



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO INTEGRADO EM ZOOTECNIA

MESTRADO

**MANIPULAÇÃO TÉRMICA SOBRE A EXPRESSÃO DOS GENES
DO CRESCIMENTO E CHOQUE TÉRMICO DURANTE O
PERÍODO EMBRIONÁRIO E PÓS-NATAL EM CODORNAS**

JOSÉ WELLINGTON RODRIGUES LIMA JÚNIOR

SÃO CRISTÓVÃO – SE
2023

JOSÉ WELLINGTON RODRIGUES LIMA JÚNIOR

**MANIPULAÇÃO TÉRMICA SOBRE A EXPRESSÃO DOS GENES
DO CRESCIMENTO E CHOQUE TÉRMICO DURANTE O
PERÍODO EMBRIONÁRIO E PÓS-NATAL EM CODORNAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Integrado em Zootecnia como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Del Vesco

SÃO CRISTÓVÃO – SE
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

L732m Lima Júnior, José Wellington Rodrigues.
Manipulação térmica sobre a expressão dos genes do crescimento e choque térmico durante o período embrionário e pós-natal em codornas / José Wellington Rodrigues Lima Júnior ; orientadora Ana Paula Del Vesco. – São Cristóvão, SE, 2023.
43 f. : il.

Dissertação (mestrado integrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Sergipe, 2023.

1. Zootecnia. 2. Codornas. 3. Estresse oxidativo. 4. Embriologia - Aves. I. Del Vesco, Ana Paula, orient. II. Título.

CDU 636.6

JOSÉ WELLINGTON RODRIGUES LIMA JÚNIOR

MANIPULAÇÃO TÉRMICA SOBRE A EXPRESSÃO DOS GENES DO
CRESCIMENTO E CHOQUE TÉRMICO DURANTE O PERÍODO
EMBRIONÁRIO E PÓS-NATAL EM CODORNAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação Integrado em
Zootecnia como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Zootecnia.

Aprovado em: 28/02/2023

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Del Vesco
Universidade Federal de Sergipe

Dr^a. Angélica Souza Khatlab
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Eliane Gasparino
Universidade Estadual de Maringá

Dr^a. Marisa Silva Bastos
Universidade Federal de Sergipe

DEDICO

A Deus, por ser essencial em minha vida e ter proporcionado todos os acontecimentos que me fizeram chegar até aqui.
Ao meu pai José Wellington Rodrigues Lima, à minha mãe Albertina Araújo matos e às minhas únicas e queridas irmã e sobrinha, por sempre estarem ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primordialmente a Deus pela sua magnificência, sempre me guiando, me fortalecendo e encorajando na minha jornada aqui na terra.

Aos meus pais, Albertina e José Wellington, obrigado por serem os melhores do mundo.

À minha irmã, Amerina, grande amiga e cúmplice em todas as minhas escolhas, sou grato por tudo.

À Universidade Federal de Sergipe, em especial ao Programa de Pós-Graduação Integrado em Zootecnia pela oportunidade e conhecimentos adquiridos.

À “profe” Ana Paula, por toda a orientação, paciência, ajuda e apoio em toda a minha jornada acadêmica na Universidade Federal de Sergipe. Sou extremamente grato.

Ao Prof. Dr. Jonatan Mikhail, grande amigo que foi de grande importância no meu aprendizado experimental e científico, me ajudando em tudo que eu precisava.

À Marisa, por ser uma pessoa incrível e sempre ter disposição em me ajudar em tudo que eu precisasse na minha dissertação.

À Angélica, por todo acompanhamento experimental, todos os conselhos, ensinamentos e paciência, sempre estando disposta à ajudar.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Sergipe, por todos os ensinamentos.

Aos professores integrantes da banca de qualificação e defesa, por todas as sugestões e ensinamentos que contribuíram para a minha dissertação.

A todo o grupo de Maringá que ajudaram e foram essencial no processo experimental da minha pesquisa.

A todos os alunos da Universidade Federal de Sergipe que contribuíram de alguma forma nas análises experimental da minha pesquisa, sou extremamente grato a todos e principalmente à Thaís Pacheco.

A todos os meus amigos e colegas do curso de Graduação e Pós-graduação em Zootecnia, Medicina veterinária, Agronomia e Biotecnologia que conviveram comigo durante esta jornada, ajudando e contribuindo com o meu crescimento pessoal e acadêmico.

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, estiveram envolvidos durante a realização deste trabalho. Que Deus os recompensem grandemente!

“Each dream you leave behind is a part of your future that will no longer exist.”

Steve Jobs

BIOGRAFIA

JOSÉ WELLINGTON RODRIGUES LIMA JÚNIOR, filho de José Wellington Rodrigues Lima e Albertina Araujo Matos, nasceu na cidade de Aracaju - SE, em 17 de outubro de 1995. Em 2014, passou a estudar no Instituto Federal de Sergipe Campus Quissamã, formando-se Técnico em Agropecuária no ano de 2016.

Em 2016 ingressou na Universidade Federal de Sergipe, fazendo parte do NEQUI, grupo de estudos em equideocultura, participou da organização de cursos, projetos e congressos. Além de ajudar em projetos de pesquisa voltados a cavalos. Realizou o estágio obrigatório na renomada Flag Is Up Farms Monty Roberts Institution em Solvang, California. Sendo o primeiro estágio obrigatório internacional do Departamento de Zootecnia e um dos pioneiros da Universidade Federal de Sergipe. Realizou experimento no Esquadrão da Polícia Montada de Sergipe, relacionado com exercícios, acupuntura e termografia, o qual serviu como trabalho de conclusão de curso, obtendo o grau de Bacharel em Zootecnia no ano de 2020.

Em 2020, ingressou no Programa de Pós-graduação Integrado em Zootecnia na Universidade Federal de Sergipe, na linha de pesquisa Biotecnologias na Produção Animal, sob orientação da Professora Dra. Ana Paula Del Vesco.

No dia 28 de fevereiro de 2023, submeteu-se à banca examinadora para a defesa de dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Zootecnia.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	1
LISTA DE FIGURAS.....	2
RESUMO.....	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUÇÃO.....	5
Embriogênese aviária.....	5
Genes de crescimento.....	6
Parâmetros importantes na incubação.....	7
Temperatura de incubação.....	9
Proteínas de choque térmico (HSPs).....	10
OBJETIVOS.....	12
Objetivo Geral:.....	12
Objetivos Específicos:.....	12
MATERIAL E MÉTODOS.....	13
Matrizes.....	13
Incubação.....	13
Pós-eclosão.....	14
Expressão gênica.....	15
Análise estatística.....	16
RESULTADOS.....	17
DISCUSSÃO.....	22
CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de primers utilizados na reação de qRT-PCR.....	16
Tabela 2 – Peso do ovo, peso corporal e peso relativo dos órgãos (média ± DP) de embriões coletados aos 16 e 18 dias de incubação.....	18
Tabela 3 – Peso corporal e peso relativo dos órgãos (média ± DP) de pintainhos aos 15 dias de vida.....	20

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Efeito da temperatura de incubação sobre a taxa de eclosão de ovos de codorna sob diferentes temperaturas de incubação (CTL: temperatura de incubação controle – 37,5°C e AT: alta temperatura de incubação – 38,5°C). Os resultados são apresentados como média e erro padrão. *Significante pelo teste de F ($P<0,05$).17
- Figura 2 – Efeito da temperatura de incubação sobre a expressão dos genes receptor para o hormônio do crescimento (*GHR*), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (*IGF1*) e proteína do choque térmico de 70 kDa (*HSP70*) em embriões de codornas com 16 dias (E16) e 18 dias (E18), sob diferentes temperaturas de incubação (CTL: temperatura de incubação controle – 37,5°C e AT: alta temperatura de incubação – 38,5°C). Os resultados são expressos como unidade arbitrária (UA) e são apresentados como a média e o erro padrão. *Significante pelo teste de F ($P<0,05$).....19
- Figura 3 – Peso dos pintainhos de codorna com 1 dia de idade incubados sob diferentes temperaturas (CTL: temperatura de incubação controle – 37,5°C e AT: alta temperatura de incubação – 38,5°C).20
- Figura 4 – Efeito da temperatura de incubação sobre a expressão dos genes receptor para o hormônio do crescimento (*GHR*), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (*IGF1*) e proteína do choque térmico de 70 kDa (*HSP70*) em pintainhos com 15 dias de idade oriundos de ovos incubados em diferentes temperaturas de incubação (CTL: temperatura de incubação controle – 37,5°C e AT: alta temperatura de incubação – 38,5°C). Os resultados são expressos como unidade arbitrária (UA) e são apresentados como a média e o erro padrão. *Significante pelo teste de F ($P<0,05$).....21

RESUMO

O estresse térmico é uma das principais fontes de estresse oxidativo. Estudos demonstram que o estresse térmico durante o período embrionário afeta significativamente a fisiologia animal, podendo causar prejuízos ao desenvolvimento corporal. As proteínas de choque térmico (HSPs) são importantes para o organismo do animal por proporcionar proteção celular contra o estresse térmico por meio de diferentes mecanismos, incluindo o desenvolvimento de termotolerância, a modulação de vias de sinalização apoptóticas e antiapoptóticas e a regulação de condições redox celulares. Dessa forma, nosso objetivo foi avaliar os efeitos da temperatura de incubação sobre o desempenho produtivo da progênie por meio das seguintes análises: taxa de eclosão total, peso ao nascimento, porcentagem de saco vitelínico residual nas idades embrionárias de 16 e 18 dias, peso relativo de órgãos e a expressão dos genes receptor do hormônio do crescimento (*GHR*), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (*IGFI*) e proteína do choque térmico de 70 kDa (*HSP70*). Para isso, foram utilizados 200 ovos de codornas (*Coturnix coturnix japonica*) incubados em duas temperaturas diferentes: 37,5°C (controle – CTL, $n = 100$) e 38,5°C (alta temperatura – AT, $n = 100$). No 16º e 18º dia de incubação, os ovos foram pesados e 6 embriões de cada idade, foram selecionados aleatoriamente de cada incubadora (CTL e AT), em seguida foram pesados e os órgãos foram extraídos para a pesagem e análise de expressão gênica (fígado). Após a eclosão, 120 pintainhos saudáveis foram pesados logo ao nascer e separados em 2 tratamentos referentes a temperatura de incubação (CTL, $n = 60$ aves; e AT, $n = 60$ aves). Aos 15 dias de vida, 6 aves de cada tratamento foram selecionados aleatoriamente, pesados e abatidos para a coleta de órgãos a serem utilizados nas análises de peso relativo de órgãos e de expressão gênica. A presente pesquisa mostrou que os embriões incubados em AT tiveram maior taxa de eclosão total ($74,36 \pm 20,52\%$) que os ovos incubados em CTL ($65,00 \pm 18,36\%$) ($P < 0,05$). Foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) em relação ao peso relativo dos órgãos entre os tratamentos AT e CTL tanto na idade embrionária E16 quanto E18. Os embriões de ovos incubados em AT na idade E16 apresentaram maior peso embrionário (PE), peso relativo do trato intestinal (PRTI) e peso relativo do proventrículo + moela (PRPM) e os embriões incubados em temperatura CTL apresentaram maior peso relativo do saco vitelino (PRSV) e peso relativo do coração (PRC) ($P < 0,05$). Na idade embrionária E18, os embriões de ovos incubados em CTL apresentaram maior peso do ovo (PO) e PRSV e os embriões de ovos incubados em AT apresentaram maior peso relativo do fígado (PRF) e PRC ($P < 0,05$). Os pintainhos com 15 dias de idade oriundos de ovos que foram incubados na CTL, demonstraram ter maiores valores de PRF, peso relativo do baço (PRB) e PRTI quando comparados com aqueles pintainhos oriundos de ovos incubados em AT ($P < 0,05$). Os resultados de expressão gênica no fígado mostraram que os embriões com idade E16 incubados em alta temperatura apresentaram maior expressão dos genes *GHR* e *HSP70* ($P < 0,05$) quando comparados aos embriões incubados em temperatura controle. Já, os embriões com idade E18, assim como os pintainhos com 15 dias de vida, a alta temperatura de incubação resultou em maior expressão dos genes *GHR* e *IGFI* ($P < 0,05$). Assim, podemos concluir que a temperatura de incubação pode influenciar parâmetros importantes no desenvolvimento embrionário com consequências também no período de pós-eclosão.

PALAVRAS CHAVES: Aves, Embriogênese, Estresse oxidativo, Hormônios do crescimento, Incubação, Proteínas do choque térmico, Zootecnia.

ABSTRACT

Heat stress is one of the main sources of oxidative stress. Studies have shown that heat stress during the embryonic period significantly affects animal physiology and may impair body development. Heat shock proteins (HSPs) are important for the animal's organism for providing cellular protection against heat stress through different mechanisms, including developing thermotolerance, modulation of apoptotic and anti-apoptotic signaling pathways, and regulation of redox conditions cell phones. Thus, our objective was to evaluate the effects of incubation temperature on the productive performance of the progeny through the following analyses: total hatching rate, birth weight, percentage of residual yolk sac at embryonic ages of 16 and 18 days, the relative weight of organs and expression of growth hormone receptor gene (*GHR*), insulin-like growth factor 1 (*IGFI*) and heat shock protein 70 kDa (*HSP70*) genes. For this, 200 quail eggs (*Coturnix coturnix japonica*) were incubated at two different temperatures: 37.5°C (control - CTL, $n = 100$) and 38.5°C (high temperature - AT, $n = 100$). On the 16th and 18th day of incubation, the eggs were weighed and 6 embryos of each age were randomly selected from each incubator (CTL and AT), then they were weighed and the organs were extracted for weighing and gene expression analysis (liver). After hatching, 120 healthy chicks were weighed at birth and divided into 2 treatments according to incubation temperature (CTL, $n = 60$ birds; and AT, $n = 60$ birds). At 15 days of life, 6 birds from each treatment were randomly selected, weighed and slaughtered for the collection of organs to be used in the analysis of relative weight of organs and gene expression. The present study showed that embryos incubated in AT had a higher total hatching rate ($74.36 \pm 20.52\%$) than eggs incubated in CTL ($65.00 \pm 18.36\%$) ($P < 0.05$). Significant differences ($P < 0.05$) were observed in relation to the relative weight of the organs between the AT and CTL treatments both at E16 and E18 embryonic ages. Embryos from eggs incubated in AT at age E16 had higher embryonic weight (PE), relative intestinal tract weight (PRTI), and relative weight of proventriculus + gizzard (PRPM), and embryos incubated at CTL temperature had higher relative yolk sac weight (PRSV) and relative heart weight (PRC) ($P < 0.05$). At embryonic age E18, embryos from eggs incubated in CTL had higher egg weight (PO) and PRSV, and embryos from eggs incubated in AT had higher relative liver weight (PRF) and PRC ($P < 0.05$). Chicks with 15 days of age from eggs that were incubated in the CTL, were demonstrated to have higher values of PRF, relative spleen weight (PRB), and PRTI when compared to those chicks from eggs incubated in AT ($P < 0.05$). The results of gene expression in the liver showed that embryos aged E16 incubated at high temperature showed higher expression of genes *GHR* and *HSP70* ($P < 0.05$) when compared to embryos incubated at control temperature. As for embryos aged E18, as well as chicks aged 15 days, the high incubation temperature resulted in greater expression of the *GHR* and *IGFI* genes ($P < 0.05$). Thus, we can conclude that the incubation temperature can influence important parameters in embryonic development with consequences also in the post-hatching period.

KEYWORDS: Avians. Embryogenesis. Oxidative stress. Incubation. Heat shock proteins. Growth hormones. Zootechnics.

INTRODUÇÃO

Embriogênese aviária

A embriogênese é o momento de maior importância na vida dos animais. No início do desenvolvimento todos os embriões de vertebrados formam camadas de células a partir das quais todos os tecidos e órgãos serão formados (LAHUNTA e GLASS, 2016). O início desse desenvolvimento é um momento de rápida metilação do DNA à medida que as células proliferam e se diferenciam, alterações causadas por fatores como o estresse térmico nessa fase podem aumentar o risco de defeitos congênitos, principalmente no tubo neural (JAWAID *et al.*, 2021).

A embriogênese aviária é uma plataforma perfeita para examinar os efeitos de fatores exógenos no desenvolvimento embrionário (LI *et al.*, 2021). Em geral, na primeira semana de incubação, o embrião de codorna começa a crescer, há o aparecimento dos primórdios traqueais, vasos sanguíneos na superfície da gema, pigmentação do globo ocular e o embrião torna-se aparente, com pernas e asas formadas, cabeça, corpo e bico claramente diferenciados. Na segunda semana, os dedos dos pés estão completamente separados um do outro, há o alongamento do embrião, a queratinização e o corpo é coberto por penugem. Na última semana, o embrião continua a crescer, o volume de líquido amniótico começa a diminuir, a célula de ar é perfurada pelo bico, a respiração pulmonar começa, e o filhote sai do ovo (BAI *et al.*, 2016).

Durante o desenvolvimento inicial, os embriões de aves dependem exclusivamente dos componentes do ovo para crescimento e desenvolvimento. A gema é um desses componentes, e apresenta uma infinidade de elementos, como lipídios, carboidratos, hormônios e anticorpos, que são fisiologicamente relevantes para o embrião em crescimento (BUZALA *et al.*, 2015). Fatores relacionados a incubação, como por exemplo a temperatura, umidade e oxigênio podem interferir no aproveitamento adequado dos nutrientes da gema, causando impacto direto sobre o desenvolvimento e metabolismo embrionário (JANISCH *et al.*, 2015). Esses fatores, podem no final da incubação apresentar cerca de metade do total de mortes durante todo o processo de incubação, sendo o principal fator dessas mortes, a aceleração do metabolismo oxidativo, devido a conversão da respiração corioalantóica do embrião dentro do ovo, para a respiração pulmonar (LI *et al.*, 2020). Sob essas condições de estresse, as proteínas do choque térmico (HSPs) interagem com as proteínas celulares para mantê-las adequadamente unidas e funcionais, exibindo, portanto, uma contribuição importante para a integridade celular, assim a HSP é um biomarcador promissor para avaliar como um organismo pode manter o

funcionamento celular sob desafios ambientais e condições de desnaturação de proteínas (AKBARIAN *et al.*, 2016).

A glândula tireoide é a primeira glândula endócrina a aparecer durante o desenvolvimento. Essa glândula consiste em dois tipos de células, as foliculares que sintetizam os hormônios triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) e parafoliculares produtoras de calcitonina (MAEDA *et al.*, 2015). Durante o desenvolvimento embrionário das aves, os hormônios tireoidianos coordenam a expressão de uma infinidade de genes, garantindo assim que a sequência correta de proliferação, diferenciação e maturação celular seja seguida em cada tecido e órgão (BUZALA *et al.*, 2015). Como resultado, a expressão intempestiva ou tardia dos genes relacionados a esse hormônios pode comprometer o desenvolvimento e o funcionamento de órgãos importantes de forma persistente e irreversível (DARRAS, 2019).

Os hormônios tireoidianos são essenciais para o desenvolvimento correto de quase todas as estruturas do corpo do embrião desde os primeiros estágios de desenvolvimento, são ainda reguladores endócrinos cruciais no desenvolvimento muscular dos embriões e do processo de eclosão e metabolismo pós-eclosão (BELNAP *et al.*, 2019). Estudos também mostram que as taxas de sobrevivência do embrião melhoram quando os níveis de hormônios tireoidianos embrionários aumentam (BUZALA *et al.*, 2015; HEGAB *et al.*, 2019).

Genes de crescimento

Um papel importante na regulação do crescimento animal também é desempenhado pelo sistema neuroendócrino, em particular o eixo hipotálamo-hipófise-somatotrófico. O hormônio do crescimento (GH) ou somatotrofina é um potente hormônio proteico anabolizante secretado pelas células da hipófise anterior, age principalmente na cartilagem epifisária para crescimento dos ossos longos e músculos, aumentando a massa muscular (KASUYA, 2016). Ele pode agir de forma direta ao se ligar aos seus receptores (GHR), ou ainda, de forma indireta pelo estímulo da produção hepática dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF), que estimula o crescimento das aves (BUZALA *et al.*, 2015). O principal controle neuroendócrino da expressão do GH pelas células somatotróficas é realizado pelo hormônio liberador de GH (GHRH) que estimula a transcrição gênica do *GH* via aumento de AMPc intracelular e ativação da proteína quinase A (KASUYA, 2016).

Estressores externos, como estresse térmico, podem afetar os processos envolvidos na produção de IGF1 com base no impacto negativo na microbiota intestinal e nas atividades das enzimas antioxidantes. HUMAM *et al.* (2019) mostraram que aves estressadas pelo calor sem suplementação pós-biótica apresentaram expressão significativamente menor de *IGF1*,

indicando que a expressão do mesmo pode ser aplicada como base para um índice de crescimento em frangos de corte estressados pelo calor.

O fator de crescimento semelhante a insulina tipo I sinaliza que há nutriente disponível para a célula, para estimular a síntese proteica e a proliferação celular. Um efeito concomitante das mudanças na ingestão de carboidratos é o efeito indireto que ocorre como resultado das mudanças na secreção de insulina. Isso ocorre porque a síntese de IGF1 no fígado também é regulada pela insulina (CLEMMONS, 2012). Outros hormônios que regulam a bioatividade do IGF1 incluem o cortisol, que antagoniza as ações do IGF1 e, portanto, pode resultar em um aumento nas concentrações séricas do mesmo, e a tiroxina, que é necessária para a biossíntese normal do IGF-1 (CLEMMONS, 2012).

O IGF1 controla o crescimento do músculo esquelético, que é produzido sob o controle de GH e GHR. Estimulando a hipertrofia muscular esquelética e inibe a atrofia muscular (HAFEZ *et al.*, 2022). As características de crescimento e carcaça estão entre as características econômicas mais importantes que estão sujeitas a uma quantidade significativa de controle genético (XU *et al.*, 2013). A regulação genética das características de crescimento é monitorada pelo genótipo da raça e pela via dos genes do eixo somatotrópico, GH e IGF1 (EL-ATTROUNY *et al.*, 2020).

Assim, o GH pituitário controla as concentrações de IGF1 e T3 no corpo; no entanto, o crescimento também é dependente do efeito imediato do T4 e de sua forma ativa, o T3, juntamente com a interação entre os hormônios tireoidianos e o eixo GH-IGF1 (BUZALA *et al.*, 2015). Por isso, a miogênese embrionária é caracterizada pela proliferação dos mioblastos (células musculares), e após a eclosão um alto número de fibras musculares são alcançadas através da hipertrofia. Estes processos são regulados pela expressão de genes como o proteína nuclear embrionária musculoesquelética 1 (*MUSTN1*), GH e IGF1 e suas inter-relações (ZHU *et al.*, 2020).

Parâmetros importantes na incubação

É amplamente aceito que a massa muscular final e a eclodibilidade são determinadas pelo ambiente embrionário. Fatores como a idade dos pais, duração do armazenamento dos ovos ou armazenamento e temperatura de incubação (HYANKVA *et al.*, 2015), viragem do ovo (MORAES *et al.*, 2008; SHOJAEI *et al.*, 2015), umidade relativa do ar (BAI *et al.*, 2016; BURGGREN e ELMONOUFY, 2017; ABUOGHABA *et al.*, 2021), e peso dos ovos (UÇAR *et al.*, 2020) são conhecidos por afetar a qualidade dos ovos e a taxa de desenvolvimento

embrionário, bem como também poderiam modificar o efeito do tamanho do ovo no desenvolvimento embrionário e no sucesso da eclosão.

O desenvolvimento do embrião, as características dos pintinhos (peso ao nascer e qualidade do pintinho) e a eclodibilidade estão associados, entre outros fatores ao peso do ovo incubado (HANAFY *et al.*, 2019). As diferenças observadas nessas características também dependem da genética da linhagem, que pode afetar a produção e parâmetros dos ovos, desenvolvimento embrionário e parâmetros dos pintinhos (GRZEGRZÓŁKA e GRUSZCZYŃSKA, 2019).

A codorna japonesa (*Coturnix coturnix japonica*) é a menor espécie aviária criada para produção de ovos e carne, e também assumiu importância mundial como animal de laboratório. Estas aves têm sido amplamente utilizadas para estudos biológicos e genéticos por apresentarem vantagens como tamanho corporal pequeno, fácil manejo e grande número de aves podem ser mantidas em um espaço limitado (ALKAN *et al.*, 2013). Além disso, as codornas japonesas se desenvolvem mais rápido que as aves da espécie *Gallus gallus domesticus* (galinhas), atingem a maturidade sexual em cerca de 8 semanas, contra os 5 a 6 meses necessários para as galinha (ABUALI *et al.*, 2019).

Adequada condição de incubação é essencial para que as codornas se desenvolvam na sua melhor performance (WANG *et al.*, 2019). Considerando que espécies avícolas comerciais, como as codornas, passam quase metade de sua vida total dentro do ovo, fatores que interferem no desenvolvimento embrionário podem afetar o desempenho e a saúde pós-eclosão dessas aves (CRUZ *et al.*, 2019). Experiências precoces, incluindo o ambiente pré-natal, são conhecidas por influenciar uma ampla variedade de mecanismos envolvidos na elaboração do fenótipo (BELNAP *et al.*, 2019).

Condições inadequadas de criação no início da vida podem levar ao desenvolvimento de consequências desfavoráveis na saúde e no bem-estar animal. O ambiente pré-natal é conhecido por influenciar o fenótipo adulto em várias espécies, em parte por mecanismos epigenéticos. Esses mecanismos participam da regulação da expressão gênica e podem induzir modificações do fenótipo. Modificações no ambiente do embrião, como a presença de contaminantes químicos, por exemplo, podem induzir mudanças epigenéticas durante o desenvolvimento de células somáticas e eventualmente de células germinativas afetando a prole das próximas gerações (CRUZ *et al.*, 2019; CERUTTI *et al.*, 2022).

Nos últimos anos, um número crescente de estudos mostrou que a informação epigenética pode ser transmitida através das gerações, assim alguns efeitos induzidos por estressores

ambientais podem ser transmitidos entre gerações (LEROUX *et al.*, 2017; SANTANA *et al.*, 2021; CERUTTI *et al.*, 2022).

Temperatura de incubação

Numerosos estudos demonstraram que a temperatura de incubação é o fator ambiental mais importante para a embriogênese aviária. Para que exista uma incubação adequada, os parâmetros, como temperatura, umidade, ventilação e viragem dos ovos em uma incubadora devem ser ideais (RAMLI *et al.*, 2015; HOPE *et al.*, 2018; SANJAYAN *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2021).

A temperatura de incubação é um dos fatores físicos mais importantes que afetam o crescimento embrionário e a formação de fibras musculares durante a miogênese embrionária (LIU *et al.*, 2015; BEN-EZRA *et al.*, 2017; BELNAP *et al.*, 2019). Temperatura mais alta durante a incubação pode acelerar o crescimento e desenvolvimento muscular. Esses resultados podem ser explicados pela expressão de marcadores de proliferação, como Pax-7 e fatores reguladores miogênicos (CHOI *et al.*, 2016). Curiosamente, a cultura de células miogênicas primárias em uma temperatura de incubação mais alta conserva o fenótipo de fibra muscular lenta do músculo aviário embrionário inicial (CHOI *et al.*, 2016).

Segundo estudos realizados com codornas, para que ocorra o adequado desenvolvimento embrionário, os ovos férteis são colocados em incubadora com controle totalmente automático para incubação e com temperatura ideal recomendada para a espécie, em torno de 37,8°C não variando mais que 0,3 °C, e umidade relativa média entre 55 a 65% (MORAES *et al.*, 2008; ALKAN *et al.*, 2013; SHOJAEI *et al.*, 2015; EZRA *et al.*, 2017; REYNA *et al.*, 2017; MAMAN *et al.*, 2018; ABUALI *et al.*, 2019; HANAFY *et al.*, 2019; HEGAB *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2021; SOLIMAN e MADKOUR, 2021).

CAI *et al.* (2019) descreveram brevemente o estágio embrionário inicial em codornas de peito azul e descobriram que a embriogênese desacelerou progressivamente à medida que a temperatura de incubação diminuiu. Semelhante à codorna japonesa, o tempo de incubação da codorna-de-peito-azul é de 16 a 17 dias (STAINTON *et al.*, 2022).

Como o embrião em desenvolvimento é pecilotérmico, qualquer alteração na temperatura de incubação pode afetar o tamanho do embrião (REYNA *et al.*, 2017), período de incubação (ZHAO *et al.*, 2017), o crescimento dos órgãos, a taxa metabólica, o desenvolvimento fisiológico (CARVALHO *et al.*, 2020), o sucesso da eclosão (ALKAN *et al.*, 2013; STIER *et al.*, 2020; EL-SHATER *et al.*, 2021) e também o desenvolvimento da coordenação motora do filhote (BELNAP *et al.*, 2019).

Estudos demonstram que o uso de estresse térmico contínuo durante o período inicial de incubação afeta significativamente a eclodibilidade, o hormônio T3, as reações corporais fisiológicas, peso dos folículos de codornas, tamanho do embrião, o crescimento dos órgãos do corpo, peso do ovo, aumenta a mortalidade embrionária, além de afetar a vida dos animais pós-eclosão interferindo no ganho de peso (BEN-EZRA *et al.*, 2017; ABUOGHABA *et al.*, 2021).

O aumento da temperatura de incubação de ovos de codornas japonesas afetam a sobrevivência embrionária e pós-eclosão, o crescimento, as temperaturas superficiais e as características sanguíneas potencialmente relacionadas à capacidade de termorregulação (CARVALHO *et al.*, 2021). Já em uma manipulação térmica controlada, protocolos intermitentes de manipulação térmica de curto prazo (3-6 h) (39-40 °C) durante a embriogênese inicial melhora o crescimento das fibras musculares do peito e hipertrofia na fase pós-natal aos 35 dias, assim podendo ser recomendados para aumentar o crescimento da massa muscular e o rendimento do músculo do peito em codornas de corte (EL-SHATER *et al.*, 2021).

Proteínas de choque térmico (HSPs)

No organismo animal as proteínas do choque térmico (HSPs), são expressas em diferentes tipos de tecidos e células em resposta a inúmeros fatores, incluindo os distúrbios celulares ocasionados por exemplo pelo estresse oxidativo induzido pelo calor e estão envolvidas em muitas vias promotoras (AKDEMIR *et al.*, 2015). As HSPs são chaperonas moleculares altamente conservadas que servem para manter os processos celulares durante o estresse, incluindo extremos térmicos (KANG e SHIN, 2021). Elas são responsáveis em manter a homeostase proteica dando suporte ao dobramento, manutenção, degradação e transporte de proteínas, sendo sintetizadas em maior parte, após o estresse oxidativo, em uma tentativa de manter a homeostase (GALLETA *et al.*, 2022).

As HSPs são classificados em 6 famílias distintas com base em seus pesos moleculares, HSP27, HSP60, HSP70, HSP90 alfa, HSP90 beta e ubiquitina (VINOTH *et al.*, 2015), além das pequenas proteínas de choque térmico (SHSPs) que são caracterizadas por seu baixo peso molecular (15–40 kDa) (BASAKI *et al.*, 2020).

Segundo a literatura, o estresse térmico leva ao estresse oxidativo, que prejudica o desempenho, aumenta a concentração sérica de colesterol e a proteína nuclear hepática, levando ao início da expressão de *HSPs* em órgãos vitais, com o objetivo de manter a homeostase das reações corporais (AKDEMIR *et al.*, 2015; AL-ZGHOUL e SALEH, 2020). Algumas HSPs são constitutivamente expressas e envolvidas em funções de manutenção. Sob condições de temperatura elevada, as células aumentam significativamente a expressão de

outras HSPs para proteger contra o dano celular associado a esses estressores. A manipulação térmica (TM) durante a embriogênese (pré-natal) induz a memória fisiológica devido à adaptação epigenética à alta temperatura, provocando tolerância térmica melhorada durante a vida pós-natal (VINOTH *et al.*, 2015).

Uma das HSP mais estudadas é a HSP70, que é muito importante para a viabilidade celular durante ambientes estressantes. A expressão de *HSP* é induzida por fatores de transcrição de choque térmico (HSF), como HSF1 e HSF3 (AL-ZGHOUL e SALEH, 2020). O grau de tolerância térmica estimulada está relacionado com a expressão de *HSPs*, e aquela com peso molecular de 70 kDa parece estar mais intimamente associada à tolerância ao calor seguida pela HSP27 e ubiquitina. A hipertermia induzida pela exposição ao calor parece aumentar a atividade e a quantidade do fator de transcrição de choque térmico aumentando a síntese de mRNA *HSPs* (VINOTH *et al.*, 2015).

As proteínas de choque térmico estão associadas aos níveis de corticosterona e ao desempenho do crescimento. A expressão de *HSP70* aumenta em condições estressantes e pode ser usada como um indicador de estresse térmico. Além disso, a proteína HSP70 protege as células impedindo a degradação da função proteica por meio da inibição da agregação de outras proteínas (KANG e SHIN, 2021).

Em estudo realizado por LIU *et al.* (2019), a proteína de choque térmico 70 (HSP70) foi maior nos grupos de pintainhos com 15 dias de idade, que passaram por estresse agudo e crônico pelo frio, o qual causou estresse oxidativo e lesão inflamatória nos tecidos cecais e influenciou a microbiota cecal, assim o aumento da expressão de *HSP70* pode contribuir na proteção do ceco contra o estresse por frio em codornas no estágio inicial. SANTANA *et al.* (2021) encontraram que mães em estresse térmico geraram filhos com maior expressão de *HSP70* do que as mães criadas em condições termoneutras.

Já as proteínas de choque térmico pequenas (SHSPs) são um grupo de HSPs que participam de muitas funções celulares como resposta a diferentes estressores (BASAKI *et al.*, 2020). A participação em muitas funções, como prevenção da agregação de proteínas e muitas outras atividades celulares, como resposta ao estresse, degradação de proteínas, manutenção da integridade do citoesqueleto, morte celular, diferenciação, regulação do ciclo celular, transdução de sinal e desenvolvimento é atribuída as SHSPs.

Assim, a expressão de *HSP* tem sido usada como um indicador de estresse ambiental em organismos vivos. A regulação positiva e o acúmulo de HSP podem melhorar o reparo e a substituição de células danificadas em condições estressantes (KANG e SHIN, 2021).

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Neste estudo, o objetivo geral foi avaliar o efeito de duas temperaturas de incubação sobre o desenvolvimento embrionário e de pintainhos de codornas de postura aos 15 dias de idade.

Objetivos Específicos:

Avaliar os efeitos da temperatura de incubação sobre o desempenho produtivo da progênie, por meio das seguintes análises:

- Peso do ovo;
- Taxa de eclosão;
- Peso ao nascimento;
- Porcentagem de saco vitelino residual dos embriões aos 16 e 18 dias;
- Peso relativo de órgãos (fígado, coração, trato intestinal (delgado e grosso) e proventrículo + moela) dos embriões aos 16 e 18 dias;
- Peso vivo e relativo de órgãos (fígado, coração, baço, bursa de fabricius, pâncreas, trato intestinal (delgado e grosso), e do proventrículo + moela) dos pintainhos aos 15 dias.
- Expressão dos genes relacionados ao crescimento (*GHR* E *IGF1*) e ao estresse térmico (*HSP70*) nos embriões e pintainhos aos 15 dias de idade.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Fazenda Experimental de Iguatemi, da Universidade Estadual de Maringá (Maringá-Paraná, Brasil), de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – no 6098240322) da Universidade Estadual de Maringá, Brasil.

Matrizes

Um total de 200 codornas de postura (*Coturnix coturnix japonica*) sendo 100 fêmeas e 100 machos, obtidas de um criatório comercial, foram criadas em círculos de eucatex (separados por sexo) em ambiente climatizado, com camas forradas com papel corrugado, comedouros do tipo bandeja e bebedouros infantis, do primeiro até os 42 dias de idade. Nesse momento, os animais foram transferidos para o galpão de postura, com paredes laterais de alvenaria com 0,50 m de altura, completadas com tela de arame até o telhado e cortinas laterais móveis, contendo gaiolas individuais de arame galvanizado, bebedouros do tipo nipple e comedouro tipo calha.

A partir dos 42 dias de idade, as aves foram mantidas em ambiente com iluminação (aproximadamente 12 h de luz e 12 h de escuro) e ventilação natural, utilizou-se uma dieta para atender as exigências da fase de postura de acordo com ROSTAGNO *et al.* (2017), contendo: EMA (kcal/kg)= 2795,30, PB (%)= 19,6, Cálcio (%)= 3,15, e Fósforo disponível (%)= 0,33 durante todo o período experimental. Durante o período de 42 a 98 dias de idade o desenvolvimento das aves e a taxa de postura foram monitorados diariamente, e os animais tiveram livre acesso a água e a ração durante todo o período experimental.

Aos 98 dias de idade, 64 fêmeas com peso corporal médio de 150 g e taxa de postura de aproximadamente 85%, foram selecionadas, e os machos (n = 64) com pesos vivos médios de aproximadamente 135 g foram separados para serem utilizados no experimento.

A partir dos 98 dias, os machos foram colocados em contato com as fêmeas por uma hora, uma vez ao dia, durante o período de 21 dias. Para minimizar o possível efeito parental dos machos foi realizado um sistema de rodízio entre os casais. Nos primeiros dez dias de acasalamento, os ovos foram apenas contabilizados. Do 11º ao 21º de acasalamento, os ovos foram coletados para incubação, pesados, e mantidos em ambiente com temperatura controlada de 22 °C, até o dia da incubação, que ocorreu no 11º dia de coleta (21º dia de acasalamento).

Incubação

Para verificar o efeito da temperatura de incubação, 200 ovos de codornas (*Coturnix coturnix japonica*) foram incubados em duas incubadoras (Modelo Luna 240 - Chocmaster®)

programadas para estarem com temperaturas diferentes: 37,5°C (incubadora controle – CTL, $n = 100$) e 38,5°C (incubadora de alta temperatura – AT, $n = 100$). A umidade relativa das duas incubadoras foi mantida em 60% e o sistema de rolagem dos ovos ocorreu de forma automática a cada duas horas. Para minimizar o efeito dos dias de armazenamento, os ovos foram distribuídos nas incubadoras em blocos, de acordo com o dia da coleta. A partir do 16º dia de incubação o sistema de rolagem dos ovos foi desativado e os nascimentos foram acompanhados até o 18º dia de incubação. Nesse período, os pintainhos recém eclodidos foram pesados para obtenção do peso ao nascimento.

Além disso, no momento da coleta 16º e 18º dia de incubação, foi feito a pesagem do ovo e posteriormente ele foi aberto e 6 embriões na idade embrionária E16 e 6 embriões E18, respectivamente, foram selecionados aleatoriamente, de acordo com a incubadora (CTL e AT). Em seguida os mesmos foram abatidos, e o peso total do embrião foi determinado. O saco vitelino residual, o coração, o fígado, o trato intestinal, o proventrículo + moela foram coletados e pesados para calcular o peso relativo dos órgãos. Amostras de fígado dos embriões nas idades E16 e E18, foram coletadas em microtubos contendo Trizol e mantidos a -80°C até o momento da análise de expressão gênica.

O número de animais nascidos vivos e a taxa de eclosão (%) também foram avaliados.

Pós-eclosão

Para avaliarmos o efeito da temperatura de incubação sobre os pintainhos pós-eclosão, logo após o nascimento 60 pintainhos saudáveis de ovos incubados na CTL e 60 pintainhos de ovos incubados na AT foram pesados, identificados e distribuídos em 2 grupos CTL e AT. Os animais foram criados de maneira convencional em círculos de proteção (Eucatex) com piso forrado com papel corrugado, em ambiente climatizado mantendo a temperatura de conforto térmico do animal do primeiro ao 15º dia de idade. Os animais receberam ração convencional formulada para atender as exigências nutricionais dessa fase inicial (1-15 dias) (2898,958 kcal/kg de energia metabolizável aparente e 20,694% de proteína bruta; ROSTAGNO *et al.* 2017). Nesse período de 15 dias, os pintainhos tiveram livre acesso a água e a ração. No 15º dia de vida, seis animais de cada tratamento escolhidos com base no peso médio do grupo ($\pm 5\%$) foram sacrificados por deslocamento cervical, para a coleta e pesagem do fígado, coração, baço, da bursa de Fabricius, do trato intestinal (delgado e grosso), pâncreas e da moela + proventrículo. O peso relativo dos órgãos foi calculado como: (peso do órgão/peso da ave) \times 100.

Logo após a pesagem do fígado, fragmentos do lobo esquerdo desse tecido foram coletados e adicionados em microtubo contendo Trizol e em seguida foram armazenados em freezer a -80°C até o momento das análises de expressão gênica.

Expressão gênica

Para a análise de expressão gênica o fígado de 4 animais por tratamento (idades embrionárias E16 e E18; e 15 dias de idade) foram utilizados. o RNA foi extraído com Trizol® de acordo com as normas do fabricante (Invitrogen, Carlsbad CA, USA). A concentração total de RNA foi mensurada usando espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm. As amostras de RNA foram tratadas com DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), para remoção de possíveis resíduos de DNA genômico, de acordo com as recomendações do fabricante. Para síntese do DNA complementar (cDNA), foi utilizado o kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega Corporation, USA) de acordo com as normas do fabricante.

Para as reações de (RT-qPCR), foi utilizado o corante fluorescente SYBR Green (SYBR® SYBR Green PCR Master mix, Applied Biosystems, EUA). A reação de amplificação continha 5 µL de cDNA diluído a 40 ng, 0,5 µL de cada primer a 10 µM (a concentração final da reação foi de 200 µM), 12,5 µL de SYBR® GREEN PCR Master Mix e 6,5 µL de água, com um volume final de 25 µL. Para medir a eficiência de cada primer, uma série de reações de 25 µl foi realizada semelhante à anterior utilizando 5µL de pool de cDNA a partir de uma diluição em série (80 ng/µL, 40 ng/µL, 20 ng/µL e 10 ng/µL). A programação do termociclador para todos os genes foi: 95°C durante 10 minutos, em seguida 40 ciclos de desnaturação e anelamento/extensão a 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto. As curvas de melting foram realizadas para garantir a especificidade das análises.

Os primers utilizados nas reações para a amplificação dos genes receptor de hormônio do crescimento (*GHR*), fator de crescimento semelhantes à insulina tipo 1 (*IGF1*), e proteína do choque térmico 70 kDa (*HSP70*), foram confeccionados com base nas sequências de genes depositados em www.ncbi.nlm.nih.gov (número de acesso NM001001293.1, FJ977570.1, NM001006685.1, respectivamente). O gene da β-actina (número de acesso L08165) foi utilizado como controle endógeno (Tabela 1). Todas as análises foram realizadas em um volume de 25 µL e em duplicatas. As eficiências de amplificação foram semelhantes para os genes de interesse, entre 90% e 110% de eficiência.

O método $2^{-\Delta CT}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001) foi utilizado para a análise de quantificação relativa de expressão dos genes.

Tabela 1 - Sequência de primers utilizados na reação de qRT-PCR

Genes	Pb ¹	TA (°C)	Orientação	Sequências dos primers (5'-3')
<i>GHR</i> ²	145	60	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	AACACAGATACCCAACAGCC AGAAGTCAGTGTTTGTCAGGG
<i>IGF1</i>	140	60	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	CACCTAAATCTGCACGCT CTTGTGGATGGCATGATCT
<i>HSP70</i>	65	60	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	ATGAGCACAAGCAGAAAGAG TCCCTGGTACAGTTTTGTGA
<i>β-actina</i>	136	60	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	ACCCCAAAGCCAACAGA CCAGAGTCCATCACAATACC

¹Pb, Pares de base; TA, temperatura de anelamento.

²*GHR*, receptor de hormônio do crescimento; *IGF1*, fator de crescimento semelhantes à insulina tipo 1; *HSP70*, proteína do choque térmico 70 kDa.

Análise estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos dados. O efeito dos tratamentos (AT e CTL) foi testado por meio da ANOVA (SAS, 2002 versão 9.00, SAS Inst. Inc., Cary, NC) utilizando o teste *F* com nível de 5% de significância.

RESULTADOS

A presente pesquisa mostrou que embriões incubados em alta temperatura tiveram maior taxa de eclosão ($74,36 \pm 20,52\%$) que os embriões do tratamento controle ($65,00 \pm 18,36\%$) ($P < 0,05$) (Figura 1).

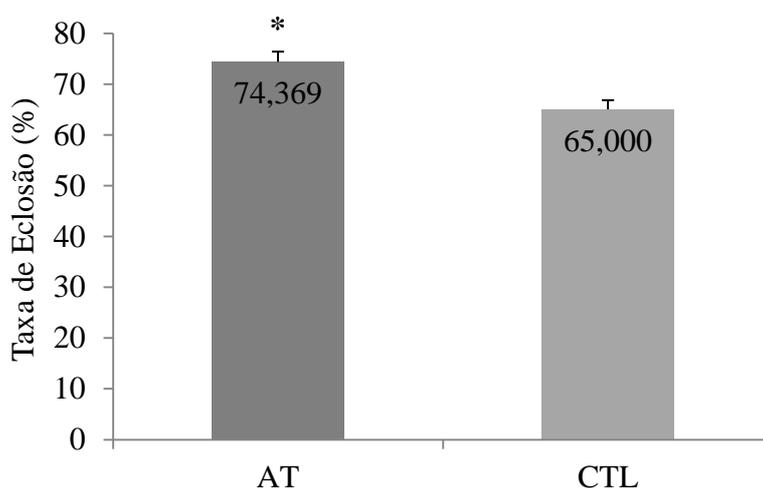


Figura 1 – Efeito da temperatura de incubação sobre a taxa de eclosão de ovos de codorna sob diferentes temperaturas de incubação (CTL: temperatura de incubação controle – $37,5^{\circ}\text{C}$ e AT: alta temperatura de incubação – $38,5^{\circ}\text{C}$). Os resultados são apresentados como média e erro padrão. *Significante pelo teste de F ($P < 0,05$).

Da mesma forma, os embriões coletados na idade E16 apresentaram maiores valores de peso do embrião (PE), peso relativo do trato intestinal (PRTI) e peso relativo do proventrículo + moela (PRPM) quando incubados em AT. Por outro lado, embriões incubados em temperatura controle apresentaram maiores valores de peso relativo do saco vitelino (PRSV) e peso relativo do coração (PRC) ($P < 0,05$, Tabela 2). Já para embriões coletados na idade E18 observamos maiores valores de PRSV para embriões incubados em CTL, e maiores valores de peso relativo do fígado (PRF) e PRC para aqueles incubados em AT ($P < 0,05$, Tabela 2).

Tabela 2 – Peso do ovo, peso corporal e peso relativo dos órgãos (média ± DP) de embriões coletados aos 16 e 18 dias de incubação

Dia	Característica	Tratamento		<i>P</i> valor
		AT	CTL	
16	PO	10,93 ± 0,92	11,74 ± 2,98	0,4494
	PE	6,81 ± 0,75	5,82 ± 0,46	0,0022*
	PRSV	25,65 ± 5,13	35,68 ± 6,57	0,0013*
	PRF	1,74 ± 0,35	1,66 ± 0,2	0,5750
	PRC	0,84 ± 0,14	1,06 ± 0,14	0,0028*
	PRTI	9,23 ± 1,39	7,3 ± 0,81	0,0013*
	PRPM	5,60 ± 0,66	4,53 ± 0,67	0,0021*
18	PO	10,42 ± 0,72	11,01 ± 0,58	0,7689
	PE	7,55 ± 0,31	7,84 ± 0,74	0,2852
	PRSV	7,08 ± 3,28	15,99 ± 5,81	0,0006*
	PRF	2,55 ± 0,22	2,12 ± 0,22	0,0003*
	PRC	1,09 ± 0,21	0,96 ± 0,12	0,0930
	PRTI	12,62 ± 1,29	11,54 ± 1,86	0,1522
	PRPM	6,19 ± 0,69	6,3 ± 0,75	0,7390

CTL: temperatura de incubação controle – 37,5°C e AT: alta temperatura de incubação – 38,5°C; PO: Peso do ovo (g); PE: Peso do embrião (g); PRSV: Peso relativo do saco vitelínico (%); PRF: Peso relativo do fígado (%); PRC: Peso relativo do coração (%); PRTI: Peso relativo do trato intestinal (%); PRPM: Peso relativo do proventrículo + moela (%). * Significante pelo teste *F* ($P < 0,05$).

Na figura 2 encontram-se os resultados da expressão gênica em embriões de codorna japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) nas idades embrionária E16 e E18. No 16º dia de incubação, notou-se que ocorreu maior expressão dos genes *GHR* e *HSP70* nos embriões de ovos incubados em AT do que nos embriões de ovos incubados na temperatura CTL ($P < 0,05$). Não houve efeito dos tratamentos sobre a expressão do gene *IGFI*. Já no 18º dia de incubação, observou-se que os genes *GHR* e *IGFI* tiveram maior expressão nos embriões de ovos incubados em AT do que nos embriões de ovos incubados na temperatura CTL ($P < 0,05$). Não houve efeito dos tratamentos sobre a expressão do gene *HSP70*.

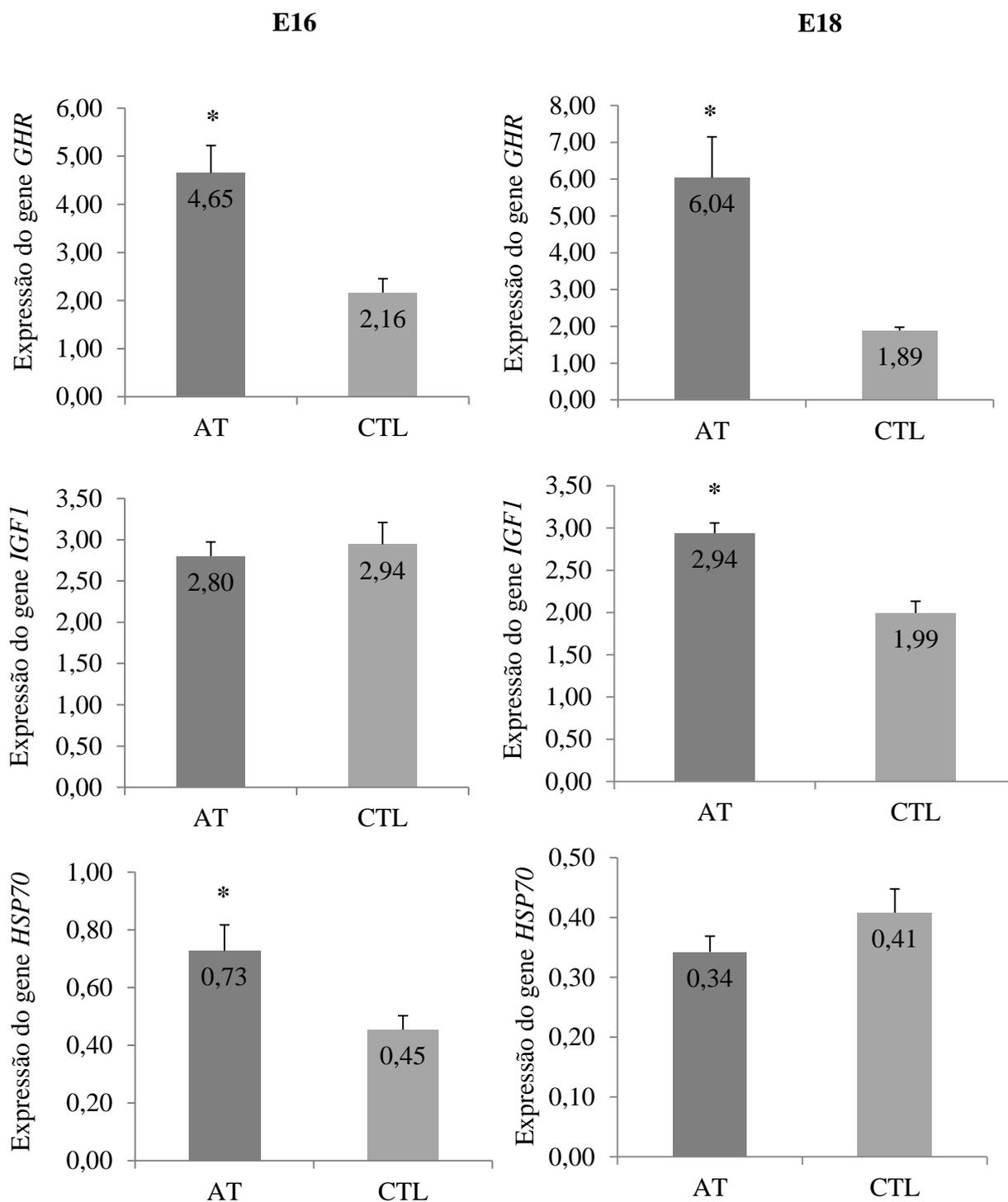


Figura 2 – Efeito da temperatura de incubação sobre a expressão dos genes receptor para o hormônio do crescimento (*GHR*), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (*IGF1*) e proteína do choque térmico de 70 kDa (*HSP70*) em embriões de codornas com 16 dias (E16) e 18 dias (E18), sob diferentes temperaturas de incubação (CTL: temperatura de incubação controle – 37,5°C e AT: alta temperatura de incubação – 38,5°C). Os resultados são expressos como unidade arbitrária (UA) e são apresentados como a média e o erro padrão. *Significante pelo teste de F ($P < 0,05$).

Não houve efeito significativo da temperatura de incubação sobre o peso inicial dos pintainhos (Figura 3).

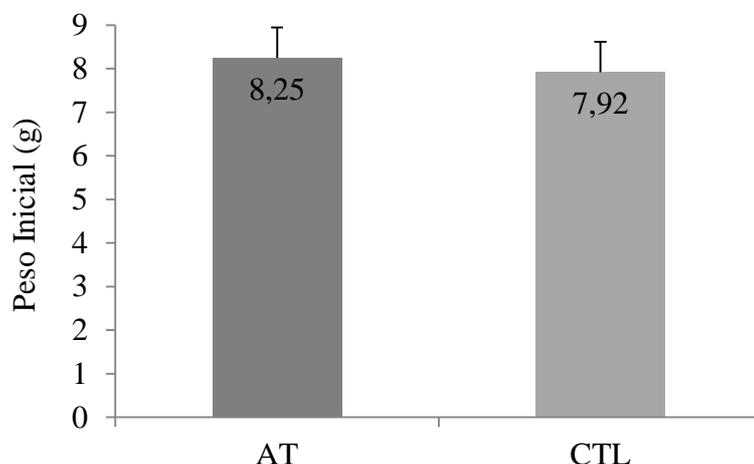


Figura 3 – Peso dos pintainhos de codorna com 1 dia de idade incubados sob diferentes temperaturas (CTL: temperatura de incubação controle – 37,5°C e AT: alta temperatura de incubação – 38,5°C).

Com relação aos pintainhos com 15 dias de idade, observamos que os animais que nasceram a partir de ovos incubados em temperatura CTL, demonstraram ter maiores valores de PRF, PRB e PRTI quando comparados com aqueles que nasceram em AT ($P < 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Peso corporal e peso relativo dos órgãos (média \pm DP) de pintainhos aos 15 dias de vida

Característica	Tratamento		<i>P</i> valor
	AT	CTL	
PV	47,17 \pm 5,64	49,17 \pm 1,99	0,2590
PRF	3,57 \pm 0,56	4,12 \pm 0,51	0,0191*
PRC	1,12 \pm 0,10	1,08 \pm 0,07	0,1901
PRB	0,06 \pm 0,01	0,07 \pm 0,02	0,0181*
PRBF	0,14 \pm 0,05	0,14 \pm 0,04	0,8752
PRTI	13,67 \pm 2,22	15,69 \pm 1,17	0,0109*
PRP	0,46 \pm 0,12	0,49 \pm 0,06	0,3883
PRPM	5,18 \pm 0,79	5,15 \pm 0,53	0,9130

CTL: temperatura de incubação controle – 37,5°C e AT: alta temperatura de incubação – 38,5°C; PV: Peso vivo (g); PRF: Peso relativo do fígado (%); PRC: Peso relativo do coração (%); PRB: Peso relativo do baço (%); PRBF: Peso relativo da bursa de fabricius (%); PRTI:

Peso relativo do trato intestinal (%); PRP: Peso relativo do pâncreas (%); PRPM: Peso relativo do proventrículo + moela (%). * Significante pelo teste de F ($P < 0,05$).

Na figura 4 encontram-se os resultados da expressão gênica em pintainhos de codorna japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) aos 15 dias de idade. Notou-se que os genes *GHR* e *IGFI* tiveram maior expressão nos pintainhos oriundos de ovos incubados em AT do que nos pintainhos oriundos de ovos incubados em temperatura CTL ($P < 0,05$).

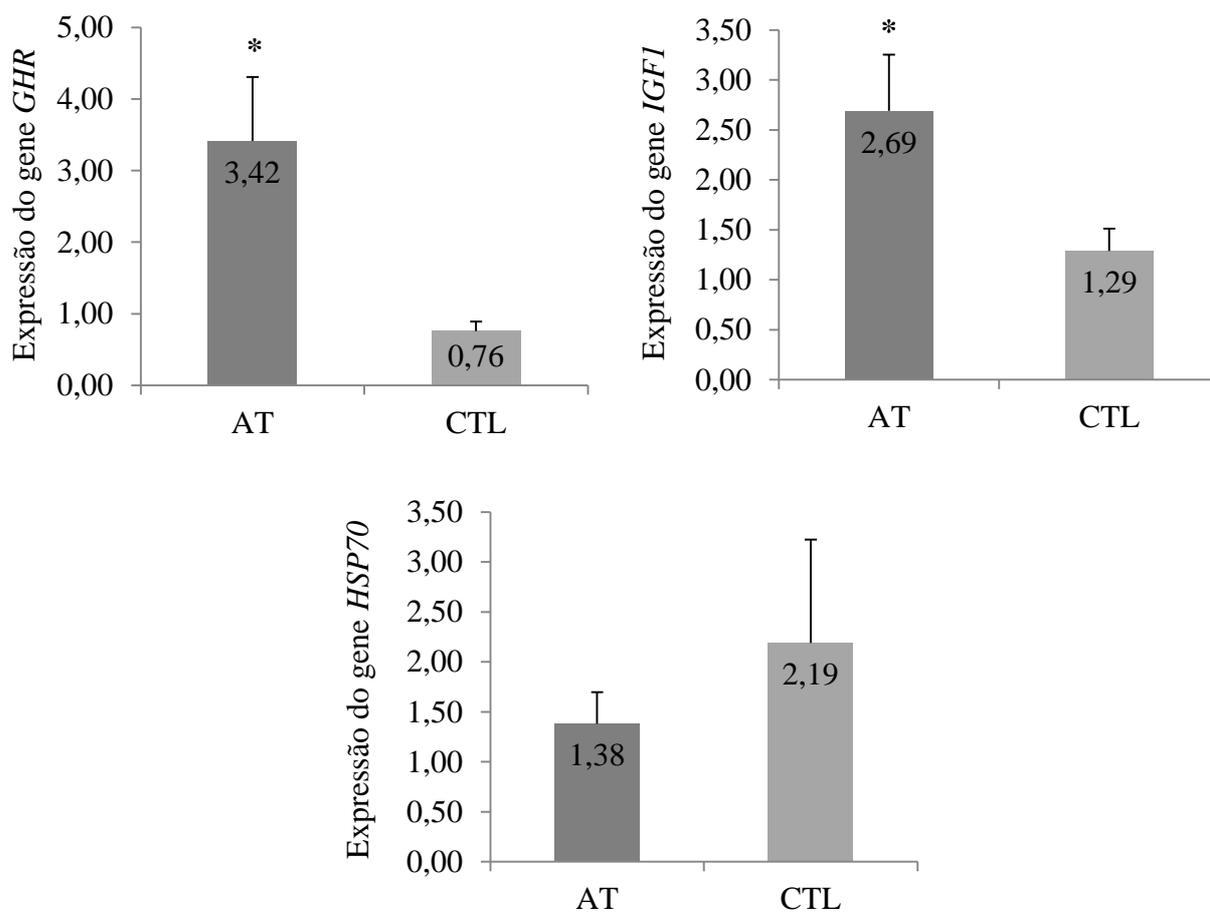


Figura 4 – Efeito da temperatura de incubação sobre a expressão dos genes receptor para o hormônio do crescimento (*GHR*), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (*IGFI*) e proteína do choque térmico de 70 kDa (*HSP70*) em pintainhos com 15 dias de idade oriundos de ovos incubados em diferentes temperaturas de incubação (CTL: temperatura de incubação controle – 37,5°C e AT: alta temperatura de incubação – 38,5°C). Os resultados são expressos como unidade arbitrária (UA) e são apresentados como a média e o erro padrão. *Significante pelo teste de F ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

De modo geral, o desenvolvimento embrionário adequado tem reflexos positivos a curto e longo prazo na produção de aves. Nesse contexto, fatores ambientais como a temperatura de incubação é considerada como um parâmetro básico para um bom desenvolvimento, pois o estresse térmico pode causar alterações fisiológicas decisivas na fase embrionária e pós-eclosão.

Ao testarmos duas temperatura de incubação: 37,5°C (CTL) e 38,5°C (AT), observamos que ovos incubados em AT apresentaram maior taxa de eclosão ($74,36 \pm 20,52\%$) que os ovos mantidos em CTL ($65,00 \pm 18,36\%$) ($P < 0,05$). Isso indica que o incremento em 1°C na temperatura de incubação estimulou o desenvolvimento embrionário, refletindo positivamente na eclodibilidade.

O desenvolvimento mais acelerado relacionado ao tratamento AT é demonstrado ainda pelo peso do embrião aos 16 dias, pelo peso relativo do trato intestinal e peso relativo do proventriculo + moela, mostrando que aos 16 dias de incubação os indivíduos mantidos em 38,5°C estavam mais desenvolvidos que os embriões mantidos em 37,5°C. Na idade embrionária de 18 dias os embriões mantidos em AT (38,5°C) apresentaram menor peso relativo do saco vitelínico e maior peso relativo do fígado e do coração, demonstrando que os indivíduos desse tratamento possivelmente estavam aproveitando melhor a reserva nutritiva do ovo e conseqüentemente se desenvolvendo mais rápido que os indivíduos do tratamento CTL.

NYUIADZI *et al.* (2020) avaliaram os efeitos do desafio térmico na incubação de ovos de galinhas e observaram que o tratamento submetido ao frio teve o processo de eclosão retardado. BELNAP *et al.* (2019) também encontraram que a exposição dos ovos ao frio (36,9 °C) durante a incubação atrasou a eclosão em ovos de codorna bobwhite. No entanto, BASAKI *et al.* (2020) não observaram diferenças significativas na eclodibilidade de ovos de galinha incubados em diferentes temperaturas (37,5°C, 41°C e 33°C). Em estudo semelhante BEN-EZRA e BURNES (2017) encontraram que ovos de codornas incubados em temperaturas inferiores a 37,5°C apresentavam embriões menores, tempo de incubação mais longos e redução no sucesso da eclosão. Já LIU *et al.* (2015) ao avaliar o efeito da temperatura na incubação de ovos de pato observou que o tratamento mantido em 38,5°C apresentou diminuição de 4% na eclodibilidade, em comparação com ovos incubados em 37,5°C. Este resultado diferem dos nosso achados, no entanto é possível que diferentes espécies tenham especificidades de parâmetros de incubação e respostas a estímulos de modos distintos.

Nossos resultados mostram que pintainhos nascidos a partir de ovos incubados em AT tendem a nascer mais pesados. ALKAN *et al.* (2013) ao avaliar os efeitos da manipulação térmica durante a embriogênese observaram que houve melhoria na aquisição da termotolerância testada às 5 semanas de idade, no entanto os pintainhos exibiram peso ao nascer significativamente menor do que os do tratamento controle. CARVALHO *et al.* (2021) encontraram que o aumento da temperatura de incubação em ovos de codornas japonesas afeta a sobrevivência embrionária e pós-eclosão, além do crescimento das aves. WANG *et al.* (2019) investigaram o efeito de aumentar a temperatura de incubação em 1 °C na expressão de nove genes relacionados à miogênese em patos, e descobriram que a manipulação térmica durante os dias 1-10 de incubação aumentou a expressão gênica relacionada à miogênese no peito de pato e no músculo da perna, mas os efeitos da manipulação térmica foram gradualmente revertidos durante o dia 10-20 e 20-27 de incubação. LIU *et al.* (2015) relataram que o aumento da temperatura de incubação em 1 °C tem efeitos imediatos e duradouros no desenvolvimento do músculo esquelético, fígado, moela e tecidos adiposos embrionário e pós-eclosão de patos. Esse aumento do músculo esquelético pode ser devido ao aumento do comprimento do miotubo e o diâmetro 3 dias após a diferenciação, já que o estresse calórico leve desempenha um papel significativo nos mecanismos miogênicos relacionados à massa e desenvolvimento muscular (CHOI *et al.*, 2016). Efeitos diferenciais nos tecidos e órgãos impactados pelo tratamento térmico embrionário podem ser causados por seus diferentes estados de desenvolvimento no mesmo estágio embrionário.

Segundo HEGAB e HANAFY (2019), o peso do ovo esta diretamente relacionado com a melhor eclodibilidade, menores taxas de mortalidade embrionária e eclosão de filhotes mais pesados na especie *Coturnix coturnix japonica*. UÇAR *et al.* (2020) relatam que ovos mais pesados proporcionam uma vantagem de cerca de 6% em relação aos mais leves, determinado que, à medida que o peso do ovo aumenta, a perda de peso durante o período de desenvolvimento embrionário diminui. Em nosso estudo, observamos que no décimo oitavo dia de incubação os ovos mantidos em CTL (37,5°C) eram mais pesados que os ovos sob alta temperatura (AT). No entanto, é importante ressaltar que o peso do ovo é influenciado pela massa de todos os seus componentes, entre eles o saco vitelínico (reserva nutritiva para o embrião), uma vez que este esteja sendo mais utilizado pelo embrião para dar suporte ao seu desenvolvimento, é esperado que o déficit na massa desse anexo embrionário reflita no peso total do ovo. Ao analisarmos o peso do embrião aos 16 dias de incubação observamos que o

tratamento AT apresentou embriões mais pesados ($6,81 \pm 0,75$) quando comparado aos embriões mantidos em CTL ($5,82 \pm 0,46$), corroborando com os achados de EL-SHATER *et al.* (2021).

Com relação ao desenvolvimento pós-eclosão, não houve diferença significativa no peso vivo (g) aos 15 dias de vida. Entretanto, houve diferença ($P < 0,05$) para o peso relativo do trato intestinal, em que os animais do tratamento CTL apresentaram maior peso relativo do órgão do que os pintainhos do tratamento AT. Todavia, cabe destacar que a boa eficiência no aproveitamento dos nutrientes fornecidos na alimentação das aves está relacionada não somente com a proporção do órgão, mas principalmente com a saúde intestinal, desenvolvimento adequado das estruturas que promovem a absorção das partículas e a microbiota ali presente (DUCATELLE *et al.*, 2018). Assim, nossos achados indicam que animais incubados em temperaturas mais altas podem ter melhor eficiência nos processos relacionados à absorção intestinal, não demandando alto desenvolvimento do órgão.

Sabe-se que o estresse térmico pode afetar negativamente a saúde intestinal das aves, prejudicando ainda a atividade de enzimas antioxidantes e conseqüentemente impactando no crescimento dos animais. A proteína de choque térmico 70 kDa (HSP70) está envolvida na manutenção da homeostase celular principalmente em situações de estresse térmico e oxidativo e, por isso, sua expressão tem sido amplamente utilizada como indicador de estresse ambiental em animais (KANG e SHIN, 2021; GALLETA *et al.*, 2022). Em nosso estudo avaliamos a expressão do gene *HSP70* em embriões de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) submetidos a diferentes temperaturas de incubação. No 16º dia de desenvolvimento embrionário, notou-se que ocorreu maior expressão de *HSP70* em embriões de ovos incubados em AT (0,73 UA) do que nos embriões de ovos incubados na temperatura CTL (0,45 UA) ($P < 0,05$). Esse achados sugerem que o embrião incubado em AT estava sob algum desafio térmico; no entanto, a maior expressão de *HSP70* indica boa resposta do organismo. Já em embriões aos 18 dias de desenvolvimento, assim como nos pintainhos com 15 dias de vida, não foram observadas diferenças significativas na expressão de *HSP70* entre os tratamentos (AT e CTL), isso talvez tenha ocorrido porque os animais em tratamento sob alta temperatura podem ter adquirido termotolerância, estabilizando a expressão do gene *HSP70* em níveis semelhantes aos do tratamento controle (CTL).

XIE *et al.* (2018) objetivaram quantificar os efeitos da exposição ao calor sobre a expressão de genes no pulmão, fígado, rim e trato gastrointestinal de três espécies de aves do deserto australiano e encontraram resultados que apoiam a hipótese de que a exposição aguda a uma alta temperatura, resultará na regulação positiva dos genes da proteína de choque térmico

(*HSP*). VINOTH *et al.* (2015) avaliaram o efeito da manipulação térmica durante a embriogênese sobre genes *HSP* e observaram que o aumento da temperatura causou aumento significativo na expressão do gene *HSP70*. KANG e SHIM (2021) investigaram os efeitos do condicionamento precoce ao calor na resistência ao estresse agudo por calor em frangos de corte, e encontraram que a expressão do *HSP70* foi maior em pintos submetidos ao estresse por calor. AL-ZGHOUL *et al.* (2020) relatam que a manipulação térmica durante a embriogênese aumenta o nível de *HSP70* em frangos de corte. Com base nesses achados, é possível dizer que a manipulação térmica durante a incubação fornece adaptação aos embriões que possibilitam melhoria na tolerância ao calor na vida pós-eclosão das aves.

O estresse ambiental pode influenciar decisivamente no desenvolvimento corporal das aves, principalmente por afetar processos envolvidos na produção de hormônios fundamentais para o crescimento (HUMAM *et al.*, 2019; HASSAN e ASIM, 2020). O hormônio do crescimento (GH), o receptor de hormônio do crescimento (GHR) e o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF) são biomoléculas que compõem o eixo somatotrópico, fundamentais no desenvolvimento embrionário e pós-eclosão relacionadas principalmente ao desenvolvimento muscular (HAFEZ *et al.*, 2022). Segundo EL-ATTROUNY *et al.* (2020), a regulação genética das características de crescimento é monitorada pela expressão dos genes que compõem o eixo somatotrópico (*GH*, *GHR* e *IGFI*).

Ao analisarmos a expressão dos genes *GHR* e *IGFI* em embriões aos 16 dias de desenvolvimento observamos diferença significativa ($P < 0,05$) apenas na expressão de *GHR*, em que os embriões mantidos em AT apresentaram maior expressão do gene quando comparados ao grupo mantido em CTL. Este achado indica que na fase inicial do desenvolvimento embrionário o incremento na temperatura de incubação estimulou a maior expressão de receptor de hormônio do crescimento que por sua vez ainda não iniciou de maneira significativa a cascata hormonal que culmina na produção de *IGFI*. Aos 18 dias de desenvolvimento embrionário essa linha de raciocínio fica evidente, uma vez que tanto o *GHR*, quanto o *IGFI* apresentam maior expressão nos embriões mantidos em AT. Aos 15 dias de vida (pós-eclosão) também foram observadas maiores expressões dos genes *GHR* e *IGFI* nos animais do tratamento AT, ratificando nosso argumento de que o incremento em 1°C na temperatura de incubação pode estimular o desenvolvimento embrionário com reflexos positivos no crescimento pós-eclosão em codornas japonesas.

ROUSHDY *et al.* (2018) submeteram pintos de 21 dias de idade até 42 dias em estresse térmico diário (36°C), e encontraram que o estresse térmico crônico diminuiu a expressão do

mRNA do *GH* hepático, concomitantemente com um aumento na expressão do gene *HSP70*. Já DALAB *et al.* (2022) submeteram ovos de galinha a temperatura de estresse térmico (39°C) em diferentes dias de incubação, e encontraram que a expressão de *IGF1* e *GH* de embriões manipulados termicamente e de pintainhos aos 35 dias de idade foram significativamente maiores nos músculos peitorais e da coxa quando comparados ao tratamento controle.

CONG *et al.* (2023) avaliaram o efeito do estresse térmico (39°C) durante a incubação de ovos de galinha nas idades embrionárias E10 e E18, e observaram que a manipulação da temperatura diminuiu a expressão de genes do crescimento (*GHR*, *IGF1* e *IGFII*) pós-eclosão. Isso indica que mesmo em condições de estresse térmico existe um limite de temperatura que estimula o crescimento a partir da qual podem haver prejuízos ao metabolismo animal comprometendo seu desenvolvimento. Assim, sugerimos que outros estudos sejam realizados a fim de avaliar diferentes níveis de estresse térmico, identificando até que temperatura é possível estimular o desenvolvimento em diferentes espécies.

CONCLUSÃO

Concluimos que a manipulação térmica com acréscimo de 1°C na temperatura de incubação pode influenciar parâmetros importantes no desenvolvimento embrionário observados no 16° e 18° dia de incubação, com possíveis impactos positivos também no período pós-eclosão.

REFERÊNCIAS

- ALKAN, S., KARSLI, T., KARABAG, K., GALIC, A., BALCIOGLU, M. S. (2013) The effects of thermal manipulation during early and late embryogenesis on hatchability, hatching weight and body weight in Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). *Archiv Tierzucht* **5678**, 789-796.
- AKDEMIR, F., SAHIN, N., ORHAN, C., TUZCU, M., SAHIN, K., HAYIRLI, A. (2015) Chromium-histidinate ameliorates productivity in heat-stressed Japanese quails through reducing oxidative stress and inhibiting heat-shock protein expression. *British Poultry Science* **56**, 247–254.
- AKBARIAN, A., MICHIELS, J., DEGROOTE, J., MAJDEDDIN, M., GOLIAN, A., SMET, S. (2016) Association between heat stress and oxidative stress in poultry; mitochondrial dysfunction and dietary interventions with phytochemicals. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **7**, 37.
- ABUALI, A. M., MOKHTAR, D. M., ALI, R. A., WASSIF, E. T., ABDALLA, K. E. H. (2019) Morphological Characteristics of the Developing Cecum of Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Microscopy and Microanalysis* **25**, 1017–1031.
- AL-ZGHOUL, M. B., SALEH, K. M. M. (2020) Effects of thermal manipulation of eggs on the response of jejunal mucosae to posthatch chronic heat stress in broiler chickens. *Poultry Science* **99**, 2727-2735.
- ABUOGHABA, A. A., ALI, F., ISMAIL, I. I., SALEH, M. (2021) Impact of acute short-term high thermal stress during early embryogenesis on hatchability, physiological body reaction, and ovarian follicles development of quails. *Elsevier Inc. on behalf of Poultry Science Association Inc* **100**, 1213–1220.
- BUZALA, M., JANICKI, B., CZARNECKI, R. (2015) Consequences of different growth rates in broiler breeder and layer hens on embryogenesis, metabolism and metabolic rate: A review. *Poultry Science* **00**, 1–6.
- BAI, J. Y., PANG, Y. Z., ZHANG, X. H., LI, Y. X. (2016) Study on the Morphological Development of Quail Embryos. *Brazilian Journal of Poultry Science* **2**, 033-036.
- BEN-EZRA, N., BURNES, G. (2017) Constant and Cycling Incubation Temperatures Have Long-Term Effects on the Morphology and Metabolic Rate of Japanese Quail. *Physiological and Biochemical Zoology* **90**, 96–105.
- BURGGREN, W. W., ELMONOUFY, N. A. (2017) Critical developmental windows for morphology and hematology revealed by intermittent and continuous hypoxic incubation in embryos of quail (*Coturnix coturnix*). *PLoS ONE* **12**, 1–20.
- BELNAP, S. C., CURREA, J. P. LICKLITER, R. (2019) Prenatal incubation temperature affects neonatal precocial birds' locomotor behavior. *Physiology & Behavior* **206**, 51–58.

- BASAKI, M., SAHRAIY, N., KEYKAYUSI, K., AKBARI, G., SHAHBAZFAR, A. A., KIANIFARD, D. (2020) Differential expression of small heat shock proteins in the brain of broiler embryo; the effects of embryonic thermal manipulation. *Journal of Thermal Biology* **93**, 102719.
- CLEMMONS, D. R. (2012) Metabolic Actions of Insulin-Like Growth Factor-I in Normal Physiology and Diabetes. *Endocrinol Metab Clin N Am* **41**, 425–443.
- CHOI, Y. M., CHEN, P. R., SHIN, S., ZHANG, J., HWANG, S., LEE, K. (2016) Mild heat stress enhances differentiation and proliferation of Japanese quail myoblasts and enhances slow muscle fiber characteristics. *Poultry Science* **95**, 1912–1917.
- CAI, J. H., YEH, T. F., WEI, H. W., LIU, I. H. (2019) Temperature-induced embryonic diapause in blue-breasted quail (*Coturnix chinensis*) correlates with decreased mitochondrial-respiratory network and increased stress-response network. *Poultry Science Association Inc.* **98**, 2977–2988.
- CRUZ, F. K., KANEKO, I. N., FIGUEROA, C. D. N., BEZERRA JUNIOR, J. S., CRAVEIRO, G. A., ROSSI, R. M., MURAKAMI, A. E., SANTOS, T. C. (2019) Development and growth of digestive system organs of European and Japanese quail at 14 days post-hatch. *Poultry Science* **98**, 1883–1892.
- CARVALHO, A. V., HENNEQUET-ANTIER, C., CROCHET, BORDEAU, T., COUROUSSE, N., CAILLEAU-AUDOUIN, E., CHARTRIN, P., DARRAS, V. M., ZERJAL, T., COLLIN, A., COUSTHAM, V. (2020) Embryonic thermal manipulation has short and long-term effects on the development and the physiology of the Japanese quail. *PLoS ONE* **15**, 0227700.
- COSTA, E. V. L., ARAUJO, V. F. S., SANTOS, A. P. P., NOGUEIRA, R. A. (2020) Morphometric evaluation of Japanese quail embryos and their extraembryonic vascular networks exposed to low-frequency magnetic field with two different intensities. *Electromagnetic Biology and Medicine* **39**, 403–410.
- CARVALHO, A. V., HENNEQUET-ANTIER, C., BRIONNE, A., CROCHET, S., JIMENEZ, J., COUROUSSE, N., COLLIN, A., COUSTHAM, V. (2021) Embryonic thermal manipulation impacts the postnatal transcriptome response of heat-challenged Japanese quails. *BMC Genomics* **22**, 488.
- CERUTTI, C., LEROUX, S., GOURICHON, D., LABRUNE, Y., DAVID, I., ZERJAL, T., COUSTHAM, V., DEVAILLY, G., PITEL, F. (2022) Short communication: Effects of in-ovo injection of endocrine disruptors and methyltransferase inhibitor on quail growth and egg-laying performances. *Animal The international journal of animal biosciences* **16**, 100464.
- CONG, W., HAN, W., LIU, J., ZHAO, R., WU, L. (2023) Embryonic thermal manipulation leads growth inhibition and reduced hepatic IGF1 expression due to promoter DNA hypermethylation in broilers. *Poultry Science* **102**, 102562.

DUVATELLE, R., GOOSEENS, E., DE MEYER, F., EECKHAUT, V., ANTONISSEN, G., HAESEBROUCK, F., VAN IMMERSSEL, F. (2018) Biomarkers for monitoring intestinal health in poultry: present status and future perspectives. *Veterinary Research* **49**, 43.

DARRAS, V. M. (2019) The Role of Maternal Thyroid Hormones in Avian Embryonic Development. *Frontiers in Endocrinology* **10**, 00066.

DALAB, A. S., ALI, A. M., ALTHNAIAN, T. A., ALKHODAIR, K. M., AL-RAMADAN, S. Y (2022) Molecular and ultrastructural investigations of the effect of thermal manipulation during embryogenesis on pectoral and thigh muscles growth factors in broilers. *J. Appl. Poult. Res.* **31**, 100188.

EL-ATTROUNY, M. M., IRAQI, M. M., SABIKE, I. I., ABDELATY, A. M., MOUSTAFA, M. M., BADR, O. A. (2020) Comparative evaluation of growth performance, carcass characteristics and timed series gene expression profile of *GH* and *IGF-1* in two Egyptian indigenous chicken breeds versus Rhode Island Red. *Journal Breeding and Genetics* **00**, 1–11.

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

GRZEGRZÓŁKA, B., GRUSZCZYŃSKA, J. (2019) Correlations between egg weight, early embryonic development, and some hatching characteristics of Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Turk J Vet Anim Sci* **43**, 253–258.

GALLETA, L., CRAVEN, M. J., MEILLERE, A., CROWLEY, T. M., BUCHANAN, K. L., MARIETTE, M. M. (2022) Acute exposure to high temperature affects expression of heat shock proteins in altricial avian embryos. *Journal of Thermal Biology* **110**, 103347.

HYANKOVA, L., NOVOTNA, B., STAROSTA, F. (2015) Divergent selection for shape of the growth curve in Japanese quail. 8. Effect of long-term selection on embryonic development and growth. *British Poultry Science* **56**, 184–194.

HOPE, S. F., KENNAMER, R. A., MOORE, I. T., HOPKINS, W. A. (2018) Incubation temperature influences the behavioral traits of a young precocial bird. *J.Exp.Zool.* **329**, 191–202.

HANAFY, A. M., HEGRAB, I. M. (2019) Effects of egg weight and light sources during incubation period on embryonic development and post-hatch growth of Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Europ.Poult.Sci.* **83**, 1612–9199.

HEGAB, I. M., HANAFY, A. M. (2019) Effect of Egg Weight on External and Internal Qualities, Physiological and Hatching Success of Japanese Quail Eggs (*Coturnix coturnix japonica*). *Brazilian Journal of Poultry Science* **21**, 001–008.

HUMAM, A. M., LOH, T. C., FOO, H. L., SAMSUDIN, A. A., MUSTAPHA, N. M., ZULKIFLI, I., IZUDDIN, W. I. (2019) Effects of Feeding Different Postbiotics Produced by *Lactobacillus plantarum* on Growth Performance, Carcass Yield, Intestinal Morphology, Gut

Microbiota Composition, Immune Status, and Growth Gene Expression in Broilers under Heat Stress. *Animals* **9**, 644.

HASSAN, A. A., ASIM, R. A. (2020) Effect of vitamin C and acetylsalicylic acid supplementation on some hematological value, heat shock protein 70 concentration and growth hormone level in broiler exposed to heat stress. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences* **34**, 357–363.

HE, Z., CHEN, X., SHI, X., LI, X., LI, C., LI, J., XU, G., YANG, N., ZHENG, J. (2020) Acetic acid, vinegar, and citric acid as washing materials for cuticle removal to improve hatching performance of quail eggs. *Poultry Science* **99**, 3865–3876.

HAFEZ, M. H., EL-KAZAZ, S. E., ALHARTHI, B., GHAMRY, H. I., ALSHEHRI, M. A., SAYED, S., SHUKRY, M., EL-SAYED, Y. S. (2022) The Impact of Curcumin on Growth Performance, Growth-Related Gene Expression, Oxidative Stress, and Immunological Biomarkers in Broiler Chickens at Different Stocking Densities. *Animals* **12**, 958.

JANISCH, S., SHARIFI, A. R., WICKE, M., KRISCHEK, C. (2015). Changing the incubation temperature during embryonic myogenesis influences the weight performance and meat quality of male and female broilers. *Poultry science* **94**(10), 2581–2588.

JAWAID, S., STRAINIC, J. P., KIM, J., FORD, M. R., THRANE, L., KARUNAMUNI, G. H., SHEEHAN, M. M., CHOWDHURY, A., GILLESPIE, C. A., ROLLINS, A. M., JENKINS, M. W., WATANABE, M., FORD, S. M. (2021) Glutathione Protects the Developing Heart from Defects and Global DNA Hypomethylation Induced by Prenatal Alcohol Exposure. *Alcoholism clinical and experimental research* **45**, 69–78.

KASUYA, E. (2016) Secretory pattern and regulatory mechanism of growth hormone in cattle. *Animal Science Journal* **87**, 178–182.

KANG, D., SHIM, K. (2021) Early heat exposure effect on the heat shock proteins in broilers under acute heat stress. *Poultry Science* **100**, 100964.

LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**, 402–408.

LIU, H., LIU, J., YAN, X., LI, Q., ZHAO, Y., WANG, Y., ZHANG, R., WANG, G., WANG, H., LI, X., YANG, C., LI, L., HAN, C., WANG, J. (2015) Impact of thermal stress during incubation on gene expression in embryonic muscle of Peking ducks (*Anas platyrhynchos domestica*). *Journal of Thermal Biology* **53**, 80–89.

LAHUNTA, A., GLASS, E. N. (2016) Embryonic Development of the Central Nervous System. *Vet Clin Small Anim* **46**, 193–206.

LEROUX, S., GOURICHON, D., LETERRIER, C., LABRUNE, Y., COUSTHAM, V., RIVIERE, S., ZERJAL, T., COVILLE, J. L., MORISSON, M., MINVIELLE, F., PITEL, F. (2017) Embryonic environment and transgenerational effects in quail. *Genet Sel Evol* **49**, 14.

- LIU, C., CHAUDHRY, M. T., ZHAO, D., LIN, T., TIAN, Y., FU, J. (2019) Heat shock protein 70 protects the quail cecum against oxidant stress, inflammatory injury, and microbiota imbalance induced by cold stress. *Poultry Science Association Inc.* **98**, 5432–5445.
- LI, K., JIANG, L., WANG, J., XIA, L., ZHAO, R., CAI, C., WANG, P., ZHAN, X., WANG, Y. (2020) Maternal dietary supplementation with different sources of selenium on antioxidant status and mortality of chicken embryo in a model of diquat-induced acute oxidative stress. *Animal Feed Science and Technology.* **261**, 114369.
- LI, X., RATHGEBER, B., MCLEAN, N., MACISAAC, J. (2021) Providing colored photoperiodic light stimulation during incubation: 1. Effects on embryo development and hatching performance in broiler hatching eggs. *Poultry Science* **100**, 101336.
- MORAES, T. G. V., ROMAO, J. M., TEIXEIRA, R. S. C., CARDOSO, W. M., (2008) Effects of egg position in artificial incubation of Japanese quail eggs (*Coturnix japonica*). *Anim. Reprod.* **5**, 50-54.
- MAEDA, K., ASAI, R., MARUYAMA, K., KURIHARA, Y., NAKANISHI, T., KURIHARA, H., MIYAGAWA-TOMITA, S. (2015) Postotic and preotic cranial neural crest cells differently contribute to thyroid development. *Developmental Biology* **409**, 72–83.
- MAATJENS, C. M., VAN ROOVERT-REIJRINK, I. A. M., ENGEL, B., VAN DER POL, C. W., KEMP, B., VAN DEN BRAD, H. (2016) Temperature during the last week of incubation. I. Effects on hatching pattern and broiler chicken embryonic organ development. *Poultry Science Association Inc.* **95**, 956–965.
- MORITA, V. S., ALMEIDA, V. R., MATOS JUNIOR, J. B., VICENTINI, T. I., VAN DEN BRAND, H., BOLELI, I. C. (2016) Incubation temperature alters thermal preference and response to heat stress of broiler chickens along the rearing phase. *Poultry Science* **95**, 1795–1804.
- MAMAN, A. H., AYGUN, A., YILDIRIM, I. (2018) Effects of High Light Intensity on Incubation Results in Quail Hatching Eggs during Incubation Period. *Selcuk J Agr Food Sci* **32** (3), 399-401.
- NYUIADZI, D., TRAVEL, A., MEDA, B., BERRI, C., GUILLOTEAU, L. A., COUSTHAN, V., WANG, Y., TONA, J. K., COLLIN, A. (2017) Effect of low incubation temperature and low ambient temperature until 21 days of age on performance and body temperature in fast-growing chickens. *Poult. Sci.* **96**, 4261–4269.
- NYUIADZI, D., BERRI, C., DUSART, L., TRAVEL, A., MEDA, 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**, 857–868.
- RAMLI, M. B., LIM, H. P., WAHAB, M. S., ZIN, M. F. M. (2015) Egg hatching incubator using conveyor rotation system. *Procedia Manufacturing* **2**, 527 – 531.

REYNA, K. S., BURGGREN, W. W. (2017) Altered embryonic development in northern bobwhite quail (*Colinus virginianus*) induced by pre-incubation oscillatory thermal stresses mimicking global warming predictions. *PLoS ONE* **12**, 1-17.

ROSTAGNO, H. S., L. F. T. ALBINO, M. I., HANNAS, J. L., DONZELE, N. K., SAKOMURA, F. G., PERAZZO, A., SARAIVA, M. L. T., ABREU, P. B., RODRIGUES, R. F., OLIVEIRA, S. L. T., BARRETO, C. L. BRITO (2017). Brazilian tables for birds and pigs: composition of foods and nutritional requirements. *4th rev. ed. UFV:Viçosa*, Minas Gerais, BR.

ROUSHDY, E. M., ZAGLOOL, A. W., EL-TARABANY, M. S. (2018) Effects of chronic thermal stress on growth performance, carcass traits, antioxidant indices and the expression of HSP70, growth hormone and superoxide dismutase genes in two broiler strains. *Journal of Thermal Biology* **74**, 337–343.

SHOJAEI, B., TALEBHEMAT, M., HASHEMNIA., SHOJAEIPOUR, S. (2015) Knee joint morphogenesis of the quail (*Coturnix japonica*) embryo. *ITALIAN JOURNAL OF ANATOMY AND EMBRYOLOGY* **120**, 127–139.

SANJAYA, W. S. M., MARYANTI, S., WARDOYO, C., ANGGRAENI, D., AZIZ, M. A., MARLINA, L., ROZIQIN, A., KUSUMORINI, A. (2018) The development of quail eggs smart incubator for hatching system based on microcontroller and internet of things (IoT). *International Conference on Information and Communications Technology* 407–411.

STIER, A., METCALFE, N.B., MONAGHAN, P. (2020) Pace and stability of embryonic development affect telomere dynamics: an experimental study in a precocial bird model. *the Royal Society* **287**, 20201378.

SANTANA, T. P., GASPARINO, E., KHATLAB, A. S., BRITO, C. O, BARBOSA, L. T., LAMONT, S. J., DEL VESCO, A. P. (2021) Effect of prenatal ambient temperature on the performance physiological parameters, and oxidativemetabolism of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) layers exposed to heat stress during growth. *Scientific Reports* **11**, 9809.

SOLIMAN, S. A., MADKOUR, F. A. (2021) Developmental events and cellular changes occurred during esophageal development of quail embryos. *Scientific Reports* **11**, 7257.

STANTON, H., TOWERS, M. (2022) Retinoic acid influences the timing and scaling of avian wing development. *Cell Reports* **38**, 110288.

UÇAR, A., ERENŞOY, K., SARICA, M., BOZ, M. A. (2020) The effect of egg weight on hatching in Pharaoh and Italian Japanese quails. *International Journal of Poultry - Ornamental Birds Science and Technology* **1**, 18-23.

VINOTH, A., THIRUNALASUNDARI, T., THARIAN, A. J., SHANMUGAM, M., RAJKUMAR, U. (2015) Effect of thermal manipulation during embryogenesis on liver heat shock protein expression in chronic heat stressed colored broiler chickens. *Journal of Thermal Biology* **53**, 162–171.

WANG, Y., YAN, X., LIU, H., HU, S., HU, J., LI, L., WANG, J. (2019) Effect of thermal manipulation during embryogenesis on the promoter methylation and expression of myogenesis-related genes in duck skeletal muscle. *Journal of Thermal Biology* **80**, 75–81.

XIE, S., TEARLE, R., MCWHORTER, T. J. (2018) Heat shock protein expression is upregulated after acute heat exposure in three species of Australian desert birds. *Avian Biology Research* **11**, 263-273.

ZHAO, J. M., HAN, Z. M., SUN, Y. H. (2017) Is embryonic hypothermia tolerance common in birds?. *The Royal Society* **13**, 20160967.

ZHU, M., WANG, M., SHAO, Y., NAN, Y., BLAR, H. T., MORRIS, S. T., ZHAO, Z., ZHANG, H. (2020) Characterization of muscle development and gene expression in early embryos of chicken, quail, and their hybrids. *Gene Gene* **10**, 1016.