

Abanico Veterinario. Janeiro-Dezembro 2020; 10:1-10. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2020.39>
Artigo Original. Recebido: 25/08/2020. Aceito: 28/11/2020. Publicado: 20/12/2020. Chave:2020-73.

Efeito do nível de dióxido de carbono na incubadora sobre o desenvolvimento embrionário e parâmetros de eclosão em frangos de corte.

Effect of incubator carbon dioxide level on embryonic development and hatching parameters in broiler chicken

Prado-Rebolledo Omar* ^{ID}, Castellano-Ortega José ^{ID}, Ruíz-Ramírez Johnatan ^{ID}, Zepeda-Batista José ^{ID}, García-Casillas Arturo ^{ID}**

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Colima. México. *Autor responsável: Prado-Rebolledo Omar. Kilómetro 40, Carretera Colima-Manzanillo. Crucero de Tecomán, Colima. C.P. 28100. **Autor para correspondência: García-Casillas Arturo. omarpr@ucol.mx, jcastellanos4@ucol.mx, jruiz7@ucol.mx, jzepeda15@ucol.mx, cesargarciasillas@hotmail.com

RESUMO

Oxigênio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2) são gases vitais para o embrião durante o processo de incubação, seu nível é imprescindível no momento da bicada, a fim de avaliar o efeito do nível de dióxido de carbono da In da incubadora sobre o embrionário. o desenvolvimento, os parâmetros de incubação e o subsequente crescimento do frango, a perda de umidade, eclodibilidade, peso do frango, tamanho do frango, glicose no sangue, hematócrito e proteínas plasmáticas foram medidos. Foram selecionados 600 ovos de reprodutores comerciais Cobb 500 de 41 semanas, com peso de 65 e 70 g, distribuídos em duas incubadoras. Uma máquina foi mantida a 4000 ppm e a outra a 3000 ppm de CO_2 . Foi utilizado um planejamento fatorial 2 x 2. A eclodibilidade foi superior a 3.000 ppm de CO_2 e o peso do ovo foi de 65 g; o frango mais pesado ficou com 70 g de ovo, quanto maior o CO_2 ppm, menor a perda de umidade, menor o CO_2 ppm, um frango maior foi observado, os níveis de glicose não foram afetados, mas os valores de proteína plasmática foram inferiores a 3000 ppm de CO_2 . Os parâmetros de incubação são melhorados diminuindo o ppm de CO_2 durante o processo de incubação.

Palavras-chave: incubação, dióxido de carbono, embrião, gases.

ABSTRACT

Oxygen (O_2) and carbon dioxide (CO_2) are vital gases for the embryo during the incubation process, its level is essential at pipping, to evaluate the effect of incubator carbon dioxide level on embryonic development, hatching parameters, and post-hatch growth of broiler, humidity loss, hatchability, weight of chicken, size of chicken, blood glucose, hematocrit and plasma proteins were measured. A total of 600 eggs from commercial breeding Cobb 500 41 weeks, were selected by weight from 65 to 70 g, were distributed on two incubators. A machine was kept at 4000 ppm and the other to 3000 ppm CO_2 . We used a 2 x 2 factorial design. The hatchability was better to 3000 ppm of CO_2 and egg weight of 65 g chicken egg; the chicken was heavier with eggs of 70 g, to more ppm of CO_2 reduction in the loss of humidity, was observed over a large chicken, blood glucose levels were not affected, but the values of plasma protein were less than 3000 ppm CO_2 . Improved hatching parameters at lower ppm of CO_2 during the incubation process.

Keywords: incubation, carbon dioxide, embryo, gases.

ABREVIATÖES

DE	desenvolvimento embrionário	SA	Síndrome ascítica
CO ₂	dióxido de carbono	UR	Umidade relativa
pO ₂	pressão parcial de oxigênio	O ₂	oxigênio
pCO ₂	pressão parcial de dióxido de carbono		

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento embrionário (**DE**) depende, em primeira instância, dos poros da casca que permitem a difusão de oxigênio (**O₂**) e dióxido de carbono (**CO₂**) entre o ambiente externo do ovo e o sangue do embrião ([Cordeiro e Hincke, 2016](#)). Essa troca gasosa se desenvolve através da membrana corioalantóide ([John, 2017](#)), que é fornecida pelos vasos sanguíneos e cuja função é semelhante à placenta de fetos mamíferos ([Koyama e Tennyson, 2016](#)). A função primária do sistema respiratório é transportar O₂ e CO₂, entre o meio ambiente e os tecidos ([D'Alba et al., 2017](#)); portanto, a respiração é regulada para atender às demandas metabólicas, fornecendo O₂ e eliminando o CO₂ ([Okur, 2019](#)). A pressão parcial de oxigênio (**pO₂**) e a pressão parcial de dióxido de carbono (**pCO₂**) na câmara de ar são um estímulo para o embrião realizar a bicada ([Deeming, 2016](#)).

[Gildersleeve e Boeschen \(1983\)](#) realizaram um experimento com ovos de peru, onde adicionaram níveis de CO₂ superiores às concentrações atmosféricas, a fim de estimular a DE durante o início do período de incubação, embora a DE fosse estimulada, não houve diferenças na eclodibilidade entre os ovos incubados varia de CO₂ atmosférico a 1% de CO₂ durante os primeiros 2 dias de incubação, de modo que a temperatura da casca, juntamente com a concentração de CO₂, afeta o peso corporal do pintinho ao nascer ([Maatjens et al., 2014a](#); [Maatjens et al., 2014b](#)).

De [Smit et al \(2006\)](#) e [De Smit et al \(2008\)](#) modificaram as condições de ventilação, para aumentar o CO₂ durante os primeiros 10 dias do DE, usando duas cepas reprodutivas, 45 e 60 semanas de idade; com diferentes níveis de suscetibilidade à síndrome da ascite (**SA**). Os níveis de CO₂ resultaram em 1 e 1,5%, portanto, o DE10 de níveis mais elevados de CO₂ resultou em maior peso corporal absoluto e relativo (ao peso do ovo) do que o DE10 a DE18; apresentaram crescimento acelerado, níveis elevados de corticosterona e T3 plasmático e pCO₂ mais alto na câmara de ar; a janela de incubação foi menor no tempo de 10 a 15 he o peso do pintinho foi maior em relação à ventilação normal. Da mesma forma, [García et al \(2013\)](#) [García et al \(2013\)](#) restringiram a ventilação durante os primeiros 10 dias de ED e encontraram uma melhora nos parâmetros de incubação.

Durante a última fase de desenvolvimento, o embrião de galinha varia seu consumo de O₂ com a temperatura ambiente ([Deeming, 2016](#)). Durante a 2ª fase da DE, uma vez que o embrião produz seu próprio calor metabólico, ele remove CO₂ em uma faixa de 0,05 a 0,3% ([D'Alba et al., 2017](#)), portanto, também depende da difusão de gases para através do poros ([Mortola e Labbe, 2005](#)). Assim, uma condição hipóxica pode limitar a DE, limitar o desenvolvimento do bico e do pé, desenvolver hipertrofia cardíaca, alterações no ritmo

cardíaco, edema pericárdico e pulmonar, alterações na hemoglobina e SA; já no último estágio da DE, fase em que ocorre a condição hipóxica, o embrião consome até 60% mais O₂ (Burggren e Elmonoufy, 2017; John, 2017; Itani *et al.*, 2018). Outro fator que pode desempenhar um papel importante na DE é a altitude; uma vez que a condutância da casca diminui. Nesse estágio, o embrião precisa de energia do metabolismo anaeróbico (Huang *et al.*, 2017). A glicose sanguínea e as reservas de glicogênio tecidual são o que fornece essa energia, necessária para a incubação (Fathollahipour *et al.*, 2018). Sabe-se que existem diferenças no metabolismo de embriões com diferentes idades e linhagens comerciais, portanto, se se pretende otimizar as condições de incubação, é necessário aprofundar suas necessidades (Hamidu *et al.*, 2018).

O objetivo da presente investigação foi determinar o efeito dos parâmetros de incubação com dois níveis de CO₂ e dois pesos de ovos.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento seguiu as diretrizes institucionais e nacionais para o cuidado e uso de animais; todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Colima. O estudo foi realizado com 600 ovos férteis de criador comercial Cobb 500, com 41 semanas de idade e pesando 65 e 70 g. Os ovos foram colocados em duas incubadoras comerciais de estágio único (HatchTech; Gildetrom 25.3905 TB., Veenendaal, Holanda), com capacidade para 4800 ovos/cada. As máquinas, que possuem sensor de temperatura ($\pm 0,1^{\circ}\text{F}$), sensor de umidade [$\pm 1\%$ umidade relativa (UR)] e sensor de CO₂ (± 100 ppm). Os ovos foram virados num ângulo de 45° e 90° a cada hora.

A circulação do ar era horizontal e laminar, através de radiadores perfurados, que causam diferenças de pressão, para melhor distribuição do ar e fluxo uniforme em cada massa de ovo, de cima para baixo e de frente para trás. As mesmas máquinas funcionavam como nascedouros e, em ambas, era feito o gerenciamento rotineiro de uma incubadora, desde a recepção do ovo até a retirada das incubadoras.

Design experimental

O experimento foi estabelecido em delineamento inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 2 x 2, com 2 concentrações de CO₂ da incubadora (3000 vs. 4000 ppm) e 2 pesos de ovos (65 e 70 g); os tratamentos foram divididos em 2 grupos subsequentes com 2 tratamentos por grupo. Anteriormente, uma seleção era feita onde ovos quebrados, sujos, microfraturados, deformados e sem peso eram descartados. Os ovos foram identificados individualmente, com um marcador de tinta indelével na ampla superfície onde está localizada a câmara de ar. As máquinas incubadoras foram mantidas na mesma temperatura por estágio durante todo o processo de incubação; 37,8 °C durante o dia 0, 37,6 °C do dia 1 ao 8, 37,5 °C do dia 9 ao 11 e 37,2 °C do dia 12 ao 21. A UR foi mantida a 50% ao longo do processo de incubação. A concentração de CO₂ foi monitorada

durante todo o processo de incubação, para verificar se permanecia dentro das faixas estabelecidas no protocolo de pesquisa.

Os critérios de resposta foram o peso individual dos ovos antes da incubação e durante a transferência no dia 18, para determinar por diferença de peso a perda de umidade, eclodibilidade, peso corporal e tamanho (medição do pico ao dedo médio sem considerar a unha).

Medições de parâmetros sanguíneos

Vinte embriões foram randomizados para uso na determinação de parâmetros sanguíneos. O sangue foi extraído da veia jugular dos embriões ou galinhas, com seringa de 1 mL e agulha calibre 30, e coletado em tubos heparinizados. Posteriormente, o sangue foi coletado em um capilar heparinado (150 µL) e imediatamente apresentado a um analisador de gases sanguíneos (GEM Premier 3000; Instrumentation Laboratory., Lexington, Massachusetts), para determinar os critérios de resposta de glicose, hematócrito e proteína plasmática.

Análise estatística

Os dados foram processados usando o programa estatístico (SAS, System, v. 8.2, Cary, NC). As distribuições de médias e resíduos foram examinadas para verificar as premissas do modelo. A eclodibilidade, peso do pintinho, perda de umidade, tamanho do pintinho, glicose, hematócrito e proteínas plasmáticas foram analisados por tempo de amostragem; usando regressão linear geral (PROC GLM), com 2 concentrações de CO₂, 2 pesos de ovos e sua interação como variáveis de classe. Para todos os parâmetros, o pintinho foi considerado a unidade experimental. Foi realizado o teste de comparações múltiplas de Tukey, quando o efeito de grupo foi considerado significativo ($P < 0,05$). Os dados expressos em porcentagem foram transformados para a proporção do arco-seno para análise.

RESULTADOS

Na Tabela 1, observa-se que o maior percentual de eclodibilidade foi com a concentração de 3.000 ppm de CO₂, e com 65 g no peso dos ovos. Os níveis de CO₂ considerados no experimento não afetaram o peso do frango; portanto, os tratamentos com 70 g de ovos obtiveram frangos mais pesados. A menor porcentagem de perda de umidade em relação à concentração de CO₂ foi registrada a 4000 ppm e sem diferenças estatísticas ($P < 0,05$), entre os ovos com 65 e 70 g. O maior tamanho do frango com relação à concentração de CO₂ foi observado a 3000 ppm e sem diferenças estatísticas entre os ovos com 65 e 70 g.

Tabela 1. Efeitos de 2 concentrações de dióxido de carbono na incubadora (3000 e 4000 ppm) e 2 pesos de ovos (65 e 70g) na eclodibilidade, peso do pintinho, perda de umidade, tamanho do pintinho, glicose, hematócrito e proteínas plasmáticas ($n = 20$ por $\text{CO}_2 \times$ peso do ovo)

Fator	Eclodibilidade e (%)	Peso do frango (g)	Perda de umidade (%)	Tamanho do frango (cm)	Glicose (mg/dL)	Hematócrito (%)	Proteínas plasmáticas (g/dL)
CO ₂ (ppm)							
3000	88.10 ^a	46.53	10.19 ^a	19.44 ^a	200.05	33.60	2.43 ^b
4000	86.40 ^b	47.00	8.70 ^b	18.44 ^b	188.85	36.80	2.71 ^a
Erro quadrado médio	2.77	2.91	2.59	0.22	373.53	12.05	0.17
Peso do ovo (g)							
65	88.10 ^a	44.99 ^b	9.49	18.83	195.20	34.60	2.56
70	86.40 ^b	48.54 ^a	9.41	19.06	193.70	35.80	2.59
Erro quadrado médio	2.77	2.91	2.59	0.22	373.53	12.05	0.17
CO ₂ (ppm) x peso do ovo (g) (g)							
3000 x 65	88.60	44.13	10.51	19.44	195.60	34.30	2.34
3000 x 70	87.60	48.93	9.87	19.45	204.50	32.90	2.53
4000 x 65	87.60	45.85	8.47	18.22	194.80	34.90	2.78
4000 x 70	85.20	48.16	8.94	18.67	182.90	38.70	2.65
Valor <i>P</i>							
CO ₂	0.03	0.38	<.0001	<.0001	0.07	0.006	0.04
Peso do ovo	0.03	<.0001	0.62	0.13	0.80	0.28	0.82
CO ₂ x peso do ovo	0.36	0.02	0.0007	0.15	0.09	0.02	0.23

^{a, b} As médias dos mínimos quadrados seguidas por sobrescritos diferentes numa coluna e fator são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Na Tabela 1, observa-se que a combinação entre as concentrações de CO₂ e os pesos dos ovos não apresentou diferenças dentro do grupo (65 e 70 g, respectivamente); mas sim entre os grupos, com o menor peso do frango ($P < 0,05$), no tratamento que combina 3000 ppm de CO₂ com 65 g de ovos. Em relação ao tamanho do frango, o resultado com maior tamanho foi observado na combinação de 3.000 ppm de CO₂, com ovos de 65 e 70 g. A concentração de glicose no sangue não mostrou diferenças em ambos os fatores. O maior percentual de hematócrito com relação à concentração de CO₂ foi registrado em 4000 ppm e sem diferença estatística ($P < 0,05$), entre os ovos com 65 e 70 g. A maior concentração de proteínas plasmáticas em relação à concentração de CO₂, foi registrada em 4000 ppm. O resultado com maior percentual de hematócrito foi registrado na combinação de 4000 ppm de CO₂, com ovos de 70 g.

DISCUSSÃO

A eclodibilidade (é a capacidade do ovo de eclodir) melhora com uma concentração mais baixa de CO₂ ([Fathollahipour et al., 2018](#)). No presente trabalho, verificou-se que a menor concentração de CO₂ melhora a eclodibilidade; portanto, a integridade da carcaça desempenha um papel importante para a troca gasosa. Assim, quando o embrião atinge o dia 18 de incubação, a respiração pulmonar começa, onde o hormônio tireoidiano desempenha um papel importante no desenvolvimento do surfactante pulmonar ([Hamidu et al., 2018](#)). O processo de respiração pulmonar contribui com O₂ para o embrião de galinha ([Deeming, 2016](#)); porém, a maturação da respiração pulmonar sem ter a casca intacta, e com o aumento da demanda metabólica de O₂ ao final da incubação, causam um aumento da pCO₂ e diminuição da pO₂ na câmara de ar, ([Flores-Santin et al., 2018](#)), ativando o mecanismo de gatilho de nascimento ([Ramachandran e McDaniel, 2018](#)). Assim, a DE normal do frango depende das trocas de ar que ocorrem através da membrana corioalantóide ([John, 2017](#)), que, junto com os poros da casca, realiza as trocas de O₂ e CO₂ entre o sangue e o meio ambiente ([Deeming, 2016](#)).

A casca é a principal responsável pela diferença entre o pCO₂ e o vapor d'água, onde o fluxo de O₂ é afetado pela casca e pela membrana interna ([Ramachandran e McDaniel, 2018](#)); portanto, pode ser uma das principais razões pelas quais a eclodibilidade não foi eficaz num nível mais alto de CO₂. Da mesma forma, a condutância do gás na casca depende da relação entre a área do poro e seu comprimento; no final, essa relação equivale à espessura da casca ([Cordeiro e Hincke, 2016](#)).

No presente estudo, observou-se que por haver menor concentração de CO₂ no ambiente, a eclosão foi melhorada; uma vez que uma condição de hipóxia não foi criada no final do processo de incubação e pO₂ e pCO₂ na câmara de ar não foram afetados. Quando os embriões são submetidos a condições de hipóxia durante o processo de incubação, o crescimento do corpo, bico e pernas é inibido; conforme mencionado ([Burggren e Elmonoufy, 2017](#)). No experimento, o peso do frango não foi afetado pelas diferentes concentrações de CO₂, mas os frangos que saíram de ovos com 70 g foram

mais pesados. Nesse sentido, sabe-se que o peso do frango está diretamente relacionado ao peso do ovo (D'Alba *et al.*, 2017). O tamanho do frango era maior quando a concentração de CO₂ era de 3000 ppm, esses dados sugerem que se os embriões se desenvolvem em condições ambientais com baixa concentração de O₂, eles perdem peso durante a bicagem e a incubação (Ramachandran e McDaniel, 2018). Portanto, embriões em condições densas de O₂ ambiente ganham peso; Isso implica que os embriões em ambientes ambientais ricos em O₂ estão melhor preparados metabolicamente para iniciar a bicagem e o nascimento (Deeming, 2016).

No estudo, o tamanho do frango foi utilizado como critério de qualidade para determinar o desempenho produtivo do rebanho; por outro lado, o conteúdo de glicogênio nos tecidos corporais é importante na exigência fisiológica no momento do início da bicada (Maatjens *et al.*, 2014a; Maatjens *et al.*, 2014b). Da mesma forma, influencia diretamente a sobrevivência do embrião; Assim, no estudo, as condições de CO₂ não afetaram os níveis de glicose no sangue das galinhas, o que pode condicionar a vitalidade das aves na granja.

O nível de hematócrito apresentou tendência numérica ligeiramente superior no tratamento com maior concentração de CO₂, informação semelhante à relatada por Scheele *et al.* (2003) que quantificou valores elevados de hematócrito como resultado dum aumento na resposta eritropoiética. A concentração de proteína plasmática foi menor quando as condições de CO₂ foram mantidas em 4000 ppm. Esses dados sugerem que em ambientes ricos em CO₂, a resposta eritropoiética é mais utilizada (Ramachandran e McDaniel, 2018), e como consequência a concentração de proteínas plasmáticas é reduzida, conforme observado no presente estudo.

Durante DE de frango, incubadoras comerciais lidam com concentrações de 4000 ppm de CO₂; mas com os resultados obtidos, sugere-se baixar a referida concentração para 3000 ppm, principalmente para melhorar a eclodibilidade.

CONCLUSÃO

Concentrações de CO₂ de 3000 ppm melhoram a eclodibilidade, a perda de umidade e o tamanho do pintinho; também tem baixos níveis de proteínas plasmáticas.

LITERATURA CITADA

BURGGREN WW, Elmonoufy NA. 2017. Critical developmental windows for morphology and hematology revealed by intermittent and continuous hypoxic incubation in embryos of quail (*Coturnix coturnix*). *PLoS One*. 12(9):e0183649. ISSN: 1932-6203. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0183649>

CORDEIRO CM, Hincke MT. 2016. Quantitative proteomics analysis of eggshell membrane proteins during chick embryonic development. *Journal of Proteomics*. 130:11-25. ISSN: 1876-7737. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2015.08.014>

D'ALBA L, Torres R, Waterhouse GIN, Eliason C, Hauber ME, Shawkey MD. 2017. What does the eggshell cuticle do? a functional comparison of avian eggshell cuticles. *Physiological and Biochemical Zoology*. 90(5):588-599. ISSN: 1537-5293. <http://dx.doi.org/10.1086/693434>

DEEMING DC. 2016. How does the bird-nest incubation unit work? *Avian Biology Research*. 9(2):103-113. ISSN: 1758-1559. <http://dx.doi.org/10.3184/175815516X14567543242701>

DE SMIT L, Bruggeman V, Tona JK, Debonne M, Onagbesan O, Arckens L, De Baerdemaeker J, Decuyper E. 2006. Embryonic developmental plasticity of the chick: Increased CO₂ during early stages of incubation changes the developmental trajectories during prenatal and postnatal growth. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 145(2):166-175. ISSN: 1095-6433. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.06.046>

DE SMIT L, Bruggeman V, Debonne M, Tona JK, Kamers B, Everaert N, Witters A, Onagbesan O, Arckens L, De Baerdemaeker J, Decuyper E. 2008. The effect of nonventilation during early incubation on the embryonic development of chicks of two commercial broiler strains differing in ascites susceptibility. *Poultry Science*. 87(1):551-560. ISSN: 0032-5791. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00322>

FATHOLLAHIPOUR S, Patil PS, Leipzig ND. 2018. Oxygen regulation in development: lessons from embryogenesis towards tissue engineering. *Cells Tissues Organs*. 205(5-6):350-371. ISSN: 1422-6421. <http://dx.doi.org/10.1159/000493162>

FLORES-SANTIN J, Rojas Antich M, Tazawa H, Burggren WW. 2018. Hematology from embryo to adult in the bobwhite quail (*Colinus virginianus*): Differential effects in the adult of clutch, sex and hypoxic incubation. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*. 218(1):24-34. ISSN: 0301-5092. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.01.005>

GARCÍA HJ, Juárez EMA, Córdova SL. 2013. Gradual increase of CO₂ during first stages of incubation with late change of O₂ partial pressure, modifies the hatch trajectory of broiler chicks. *Veterinaria México*. 44(1):1-16. ISSN: 0032-5791. <http://veterinariamexico.unam.mx/index.php/vet/article/view/325>

GILDERSLEEVE RP, Boeschen DP. 1983. The effects of incubator carbon dioxide level on turkey hatchability. *Poultry science*. 62(5):779-784. ISSN: 0032-5791. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.0620779>

HAMIDU JA, Torres CA, Johnson-Dahl ML, Korver DR. 2018. Physiological response of broiler embryos to different incubator temperature profiles and maternal flock age during incubation. 1. Embryonic metabolism and day-old chick quality. *Poultry Science*. 97(8):2934-2946. ISSN: 1525-3171. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.pey089>

HUANG S, Zhang L, Rehman MU, Iqbal MK, Lan Y, Mehmood K, Zhang H, Qiu G, Nabi F, Yao W, Wang M, Li J. 2017. High altitude hypoxia as a factor that promotes tibial growth plate development in broiler chickens. *PLoS One*. 12(3):e0173698. ISSN: 1932-6203. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0173698>

ITANI N, Salinas CE, Villena M, Skeffington KL, Beck C, Villamor E, Blanco CE, Giussani DA. 2018. The highs and lows of programmed cardiovascular disease by developmental hypoxia: studies in the chicken embryo. *Journal of Physiology*. 596(15):2991-3006. ISSN: 1469-7793. <http://dx.doi.org/10.1113/JP274111>

JOHN NM. 2017. Structure and function of the shell and the chorioallantoic membrane of the avian egg: embryonic respiration. In: *The Biology of the Avian Respiratory System*. Springer. 219-247 p. ISBN: 978-3-319-44152-8. https://doi.org/10.1007/978-3-319-44153-5_9

KOYAMA T, Tennyson AJD. 2016. Respiratory pores on Ostrich *Struthio camelus* (Aves: Struthionidae) eggshells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 923(1):51-55. ISSN: 0065-2598. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-38810-6_7

MAATJENS CM, Reijrink IA, Molenaar R, van der Pol CW, Kemp B, van den Brand H. 2014a. Temperature and CO₂ during the hatching phase. I. Effects on chick quality and organ development. *Poultry science*. 93(3):645-654. ISSN: 0032-5791. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2013-03490>

MAATJENS CM, Reijrink IA, van den Anker I, Molenaar R, van der Pol CW, Kemp B, van den Brand H. 2014b. Temperature and CO₂ during the hatching phase. II. Effects on chicken embryo physiology. *Poultry science*. 93(3):655-663. ISSN: 0032-5791. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2013-03491>

MORTOLA JP, Labbe K. 2005. Oxygen consumption of the chicken embryo: interaction between temperature and oxygenation. *Respiratory physiology & neurobiology*. 146(1):97-106. ISSN: 1569-9048. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2004.10.011>

OKUR N. 2019. Effects of incubator carbon dioxide and oxygen levels, and egg weight on Broilers' hatchability of fertile eggs. *Brazilian Journal of Poultry Science*. 21(3). ISSN: 1516-635X. <http://dx.doi.org/10.1590/1806-9061-2019-1038>

RAMACHANDRAN R, McDaniel CD. 2018. Parthenogenesis in birds: a review. *Reproduction*. 155(6):R245-R257. ISSN: 1741-7899. <http://dx.doi.org/10.1530/REP-17-0728>

SAS. 2001. SAS/STAT User's guide. 8.2, v. SAS Institute Inc. Cary, NC.

SCHEELE CW, van Der Klis JD, Kwakernaak C, Buys N, Decuyper E. 2003. Haematological characteristics predicting susceptibility for ascites. 2. High haematocrit values in juvenile chickens. *British Poultry Science*. 44(3):484-489. ISSN: 0007-1668. <http://dx.doi.org/10.1080/00071660310001598300>