# INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO DE 39ºC SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E A ESTABILIDADE OXIDATIVA DO SACO VITELÍNICO

Ismael Berti Ferreira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Angélica de Souza Khatlab, Eliane Gasparino (Orientadora). E-mail: egasparino@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Maringá, PR.

**Zootecnia/Recursos Pesqueiros, Genética e Melhoramento dos Animais Domésticos.**

**Palavras-chave:** embriogênese, estado redox, termotolerância

## RESUMO

Nosso objetivo foi avaliar os efeitos da alta temperatura de incubação de 39ºC durante todo o período de incubação, sobre o desenvolvimento do embrião (peso e comprimento do embrião, taxa de eclosão total, porcentagem de saco vitelínico residual e perda de umidade do ovo) e a estabilidade oxidativa (atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutationa S-transferase, conteúdo de antioxidantes não enzimáticos – glutationa reduzida, flavonoides e polifenóis totais, capacidade antioxidante, conteúdo de espécies reativas ao oxigênio totais, conteúdo de nitrito e peroxidação lipídica primária e secundária) do saco vitelínico dos embriões de codornas de postura (*Coturnix coturnix japonica*) com 15 dias de incubação. Quatrocentos ovos férteis foram distribuídos em dois tratamentos: temperatura de incubação controle 37,5ºC (n=200 ovos) e alta temperatura de incubação 39ºC (n=200 ovos). No 15º dia de incubação, 20 ovos por tratamento foram escolhidos, pesados e em seguida o saco vitelínico residual foi coletado e pesado. O embrião também foi pesado separado do saco vitelínico. Após a pesagem, os sacos vitelínicos foram coletados para as análises de estabilidade oxidativa. Os dados foram avaliados por meio da ANOVA one-way e as médias foram comparadas pelo teste t de Student ($P<0,05$). Os embriões oriundos de ovos incubados em alta temperatura apresentaram menor porcentagem de saco vitelínico residual, conteúdo de flavonoides, conteúdo de espécies reativas de oxigênio totais, e oxidação lipídica secundária, bem como a maior capacidade antioxidante. A temperatura de incubação de 39ºC, potencializou a absorção do saco vitelínico residual pelos embriões, bem como reduziu o estresse oxidativo, a oxidação lipídica secundária e aumentou a capacidade antioxidante do saco vitelínico dos embriões. Assim, nossos resultados preveem embriões oriundos de ovos incubados em alta temperatura com menor nível de estresse e possivelmente maior resistência aos diferentes tipos de estresse.

## INTRODUÇÃO

O desenvolvimento embrionário dos animais é um dos períodos mais críticos, por ser este um período de alta sensibilidade ambiental que permite a programação fenotípica dos mesmos (Tona et al., 2022). É durante este período que o ambiente pode exercer forte influência sobre a saúde, o bem-estar e o desempenho dos animais. Inúmeros parâmetros relacionados a incubação são capazes de influenciar o desenvolvimento embrionário, a eclosão e a sobrevivência dos animais após a eclosão, mas, o desenvolvimento animal a curto e longo prazo é em sua maior parte

dependente, principalmente da temperatura da incubação (Tona et al., 2022). Temperatura maior ou menor que a temperatura convencional de incubação (37,5ºC a 37,8°C), pode influenciar de forma positiva ou negativa o desenvolvimento dos órgãos dos embriões, os parâmetros de eclosão, a qualidade do pintainho na eclosão, bem como a imunocompetência das aves após a eclosão (Han et al., 2022).

Apesar da manipulação térmica da incubação estar recebendo cada vez mais atenção, como estratégia para potencializar a tolerância das espécies aviárias ao calor após a eclosão, alguns fatores como o período de incubação, a duração do aumento da temperatura e, o nível de aumento da temperatura, devem ser levados em consideração, uma vez que, a alta temperatura durante a incubação, também pode ser prejudicial ao desenvolvimento embrionário. Já que ela também pode ser um gatilho para disparar o estresse oxidativo nos embriões (Helal; Makihara; Iwasawa, 2025). Condições de estresse oxidativo em embriões já foi anteriormente associada à morte embrionária precoce, malformações e retardo de crescimento após a eclosão. O saco vitelínico que consiste em gema e no tecido do saco vitelínico envolvendo a gema, é um órgão extraembrionário dito multifuncional, essencial para o desenvolvimento e a saúde do embrião. Isso porque muitos órgãos do embrião em desenvolvimento ainda não amadureceram, e o saco vitelínico atua como fonte de nutrientes, como medula óssea, como intestino, como fígado, como tireoide e como sistema imunológico. Agentes estressores como a temperatura de incubação inadequada (demasiadamente alta ou baixa), pode afetar diretamente o saco vitelínico e causar danos oxidativos, o que por sua vez afeta a disponibilidade de nutrientes do saco vitelínico e sua utilização pelo embrião, causando deficiência de nutrientes essenciais e anticorpos maternos, que pode resultar em mortalidade precoce do pintainho e/ou na produção de pintainho de baixa qualidade (Helal; Makihara; Iwasawa, 2025). Nesse contexto, este estudo foi conduzido para avaliar os efeitos da alta temperatura de incubação de 39ºC, aplicada de forma constante durante todo o período de incubação, sobre o desenvolvimento do embrião e a estabilidade oxidativa do saco vitelinico dos embriões de codornas de postura (*Coturnix coturnix japonica*) com 15 dias de incubação.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (nº 8954270323). Neste estudo, 400 ovos férteis obtidos de codornas de postura (*Coturnix coturnix japonica*) foram distribuídos em dois tratamentos referentes a temperatura de incubação: temperatura controle 37,5ºC (n=200 ovos) e alta temperatura 39ºC (n=200 ovos). Na incubadora controle os ovos foram mantidos a 37,5°C com 60% de umidade relativa do ar, durante todo o período de incubação (1 a 15 dias) e, na incubadora com alta temperatura, os ovos foram mantidos a 39ºC com 60% de umidade relativa, também durante todo o período de incubação (1 a 15 dias). No 15º dia de incubação 20 ovos por tratamento foram escolhidos aleatoriamente e pesados. Em seguida o saco vitelínico residual foi coletado dos embriões e pesado. O embrião também foi pesado e teve seu comprimento mensurado com paquímetro digital eletrônico (Matrix®).

Após a pesagem dos sacos vitelínicos, os mesmos foram coletados para as análises de estabilidade oxidativa que foi determinada por meio da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutationa S-transferase, conteúdo de antioxidantes não enzimáticos – glutationa reduzida, flavonoides e polifenóis totais, capacidade antioxidante (DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil e $ABTS^{\bullet+}$ - ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) conteúdo de espécies reativas

ao oxigênio totais - ROSt, conteúdo de nitrito e peroxidação lipídica primária (dienos conjugados) e secundária (malondialdeído, MDA). A porcentagem de saco vitelínico residual dos embriões, foi estimada conforme Dayan et al. (2020). A perda de umidade do ovo foi calculada da seguinte forma: ((peso inicial do ovo - peso do ovo aos 15 dias de incubação)/peso inicial do ovo)×100. Todos os dados foram avaliados por meio da ANOVA one-way e, as médias foram comparadas pelo teste t de Student (P<0,05) (SAS, 2002 versão 9.00, SAS Inst. Inc., Cary, NC).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve efeito significativo da alta temperatura de incubação sobre o peso e o comprimento do embrião, a taxa de eclosão total e a perda de umidade do ovo (P>0,05). Embriões oriundos de ovos incubados a 39ºC apresentaram menor porcentagem de saco vitelinico residual (25,46%) que os embriões de ovos incubados na temperatura controle (32,81%) (P=0,0092). A porcentagem do saco vitelino residual fornece informações do desenvolvimento embrionário e do seu estado nutricional, sendo que a menor porcentagem do saco vitelino residual durante o período de perieclosão indica melhor absorção e utilização de nutrientes pelo embrião. Resultando em embriões e pintainhos em crescimento de melhor qualidade, além de afetar positivamente o estado imunológico dos pintainhos recém-eclodidos, isso porque os anticorpos maternos são transferidos das matrizes para sua progênie através da gema e do albúmen (Dayan et al., 2020). Além disso, a temperatura de incubação tem efeito sobre a expressão de diferentes genes envolvidos em diferentes vias metabólicas no tecido do saco vitelínico, sugerindo que isso pode afetar a utilização da gema e dos recursos nutricionais do saco vitelínico, impactando de forma positiva e/ou negativa a qualidade dos embriões e pintainhos na vida adulta. A maior capacidade antioxidante (DPPH e $ABTS^{\bullet+}$) foi observada nos embriões oriundos de ovos incubados a 39ºC (DPPH P=0,0481 e $ABTS^{\bullet+}$ P=0,0267) e nesses mesmos embriões nós observamos menor conteúdo de flavonoides (P=0,0421) e de ROSt (P=0,0250), bem como a menor oxidação lipidica secundária (P=0,0311) (Figura 1).

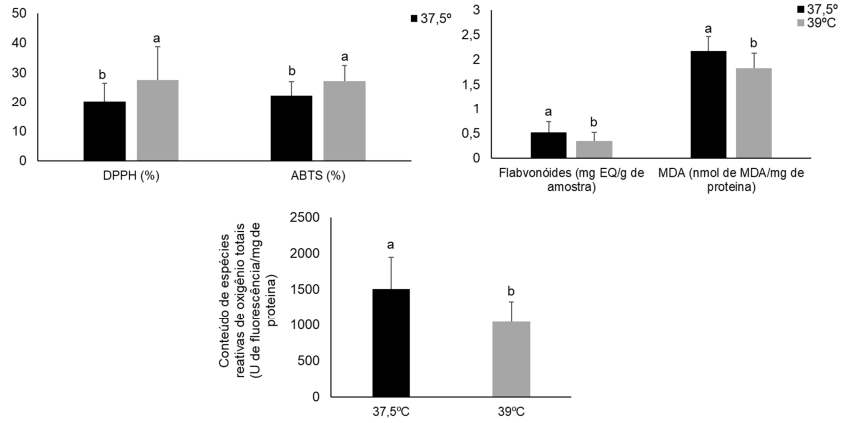



**Figura 1.** Efeito da temperatura de incubação sobre a estabilidade oxidativa do saco vitelinico dos embriões com 15 dias de incubação. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão. $^{a,b}$Médias diferentes pelo teste t de Student (P<0,05). DPPH = atividade antioxidante de neutralização do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil; $ABTS^{\bullet+}$ = atividade antioxidante de por meio da neutralização do radical ácido 2,2′-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico); ROSt = espécies reativas de oxigenio totais, unidade de fluorescência/mg de proteína; MDA = oxidação lipidica secundária – malondialdeido.

Os nossos resultados indicam que embriões oriundos de ovos incubados em alta temperatura durante todo o período de incubação, possivelmente desenvolveram um mecanismo de aclimatação a esta condição, sem a necessidade de grande gasto energético desviado para outros tipos de mecanismo de defesa antioxidante, como

por exemplo, o enzimático. Já que parece que esses embriões priorizaram mais o uso de antioxidantes não enzimáticos como os flavonoides (menor concentração pode ser indicio do uso dessa molécula no combate de radicais livres) para lidar com as espécies reativas de oxigênio. Os resultados sugerem ainda a existência de um equilíbrio entre a quantidade de ROSt e de antioxidantes nessas embriões, uma vez que nós não verificamos a ocorrência peroxidação lipídica primária e observamos menor peroxidação lipídica secundária, indicando que a maior capacidade de defesa antioxidante desses animais, possivelmente mediada pelos antioxidantes não enzimáticos, foi capaz de conter as ROSt interrompendo as reações oxidativas. Um dos mecanismos propostos para isso se baseia na suposição de que fatores ambientais, em especial a temperatura, têm forte influência na determinação do ponto de ajuste dos sistemas de controle fisiológico durante fases críticas do desenvolvimento (Piesutn et al., 2008). A manipulação da temperatura durante a incubação surge como uma estratégia para melhorar a resiliência embrionária e o desempenho pós-eclosão. Uma vez que a exposição controlada a temperaturas específicas durante o desenvolvimento embrionário tem demonstrado ser um método de aprimorar os mecanismos termorregulatórios dos pintainhos (Piesutn et al., 2008; Han et al., 2022; Tona et al., 2022).

## CONCLUSÕES

A temperatura de incubação de 39ºC aplicada durante todo o período de incubação, potencializou a absorção do saco vitelínico residual pelos embriões, bem como reduziu o estresse oxidativo, a oxidação lipídica secundária e aumentou a capacidade antioxidante do saco vitelínico dos embriões. Nossos resultados preveem embriões oriundos de ovos incubados em alta temperatura com menor nível de estresse e possivelmente maior resistência aos diferentes tipos de estresse.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo, a Universidade Estadual de Maringá e ao Departamento de Zootecnia pelo apoio técnico (DZO).

## REFERÊNCIAS

DAYAN, J.; REICHER, N.; MELKMAN-ZEHAVI, T.; UNI, Z. Incubation temperature affects yolk utilization through changes in expression of yolk sac tissue functional genes. **Poultry Science**, v. 99, n. 11, p. 6128-6138, 2020.

HAN, G.; LI, S.; LI, Y.; TRAN, P. V.; FURUSE, M.; BUNGO, T.; CHOWDHURY, V. S.; BAI, Z.; LI, C. Thermal manipulation modifies embryonic growth, hepatic free amino acid concentrations, and hatching performance in layer-type chicks. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, p. 1049910, 2022.

HELAL, M.; MAKIHARA, N.; IWASAWA, A. A Concise review of factors limiting yolk sac nutrient utilization in chicken embryos. Reviews in Agricultural Science, v. 13, n. 1, p. 20-31, 2025.

PIESTUN, Y.; SHINDER, D.; RUZAL, M.; HALEVY, O.; BRAKE, J.; YAHAV, S. Thermal manipulations during broiler embryogenesis: effect on the acquisition of thermotolerance. Poultry Science, v. 87, n. 8, p. 1516-1525, 2008.

TONA, K.; VOEMESSE, K.; N'NANLÉ, O.; OKE, O. E.; KOUAME, Y. A. E.; BILALISSI, A.; METEYAKE, H.; OSO, O. M. Chicken incubation conditions: role in embryo development, physiology and adaptation to the post-hatch environment. **Frontiers in Physiology**, v. 13, p. 1-15, 2022.