



El incremento gradual de CO₂ en la primera mitad de la incubación, con cambio posterior de la presión de O₂, modifica la trayectoria de incubación del pollo de engorda

Gradual increase of CO₂ during first stages of incubation with late change of O₂ partial pressure, modifies the hatch trajectory of broiler chicks

Janet García Herrera* Marco Antonio Juárez Estrada* Sonia López Córdova*

Abstract

This work was conducted to determine the effect of non-ventilation (NV) during the first 10 days of incubation on carbon dioxide (CO₂) concentrations and its effects on embryonic development (ED). Two studies were done on fertile hatching eggs from breeder hens (Ross 308) of 30 and 45 weeks of age. In the first study, two different incubation conditions were created, one incubator was non-ventilated (NV) during the first ten days of incubation, allowing the CO₂ to rise and a second incubator was kept under standard conditions, with adequate ventilation (V). After the first 10 days, both incubations were kept under standard conditions. NV group at 10 days of incubation showed 11 600 ppm of [CO₂], with 48% of hatchability from fertile eggs, higher ($P < 0.05$) than 2 100 ppm of [CO₂], and 41% of hatchability from fertile eggs of V group. Day-old chicks from NV were longer and heavier than chicks from V group. For the second study, two different incubation conditions were created, one incubator was moderately non-ventilated (MNV), and the second one was strictly non-ventilated (SNV). At transfer time, a hole of 1.3 mm in diameter was done over eggshell air cell, every incubator had two groups: with hole (H) and without hole (NH). MNV group at ten days of incubation showed 15 000 ppm of [CO₂], and SNV group showed 17 000 ppm of [CO₂], with 82% and 77% of hatchability, respectively. The induced hypercapnia during the early development stage improved hatchability parameters, weight and length of chicks. In 45 week-old breeder hens, an optimal hatching profile at high height above sea level with a limit of 15 000 ppm of [CO₂] was determined. The eggshell hole helps to reduce embryonic mortality at 19.8 days; however, under this type of NV incubation, it is very important to take into account egg-mass loss, height above sea level and eggshell conductance constant, since all these factors contribute to generate the optimal partial pressure of [O₂] and [CO₂] before and during hatching.

Key words: EGSHELL CONDUCTANCE, HATCHABILITY, *GALLUS GALLUS*, EMBRYODIAFNOSIS, EGG-MASS LOSS.

Resumen

Se implementó ventilación restringida (VR) para obtener un aumento gradual de CO₂ durante los primeros 10 días del desarrollo embrionario (DE) en dos estudios con huevos fértiles de aves reproductoras pesadas (Ross 308) de 30 y 45 semanas de edad. En el primer estudio se formaron dos grupos: VR y ventilación estándar (V). El grupo VR al día 10 del DE mostró 11 600 ppm de [CO₂], con 48% de incubabilidad, mayor a las 2 100 ppm de CO₂ y 41% de incubabilidad del grupo V. Los pollitos del grupo VR fueron más largos y pesados. En el segundo estudio, los grupos fueron: ventilación restringida media (VRM) y ventilación restringida alta (VRA). Al momento de la transferencia se efectuó una perforación de 1.3 mm en la cámara de aire, los grupos se subdividieron en cascarón sin perforar (CSP) y cascarón perforado (CP). El grupo VRM mostró 15 000 ppm de [CO₂] y el VRA 17 000 ppm, con 82% y 77% de incubabilidad, respectivamente. La hipercapnia inducida en la etapa temprana del DE favorece los parámetros de incubación, el peso y la longitud de los pollitos. En gallinas de 45 semanas de edad se determinó un perfil óptimo de incubación a gran altitud sobre el nivel del mar, con límite de 15 000 ppm para [CO₂].

Recibido el 12 de junio de 2012 y aceptado el 14 de noviembre de 2012

*Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, DF.

Responsable de correspondencia: Marco Antonio Juárez Estrada, teléfono: 5616-6923, 5622-5867 y 68 ext. 220, correo electrónico: britoco@unam.mx.

Nota: El presente artículo forma parte de la tesis de Licenciatura de Janet García Herrera.

La perforación en el cascarón disminuye la mortalidad en la etapa de inicio de la respiración pulmonar; sin embargo, debe lograrse el equilibrio hídrico de los embriones, además de considerar la altitud sobre el nivel del mar y el grado de k = conductancia del cascarón, ya que estos factores son clave para una óptima presión parcial de $[O_2]$ y $[CO_2]$ antes y durante la eclosión.

Palabras clave: CONDUCTANCIA DEL CASCARÓN, NATALIDAD, *GALLUS GALLUS*, EMBRIODIAGNÓSTICO, BALANCE HÍDRICO.

Introduction

Embryonic development (ED) of domestic fowl is a dynamic process that requires a balance between the factors involved; although age, genetics and feeding of parents influence egg size, the hatching success is largely determined by embryo viability and eggshell quality, in addition to the physical and chemical composition of the environment surrounding the egg.^{1,2}

Gas exchange is essential for ED during incubation, if this is not appropriate, it may affect embryo viability.^{1,2} Although O_2 is the gas that drives the metabolic machinery of embryonic cells to obtain a complex development, production and presence of CO_2 is essential in the generation of internal pressure which favors gas exchange.² Artificially, chicken eggs are incubated in an atmosphere with 21% O_2 and 400 to 5,000 ppm of CO_2 during different periods of incubation. Ventilation provides O_2 to incubators for embryos and removes the excess CO_2 generated. However, recent research has shown that hypercapnia induced in certain periods throughout the incubation process can be beneficial for ED.^{3,5} For example, De Smit *et al.*⁴ observed that a gradual increase up to 15,000 ppm of CO_2 during the first 10 days of incubation, favors further development of the embryo and a better development in bird growth after hatching. Willemsen *et al.*,⁵ with a non-ventilation (NV) system during this same period, reported a lower proportion of embryos in a bad position and a higher percentage of births. The tolerance of embryos to CO_2 is modified as ED advances, which is due to the rapid establishment of the primary respiratory system through the vasculosa and chorioallantoic membrane (CAM), which starts its operation at 96 hours of ED and is fully functional at 150 hours of the process.^{4,6} Both structures allow diffusion of oxygen, carbon dioxide and H_2O vapor between the environment and the blood of the embryo during the early and medium incubation process.⁷ Therefore, the increasing CO_2 pressure outside the shell tends to induce a lack of O_2 availability, which promotes development and early operation of the CAM. Therefore, there is a higher development of certain embryo organs, that, by encouraging a rapid ED, leads to greater maturity, hence, hatching occurs earlier, with a narrower window of births and a general optimization of

Introducción

El desarrollo embrionario (DE) de las aves domésticas es un proceso dinámico que requiere de un equilibrio entre los factores involucrados; aunque la edad, la genética y la alimentación de los progenitores influyen en el tamaño del huevo, son la viabilidad del embrión, la calidad del cascarón, además de la composición química y física del medio ambiente que rodea al huevo los que determinan, en gran parte, el éxito de su eclosión.^{1,2}

El intercambio de gases es fundamental para el DE durante la incubación, ya que si éste no es apropiado, se puede afectar la viabilidad del embrión.^{1,2} Aunque el O_2 es el gas que impulsa la maquinaria metabólica de las células embrionarias con el fin de obtener un desarrollo complejo, la producción y presencia del CO_2 es imprescindible en la generación de la presión interna que favorece el intercambio gaseoso.² De manera artificial, los huevos de gallina son incubados en un ambiente con 21% de O_2 y de 400 a 5,000 ppm de CO_2 durante los diferentes periodos de la incubación. La ventilación de las incubadoras proporciona O_2 para el embrión y elimina el exceso de CO_2 generado. Sin embargo, investigaciones recientes han mostrado que la hipercapnia inducida en determinados periodos a lo largo del proceso de incubación puede ser benéfica para el DE.^{3,5} Por ejemplo, De Smit *et al.*⁴ observaron que un aumento gradual de hasta 15,000 ppm de CO_2 durante los primeros 10 días de incubación, favorece un mayor desarrollo del embrión y un mejor desenvolvimiento en el crecimiento de las aves después de su eclosión; Willemsen *et al.*,⁵ con un sistema de no-ventilación (NV) durante este mismo periodo, observaron una menor proporción de embriones en mala posición y un mayor porcentaje de nacimientos. La tolerancia de los embriones al CO_2 se modifica conforme avanza el DE, lo cual se debe a un rápido establecimiento del sistema respiratorio primario a través de la vasculosa y de la membrana corioalantoidea (MCA), la cual inicia su funcionamiento a las 96 horas del DE y se encuentra completamente funcional a las 150 horas de dicho proceso.^{4,6} Ambas estructuras permiten la difusión de oxígeno, bióxido de carbono y vapor de H_2O entre el medio ambiente y la sangre del embrión durante el proceso de incubación temprano y medio.⁷ Por lo tanto, el incremento de la presión externa al cascarón por el

hatchability.^{1,4,8,9} In order to achieve good flock uniformity, it is preferable the existence of a short birth window during incubation, since a CO₂ concentration higher than 20,000 ppm encourages chicks to peck at the shell.¹⁰ The primary stimulus to trigger the internal pecking is the increase of CO₂, with a significant elevation in the concentration of corticosterone and T3/T4. High availability of O₂ is required once the air reservoir cell is exhausted. This is the more critical ED stage, because if the future chick is not successful at changing from diffusive to convective respiration in a period of about 6 hours, their survival is compromised. According to several studies, an availability of up to 23% O₂ during this period can enhance birth rate.¹¹⁻¹⁴

Meir and Tazawa¹⁵ describe a way to try to increase the percentage of births, which is drilling the shell over the air cell during the second stage of the incubation period of fertile chicken and goose eggs. Drilling tentatively increases the partial pressure of oxygen (PaO₂) internally and laterally to the CAM,^{16,17} which as indicated by Meir and Tazawa,¹⁵ improves gas exchange and increases the availability of oxygen to the embryo in one of the most critical stages of ED, when diffusive breathing of the CAM is being gradually replaced to the convectively breathing of the air capillaries of the lungs. Correa *et al.*¹⁸ described a method for applying vaccines *in ovo* by automatic injection in which the inoculated embryos showed better hatchability after 460 hours and before the 468 hours of incubation, possibly by promoting gas exchange. The present study evaluated a change in the trajectory of incubation in order to favor ED, attributed to early incubation with increasing concentrations of CO₂, coupled with the increased availability of O₂ in the critical time of embryonic breathing change from diffusive to convective when transferring from the incubator to the hatcher.

Material and methods

Fertile eggs from breeder hens of the Ross 308 breed, 30 and 45 weeks old, housed in a farm located at 890 masl in Jojutla, Morelos, Mexico were used. Eggs were transferred to the incubation site at a height of 2,230 meters, weighed, identified and then randomly assigned to each treatment.

Experimental design

For the first study, eggs from 30-week-old birds were divided into two experimental groups: the first one with a non-ventilation (NV) system and the second one with adequate ventilation (V). The same type of incubator machine was used for both tests.* The NV system was achieved during the first 10 days of incubation,

CO₂ tiende a inducir una falta de disponibilidad de O₂, lo cual promueve el desarrollo y funcionamiento más precoz de la MCA; consecuentemente, hay un mayor desarrollo de determinados órganos del embrión, que, al favorecer un acelerado DE, propicia una mayor madurez, por lo tanto, la eclosión es más temprana, con una ventana de nacimientos más estrecha y una optimización general de la incubabilidad.^{1,4,8,9} Para lograr una buena uniformidad de parvada es preferible que durante la incubación exista una ventana de nacimiento corta, ya que una concentración mayor a 20,000 ppm de CO₂ estimula a los pollitos a picar el cascarón.¹⁰ El estímulo primordial para disparar el picaje interno es el incremento de CO₂, con un aumento significativo en la concentración de corticosterona y T3/T4; agotada la reserva de aire de la cámara, se requiere contar con gran disponibilidad de O₂, ésta es la etapa más crítica del DE, ya que si el futuro pollito no logra efectuar favorablemente el cambio de respiración difusiva a convectiva en un periodo aproximado de 6 horas, se compromete su sobrevivencia. De acuerdo con diversas investigaciones se ha observado que una disponibilidad de hasta 23% de O₂ durante este periodo puede contribuir a mejorar la tasa de natalidad.¹¹⁻¹⁴

Meir y Tazawa¹⁵ describen una forma para tratar de aumentar el porcentaje de nacimientos, que consiste en la perforación del cascarón sobre la cámara de aire durante la segunda etapa del periodo de incubación de huevos fértiles de gallina y gansa. La perforación aumenta tentativamente la presión parcial de oxígeno (PaO₂) de forma interna y lateral a la MCA,^{16,17} lo cual según indican Meir y Tazawa,¹⁵ mejora el intercambio gaseoso y aumenta la disponibilidad de oxígeno al embrión en una de las etapas más críticas del DE, cuando se sustituye gradualmente la respiración difusiva de la MCA a la forma convectiva de los capilares aéreos de los pulmones. Correa *et al.*¹⁸ describieron un método para aplicar vacunas *in ovo* por medio de inyección automática en el que los embriones inoculados después de las 460 horas y antes de las 468 horas de incubación, presentaron mejor incubabilidad, posiblemente por favorecer el intercambio gaseoso. En el presente estudio se valora un cambio en la trayectoria de incubación con la finalidad de favorecer el DE, atribuido a una incubación temprana con incremento en la concentración de CO₂, complementado con una mayor disponibilidad de O₂ en el momento crítico del cambio de respiración embrionaria de difusiva a convectiva al momento de la transferencia de la máquina incubadora a la nacedora.

Material y métodos

Se utilizaron huevos fértiles de aves reproductoras pesadas de la estirpe Ross 308, de 30 y 45 semanas de edad, alojadas en una granja ubicada a 890 msnm en

when the air exhaustion or exit openings were closed (two on top in this incubator model) and, partially, the air inlets or damper. Group V remained under incubation conditions as recommended by the incubator manufacturer to perform incubations at places above 900 masl (0.5% CO₂ and 21% O₂). After day 10, both groups continued incubation under the same standard conditions.

In the second study, eggs from of 45-week-old birds were used, and divided into two experimental groups based on the results from the first study; both used the same type of incubator.* The first group was incubated in a moderately non-ventilated (MNV) environment and the second was kept strictly non-ventilated (SNV). A total of 252 fertile eggs were incubated in each machine. After day 10 of incubation, the embryos were kept under standard conditions. At 444 hours of incubation, adjustments of temperature and relative humidity (RH) were performed. Each experimental group was divided into 2 subgroups (n = 126), a perforation was done to one of the subgroups (1.3 mm Ø) in the shell at the obtuse pole of the egg, drilling was performed on day 19 plus 8 hours, with reference to the method described by Correa *et al.*¹⁸ Four subgroups were obtained: MNV with hole (H), MNV without hole (NH), SNV with hole (H) and SNV without hole (NH). Subgroups were incubated under the same conditions in the same machines, which were conditioned as hatchers to facilitate embryo hatching.

Incubation protocol

The dry bulb temperature from day 1 to 2 of ED was 100.0°F, day 3 to 7 was 99.9°F, from 8 to 10 was 99.7°F, day 11 to 13 was 99.5°F, day 14 to 15 was 99.3°F, day 16 to 17 was 99.0°F, and day 18 to 21 was 98.4°F. The wet bulb temperature in both experimental groups, from day 1 to 18 of ED remained at 84.5°F, incubated eggs in both treatments received lateral movement to its vertical axis (45° every 90 minutes). Eggs did not move from 444 hour until eclosion. Temperature (°C), relative humidity (%), CO₂ (ppm) and O₂ (%) were measured four times a day, from the internal and external environment of the incubators. Temperature readings were made with a mercurial column thermometer,* relative humidity was assessed with a hair hygrometer of variable tension,** O₂ measurement was performed using a galvanic cell,** CO₂ was determined with an infrared sensor.*** Based on the difference between egg weights at the beginning of the experiment and on days 10 and 18 of the DE, moisture loss (%) was calculated. The percentage of hatchability was obtained with the following formula: (total of hatched chicks ÷ total fertile eggs) × 100. The birth rate was calculated as

Jojutla, Morelos. Los huevos fueron trasladados al sitio de incubación a una altura de 2,230 msnm, se pesaron e identificaron y posteriormente se asignaron de manera aleatoria a cada uno de los tratamientos.

Diseño experimental

Para el primer estudio se formaron dos grupos experimentales con los huevos de las aves de 30 semanas de edad: el primero fue con ventilación restringida (VR) y el segundo con ventilación estándar (V), para ambos se empleó el mismo tipo de máquina incubadora.* La VR se logró durante los primeros 10 días de incubación, al cerrar las aberturas de exhausto o salida de aire (dos en la parte superior en este modelo de incubadora) y, de manera parcial, las entradas de aire o *damper*; el grupo V se mantuvo bajo condiciones de incubación de acuerdo con lo recomendado por el fabricante de las incubadoras para efectuar incubaciones en sitios por arriba de los 900 msnm (0.5% de CO₂ y 21% de O₂); después del día 10, ambos grupos continuaron la incubación bajo las mismas condiciones estándar.

En el segundo estudio se utilizaron los huevos que provenían de las aves de 45 semanas de edad, y con base en los resultados del primer estudio se formaron dos grupos experimentales, en ambos se utilizó el mismo tipo de máquina incubadora;** el primer grupo fue incubado con ventilación restringida media (VRM) y el segundo con ventilación restringida alta (VRA). En cada máquina se incubaron 252 huevos fértiles. Después del día 10 de incubación, los embriones se mantuvieron bajo condiciones estándar. A las 444 horas de incubación, se realizó un ajuste de temperatura y humedad relativa (HR), cada grupo experimental se dividió en 2 subgrupos (n = 126); a uno de los subgrupos se les hizo una perforación (1.3 mm Ø) en el cascarón del polo obtuso del huevo, la perforación se realizó al día 19 con 8 horas, tomando como referencia el método descrito por Correa *et al.*¹⁸ Se obtuvieron 4 subgrupos: VRM con perforación (CP), VRM sin perforación (CSP), VRA con perforación (CP) y VRA sin perforación (CSP). Los subgrupos se incubaron bajo el mismo régimen en las mismas máquinas, las cuales se acondicionaron como nacedoras para facilitar la eclosión de los embriones.

Protocolo de incubación

La temperatura del bulbo seco del día 1 al 2 del DE fue de 100.0°F, del día 3 al 7 fue de 99.9°F, del día 8 al 10 fue de 99.7°F, del día 11 al 13 fue de 99.5°F, del día

*Hova-Bator® Mod. #1583 G.Q.F. Manufacturing Company Inc. Savannah, Georgia, Estados Unidos de América.

**SPORTSMAN® Mod. #1502, G.Q.F. Manufacturing Company Inc. Savannah, Georgia, Estados Unidos de América

follows: (total of chicks hatched from eggs incubated ÷ total) × 100. Moisture loss (%) was calculated based on the difference between egg grading at the beginning of the experiment and the weight measurements made on days 10 and 18 of the ED. The percentage hatchability was obtained with the following formula: (total of hatched chicks ÷ total fertile eggs) × 100. The birth rate was calculated as follows: (total of hatched chicks ÷ total eggs incubated) × 100.

Embryodiagnosis

The embryonated eggs were determined by candling at 444 hours of incubation. After 510 hours, embryo mortality was recorded according to the stage in which ED failed: stage I (days 1 to 7 of ED), stage II (day 8 to 17 of ED), stage III (days 18 to 21 of ED) and stage IV (pipped unborn).^{19,20}

Hatching intervals

Revisions were made every two hours to evaluate the hatching intervals after making the transfer at 468 hours, recording from the first to the last chick hatched from each group. All chicks were removed from the hatcher (8-10 hours after hatching) in order to avoid dehydration and to assess their quality.

Rating the quality of neonatal chicks

The quality of the hatched chicks was assessed based on ten comprehensive physical parameters.²⁰⁻²² Each parameter was graded according to the importance of the evaluated characteristic. A mean value was obtained from each experimental subgroup, the final score allowed the following categorization: 90-100 points = Excellent, 80-89 = Prime; 70-79 = Second; 60-69 = Poor and < 59 = Unacceptable. This scale was modified from that proposed by Lopez *et al.*²⁰ Total length (cm) and weight (g) were measured for each newborn chick.^{5,22-25}

Statistical analysis

The primary explanatory variables were: V and NV conditions (first study); MNV and SNV (second study). The secondary explanatory variables were: hole (H) and no-hole (NH). The response variables were: incubation parameters, chick quality, weight and length. The likely differences between data from the first study were determined through a single-factor analysis of variance (GLM). Significant differences between treatments were discriminated by the multiple comparison

14 al 15 fue de 99.3°F, del día 16 al 17 fue de 99.0°F, y del día 18 al 21 fue de 98.4°F; la temperatura del bulbo húmedo en ambos grupos experimentales, del día 1 al 18 del DE se mantuvo en 84.5°F; los huevos incubados en ambos tratamientos recibieron un movimiento lateral a su eje vertical (45° cada 90 minutos). De las 444 horas hasta la eclosión no tuvieron movimiento. Cuatro veces al día se tomaron lecturas de temperatura (°C), humedad relativa (%), CO₂ (ppm) y O₂ (%) del ambiente interno y externo de las máquinas incubadoras; la lectura de temperatura se efectuó con un termómetro de columna mercurial,* la de humedad relativa se realizó con un higrómetro de cabello de tensión variable,* la medición de O₂ se realizó con una celda galvánica,** el CO₂ se determinó con un sensor infrarrojo.*** Con base en la diferencia entre el pesaje de los huevos al inicio del experimento y los pesajes efectuados los días 10 y 18 del DE, se calculó la pérdida de humedad (%). El porcentaje de incubabilidad se obtuvo con la siguiente fórmula: (total de pollitos nacidos ÷ total de huevos fértiles) × 100. El porcentaje de natalidad se calculó de la siguiente manera: (total de pollitos nacidos ÷ total de huevos incubados) × 100.

Embridiagnóstico

Con ayuda del ovoscopio, a las 444 horas de incubación se determinaron los huevos no embrionados, después de las 510 horas, se registró la mortalidad embrionaria de acuerdo con la etapa del DE en la cual fracasaron: etapa I (día 1 al 7 del DE) etapa II (día 8 al 17 del DE), etapa III (día 18 al 21 del DE) y etapa IV (picados no nacidos).^{19,20}

Ventana de nacimientos

Después de efectuar la transferencia y a partir de las 468 horas, se realizaron revisiones cada dos horas, para evaluar la ventana de nacimientos, registrando desde el primero hasta el último pollito eclosionado de cada grupo; todos los pollitos se extrajeron de la nacedora (8-10 horas posteriores a su eclosión) con la finalidad de evitar su deshidratación y poder evaluar su calidad.

Calificación de la calidad de los pollitos neonatos

Se evaluó la calidad de los pollitos eclosionados con base en diez parámetros físicos integrales.²⁰⁻²² Cada

*Brannan® S Brannan & Sons Ltd. Cleator Moor, Cumbria CA25 5QE, Inglaterra.

**Taylor® Taylor Precision Products H. 2311 W. 22nd Street Oak Brook, IL, 60523. Estados Unidos de América

***Analox® Analox Instruments Ltd. Unit 22 Acton Park Estate. The Vale, London W3 7QE, Inglaterra

Tukey's test ($P < 0.05$).²⁶ A two-factor model (2×2) was used in the second study: the first was the type of ventilation during the first 10 days of ED (MNV and SNV) and the second was drilling the shell (H and NH) at the 19th day of ED, these were determined without the interaction of the main effects. The difference between group means were discriminated using the multiple comparison Tukey's test ($P < 0.05$). Percentage and proportional data were evaluated by means of the chi-square test, with a significance of $P < 0.05$.²⁶

Results

First study (Ross 308 breed, 30 weeks old)

In both groups the O_2 concentration at day 10 of incubation was 19.5%, the behavior of this gas was similar for the rest of the incubation period. CO_2 concentration at day 10 of incubation in the NV group was 11,600 ppm, greater ($P < 0.05$) than 2,072 ppm in group V. After day 10 through day 15 of the ED, CO_2 concentration did not differ between groups. An average of 19.8% O_2 and 952 ppm of CO_2 was recorded in the hatchery during the evaluation period, with a mean temperature of 22.9°C and 58.5% RH.

The NV group showed a hatchability of 48%, 7% higher than group V. The non-ventilation group showed greater ($P < 0.05$) birth rate than the group V (Table 1). In stage I of embryonic mortality, group V showed a 16.2% mortality rate, greater ($P < 0.05$) than 11.2% of the NV group; in stage II, group V showed a mortality of 12.1%, higher ($P < 0.05$) to 9.2% in the control group. During stages III and IV, there was no statistical difference between groups (Table 1). The mean initial egg weight was 60 g for each group. The quality of chicks tested at birth showed no statistical difference between groups in all categories. Regarding the weight of the chicks, the NV group with 43.2 g was heavier ($P < 0.05$) than those in group V (41.7 g). Chicks in the NV group measured, on average, 16.9 cm and were longer ($P < 0.05$) than chicks in group V, with 16.6 cm in length (Table 2).

Second study (Ross 308 breed, 45 weeks old)

At day 10 of incubation, the O_2 MNV group was 19.9%, higher ($P < 0.05$) than 19.7% in group SNV. After day 10, the concentration of this gas in both groups was the same. CO_2 concentration at day 10 of incubation in the SNV group was 17,250 ppm, greater ($P < 0.05$) than 14,975 ppm registered in the MNV group. The mean ambient gases in the hatchery were 20.8% O_2 and

parámetro se calificó de acuerdo con la importancia de la característica evaluada. De cada subgrupo experimental se obtuvo un promedio de todos los pollitos evaluados, la puntuación final permitió la siguiente categorización: 90-100 puntos = Excelente; 80 a 89 = Primera; 70 a 79 = Segunda; 60 a 69 = Deficiente y < 59 = Inaceptable, esta escala fue modificada a partir de la propuesta por López *et al.*²⁰ Se midió la longitud total (cm) y el peso (g) de cada uno de los pollitos neonatos.^{5,22-25}

Análisis estadístico

Las variables explicativas primarias fueron: la condición de V y VR (primer estudio); VRM y VRA (segundo estudio); las variables explicativas secundarias fueron: la perforación del cascarón (CP) y sin perforar (CSP); las variables de respuesta fueron: los parámetros de incubación, la calidad del pollito, su peso y longitud. Las probables diferencias entre los datos del primer estudio se determinaron a través de un análisis de varianza de un solo factor (GLM); las diferencias significativas entre los tratamientos se discriminaron por medio de la prueba múltiple de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$).²⁶ En el segundo estudio se utilizó un modelo de dos factores (2×2): el primero fue el tipo de ventilación los primeros 10 días del DE (VRM y VRA), y el segundo fue la perforación del cascarón (CP y CSP) al día 19 del DE; sin interacción de los factores se determinaron los efectos principales. La diferencia entre medias de grupo se discriminaron por medio de la técnica de comparación múltiple de medias de Tukey con una significancia de $P < 0.05$. Los datos porcentuales y proporcionales se evaluaron por medio de la prueba Ji^2 , con una significancia de $P < 0.05$.²⁶

Resultados

Primer estudio (Estirpe Ross 308, 30 semanas de edad)

En ambos grupos la concentración de O_2 al día 10 de incubación fue de 19.5%, el comportamiento de este gas fue similar durante el resto del periodo de incubación. La concentración de CO_2 al día 10 de incubación en el grupo VR fue de 11,600 ppm, mayor ($P < 0.05$) a las 2,072 ppm del grupo V. Después del día 10 y hasta el día 15 del DE, la concentración de CO_2 no difirió entre grupos. En la sala de incubación se registró un promedio de 19.8% de O_2 y 952 ppm de CO_2 durante todo el periodo de evaluación, con temperatura ambiental promedio de 22.9° C y 58.5% de HR.

El grupo de VR mostró una incubabilidad de 48%, mayor en 7 puntos porcentuales al grupo V; el grupo

1.276 ppm of CO₂, with average temperature of 21.8°C and 48% RH. There was no interaction of the factors for hatchability, only a main effect of medium NV with an average of 82.3%, which was greater ($P < 0.05$) than the 77.2% recorded in the NV group, with high concentrations of CO₂ (Table 3). At birth, there was no interaction between factors, an effect of the NV variable on CO₂ environment was observed, where the 74.4% obtained was greater ($P < 0.05$) than 70.2% in the NV, with high CO₂ concentrations (Table 3). At the stage of embryonic mortality I, group H with 4.2% was greater ($P < 0.05$) than 0% of NH group, in stage III. The NH group with 14.71%, was greater ($P < 0.05$) than 9.7% in H group. In stages II and IV there was no statistical difference between groups (Table 4). The mean weight of the eggs at the beginning of incubation in MNV and SNV groups was 65g, weight loss at 18 days in the SNV group was 12.1% greater ($P < 0.05$) than 11.4% MNV group.

The start of external pipping in the MNV group was at 495 hours, before ($P < 0.05$) the 501 hours in the SNV group. Both groups ended hatching at 521 hours. The hatching interval in MNV group was 25.5 hours, greater ($P < 0.05$) than the 21.5 hours recorded in the SNV group. At birth, 59.7% of the chicks were excellent in the SNV group, greater ($P < 0.05$) than 48.9% of chicks in this category in the MNV group. The percentage of good quality chicks in the MNV group was

de ventilación restringida mostró mayor ($P < 0.05$) natalidad que el grupo V (Cuadro 1). En la etapa I de mortalidad embrionaria, el grupo V mostró 16.2% de mortalidad, mayor ($P < 0.05$) al 11.2% del grupo VR; en la etapa II, el grupo V mostró una mortalidad de 12.1%, mayor ($P < 0.05$) al 9.2% del grupo testigo. Durante las etapas III y IV, no hubo diferencia estadística entre grupos (Cuadro 1). El peso inicial promedio de los huevos fue de 60 g para cada grupo. La calidad de los pollitos evaluados al nacimiento no mostró diferencia estadística entre grupos en todas sus categorías; en cuanto al peso de los pollitos, los del grupo VR con 43.2 g fueron más pesados ($P < 0.05$) que los del grupo V (41.7 g). Los pollitos del grupo VR midieron, en promedio, 16.9 cm y fueron más largos ($P < 0.05$) que los pollitos del grupo V, con 16.6 cm de longitud (Cuadro 2).

Segundo estudio (Estirpe Ross 308, 45 semanas de edad)

Al día 10 de incubación, el O₂ del grupo VRM fue de 19.9%, mayor ($P < 0.05$) al 19.7% del grupo VRA; después del día 10, la concentración de este gas en ambos grupos fue el mismo. La concentración de CO₂ al día 10 de incubación en el grupo VRA fue de 17,250 ppm, mayor ($P < 0.05$) a las 14,975 ppm registradas en el grupo VRM. El promedio de gases ambientales en la sala de incubación fue de 20.8% de O₂ y 1,276 ppm de

CUADRO 1

Parámetros de incubación en huevos de gallina reproductora pesada de la estirpe Ross 308 (*Gallus gallus*) de 30 semanas de edad, incubados con ventilación restringida durante la primera mitad del desarrollo embrionario

Incubation parameters in eggs from 30-week-old Ross 308 broiler breeder (*Gallus gallus*) hens incubated with a non-ventilation system during the first half of embryonic development

Parameter	Non-Ventilation* (%)	Standard Ventilation (%)
Apparent Fertility**	96.43 ± 1.37 ^A	96.43 ± 1.37 ^A
Hatchability**	48.11 ± 3.41 ^A	40.73 ± 0.80 ^B
Birth rate**	46.43 ± 3.92 ^A	39.29 ± 1.31 ^B
Mortality stage I***	(11.51%) ^B	(16.23%) ^A
Mortality stage II***	(9.21%) ^B	(12.80%) ^A
Mortality stage III***	(26.46%) ^A	(25.53%) ^A
Mortality stage IV***	(2.28%) ^A	(2.3%) ^A

*Ventilation was restricted during the first 10 days of embryonic development.

** Percentage value ± standard deviation from 42 eggs per incubator, values in the same row with different superscript letter differ significantly, Tukey ($P < 0.05$).

*** Percentage value average embryonic mortality, values in the same row with different letter superscripts are different, chi-square test ($P < 0.05$). N = 4 machines Hova Bator 1583.

CUADRO 2

Calidad, peso y longitud de los pollitos provenientes de huevos de gallina reproductora pesada de la estirpe Ross 308 (*Gallus gallus*) de 30 semanas de edad, incubados con ventilación restringida durante la primera mitad del desarrollo embrionario

Quality, weight and length of chicken from 30-week-old Ross 308 broiler breeder (*Gallus gallus*) hens incubated with a non-ventilation system during the first half of embryonic development

Parameter	Non-Ventilation*	Standard Ventilation
Excellent (%)** Ψ	12.50 $\pm$ 7.51 ^A	9.0 $\pm$ 3.47 ^A
Good (%)** Ψ	62.50 $\pm$ 0.58 ^A	66.0 $\pm$ 3.45 ^A
Regular (%)** Ψ	25.0 $\pm$ 6.93 ^A	22.0 $\pm$ 3.47 ^A
Deficient (%)** Ψ	0 $\pm$ 0 ^A	3.0 $\pm$ 3.47 ^A
Unacceptable (%)** Ψ	0 $\pm$ 0 ^A	0 $\pm$ 0 ^A
Chick weight (g)** Φ	43.21 $\pm$ 2.58 ^A	41.66 $\pm$ 2.76 ^B
Chick length (cm)** Φ	16.89 $\pm$ 0.73 ^A	16.64 $\pm$ 0.51 ^B

*Ventilation was restricted during the first 10 days of embryonic development.

**Different letters in superscript value $\pm$ standard deviation referred compared in the same row indicate statistically significant difference ($P < 0.05$) between treatments. Ψ N = 4 Φ r = 4, n = 16.

49.4% greater ($P < 0.05$) than 39.2% in SNV group. There was no statistical difference between groups in other categories (Table 5).

Discussion

The vent restriction during the first 10 days of incubation in the NV group of the first study generated a concentration of 11,600 ppm CO₂, this increase exceeded the tolerance levels commercially recommended (from 3.000 to 5.000 ppm), but it has been shown that a gradual increase in CO₂ from 8,000 to 15,000 ppm during the first 10 days of incubation accelerates and improves hatchability.^{1,4,27,28} Hogg²⁹ obtained 2% improvement in hatchability by incubating fertile eggs from broiler birds (Ross 308), with a concentration of 15,000 ppm of CO₂ at day 10 ED. In the present study, the NV group exceeded 7% V hatchability, making it clear that there is an improvement in the incubation parameters, which is closely linked to the main effect of increased CO₂ during the first stage of ED. It is possible that mortality in stage I (16.2%) in V group was due to a lack of strength of the embryo, caused by the variability in the internal environment of the incubator, analogous to multistage incubator systems. By maintaining a one-stage NV system during the first period of incubation, moisture loss from the eggs inside the incubator creates greater inside flow of wet air, leading to a more stable and appropriate environment for embryos, which is crucial in high altitude places such as the incubation site, as it positively changes the trajectory of incubation during the embryo endother-

CO₂, con temperatura ambiental promedio de 21.8°C y 48% de HR. No hubo interacción de los factores para incubabilidad, sólo se registró un efecto principal de la VR media con un promedio de 82.3%, el cual fue mayor ($P < 0.05$) al 77.2% de la VR, con alta concentración de CO₂ (Cuadro 3). En natalidad, tampoco hubo interacción entre los factores, se observó efecto de la variable VR con CO₂ medio, donde el 74.4% obtenido fue mayor ($P < 0.05$) al 70.2% registrado en la VR, con alta concentración de CO₂ (Cuadro 3). En la etapa de mortalidad embrionaria I, el grupo CP con 4.2% fue mayor ($P < 0.05$) al 0% del grupo CSP; en la etapa III, el grupo CSP con 14.71%, fue mayor ($P < 0.05$) al 9.7% del grupo CP; en las etapas II y IV no hubo diferencia estadística entre grupos (Cuadro 4). El peso promedio de los huevos al inicio de la incubación en los grupos VRM y VRA fue de 65g, la pérdida de peso al día 18 del DE en el grupo VRA fue de 12.1% mayor ($P < 0.05$) al 11.4% del grupo VRM.

El inicio del picaje externo en el grupo VRM fue a las 495 horas, antes ($P < 0.05$) de las 501 horas de inicio del picaje del grupo VRA; ambos grupos finalizaron la eclosión a las 521 horas. La ventana de nacimiento del grupo VRM fue de 25.5 horas, mayor ($P < 0.05$) a las 21.5 horas registradas en el grupo VRA. Al nacimiento, fueron excelentes 59.7% de los pollitos del grupo VRA, mayor ($P < 0.05$) al 48.9% de pollitos de esta categoría en el grupo VRM. El porcentaje de pollitos con buena calidad en el grupo VRM fue de 49.4%, mayor ($P < 0.05$) al 39.2% del grupo VRA. En las demás categorías no hubo diferencia estadística entre grupos (Cuadro 5).

mic phase (1-10 days, critical stage of ED). It has been observed that the relative humidity inside the incubator is the main factor for heat transfer from air to the shell (heat convection), the greater the height of the incubation site, the more critical this transfer becomes.

In the present study, two types of incubators were used, and it was important to consider the optimum air velocity that each maintains, as well as the temperature effects at the shell level; since, if the air velocity through the incubator is not uniform, there are oscillations in the heat transfer and, subsequently, in the temperature perceived by the embryo. In order to eliminate these differences, the heat transfer capacity should be increased (moist air) as the hotter eggs lose relatively more heat than cooler eggs, because the temperature range is reduced and the machine temperature is more stable. A NV system contributes to a better control of physical variables in the most critical stage of incubation (1-10 ED). Weight and length, as well as excellent and good quality chicks were greater in the

Discusión

La restricción de ventilación durante los primeros 10 días de incubación en el grupo VR del primer estudio generó una concentración de CO₂ de 11,600 ppm, el incremento superó los niveles de tolerancia recomendados comercialmente (3,000-5,000 ppm); sin embargo, se ha mostrado que un incremento gradual de CO₂ de 8,000 a 15,000 ppm durante los primeros 10 días de incubación acelera el DE y mejora la incubabilidad.^{1,4,27,28} Hogg,²⁹ al incubar huevos fértiles de aves reproductoras pesadas (Ross 308), con una concentración de 15,000 ppm de CO₂ al día 10 del DE, obtuvo una mejora de 2% en la incubabilidad. En el presente estudio, el grupo VR superó en 7% la incubabilidad del grupo estándar, por lo que es evidente que existe una mejora de los parámetros de incubación, lo cual está muy ligado al efecto principal de incremento de CO₂ durante la primera etapa del DE. Es posible que la mortalidad en la etapa I (16.2%) del grupo V se haya

CUADRO 3

Parámetros de incubación en huevos de gallina reproductora pesada de la estirpe Ross 308 (*Gallus gallus*) de 45 semanas de edad, incubados con ventilación restringida durante la primera mitad del desarrollo embrionario

Incubation parameters in eggs from 45-week-old Ross 308 broiler breeder (*Gallus gallus*) hens incubated with a non-ventilation system during the first half of embryonic development

<i>Parameter</i>	<i>MNV* (15,000 ppm)</i>	<i>SNV* (17,000 ppm)</i>	<i>Mean</i>
<i>Apparent Fertility**</i>			
Shell with hole	92.86 ± 2.55	91.67 ± 2.21	92.27 ± 2.38 ^A
Shell without hole	92.86 ± 2.55	91.67 ± 2.21	92.27 ± 2.38 ^A
Mean	92.86 ± 2.45 ^A	91.67 ± 2.12 ^A	
<i>Hatchability**</i>			
Shell with hole	81.58 ± 2.50	75.10 ± 5.72	78.35 ± 5.42 ^A
Shell without hole	83.12 ± 5.27	79.21 ± 4.0	81.17 ± 4.10 ^A
Mean	82.35 ± 4.06 ^A	77.16 ± 5.2 ^B	
<i>Birth rate**</i>			
Shell with hole	73.81 ± 5.69	67.85 ± 4.23	70.81 ± 5.74 ^A
Shell without hole	75.0 ± 4.22	72.62 ± 4.22	73.81 ± 4.26 ^A
Mean	74.41 ± 4.88 ^A	70.24 ± 4.77 ^B	

*Ventilation was restricted the first 10 days of incubation with two types of sealing: moderately non-ventilated and strictly non-ventilated.

**Percentage value ± standard deviation from 252 eggs per incubator, values in the same row with different superscript letter differ significantly, Tukey (P < 0.05). N = 2 Sportsman No. 1502 machines.

CUADRO 4

Mortalidad en huevos de gallina reproductora pesada de la estirpe Ross 308 (*Gallus gallus*) de 45 semanas de edad, incubados con ventilación restringida durante la primera mitad del desarrollo embrionario

Mortality in eggs from 45-week-old Ross 308 broiler breeder (*Gallus gallus*) hens incubated with a non-ventilation system during the first half of embryonic development

<i>Parameter</i>	<i>Hole (%)</i>	<i>No Hole (%)</i>
Mortality stage I**	(4.2%) ^A	(0%) ^B
Mortality stage II**	(3.87%) ^A	(5.40%) ^A
Mortality stage III**	(9.70%) ^A	(14.71%) ^A
Mortality stage IV**	(6.51%) ^A	(6.26%) ^A

* Ventilation was restricted during the first 10 days of embryonic development.

** Mean percentage value of embryonic mortality, values in the same row with different letter superscripts are different, chi-square test ($P < 0.05$). $N = 2$, $r = 6$, $n = 42$.

CUADRO 5

Calidad, peso y longitud de los pollitos provenientes de huevos de gallina reproductora pesada de la estirpe Ross 308 (*Gallus gallus*) de 45 semanas de edad, incubados con ventilación restringida durante la primera mitad del desarrollo embrionario

Quality, weight and length of chicken from 40-week-old Ross 308 broiler breeder (*Gallus gallus*) hens incubated with a non-ventilation system during the first half of embryonic development

<i>Parameter</i>	<i>MNV*(15,000 ppm)</i>	<i>SNV*(17,000 ppm)</i>
Excellent (%)** Ψ	48.92 $\pm$ 8.73 B	59.67 $\pm$ 11.65 A
Good (%)** Ψ	49.41 $\pm$ 9.59A	39.17 $\pm$ 11.06B
Regular (%)** Ψ	1.08 $\pm$ 2.54A	1.17 $\pm$ 2.73A
Deficient (%)** Ψ	0.59 $\pm$ 2.02 A	0 $\pm$ 0A
Unacceptable (%)** Ψ	0 $\pm$ 0 A	0 $\pm$ 0 A
Chick weight (g)** Ψ	46.58 $\pm$ 3.54A	46.22 $\pm$ 4.99A
Chick lenght (cm)** Ψ	17.31 $\pm$ 0.70A	17.38 $\pm$ 1.45A

*Ventilation was restricted during the first 10 days of embryonic development with two types of sealing: moderately non-ventilated and strictly non-ventilated.

**Different letters in superscript value $\pm$ standard deviation referred compared in the same row indicate statistically significant difference ($P < 0.05$) between treatments. $N = 2$ Ψ $r = 6$, $n = 32$.

NV group. Although De Smit *et al.*⁴ did not determine the quality of the chick at hatching when evaluating a NV system during the first 10 days ED, they obtained greater growth after hatching, during the first and third weeks of age in chickens hatched with this protocol. The tolerance of the embryo to CO₂ concentration from day 4 ED is due to the speed with which it can establish and use its early breathing (vasculosa and CAM). Smit *et al.*⁴ determined that there is a *plateau*

debido a una falta de fortaleza del embrión, ocasionada por la variabilidad en el ambiente interno de la incubadora, análogo a las incubadoras de sistemas multietápicos. Al mantener un sistema unietápico de VR durante el primer periodo de la incubación, la pérdida de humedad de los huevos en el interior de la incubadora genera una mayor circulación de aire húmedo dentro de ella, creando un ambiente más apropiado y estable para los embriones, lo cual es crucial a una

stage, at about 100 hours of ED, which is critical for the natural production of CO₂. The osmotic diffusion action of the vasculosa to capture O₂ and remove CO₂ is limited at this time. At 144 hours, when there is direct contact between the CAM and the albumin membrane, it assumes the respiratory function of the embryo, which is consistent with the observed increase in CO₂ in SNV and MNV groups during the 10 days with restricted ventilation. Molenaar *et al.*,³⁰ Hassanzadeh *et al.*,³¹ Chan and Burggren³² and Bahadoran *et al.*⁸ found that moderate hypoxia and hypercapnia during the early stage of ED induce a physiological effect on the growth of embryonic organs. In the present work, even with the altitude above sea level of the incubation site, optimal amounts of O₂ were generated with a range of 19.2% to 20.5%, which was beneficial to the weight of chicks in the NV group. During the early ED, O₂ is used in greater quantity for the synthesis of tissues and less amounts of CO₂ are produced.^{4,8,27,33} Based on observations by Sahan *et al.*,¹⁴ hatchability of chicks and birth weight were improved by supplementing O₂ (23%) during the final stage of ED (18-21 ED). The growth rate and feed efficiency of broiler chicks after hatching were also elevated, because the availability of O₂ is greater at the time of change from chorioallantoic to pulmonary respiration.

In the second study it was decided to try two higher concentrations of CO₂ in order to give O₂ directly to the embryo, which produced a positive effect of this drilling to achieve lower embryonic mortality at this stage. Unlike the work done here (altitude of 2,230 masl), those made in areas located at lower altitude above sea level showed better hatchability parameters. According to Ar,³⁴ hatching rate can be affected mainly by the intrinsic conductance of the shell. However, the most important factor after considering this feature, is the differential between the ambient O₂ partial pressure and atmospheric pressure at low or high altitudes above sea level, since at high altitude this pressure is much lower than that at sea level, which affects the ability of gas exchange through the shell, especially in critical condition in late stages of ED, when the O₂ requirements are very high. Nonetheless, Bahadoran *et al.*⁸ already indicated beneficial effects of transient hypoxia in the primary ED stage, that in the NV group, according to Fick's law, at high altitude with less atmospheric pressure and in the presence of increased PaCO₂, as the NV group, greater diffusion through the shell, the MCA and the biofilm between it and the shell, can be encouraged, of a particle of lower molecular weight such as O₂.¹⁶

It has been observed that birds hatched and reared at higher altitudes show lower incidence of ascites, mortality and right ventricular hypertrophy, compared with birds that are born at lower altitudes and are

gran altitud como la del sitio de incubación, ya que modifica positivamente la trayectoria de incubación durante la fase endotérmica del embrión (1-10 días, etapa crítica del DE). Se ha observado que la humedad relativa dentro de la incubadora es el principal factor para la transferencia de calor del aire hacia el cascarón (convección térmica), entre mayor sea la altura del sitio de incubación, esta transferencia se vuelve más crítica.

En el presente estudio se utilizaron dos tipos de máquinas incubadoras, y fue importante considerar la óptima velocidad del aire que cada una de ellas mantiene, así como sus efectos sobre la temperatura a nivel del cascarón, ya que si la velocidad del aire a través de la incubadora no es uniforme, se presentan oscilaciones en la transferencia de calor y, por lo tanto, en la temperatura que percibe el embrión; para eliminar estas diferencias se debe incrementar la capacidad de transmisión de calor (aire más húmedo), ya que los huevos más calientes perderán relativamente más calor que los huevos más fríos, debido a que el rango de temperaturas se reduce y la temperatura de las máquinas es más estable; un sistema de VR contribuye a un mejor control de las variables físicas en la etapa más crítica de la incubación (1-10 DE). El peso y longitud, al igual que los pollitos de excelente y buena calidad fueron mayores en el grupo VR; si bien De Smit *et al.*⁴ no determinaron la calidad del pollito a la eclosión, al evaluar un sistema de VR los primeros 10 días del DE, obtuvieron un crecimiento mayor después de la eclosión, durante la primera y tercera semanas de edad en los pollos incubados con este protocolo. La tolerancia del embrión a la concentración de CO₂ a partir del día 4 del DE se debe a la velocidad con la que logra establecer y utilizar su sistema de respiración temprana (vasculosa y MCA). De Smit *et al.*⁴ determinaron que existe una etapa de *plateau*, alrededor de las 100 horas del DE, que es crítica para la producción de CO₂ natural; la acción de difusión osmótica por parte de la vasculosa para captar el O₂ y remover el CO₂ se ve limitada en ese momento; a las 144 horas, cuando ocurre el contacto directo de la MCA con la membrana albuminífera, ésta asume la función respiratoria del embrión, lo cual coincide con el aumento de CO₂ observado en los grupos VRM y VRA durante los 10 días de restricción en la ventilación. Molenaar *et al.*,³⁰ Hassanzadeh *et al.*,³¹ Chan y Burggren³² y Bahadoran *et al.*⁸ determinaron que la hipoxia e hipercapnia moderada durante la etapa temprana del DE induce un efecto fisiológico sobre el crecimiento de los órganos del embrión. En el presente trabajo, aun con la altitud sobre el nivel del mar del sitio de incubación, se generaron cantidades óptimas de O₂ con un rango de 19.2% a 20.5%, lo cual fue benéfico para el peso de los pollitos del grupo VR. Durante el DE temprano, el O₂ se utiliza en ma-

reared at high altitudes, thus the adaptability obtained by transient hypoxia in the early stages of ED is beneficial for embryo maturation and subsequent productive life.^{8,14,31,35} De Smit *et al.*⁴ Tona *et al.*¹ Willemsen *et al.*³⁶ Everaert³⁷ and Lopez³⁸ mentioned that the effects of a NV system on hatchability depends on differences in genotype and age of breeding poultry, in addition to the CO₂ concentration reached during this incubation step, which is an important factor to improve the observed parameters. In the second study, better percentages of hatchability and fertility at day 10 of DE were achieved for the MNV group, which showed a CO₂ level of 15,000 ppm, less than the 17,000 ppm in the SNV group. Similarly to this study, De Smit *et al.*,⁴ when incubating fertile eggs from 45-week-old broiler birds (Cobb 500), under NV conditions, obtained 15,000 ppm CO₂ in the first 10 days of ED, with positive results on the hatch intervals, ED rate acceleration, and greater absolute and relative weight of NV group embryos. However, unlike the present study, De Smit *et al.*⁴ did not found an improvement in the incubation parameters, which was determined only in breeding birds with 60 weeks of age at 10,000 ppm CO₂. This result indicates that the altitude above sea level and the age of the birds are two factors that favor the incubation parameters. In another study, with fertile eggs from 37-week-old broiler breeders (Ross 308), Lopez,³⁸ at the same altitude as the present study, obtained a concentration of 9,000 ppm CO₂ at day 10 of ED, achieving 67% lower hatchability than that observed here in the second study. Furthermore, Lopez³⁸ incubated with NV, fertile eggs from light breeding birds (*Bovans White*), achieving a concentration of 12,000 ppm CO₂ and 57% hatchability, but when increasing in another NV group only 2,000 ppm of CO₂ during these early 10 days of incubation, hatchability dropped to 39%. Clearly there is a tolerance limit of embryos to higher concentrations of CO₂, so that if it exceeds the maximum CO₂ concentration during the first 10 days of ED, there are adverse outcomes.

According to this study, the incubation parameters of high conformation birds can be improved by gradually increasing the concentration of CO₂ during the first 10 days of ED, from 10,000 to 15,000 ppm. However, if this limit is exceeded with an increase of only 2,000 ppm of CO₂, the results do not improve. The embryos of broiler birds of 45 weeks of age are less susceptible to an increase of up to 15,000 ppm of CO₂, compared with the 14,000 ppm CO₂ in light birds observed by Lopez.³⁸ De Smit *et al.*⁴ and Willemsen *et al.*³⁶ indicated that embryos derived from broiler breeders are less susceptible to hypercapnia produced in a NV system, as shown in an ED acceleration of the surviving birds and stronger physiological strength.

In the second study, the NH group showed in-

mayor cantidad para la síntesis de los tejidos y se produce menor cantidad de CO₂.^{4,8,27,33} Con base en las observaciones de Sahan *et al.*,¹⁴ lograron mejorar la capacidad de eclosión de los pollitos y el peso al nacimiento al complementar con O₂ (23%) durante la etapa final del DE (18-21 DE); además, consiguieron aumentar la tasa de crecimiento y eficiencia alimenticia de los pollos de engorda después de la eclosión, debido a que la disponibilidad de O₂ es mayor al momento del cambio de respiración corioalantoidea a pulmonar.

En el segundo estudio se decidió probar con dos concentraciones mayores de CO₂ con la finalidad de dar O₂ directamente al embrión, con lo cual se observó que existe un efecto positivo de esta perforación al lograr disminuir la mortalidad embrionaria en esta etapa. A diferencia de los trabajos efectuados aquí (altitud de 2,230 msnm), los realizados en zonas ubicadas a menor altitud sobre el nivel del mar muestran mejores parámetros de incubabilidad. De acuerdo con Ar,³⁴ el porcentaje de eclosión se puede ver afectado principalmente por la conductancia intrínseca del cascarón; sin embargo, el factor más importante después de considerar esta característica, es el diferencial existente entre la presión parcial de O₂ ambiental y la presión atmosférica a baja o gran altitud sobre el nivel del mar, ya que a grandes altitudes esta presión es mucho menor que la existente a nivel del mar, lo cual afecta la capacidad de intercambio gaseoso a través del cascarón, situación crítica sobre todo en las últimas etapas del DE, cuando los requerimientos de O₂ son muy altos. Sin embargo, en la etapa primaria del DE, Bahadoran *et al.*⁸ han indicado ya los efectos benéficos de una hipoxia transitoria, que en el grupo de VR, de acuerdo con la ley de Fick, a una gran altitud con menor presión atmosférica y en presencia de una mayor PaCO₂ como la del grupo de VR, se puede favorecer una mayor difusión a través del cascarón, de la MCA y del *bio-film* entre ésta y el cascarón, de una partícula de menor peso molecular como es el O₂.¹⁶ Se ha observado que las aves que fueron incubadas y criadas a mayor altitud muestran menor incidencia de mortalidad por ascitis e hipertrofia ventricular derecha, en comparación con las aves que nacen a menor altitud y son criadas a grandes altitudes, por lo cual la capacidad de adaptación obtenida por una hipoxia transitoria en los primeros estadios del DE es benéfica para la maduración del embrión y su posterior vida productiva.^{8,14,31,35} De Smit *et al.*,⁴ Tona *et al.*,¹ Willemsen *et al.*,³⁶ Everaert³⁷ y López³⁸ mencionan que los efectos de un sistema de VR sobre la incubabilidad dependen de las diferencias en genotipo y edad de las aves reproductoras, además de la concentración de CO₂ alcanzada durante esta etapa de la incubación, lo cual es un factor importante para que los parámetros observados mejoren. En el segundo estudio se obtuvo mejor porcentaje de incubabilidad y

creased embryonic mortality in stage III. Meir and Ar³⁹ and Molenaar *et al.*⁴⁰ performed the same type of procedure, observing no statistical difference in mortality between the groups of perforated and non-perforated shell. Molenaar *et al.*⁴⁰ mentioned that O₂ diffusion was limited to a level unfavorable for changes in breathing (18.5 days ED) for being just one drill. It is possible that the decrease in mortality observed in stage III in the NH group is more related to a beneficial effect by incubation with NV than single drilling shell. Meir and Ar³⁹ drilled 1 to 5 holes of 5 mm Ø in the air chamber of fertile goose eggs on different days of ED (11, 15, 18, 22, 25). Drilling on days 15-22 showed greater hatchability rates when embryos lost 14% of moisture, whereby the diameter of the hole and the time that eggs must be drilled should be calculated in order to achieve optimum weight loss, to obtain a proper water balance. Meir and Tazawa¹⁵ indicate that drilling the shell in the air chamber possibly increases the internal and adjacent O₂ partial pressure in the CAM, if a uniform distribution is maintained inside the shell, so there is an improvement in oxygen exchange and availability. Although Meir and Tazawa¹⁵ considered that the most important factor to achieve good results is optimum weight loss, since O₂ availability inside the chamber had a limited effect. It is feasible that this effect was due to the limited action area of this O₂ partial increase in the air chamber, since it has been shown that lateral diffusion through the *biofilm* eggshell membrane and the internal testaceous membrane is very limited in H eggs, given that according to Fick's law there is a high diffusion resistance at this point.²¹ It is likely that the drill hole size has not allowed a proper O₂ exchange and availability required by the embryo at the final stage of ED and, therefore, favored a greater positive effect on the modification of the atmosphere in the first half of ED. Meir and Tazawa¹⁵ mention that appropriate control of weight loss of H₂O vapor can contribute to better assessment of the optimization degree in the gas exchange produced by perforation, which was evident in the present study where the MNV group scored better water balance at the time of transfer (11.45%) than the SNV group (12.0%).⁴¹ One aspect to consider is that the concentration of CO₂ in the lower air chamber, drops dramatically at this stage due to the drilling. According to De Smit *et al.*²⁷ this high concentration of CO₂ is vital to the previous increase of corticosterone, which acts as a trigger for increased metabolic thyroid that responds with the release of a high amount of T3 and T4 before internal embryo pipping and until hatching. The length of the birth interval should be as small as possible, because the chicks are born at the beginning (470 hours) or end (510 hours), have a lower growth potential during the first week, compared to those born during peak

natalidad que al día 10 del DE para el grupo VRM, que mostró un nivel de 15,000 ppm de CO₂, menor a las 17,000 ppm del grupo VRA; de forma análoga a este estudio, De Smit *et al.*,⁴ al incubar huevos fértiles de aves reproductoras pesadas (Cobb 500) de 45 semanas de edad, bajo condiciones de VR, los primeros 10 días del DE obtuvieron 15,000 ppm de CO₂, con resultados positivos sobre la ventana de nacimiento, aceleración en la tasa de DE, mayor peso absoluto y relativo de los embriones del grupo NV; sin embargo, a diferencia del presente estudio, De Smit *et al.*⁴ no encontraron una mejoría en los parámetros de incubación, la cual sólo determinaron en aves reproductoras de 60 semanas de edad con 10,000 ppm de CO₂, este resultado indica que la altura sobre el nivel del mar y la edad de las aves son dos factores que favorecen los parámetros de incubación. En otro estudio, con huevos fértiles de reproductoras pesadas (Ross 308) de 37 semanas de edad, López,³⁸ a la misma altitud que el presente estudio, obtuvo una concentración de 9,000 ppm de CO₂ al día 10 del DE, logrando una incubabilidad de 67%, menor a lo observado aquí en el segundo estudio. Además, López³⁸ incubó con VR, huevos fértiles de aves reproductoras ligeras (*Bovans White*), logrando una concentración de 12,000 ppm de CO₂ y 57% de incubabilidad; sin embargo, al aumentar en otro grupo de VR únicamente 2,000 ppm de CO₂ durante estos primeros 10 días de incubación, la incubabilidad bajó a 39%. Es evidente que existe un límite de tolerancia de los embriones a mayores concentraciones de CO₂, de tal manera que si se rebasa el límite máximo en la concentración de CO₂ durante los primeros 10 días del DE, se observan resultados adversos.

De acuerdo con el presente estudio, los parámetros de incubación de las aves de alta conformación pueden mejorar si se incrementa de forma gradual la concentración de CO₂ durante los primeros 10 días del DE, de 10,000 hasta 15,000 ppm; sin embargo, si se rebasa este límite con un aumento de tan sólo 2,000 ppm de CO₂, los resultados no mejoran. Los embriones de aves reproductoras pesadas de 45 semanas de edad son menos susceptibles a un incremento de hasta 15,000 ppm de CO₂, comparado con las 14,000 ppm de CO₂ observado en las aves ligeras por López.³⁸ De Smit *et al.*⁴ y Willemssen *et al.*³⁶ indicaron que los embriones provenientes de reproductoras pesadas son menos susceptibles a la hipercapnia producida en un sistema de VR, ya que muestran un aceleramiento en su DE y las aves sobrevivientes presentan mayor fortaleza fisiológica.

En el segundo estudio, el grupo CSP mostró una mayor mortalidad embrionaria en la etapa III. Meir y Ar³⁹ y Molenaar *et al.*,⁴⁰ al efectuar este mismo tipo de procedimiento, no obtuvieron diferencia estadística en mortalidad entre los grupos de cascarón perforado y los no perforados; Molenaar *et al.*⁴⁰ mencionan que la

period of 490 hours of ED.^{27,42} In the second study, the hatch interval of the MNV group started at 495 hours, which coincides with the period referred to as optimal.²⁷ According to the staging time of birth that described Padron *et al.*,⁴² the SNV group is classified as late. Bruggeman *et al.*²⁸ reported a better quality of chicks from a NV system; in the second study, the MNV group showed 49% of excellent and 49.5% good quality chicks.

The present study found that when using a NV system during the first 10 days of ED, coupled with a perforation of the shell during the transfer, the trajectory of the incubation process is modified, without affecting the incubation parameters. A better quality of chicks with favorable weight and length was obtained, a narrower hatch interval and lower mortality in the H group during the stage of embryonic breathing change. The conductance of the shell, the diameter of the drilling and the time at which to perform the drilling, are the key to optimize weight loss and gas exchange at the time of transfer. An optimal tolerance range of 15,000 ppm CO₂ was established for incubation during the first half of embryonic development of fertile eggs in bird breeders at the *Prime age old* stage.

Acknowledgements

Special thanks to the Direccion General de Asuntos del Personal Academico (DGAPA-UNAM) for the financial support given through the project PAPIIT IN 220909-3 "Evaluation of CO₂ increase in the early stage of incubation on development embryonic domestic fowl".

References

1. TONA K, ONAGBESAN O, BRUGGEMAN V, DE SMIT L, FIGUEIREDO D. Non-ventilation during early incubation in combination with dexamethasone administration during late incubation: 1. Effects on physiological hormone levels, incubation duration and hatching events. *Comp Bioch Physiol* 2007; 4:150-175.
2. AR A, RAHN H. Interdependence of gas conductance, incubation length, and weight of the avian egg. *Respir Funct Birds, Adult Embryonic* 1979; 227-236.
3. GILDERSLEEVE RP, BOESCHEN DP. The effects of incubator carbon dioxide level on turkey hatchability. *Poult Sci* 1983; 62:779-784.
4. DE SMIT L, BRUGGEMAN V, TONA JK, DEBONNE M, ONAGBESAN O, ARCKENS L. Embryonic developmental plasticity of the chick: Increased CO₂ during early stages of incubation changes the developmental trajectories during prenatal growth. *Comp Bioch Physiol: Part A* 2006; 145:166-175.
5. WILLEMSSEN H, EVERAERT N, WITTERS A, DE SMIT L, DEBONNE M, VERSCHUERE F. Critical

difusión de O₂ se limitó a un nivel no favorable durante el cambio de respiración (18.5 días de DE) por ser sólo una perforación; es posible que la disminución de la mortalidad en la etapa III observada en el grupo CSP, se encuentre más relacionada con un efecto benéfico por la incubación con VR que con la perforación única del cascarón. Meir y Ar³⁹ perforaron de 1 a 5 agujeros de 5 mm Ø en la cámara de aire de huevos fértiles de ganso en diferentes días del DE (11, 15, 18, 22, 25); la perforación en los días 15 a 22 mostró mayor porcentaje de nacimientos cuando los embriones perdieron 14% de humedad, por lo cual el diámetro del agujero y el tiempo en que deben perforarse los huevos deben ser calculados con la finalidad de lograr una pérdida de peso óptima, para obtener un balance hídrico apropiado. Meir y Tazawa¹⁵ indican que la perforación del cascarón en la cámara de aire posiblemente aumenta la presión parcial de O₂ en el interior y adyacentemente, en la MCA, si se mantiene una distribución uniforme de ella dentro del cascarón; por lo que hay una mejora en el intercambio y disponibilidad de oxígeno; sin embargo, Meir y Tazawa¹⁵ consideraron que el factor más importante para obtener buenos resultados es lograr una óptima pérdida de peso, ya que la disponibilidad de O₂ dentro de la cámara tuvo un efecto limitado; es factible que este efecto se debiera a la poca área de acción de este incremento parcial de O₂ dentro de la cámara de aire, ya que se ha indicado que la difusión lateral a través del *biofilm* del cascarón y la membrana testácea interna es muy limitado en los huevos CP, ya que de acuerdo con la ley de Fick existe una alta resistencia a la difusión en este punto.²¹ Es probable que el tamaño del agujero de perforación no haya permitido un apropiado intercambio y disponibilidad del O₂ requerido por el embrión en la etapa final del DE, y por lo tanto, favoreció un mayor efecto positivo a la modificación de la atmósfera en la primera mitad del DE. Meir y Tazawa¹⁵ mencionan que el control apropiado en la pérdida de peso en forma de vapor de H₂O, puede contribuir a evaluar mejor el grado de optimización en el intercambio de gases producido por la perforación, lo cual fue evidente en el presente estudio, donde el grupo VRM obtuvo un mejor balance hídrico al momento de la transferencia (11.45%) que el grupo VRA (12.0%).⁴¹ Un aspecto que debe considerarse es que la concentración de CO₂ en la cámara de aire baja drásticamente en esta etapa debido a la perforación. De acuerdo con De Smit *et al.*,²⁷ esta alta concentración de CO₂ es vital para el incremento previo de corticosterona, que actúa como disparador del incremento metabólico de la tiroides, que responde con la liberación de una alta cantidad de T3 y T4 antes del picaje interno del embrión y hasta la eclosión. La duración de la ventana de nacimiento debe ser la menor posible, ya que los pollitos que nacen al principio (470 horas)

- Assessment of chick quality measurements as an indicator of post hatch performance. *Poult Sci* 2008; 87:2358-2366.
6. TAYLOR LW, KREUTZIGER GO. The gaseous environment of the chick embryo in relation to its development and hatchability. 2. Effect of carbon dioxide and oxygen levels during the period of the fifth through the eight days of incubation. *Poult Sci* 1965; 44:98-106.
 7. TULLETT SG, DEEMING DC. The relationship between eggshell porosity and oxygen consumption of the embryo in the domestic fowl. *Comp Bioch Physiol* 1982; 72A:529-533.
 8. BAHADORAN S, HASSANZADEH M, ZAMANIMO-GHADDAM AK. Effect of chronic hypoxia during the early stage of incubation on prenatal and postnatal parameters related to ascites syndrome in broiler chickens. *Iranian J Vet Res* 2010; 11:64-71.
 9. DEEMING DC. Importance of sub-embryonic fluid and albumen in the embryo's response to turning of the egg during incubation. *Br Poult Sci* 1989; 30:591-606.
 10. FRENCH NA. What the embryo needs. *Proceedings of Incubation*; 2010; Utrecht. The Netherlands 2010; 1-5.
 11. EVERAERT N, KAMERS B, WITTERS A, DE SMIT L, DEBONNE M, DECUYPERE E. Effect of four percent carbon dioxide during the second half of incubation on embryonic development, hatching parameters, and posthatch growth. *Poult Sci* 2007; 86:1372-1379.
 12. VISSCHEDIJK AHJ. The air space and embryonic respiration. 3. The balance between oxygen and carbon dioxide in the air space of the incubating chicken egg and its role in stimulating pipping. *Br Poult Sci* 1968b; 9:197-210.
 13. TONA K, MALHEIROS RD, BAMELIS F, CAREGHI C, MORAES VMB, ONAGBESAN O *et al.* Effects of storage time on incubating egg gas pressure, thyroid hormones, and corticosterone levels in embryos and on their hatching parameters. *Poult Sci* 2003; 82:840-845.
 14. SAHAN U, IPEK A, ALTAN O, YILMAZ-DIKMEN B. Effects of oxygen supplementation during the last stage of incubation on broiler performance, ascites susceptibility and some physiological traits. *Anim Res* 2006; 55:145-152.
 15. MEIR M, TAZAWA H. Effects of drilling holes into the air cell of incubated goose eggs on distribution of oxygen partial pressures under the shell. *Br Poult Sci* 1999; 40:472-477.
 16. VISSCHEDIJK AHJ, GIRARD H, AR A. Gas diffusion in the shell membranes of the hen's egg; Lateral diffusion *in situ*. *J Comp Physiol [B]* 1988; 158:567-574.
 17. AR A, GIRARD H. Anisotropic gas diffusion in the shell membrane of the hen's egg. *J Exp Zool* 1989; 251:20-26.
 18. CORREA RS, DEKICH MA, BEVENSEE EF. Method for improving chick hatchability. United States. Patent Application Publication, Sep 7, 2006.
 19. JUÁREZ EMA, LÓPEZ CS, LEDESMA MN. El embriodiagnóstico como herramienta imprescindible para la evaluación del proceso de incubación en aves domésticas. XIX Congreso Nacional de Patología Veterinaria 2010; 2010 mayo 26-28; Villahermosa

o al final (510 horas), tienen un menor potencial de crecimiento durante la primera semana, comparados con los que nacen durante el periodo pico de las 490 horas del DE;^{27,42} en el segundo estudio, la ventana de nacimiento del grupo VRM inició a las 495 horas, lo cual coincide con el periodo referido como óptimo.²⁷ De acuerdo con la clasificación por etapas del tiempo de nacimiento que ha descrito Padron *et al.*,⁴² el grupo VRA se clasifica como tardío. Bruggeman *et al.*²⁸ observaron una mejor calidad de los pollitos provenientes de un sistema de VR, en el segundo estudio, el grupo de VRM mostró 49% de pollitos de excelente calidad y 49.5% de buena calidad.

En el presente estudio se determinó que al utilizar un sistema de VR los primeros 10 días del DE, junto a una perforación del cascarón durante la transferencia, se modifica la trayectoria del proceso incubatorio, sin afectar los parámetros de incubación, se obtuvo una mejor calidad de los pollitos con peso y longitud favorables, una ventana de nacimiento más estrecha y menor mortalidad en el grupo CP durante la fase embrionaria de cambio de respiración. La conductancia del cascarón, el diámetro de la perforación y el momento en que se debe realizar la perforación, son la clave para optimizar la pérdida de peso y el intercambio de gases al momento de la transferencia. Se estableció un rango de tolerancia óptimo de 15,000 ppm de CO₂ para la incubación durante la primera mitad del desarrollo embrionario de huevos fértiles de aves reproductoras pesadas en la etapa *Prime age old*.

Agradecimientos

Se agradece a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM) por el financiamiento otorgado para la realización del presente estudio a través del proyecto PAPIIT IN 220909-3 "Evaluación del incremento de CO₂ en la etapa temprana de incubación sobre el desarrollo embrionario en aves domésticas".

-
- (Tabasco) México. Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, A.C. 2010:525-535.
20. LÓPEZ CS, JUÁREZ EMA, PRADO ROF. Una escala no invasiva para la clasificación de la calidad en pollitos recién nacidos permite valorar el proceso de incubación. XXXIV Convención ANECA 2009. 2009 agosto 12-15; Acapulco de Juárez (Guerrero); México. México D.F. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, A.C. 2009:1-9.
 21. BOERJAN M. Maximizando la uniformidad y la calidad de los pollitos. *Boletín AP Zeddam*, The Netherlands: Pas Reform Hatchery Technologies 2005; 23:18-23.
 22. WOLANSKY N, RENEMA A. Relationships between chicks. Conformation and quality measures with

- early growth traits in males of eight selected pure or commercial broiler breeder strains. *Poult Sci* 2006; 85:1490-1497.
23. TONA K, ONAGBESAN OM, JEGO Y, KAMERS B, DECUYPERE E, BRUGGEMAN V. Comparison of embryo physiological parameters during incubation, chick quality, and growth performance of three lines of broiler breeders differing in genetic composition and growth rate. *Poult Sci* 2004; 83:507-513.
 24. MAULDIN JM, MASOERO S, SANTOS J, FAIRCHILD BD. Predicting chick quality: Which is best - chick length or hatch day body weight? The University of Georgia, College of Agricultural and Environmental Sciences, Cooperative Extension Service, Poult Fact Sheet. Sept. 2008; 4.
 25. PETEK M, ORMAN A, DIKMEN S, ALPAY F. Relations between day-old chick length and body weight in broiler, quail and layer. *Uludag Univ J Fac Vet Med* 2008; 27:25-28.
 26. GILL JL. Design and analysis of experiments in the animal and sciences. Vol. 1 Ames (Io): The Iowa State University Press, 1978.
 27. DE SMIT L, BRUGGEMAN V, DEBONNE M, TONA JK, KAMERS B, EVERAERT N. The effect of nonventilation during early incubation on embryonic development of chicks of two commercial broiler strains differing in ascites susceptibility. *Poult Sci* 2008; 87:551-560.
 28. BRUGGEMAN V, WITTERS A, DE SMIT L, DEBONNE M, EVERAERT N, KAMERS B. Acid-base balance in chicken embryos (*Gallus domesticus*) incubated under high CO₂ concentrations during the first 10 days of incubation. *Respir Physiol Neurobiol* 2007; 159:147-154.
 29. HOGG A. Single stage incubation trials. *Poult Avian Biol Reviews* 1997; 8:168.
 30. MOLENAAR R, REIJERINKIAM, MEIJERHOF R. Relationship between hatchling length and weight on later productive performance in broilers. *World Poult Sci J* 2008; 64:599-604.
 31. HASSANZADEH M, BOZORGMEHRI FMH, BUYSE J, BRUGGEMAN V, DECUYPERE E. Effect of chronic hypoxia during the embryonic development on the physiological functioning and on hatching and posthatching parameters related to ascites syndrome in broiler chickens. *Avian Pathol* 2004; 33:558-564.
 32. CHAN T, BURGREN W. Hypoxic incubation creates differential morphological effects during specific developmental critical windows in the embryo of the chicken (*Gallus gallus*). *Respir Physiol Neurobiol* 2005; 145:251-263.
 33. FASENKO GM, ROBINSON FE, FEDDES JJR, SEGURA J. Examining the Embryonic Metabolism of Short and Long Term Stored Eggs. In: ROBINSON F, RENEMA R, FASENKO G, editors. *New Developments in Reproduction and Incubation of Broiler Chickens*. Edmonton, Canada: Spotted Cow Press, 2003:287-292.
 34. AR A. Gas exchange of the avian embryo at altitude-The half-empty glass. *Funktionsanalyse Biologischer Systeme* 1993; 23:339-350.
 35. HASSANZADEH M. New Approach for the incidence of ascites syndrome in broiler chickens and management control the metabolic disorders. *Int J Poult Sci* 2009; 8:90-98.
 36. WILLEMSSEN H, TONA K, BRUGGEMAN V, ONAGBESAN O, DECUYPERE E. Effects of high CO₂ level during early incubation and late incubation *in ovo* dexamethasone injection on perinatal embryonic parameters and post-hatch growth of broilers. *Br Poult Sci* 2008; 49:22-231.
 37. EVERAERT N. Effects of hypercapnia during late incubation on the physiology and performance of different chicken lines. *Dissertations of Agriculture, Doctor in Bio-ingenieurswetenschappen*. [PhD thesis (no. 831)]. Leuven, Belgium: Katholieke University, 2008.
 38. LÓPEZ REL. Desarrollo embrionario durante la incubación con incremento gradual de CO₂ en huevos fértiles de gallina doméstica (*Gallus gallus*) (tesis de licenciatura) México DF: Universidad Nacional Autónoma de México, 2011.
 39. MEIR M, AR A. Artificial increase of eggshell conductance improves hatchability of early laid goose eggs. *Br Poult Sci*. 1996; 37:937-51.
 40. MOLENAAR R, VRIES S, VAN DEN ANKER I, MEIJERHOF R, KEMP B, VAN DEN BRAND H. Effect of eggshell temperature and a hole in the air cell on the perinatal development and physiology of layer hatchlings. *Poult Sci* 2010; 89:1716-1723.
 41. MEIR M, AR A. Changes in eggshell conductance, water loss and hatchability of layer hens with flock age and moulting. *Br Poult Sci* 2008; 49:677-689.
 42. PADRÓN M, FANCHER B, GAYTAN E, MALAGÓN G. Influencia del Tiempo de Nacimiento sobre el Desempeño del Pollito Durante la Primera Semana. *Aviagen Inc. Suppl*. 2005.