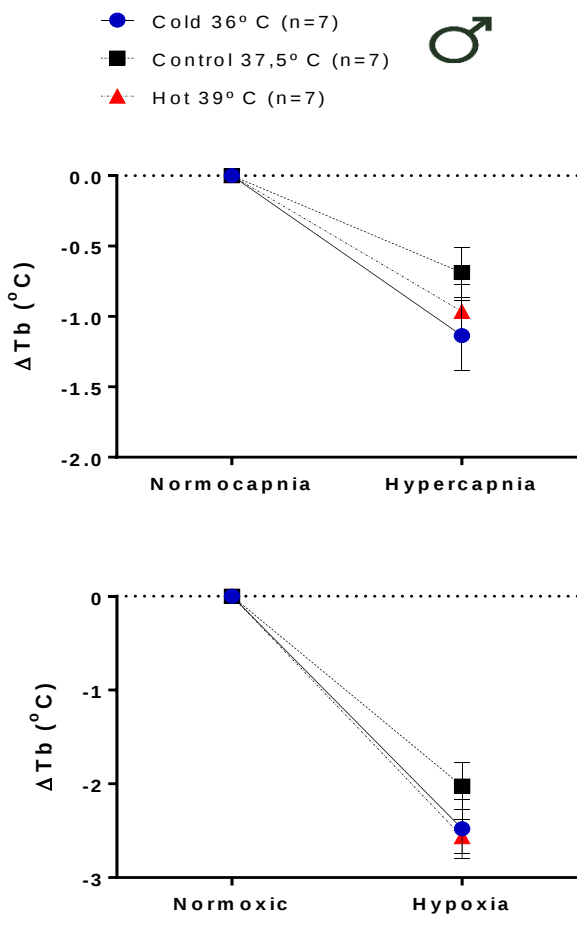
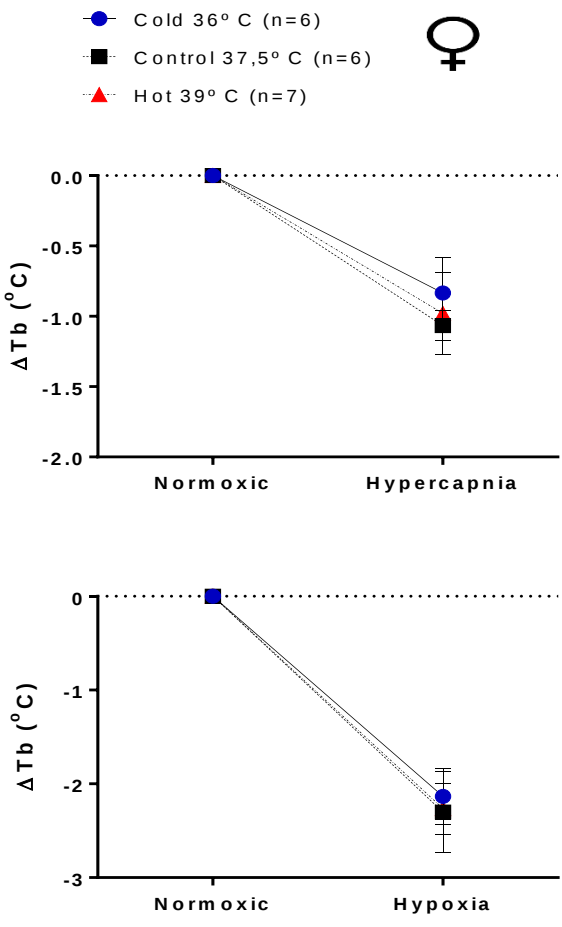


FIGURE 6

3D animals

A



14D animals

B

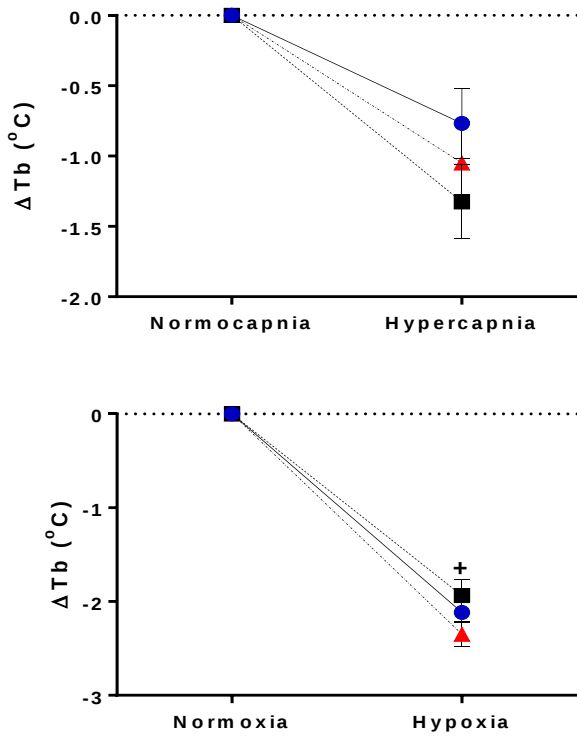
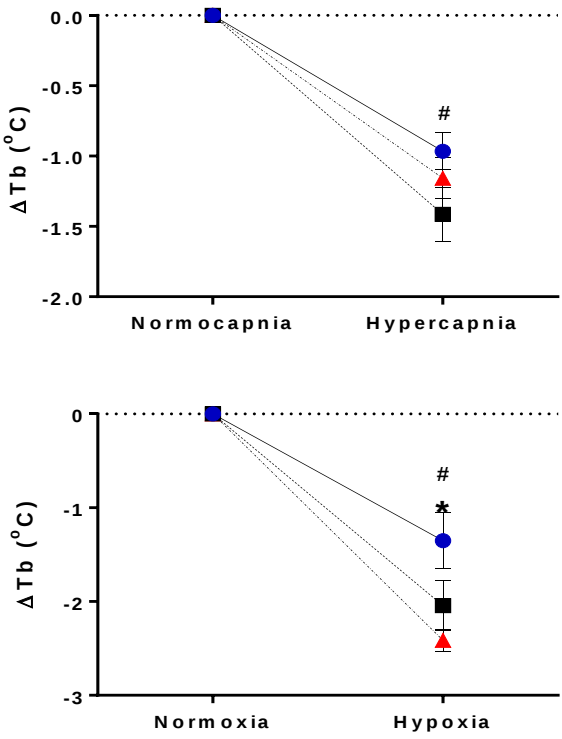


FIGURE 7

Resumo dos dados

Machos

Idade	Tratamentos	Normocapnia/ Normoxia	Hipercapnia (7% CO ₂)	Hipóxia (10% O ₂)
3d	36 °C	-	-	-
	39 °C	-	-	-
14d	36 °C	> BM	< $\dot{V}_E$, < $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$	-
	39 °C	< $\dot{V}O_2$ >HM, >Tb, <BM	< $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$	<Tb

Fêmeas

Idade	Tratamentos	Normocapnia/ Normoxia	Hipercapnia (7% CO ₂)	Hipóxia (10% O ₂)
3d	36 °C	>BM	< $\dot{V}_E$, < $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$	> $\dot{V}O_2$, < $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$
	39 °C	-	-	-
14d	36 °C	> BM, <Tb	>Tb	> $\dot{V}_E$, > $\dot{V}O_2$, >Tb
	39 °C	< $\dot{V}_E$, < $\dot{V}O_2$ >HM, >Tb	< $\dot{V}_E$, < $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$	-