

Characterization of embryonic mortality in broilers

Caracterización de mortalidad embrionaria en pollos de engorde

Adriana Peñuela S^{1*} M.Sc, Aureliano Hernandez V² Ph.D.

¹University of Santander, Faculty of Agrucultural Sciences, Veterinary Medicine. Campus Universitario Lagos del Cacique Bucaramanga, Colombia. ²National University of Colombia, Faculty of Veterinary Medicine and Zootecnia, Bogotá, Colombia. *Correspondence: e.penuela@mail.udes.edu.co

Received: June 2017; Accepted: December 2017.

ABSTRACT

Objective. The purpose of this study was to characterize the incidence of EM in Ross 308 strain eggs. **Materials and methods.** A prospective cohort study was performed, through candling and embryodiagnosis, in 4 groups of eggs coming from 4 different age breeders. Other data such as percentage of infertility, malformation, malposition, cracked and contaminated eggs were reported. **Results.** General EM reached 16.08% IC95% (14.69; 17.60) and was different among the different age-groups ($p < 0.001$), being higher for eggs from 64 week-old breeders with 27.66% IC95%(23.92; 31.99) and lower for the 47 weeks old ones (8.84% IC95%) (6.97; 11.22). In the first week of incubation 57.53% of the embryos died and mortality was at its highest during days 1 and 3; in the second week EM was 38.42% died, with a maximum of deaths between days 19 and 21. **Conclusions.** This study allowed confirmation on the biphasic behaviour of EM, although there are variations in the peaks of mortality possibly attributed to differences in production conditions for each enterprise.

Keywords: Flocks, incubation, embryo mortality (Sources: AGROVOC, ICYT).

RESUMEN

Objetivo. El propósito de este estudio fue caracterizar la incidencia de mortalidad embrionaria (ME) en huevos de estirpes Ross 308 en una empresa de Santander, Colombia. **Materiales y métodos.** Se realizó un estudio de cohorte prospectivo en el cual se siguieron durante la incubación, por medio de ovoscopia y embriodiagnóstico, 4 grupos de huevos provenientes de reproductoras de 4 edades diferentes. Se reporta el porcentaje de infertilidad, de malformaciones, malposición, huevos fisurados y contaminados. **Resultados.** La ME general alcanzó 16.08% IC95%(14.69; 17.60) y fue diferente entre los grupos de edad ($p < 0.001$); esta fue mayor para los huevos de reproductoras de 64 semanas con 27.66% IC95% (23.92; 31.99) y menor para las de 47 semanas con 8.84% IC95% (6.97; 11.22). En la primera semana de incubación murió el 57.53% de los embriones y se presentó el pico de muerte entre los días 1 y 3; la segunda semana murió el 38.42%, con un máximo de muertes entre el día 19 y 21. **Conclusiones.** Este estudio, es el primero de su naturaleza para la zona y la estirpe y permitió confirmar el comportamiento bifásico de la ME aunque existen variaciones en los picos de mortalidad atribuidas posiblemente a las diferencias de las condiciones de producción propias de las empresas.

Palabras clave: Reproductoras, incubación, mortalidad embrionaria (Fuentes: AGROVOC, ICYT).

INTRODUCTION

EM is an economical problem for the poultry industry. In the early twentieth century, when flocks were smaller, the EM average was not above 10%. However, in the 1950s when primitive methods were replaced by modern practices of intensive production, which included confinement reproduction and artificial hatching, EM would frequently rise up to 25% or even more (1). Currently, the development of specialized breeders, its selection to ideal parameters and the technology applied into incubators have led to the establishment of limits for each strain, under which the capacity of hatching has been tested by ideal incubation conditions.

EM in chickens is not evenly distributed during the 21 days of incubation and it has been established, through mathematical models, that mortality curves present two peaks during the different phases of development, which occur between the first and third week, and are mainly related to changes in embryo metabolism (2). For this reason, EM was divided into early, intermediate and late periods.

The early EM (EEM) happens during the first week of incubation (3). It is especially high between day 3 and 5. Presumably, it is due to CO₂ accumulation or to hydronephrosis (1); the latter, as a result of mechanical obstruction when the mesonephros starts working (3). Romanoff, in 1949, mentioned some other possible causes for EEM such as respiratory maladjustments before the establishment of special respiratory surfaces (area vasculosa and chorioallantois) that appear during the first three or four days of incubation. On the other hand, carbohydrates are the main source of energy for the embryo and probably enough CO₂ is accumulated up to fatal levels. Also, there is a maximum concentration of lactic acid at a time when the enzyme decomposing this molecule, is also present in small quantities. Additionally, it was reported that nitrogen in the early stage of embryonic growth is excreted as ammonium, which is highly toxic for the embryo (1).

During the second week of incubation, intermediate EM (IEM) occurs and it is usually low. In quails raised in captivity, it has been related to a deficient diet in animal protein, minerals (especially calcium) or vitamins. One study showed that IEM increased when the breeder only depends on a diet based on vegetables, or during the winter when animals could not obtain enough sunlight or vitamin D. Also, vitamin E and riboflavin deficiencies may rise mortality rate during this period (1).

INTRODUCCIÓN

La ME es un problema de gran importancia económica en la industria avícola. A principios del siglo XX, cuando los lotes eran pequeños no superaba el 10%; sin embargo, hacia 1950 cuando los métodos primitivos de manejo de las aves fueron sustituidos por modernas prácticas de producción intensiva, reproducción en confinamiento e incubación artificial a gran escala, la ME frecuentemente alcanzaba el 25% o más (1). Actualmente, el desarrollo de líneas especializadas, su selección hacia parámetros ideales de producción y el desarrollo tecnológico de las incubadoras, ha permitido establecer límites para cada estirpe, bajo los cuales se ha comprobado la capacidad de eclosión en condiciones deseables en el proceso de incubación.

La ME en pollos no se distribuye uniformemente durante los 21 días de incubación y se ha establecido, por medio de modelos matemáticos, que la curva de mortalidad presenta dos picos durante las diferentes fases del desarrollo, los cuales ocurren en la primera y tercera semana y están relacionados con los cambios en el metabolismo de los embriones (2). En consecuencia, la ME se dividió en temprana, intermedia y tardía.

La ME temprana (MET) sucede en la primera semana de incubación (3). Se observa que es especialmente alta entre el día 3 y 5 y se presume que ocurre a causa del cambio en la eliminación del CO₂, o por hidronefrosis (1) que resulta de una obstrucción mecánica del mesonefros, cuando este órgano comienza a funcionar (3). Romanoff en 1949 mencionó otras causas posibles de MET, dentro de las que se incluye un desajuste respiratorio antes del establecimiento de la superficie respiratoria (correspondiente al área vascular y a la corioalantoides) que aparece en los primeros 3 ó 4 días de desarrollo embrionario. Por otro lado, los carbohidratos son la fuente principal de energía del embrión en este momento y probablemente el CO₂ se acumula en suficiente cantidad para resultar fatal. Incluso, hay una concentración máxima de ácido láctico al tiempo que la enzima que lo desdobla está presente en pequeñas cantidades. Adicionalmente se reportó que el nitrógeno en el período de desarrollo temprano es excretado en forma de amonio, el cual es muy tóxico para el embrión (1).

Durante la segunda semana de incubación ocurre la ME intermedia (MEI) la cual generalmente es baja. En codornices criadas en cautiverio se relacionó con una dieta deficiente en proteína animal, minerales (especialmente calcio) o vitaminas. En un estudio se observó que aumentaba en animales con dieta de origen exclusivamente vegetal, o en invierno cuando las aves recibían cantidades insuficientes de sol o vitamina D. También, las deficiencias de vitamina

Late EM (LEM) occurs during the third week of incubation and raises toward the 19th day (1), when the embryonic oxygen requirements are highest (3). It may be caused by a failure in the transition from allantoic to pulmonary respiration. By the end of the developmental period, the cumulative effects from adverse conditions of incubation may result in the embryo poor viability and abnormal changes in the embryo fluids become crucial (1).

One aspect that contributes to EM variability is the flock's age (4). Chickens, particularly from Cobb and Ross strains, get into the egg production phase around the 25th week and it is expected that by the 64th week they reach the productive levels under ideal conditions established in industrialized countries. However, it is clear that production characteristics change due to the flock age, for as time goes by, the expected EM values change (5).

For example, it is known that eggs from old flocks (compared to eggs from younger ones) are more sensible to heat increment in the nest, to long storage, to any inadequate preincubation treatment and even, because of the lack of enough egg's turning during incubation, possibly because of differences in the quality of albumen, yolk or shell (6).

In Colombia, the egg producing industry is highly important and it is believed that evaluation of given especially from Santander, to characterize the EM behaviour from commercial strains under the conditions of this region will provide indications which until now had only been studied in other places in the world. Present findings might aid in future plans as to increase productivity in industrial operations.

The present work was aimed to evaluate EM under controlled conditions in commercial industries.

METHODS AND MATERIALS

Population and study design. Animals were received being 1 day-old and remained in the same farm until slaughtering. The breeding of all flocks was according to the recommendations provided by the company Ross breeders. Nutrition and vaccination plan is standardized for all farms following the requirements by the zone. Besides, a common biosecurity plan is executed by all the farms.

Every egg is picked up, classified, desinfected and transported the same day into the incubator.

E y riboflavina, pueden aumentar la mortalidad en este período (1).

La ME tardía (METa) ocurre durante la tercera semana de incubación y tiende a aumentar hacia el día 19 (1), cuando la demanda de oxígeno del embrión se incrementa significativamente (3). Puede ser causada por una falla en la transición de la respiración alantoidea a la pulmonar. Al final del período de desarrollo, los efectos acumulativos de condiciones de incubación desfavorables pueden resultar en pobre viabilidad del embrión y los cambios anormales en el estado fisicoquímico de los fluidos del embrión que son especialmente importantes (1).

Un aspecto que contribuye a la variabilidad de la ME es la edad de las reproductoras (4). Las gallinas, particularmente de la estirpe Cobb y Ross, entran en fase de producción alrededor de la semana 25 y se espera que alcancen la semana 64 con los estándares de los parámetros establecidos bajo condiciones de producción ideales en países industrializados. Sin embargo, está claro que las características de producción cambian con la edad del lote, por lo que a medida que la edad aumenta los valores esperados de ME también cambian (5).

Por ejemplo, se sabe que los huevos de gallinas viejas (comparados con huevos de gallinas jóvenes) son más sensibles al incremento de la temperatura en el nido, a períodos de almacenamiento largos, a cualquier tratamiento de preincubación inadecuado e incluso al volteo insuficiente durante la incubación, posiblemente por diferencias en la calidad del albumen, la yema o la cáscara (6).

Ante la relevancia de la avicultura en la economía colombiana, y especialmente en el departamento de Santander, caracterizar el comportamiento de la ME en estirpes comerciales bajo condiciones de producción propias de la zona, dará indicios del comportamiento de estirpes que hasta el momento sólo han sido evaluadas en otros lugares del mundo y servirá como fuente de orientación para realizar ajustes en el proceso productivo.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la ME bajo condiciones controladas en industrias comerciales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población y diseño de estudio. Las reproductoras se reciben de 1 día de edad y permanecen en la misma granja hasta su sacrificio. Todos los lotes en cría y levante se manejan según las recomendaciones de la casa de abuelas que produce las reproductoras. El plan nutricional y de vacunación

Later, it is stored at a temperature which ranges from 19 to 20°C and remains there according to incubation schedule and incubators availability. Eggs are removed from the cold room twelve hours before entering an incubator and they are left at room temperature; then they are incubated into the machines of multiple stages and automatic turning each hour. The temperature for the incubators is 37.5°C and 50% of relative humidity. Eggs remain in the incubators until the 18th day. From there, they are transferred to the hatcheries, to a temperature of 36.9°C.

Research was designed as a study of prospective cohort. It was performed following four groups of hatching eggs from broiler breeder (Ross 308) at 28, 40, 47 and 64 weeks of age. For each group a size of sample was calculated according to the mortality incidence established for every age in the guide of the strain. Taking these parameters into account, a sample was given for each group, in Epidat 4.1, in the sample for a proportion module, with a precision of 3%, an alpha error of 0.05% and a design effect of 2, so that the total EM proportion may be estimated. To this number as result the percentage of infertility correspondent was added to every age value, and the correspondent result, divided by the amount of eggs in the trays, the number of trays to be evaluated was obtained, this number was approximated to the upper integer as to obtain the total of eggs for the follow up.

The follow up was done by setting eggs from selected trays from days 8 and 13 through candling. The light eggs were removed from the tray and opened to determine the EM state, according to the parameters of Hamburger and Hamilton for every day of incubation (7). The day of hatching, embryodiagnosis was performed to evaluate the condition of those eggs which did not hatch. The day of death was established and the information consolidated to obtain the total number of dead embryos in every group of eggs. Furthermore, findings regarding contamination, malformations, malpositions and shell cracks were also registered.

Statistical analysis. The Kaplan Meir method was used to calculate EM incidence and the curves of incidence for every age were compared through the log-rank test. Additionally, the proportion was calculated with its respective confidence interval for infertility, contamination, malposition, malformation and cracked eggs and the variables for each age groups were compared using the Chi-square test or Fisher's exact test. For all calculations, the statistical software STATA® 12 (Statacorp LLC, Texas, USA) was used.

está estandarizado para todas las granjas según los requerimientos de la zona. Además, se cumple un plan de bioseguridad común para todas las granjas.

Cada huevo se recoge, clasifica, desinfecta y transporta el mismo día a la incubadora. Posteriormente, se almacena en el cuarto frío, a una temperatura entre 19 y 20°C, y permanecen allí según la programación de incubación y la disponibilidad de incubadoras. Los huevos se sacan del cuarto frío 12 horas antes de ingresar a la incubadora y se dejan a temperatura ambiente; luego se incuban en máquinas ChickMaster (Medina, USA) de etapa múltiple y volteo automático cada hora. La temperatura establecida para las máquinas es de 37.5°C y 50% de humedad relativa. Los huevos permanecen en las incubadoras hasta el día 18. De allí, son transferidos a las bandejas de nacimiento hasta la eclosión de los pollos, a una temperatura de 36.9°C.

La investigación fue diseñada como un estudio de cohorte prospectivo. Se realizó seguimiento a 4 grupos de huevos de reproductoras Ross 308 de 28, 40, 47 y 64 semanas de edad. Para cada grupo de huevos se calculó un tamaño de muestra según la incidencia de mortalidad conocida para cada edad en la guía de la estirpe. Teniendo en cuenta estos parámetros, se calculó la muestra para cada grupo, en Epidat 4.1, en el módulo de muestreo para una proporción, con una precisión de 3%, un error α de 0.05% y un efecto de diseño de 2, para estimar la proporción de ME total. Al número obtenido se sumó el porcentaje de infertilidad correspondiente a cada edad y al dividir entre la cantidad de huevos de las bandejas, se obtuvo el número de bandejas a evaluar, el cual se aproximó al entero superior para obtener así el total de huevos para el seguimiento.

Se realizó seguimiento por ovoscopia de las bandejas seleccionadas los días 8 y 13. Los huevos claros se retiraron de la bandeja y se abrieron para determinar el estadio de ME, según las indicaciones de Hamburger y Hamilton (7) para cada día de incubación. El día de la eclosión de los pollos se realizó el embriodiagnóstico para evaluar la condición de los huevos que al final del período no eclosionaron. Se determinó el día de muerte y se consolidó la información, para obtener el número total de embriones muertos en cada grupo de huevos. Adicionalmente se registraron hallazgos relacionados con contaminación, malformaciones, malposiciones y fisuras en la cáscara.

Análisis estadístico. Se calculó la incidencia de ME con el método de Kaplan Meier y se compararon las curvas de incidencia para cada edad por medio de la prueba log-rank. Adicionalmente se calculó la proporción con su respectivo intervalo de confianza para las variables de infertilidad, contaminación,

Ethical considerations. This investigation fulfilled the agreements from Law 84 (National Congress of Colombia, 1989) and was approved by the Ethics committee on Scientific Investigation from Universidad Industrial de Santander (CIENCI-UIS).

RESULTS

A total of 3240 eggs were examined, 2675 chickens were born and showed a hatchability of 82.56% IC95% (81.25; 83.36). 2.90% of the eggs were infertile IC95% (2.32; 3.47). From the 3146 remaining, 471 died during the 21 day period of incubation as shown in table 1, with an EEM of 8.92%, IEM of 0.66% and a LEM of 6.5%; this is that the greater amount of deaths occurred during the first week, that is 57.53% IC 95% (53.05; 62.01), followed by the third week with 38.42% IC 95% (34.01; 42.83), whereas through days 8 to 14 of incubation only 19 embryos died, which represented 4.03% of deaths IC95% (2.25; 5.81).

The cumulative incidence of EM was 16.08% IC95% (14.69; 17.60). EM was higher in breeder flock at 64 weeks with a total of 27.66% IC95% (23.92; 31.99), followed by the 40 week old with 15.23% IC95% (12.40; 18.70), and finally the 28 weeks old with 14.27% IC95% (12.00; 16.96), whereas the 47 weeks old showed the best performance with 8.84% IC95% (6.97; 11.22). The log-rank test confirmed that there were significant differences between the cumulative incidence by every age ($p < 0.001$). In figure 1 the incidence curve may be observed, a general one and one for every breeding age.

Other relevant findings represented 2.61% IC 95% (2.04; 3.16) of the embryos in abnormal positions inside the shell. The most frequent malposition was the peak displacement over the right wing (type VI), with 48.78%, followed by the upside down embryonic position resulting in head away from air cell (type IV), with 19.51%.

The frequency of malformations was of 0.54% IC 95% (0.28; 0.79), especially represented by deformities in two or more parts of the body such as beak, limbs or head, which reached the 58.82%, followed by visible malformations in one area of the body, such as absence of one or both eyes (23.52%) or presence of brain herniation (17.64%). Additional to this, 0.18% of the eggs showed cracked shells IC95% (0.03; 0.33) and a bacterial contamination of 0.37% IC95% (0.16; 0.57).

malposición, malformación y huevos fisurados y se compararon los resultados de estas variables entre los grupos de edad por medio de la prueba ji cuadrado o exacta de Fisher. Para todos los cálculos se utilizó el software estadístico STATA® 12 (StataCorp LLC, Texas, USA).

Consideraciones éticas. Esta investigación cumplió con las disposiciones de la Ley 84 (Congreso Nacional de Colombia, 1989) y fue aprobada por el Comité de Ética en Investigación Científica de la Universidad de Santander (CIENCI-UIS).

RESULTADOS

Se evaluaron 3240 huevos, de los cuales nacieron 2675 pollos que representaron una incubabilidad de 82.56% IC95% (81.25; 83.86). 2.90% de los huevos IC95% (2.32; 3.47) resultaron infértiles. De los 3146 restantes, murieron 471 embriones que se distribuyeron en los 21 días de incubación como se muestra en la tabla 1, con una MET de 8.92%, MEI de 0.66% y METa de 6.5%; de ahí que en la primera semana ocurrió la mayor cantidad de muertes con el 57.53% de las mismas IC95% (53.05; 62.01), seguida de la tercera semana con 38.42% IC95% (34.01; 42.83), mientras que durante los días 8 a 14 de incubación sólo murieron 19 embriones, lo que representó el 4.03% de las muertes IC95% (2.25; 5.81).

La incidencia acumulada de ME fue de 16.08% IC95% (14.69; 17.60). La ME fue mayor en las reproductoras de 64 semanas con un total de 27.66% IC95% (23.92; 31.99), seguida por las reproductoras de 40 semanas con 15.23% IC95% (12.40; 18.70) y las de 28 semanas con 14.27% IC95% (12.00; 16.96), mientras que las reproductoras de 47 semanas mostraron el mejor desempeño con 8.84% IC95% (6.97; 11.22). La prueba de Log-rank confirmó la existencia de diferencias significativas entre las curvas de incidencia acumulada de cada edad ($p < 0.001$). En la figura 1 se observa la curva de incidencia, general y para cada edad de las reproductoras.

Otros hallazgos relevantes reportaron 2.61% IC95% (2.04; 3.16) de los embriones en posiciones anormales dentro de la cáscara. La malposición más frecuente fue la ubicación del pico sobre el ala derecha (tipo VI), con 48.78%, seguida por el embrión rotado con la cabeza lejos de la cámara de aire (tipo IV), con 19.51%.

La frecuencia de malformaciones fue de 0.54% IC95% (0.28; 0.79), representadas especialmente por deformidades en dos o más partes del cuerpo como el pico, las extremidades o la cabeza, las cuales alcanzaron el 58.82% seguidas por deformaciones

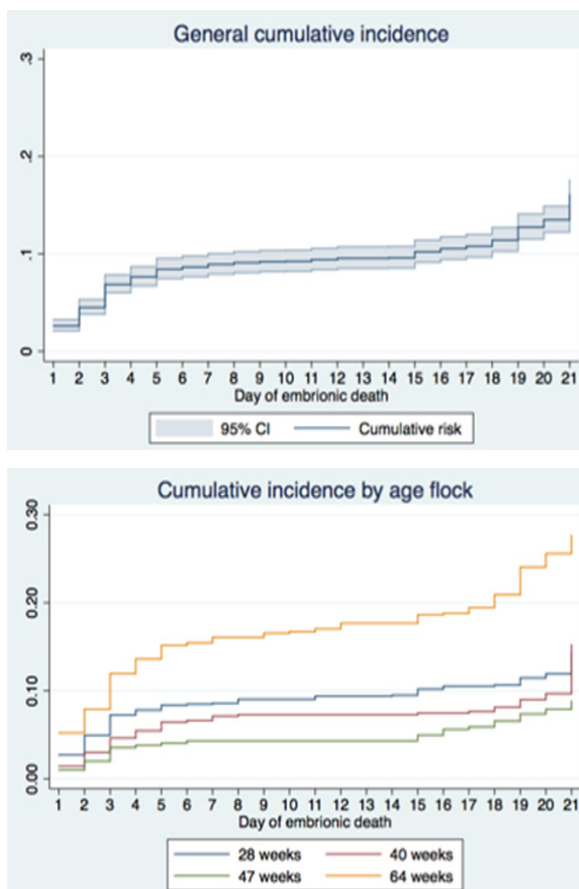


Figure 1. Cumulative incidence of EM, general and one for every breeding age.

As shown in Table 2, several differences were seen in the percentage of infertility, malposition and PNN. It was not the case for malformations, contamination and the percentage of cracked eggs.

visibles en una sola parte del cuerpo, como ausencia de uno o los dos ojos (23.52%) o presencia de hernia cerebral (17.64%). Adicionalmente se encontraron 0.18% de los huevos con fisuras en la cáscara IC95% (0.03; 0.33) y presencia de contaminación bacteriana del 0.37% IC95% (0.16; 0.57).

Como se muestra en la tabla 2, se evidenciaron diferencias en el porcentaje de infertilidad y malposición. No fue así para las malformaciones, la contaminación y el porcentaje de huevos fisurados.

DISCUSIÓN

Desde los primeros reportes de Payne en 1919 se observó que los embriones no morían uniformemente durante los 21 días de incubación, y por el contrario, había dos períodos críticos: el primero entre los días 4 y 6, y el segundo entre los días 18 y 20, durante los que ocurría cerca del 65% de la mortalidad (8). A partir de esto, se desarrollaron modelos matemáticos multifásicos para caracterizar la distribución de la ME y ratificaron este patrón.

El primer modelo propuesto fue desarrollado en 1996 por Jassim et al (2) quienes realizaron predicciones de infertilidad, ME total y de la distribución acumulada de dos fases para el tiempo hasta la ME a partir de la suma de dos distribuciones logísticas. Estos autores encontraron una ME de 11% (2), la cual se acerca al porcentaje encontrado en el presente estudio, que fue de 16.08%. En otra aproximación, Kuurman et al (9) perfeccionaron el modelo predictivo usando una distribución de Weibull, a partir de una ME un poco más baja, de 10% (9).

Por otro lado, Jassim et al (2). determinaron que la primera fase tuvo el pico de ME el día 2, con una duración de 4.6 días, y la segunda fase tuvo su pico el día 18, con una duración de 4.8 días (2).

Table 1. Number of dead embryos in every day of incubation, according to every breeding age.

Age	n	Day of death																				Total	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		21
28	972	26	21	21	5	5	1	1	4	0	0	3	0	0	1	6	3	0	1	7	4	20	129
40	648	9	10	10	5	6	1	3	1	0	0	0	0	0	1	0	1	3	5	4	32	91	
47	810	8	8	12	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	5	5	2	5	6	4	7	68	
64	810	39	19	28	11	10	2	4	0	3	1	2	4	0	0	6	1	4	9	19	9	12	183
Total	3240	82	58	71	23	23	6	8	5	3	1	5	4	0	1	18	9	7	18	37	21	71	471
Cumulative incidence		2.61	4.50	6.86	7.65	8.43	8.64	8.92	9.09	9.20	9.23	9.41	9.55	9.55	9.58	10.21	10.53	10.78	11.42	12.73	13.49	16.08	

Table 2. Other findings observed through lighting process and embryodiagnosis

Age	n	Egg weight (g)	Infertile (%)	Cracks (%)	Malposition (%)	Malformation (%)	Culls (%)
28	972	57.61	1.02	0.10	1.45	0.73	0.51
40	648	64.61	1.85	0	2.67	0.31	0.15
47	810	65.10	1.23	0.12	2.62	0.25	0.12
64	810	70.78	7.65	0.49	4.01	0.80	0.37
General	3240		2.90	0.18	2.61	0.54	0.37
P value			<0.001	0.116	0.012	0.328	0.565

DISCUSSION

Ever since the early reports from Payne in 1919, it was observed that embryos did not die uniformly during the first 21 days of incubation, and that on the contrary, there were two critical periods: the first one between days 4 and 6, and the second one between the days 18 and 20, where a percentage of mortality next to 65% was present (8). Because of this, several mathematical multiphasic models were developed to characterize the EM distribution and they ratified this pattern.

The first model was developed in 1996 by Jassim et al. (2), who made predictions on infertility, total EM and on the accumulated distribution of the two phases for time until the EM starting from the adding of two logistics distributions. These authors found an EM of 11% (2), which is closer to the one found in the present study, which was of 16.08%. In another approximation, Kuurman et al. (9), perfected the predictive model using a distribution of Weibull, starting from a lower EM, of 10% (9).

Jassim et al (2), determined that the first phase had its peak of EM on day 2, with a lasting of 4.6 days, and that the second phase had its peak on the day 18, with a duration of 4.8 days (2). The previous information contrasts with the present study, where the EM peak for the first phase was day 1 and lasted around 3 days, and the peak in the second phase was day 21 and lasted three days as well. This allows to establish that even if the biphasic pattern remains, there are conditions in the eggs, like handling during incubation processes that could affect the embryo in different states, speed up or delay the death peak in every stage, although it was always associated to vital changes in the beginning as well as in the end of incubation.

Lo anterior contrasta con el presente estudio, en el que el pico de ME para la primera fase fue el día 1 y duró aproximadamente 3 días y el pico en la segunda fase fue el día 21 y duró también 3 días. Esto permite establecer que aunque se mantiene el patrón bifásico, existen condiciones tanto de los huevos, como del manejo durante el proceso de incubación, que podrían afectar al embrión en diferentes estadios y adelantar o retrasar el pico de muerte en cada etapa, pero siempre asociado a cambios vitales tanto al inicio como al final de la incubación.

En el estudio de Payne también fue evidente que la tercera semana de incubación fue más crítica que la primera (con el 60% de las muertes después del día 14 de incubación) (8), mientras que en el presente estudio fue la primera semana en la que se observó el mayor número de muertes (57.54%). Algo semejante ocurrió en el estudio de Jassim et al., en el que se reportó entre 63 y 73% de mortalidad, pero incluyendo la segunda semana de incubación (2).

En este trabajo la MET fue 8.92%; sin embargo, en Canadá el 8% fue considerado como un valor inusualmente alto que al igual que en este seguimiento excede los límites esperados para la primera semana de incubación (10). Además, este porcentaje también supera los valores máximos permitidos por la guía para la estirpe Ross 308, en la cual el mayor porcentaje aceptado de MET es de 5.5% cuando los huevos provienen de reproductoras entre 25 y 30 semanas de edad. Sin embargo, es importante tener en cuenta que estas guías son formuladas por la casa matriz de la estirpe, bajo condiciones "ideales" de producción de huevos e incubación, que no pueden ser comparadas con el estilo de cría, levante y producción de Santander, Colombia.

Al detallar el momento de muerte de los embriones durante la primera semana, se observa que el pico de muerte fue el día 1, seguido de cerca por el día

Payne also showed that the third week of incubation was more critical than the first one (with a 60% of deads after the 14th day of incubation (8), whereas in the present study it was during the first week where the greater amount of deads were reported (57.24%). Something similar happened in the Jassim et al. study, where mortality was reported between 63 and 73%, but including the second week of incubation (2).

In this study the EEM was 8.92%, however, in Canada the 8% was considered as a value unusually high just like in this follow up exceeds the expected limits for the first week of incubation (10). Besides, this percentage also overpasses the maximum values allowed by the Ross 308 strain guide, in which the highest value allowed for an EEM is 5.5% when eggs come from flocks between the ages of 25 and 30 weeks old. Nevertheless, it is important to take into account that these guides are formulated by the matrix house of the strain under ideal conditions for poultry and incubation, none of which can be compared to the own mode of breeding and production in Santander, Colombia.

When detailing the moment of death of embryos during the first week, it is observed that the pick of death was day 1, followed closely by day 3. In contrast, Scott and Mackenzie (10) specifically evaluated death according to the stages provided by Hamburger and Hamilton (7) and found a peak of death between the stages HH14 to HH18 and a lower one in the stages HH24 and HH28.

The first one matches with the present study giving that stages HH14 to HH18 occur during day 3 of development and is related to changes that include the amnion, heart and circulatory system formation; the second peak matches the days 4 and 5 of incubation and is related to possible alterations in the formation of the visceral arches (10), the corion and allantois fusion and the beginning of the functioning of the mesonephros (3). This agrees with the characterization given by the multiphasic models previously mentioned, but it differs from the present study given that it was on day 1 where the highest peak of mortality was seen.

As to IEM, the present research found an incidence of 0.66%, which remains within the limits of the Ross 308 guiding, where the maximum value allowed is 1%. During the second week of incubation the mineralization of bones begins, the secreted hormonal activity is established in thyroid, pituitary and gonads. Also, nutrients actively are taken from albumin and progressively from the yolk (11). For these

3. En contraste, Scott y Mackenzie (10) evaluaron específicamente la muerte en función de las etapas propuestas por Hamburger y Hamilton (7) y encontró un pico de muerte entre las etapas HH14 a HH18 y uno más bajo en las etapas HH24 y HH28.

El primero coincide con el presente estudio ya que las etapas HH14 a HH18 ocurren durante el día 3 de desarrollo y se relaciona con cambios que incluyen la formación del amnios, del corazón y el sistema circulatorio; el segundo pico coincide con los días 4 y 5 de incubación y se relaciona con posibles alteraciones en la formación de los arcos viscerales (10), la fusión del corion y la alantoides, y el inicio del funcionamiento del mesonefros (3). Lo que concuerda con la caracterización dada por los modelos multifásicos anteriormente mencionados, pero difiere un poco con el actual estudio teniendo en cuenta que el día 1 se presentó el pico más alto de mortalidad.

En cuanto a la MEI, en esta investigación se encontró una incidencia de 0.66%, lo cual se mantiene dentro de los límites de la guía de incubación para Ross 308, donde el máximo permitido es de 1%. Durante la segunda semana de incubación comienza la mineralización de los huesos, se establece la actividad de hormonas secretadas por órganos como la tiroides, la pituitaria y las gónadas, y los nutrientes se movilizan activamente desde la albumina y progresivamente desde el vitelo (11). Por estos motivos, suministrar una dieta balanceada a los lotes es vital para transferir al huevo los elementos necesarios para el desarrollo del embrión y por lo mismo, excesos o deficiencias de ciertos nutrientes incidirán en la mortalidad durante la segunda semana de incubación.

La METa en este estudio fue de 6.5%, que excede el reportado por Elibol et al (12) y Lourens (13) 10, 12, or 14 d of incubation at standard conditions to determine if an increased turning frequency would facilitate an early cessation of turning. Turning was discontinued after the respective days were completed. Eggs remained in setter trays until combined at 18 d to complete hatching in a single machine. The young flocks exhibited significantly better fertile hatchability, as expected, but there was no overall effect due to differences in cessation of turning from 8 to 14 d of incubation (range 88.9 to 89.2%, y por la guía de incubación Ross 308, en la cual el máximo permitido es de 4.5% (incluidos los embriones que pican la cáscara) para las reproductoras de 25 a 30 semanas. Sin embargo, coincide con la mortalidad encontrada en huevos que fueron almacenados durante largo tiempo (14) o en huevos incubados que tenían la cáscara fisurada (15).

reasons, to supply a balanced diet to the breeder flocks is vital in order to transfer into the egg the necessary elements for embryo development and, for the same reason, excess or deficiency of some nutrients will influence EM during the second week of incubation.

The LEM in this study was 6.5%, which exceeds the one reported by Elibol et al (12) and Lourens (13) 10, 12, or 14 d of incubation at standard conditions to determine if an increased turning frequency would facilitate an early cessation of turning. Turning was discontinued after the respective days were completed. Eggs remained in setter trays until combined at 18 d to complete hatching in a single machine. The young flocks exhibited significantly better fertile hatchability, as expected, but there was no overall effect due to differences in cessation of turning from 8 to 14 d of incubation (range 88.9 to 89.2%, and by the incubation guide Ross 308, in which the maximum allowed is 4.5% (included those embryos who pip the shell) for the breeder flocks between 25 to 30 weeks of age. However, it matches to the mortality found in eggs that were stored for long periods of time (14) or in incubated eggs with cracked shell (15).

The last week of incubation showed a peak in the mortality on the day 19, which agrees with the findings in the multiphasic models (2,9). At this time, the allantoic blood vessels are responsible for respiration and excretion, but when the embryo breaks the shell membranes using the beak in order to access to the air cell, lung breathing is completed (8), and any failure in this transition may interfere with successful birth of the embryo (1). Also, it may be associated to other changes present after day 16 and may contribute to less vigorous embryos weakening. The first change is that nutrients for the embryo are obtained primarily from the albumen and after day 16, it starts relying mainly on the yolk. Besides, during day 19, the yolk has not been absorbed yet, but it is in the process of going into the abdominal cavity (8), and this can alter the viability of the embryo.

This study allowed to describe the EM according to the ages of the breeder flocks, determining aspect in the evaluation of the EM and that has been widely discussed in multiple experimental studies (5, 12, 16). The EM was higher in eggs from the 64 weeks old breeders, followed by the 40, 28 and 47 weeks. This behaviour is attributed, among other issues, to differences in the egg weight and the quality of the shell measured through variables such as specific gravity, thickness, conductance or porosity (17).

La última semana de incubación mostró un pico en la mortalidad el día 19, lo que concuerda con lo evidenciado en los modelos multifásicos (2,9). Hasta este momento los vasos sanguíneos alantoideos cumplen la función de respiración y excreción de desechos, pero cuando el embrión rompe con el pico las membranas de la cáscara y accede a la cámara de aire, la respiración pulmonar se completa (8) y cualquier falla en esta transición puede interferir con la eclosión exitosa del embrión (1). También, puede estar asociado a otros cambios que ocurren después del día 16 y que pueden contribuir a debilitar los embriones menos vigorosos. El primer cambio se refiere a que los nutrientes del embrión son obtenidos principalmente de la albumina y después del día 16, el embrión empieza a depender de la yema. Además, hacia el día 19 la yema no se ha absorbido pero se encuentra en el proceso de pasar dentro de la cavidad abdominal (8) y esto puede alterar la viabilidad del embrión.

Este estudio permitió describir la ME de acuerdo con la edad de las reproductoras, aspecto que es determinante en la evaluación de la ME y ha sido ampliamente discutido en múltiples estudios experimentales (5,12,16). La ME fue más alta en los huevos de las reproductoras de 64 semanas, seguida de las de 40, 28 y 47 semanas. Este comportamiento es atribuido, entre otras cosas, a diferencias en el peso del huevo y la calidad de la cáscara medida por variables como la gravedad específica, el grosor, la conductancia o la porosidad (17).

Se ha reportado que la cáscara generalmente adelgaza con la edad (17) y que las gallinas jóvenes tienden a producir huevos con cáscara más gruesa que las gallinas viejas (18). Aunque no se midió la calidad de la cáscara en este estudio, si fue evidente que los huevos de las gallinas de 64 semanas se fracturaban más fácilmente, tuvieron el mayor porcentaje de huevos fisurados aunque sin diferencias con las otras edades, y también la cáscara era en general más delgada y con imperfecciones del color y la textura.

Otro estudio encontró una fuerte asociación entre la MET y la gravedad específica, particularmente en gallinas viejas, según la cual con gravedades menores a 1,080, los embriones murieron más, lo que se atribuyó a una mayor pérdida de agua de huevos por el adelgazamiento de la cáscara (19). Aunque la gravedad específica no se evaluó, las características físicas evidenciadas podrían ser un reflejo de su disminución, que finalmente pudo haber impactado la MET en huevos de reproductoras de 64 semanas, la cual resultó ser la más alta de todas las edades evaluadas.

La incubabilidad generalmente es máxima en la porción media de la etapa productiva cuando el

It was reported that the shell generally gets thinner with age (17) and that young hens tend to produce eggs with a thicker shell compared to the older ones (18). Although the quality of the shell was not measured in this study, it was evident that those eggs from the 64 weeks old broke or fractured easier, they had the higher percentage of cracked shells although with no differences between the other ages, and also the shell was thinner and with imperfections regarding color and texture.

A strong association between the LEM and specific gravity was reported, particularly in old hens. According to this, when gravities are under 1.080, more embryos died, which was attributed to a greater water loss due to thinning of the shell (19). Although the specific gravity was not evaluated, the physical characteristics could give an idea of its decrease, which could have impacted LEM in the 64-week flock. This LEM turned out to be the highest among all evaluated ages.

Hatchability is usually maximum in the middle part of the hens productive period, when shell thickness values decrease and the porosity becomes higher (17). These findings coincide with the present ones, since the best results found were obtained in the 47-week-old breeders group. On the other hand, a study done on ducks shows that thickening of the shell may increase EEM because there is less porosity and besides the distribution of the pores tends to be on the blunt and sharp end of the egg, in contrast to a higher porosity in the equator of the eggs of embryos who manage to hatch (20). This could be related to the finding in this study which is that embryos of breeder flock at 28 weeks had the second highest incidence of EEM given that the eggs with the previous characteristics are typical from breeders who initiate the production.

A positive correlation has also been found between the flock age and the egg size (18), as a result of an increase in yolk deposition caused by changes in the ovarian function influenced by age, translated into follicle weight gaining, and therefore, a heavier egg (5). These findings agree with present ones, given that the biggest and smallest eggs were from the breeder flocks at 64 and 28 weeks, respectively.

Besides, keeping in mind that yolk provides the nutrients for embryonic development, it is to be expected that eggs from younger breeders have a lower availability of nutrients and, therefore, this has a negative effect in embryonic development (5), which could explain in part the EM in eggs from the breeder flock at 28 weeks.

grosor de la cáscara disminuye y la porosidad se incrementa (17), lo cual concuerda con este estudio en el que los mejores resultados fueron de los huevos de reproductoras de 47 semanas. Por otro lado, un estudio en patos muestra que el engrosamiento de la cáscara puede llegar a incrementar especialmente la MET porque hay menor porosidad y además, la distribución de los poros tiende a estar hacia el polo romo y agudo del huevo, en contraste con mayor porosidad en el ecuador de los huevos de los pollos que logran eclosionar (20). Esto podría estar relacionado con el hallazgo de este estudio según el cual los embriones de las reproductoras de 28 semanas tuvieron la segunda mayor incidencia de MET, ya que huevos con las características mencionadas son típicos de reproductoras que inician el ciclo de producción.

También se ha encontrado una correlación positiva entre la edad del lote y el tamaño del huevo (18), a consecuencia de un incremento en la deposición de yema ocasionado por cambios en la función ovárica influenciados por la edad, que se traducen en incremento del peso del folículo, y por ende en mayor peso del huevo (5). Lo anterior fue obvio en este seguimiento en el que los huevos más grandes y más pequeños fueron los de las reproductoras de 64 y 28 semanas, respectivamente.

Además, teniendo en cuenta que la yema provee los nutrientes para el desarrollo del embrión, es de esperar que los huevos de gallinas jóvenes tengan una menor disponibilidad de nutrientes y por tanto, esto tenga efecto negativo sobre el desarrollo embrionario (5), lo que podría explicar en parte la ME en los huevos de las reproductoras de 28 semanas.

Adicionalmente, el tamaño del huevo está correlacionado con el tamaño del embrión (21) y en consecuencia se espera que de huevos grandes se obtengan pollos grandes. Las causas probables de la relación incluyen una superficie más amplia para la difusión de O_2 , mayor circulación y extracción de nutrientes de la yema, y sobrehidratación por menor pérdida de agua (22) changes in eggshell conductance and incubation time permit the water loss necessary for embryonic development. To what extent this happens for different-size eggs within a species is much less known. Chicken eggs with fresh egg weight (Wegg). Esto último fue evidente en el presente estudio a través de los hallazgos de albumina residual en algunos embriones que murieron hacia el final de la incubación y aunque no se cuantificaron, es una característica que se tiene en cuenta en el embriodiagnóstico, ya que esto puede estar relacionado, además, con condiciones adversas de incubación. Por otro lado, se debe tener en cuenta que el incremento de ME asociado a huevos grandes, especialmente METa, se ha

Moreover, egg size is correlated to embryo size (21) and in consequence, it is expected to obtain big chickens from big eggs. Expected causes for the abovementioned relation include a wider surface for O₂ diffusion, higher circulation and extraction of nutrients from the yolk, and overhydration by fewer water loss (22). The latter was presently encountered as shown by residual albumen observed in some embryos who died toward the end of incubation and, although the abovementioned incidence was not recorded, it is an important characteristic in embryodiagnosis, since this may be related to adverse conditions during incubation. On the other hand, the EM increase associated to large eggs, especially in the LEM period, was postulated as a consequence of the difficulty for the embryo to lose metabolic heat during the last periods of incubation (23).

Shell's weight and thickness are negatively associated to the relative rate of water loss. Regarding that, it is believed that the main osmoregulatory mechanism of the embryo is the chorioallantoic membrane (CAM), which acts as a selective barrier, allowing the absorption of electrolytes and water from allantoic fluid and functions as an effective defense against intraluminal toxic contents (24).

The CAM degenerates toward day 19 when pulmonary ventilation begins. This change in oxygenation may affect the blood flow due to local hypoxia and vasoconstriction (24) and under adverse conditions it may increase LEM.

Another aspect related to age and EM augmentation is the difference in embryo development associated to egg laying sequence, which makes reference to the production pattern determined by days where hens lay eggs consecutively, followed by a "pause" due to ovulation delay of the F1 follicle (25).

The follicle destined to be the first egg of the new sequence remains in the ovary around 16 hours more than the remaining follicles, and consequently, the first hatched embryo tends to be more developed than the rest of the embryos. Even, low incubability has been observed, which may be caused by the preovulatory aging of the oocyte or by changes in the yolk composition, which affect embryonic growth (25).

If it is taken into account that the laying sequence of the eggs normally decreases as the flock production period finishes, low hatchability may be related to the incidence increase from first eggs of laying sequences in flocks growing older (25). The above could explain the fact that the

explicado a partir de las dificultades del embrión para perder calor metabólico durante las últimas etapas de la incubación (23).

Incluso el peso y el grosor de la cáscara están correlacionados negativamente con la tasa relativa de pérdida de agua del huevo. Con respecto a esto, se cree que el principal mecanismo osmoregulador del embrión en desarrollo es la membrana corioalantoidea. Esta membrana actúa como una barrera selectiva, permitiendo la absorción de electrolitos y agua del fluido alantoideo mientras mantiene una defensa efectiva ante contenidos tóxicos intraluminales (24).

La membrana corioalantoidea se degenera hacia el día 19, cuando inicia la ventilación pulmonar. Este cambio en la oxigenación puede afectar el flujo sanguíneo a consecuencia de hipoxia local y vasoconstricción (24) y bajo condiciones adversas puede repercutir en el incremento de la METa.

Otro aspecto relacionado con la edad y el incremento de ME es la diferencia en el desarrollo de los embriones asociada a la secuencia de puesta del huevo, la cual hace referencia al patrón de producción determinado por días en los que la gallina pone huevos consecutivamente, seguidos de una "pausa" producida por el retraso en la ovulación del foliculo F1 (25).

El foliculo destinado a ser el primer huevo de la nueva secuencia permanece en el ovario cerca de 16 horas más que los siguientes foliculos y consecuentemente se ha encontrado que el primer embrión de la secuencia tiende a ser más desarrollado que los siguientes embriones. Aun así, se ha observado baja incubabilidad en estos huevos, lo que podría deberse al envejecimiento pre-ovulatorio del oocito, o a cambios en la composición de la yema que afectan el crecimiento embrionario (25).

Si se tiene en cuenta que la duración de la secuencia de puesta del huevo normalmente disminuye a medida que finaliza el período de producción de la parvada, se puede relacionar la baja incubabilidad con el incremento en la incidencia de primeros huevos de las secuencias de puesta en lotes que envejecen (25). Lo anterior podría explicar el hecho de que la mayor incidencia de ME y de infertilidad fue de los huevos de reproductoras de 64 semanas. Sin embargo, otros estudios atribuyen el incremento de estos parámetros directamente al efecto de la edad y no a la secuencia de ovoposición (26).

En relación con otros hallazgos, las malposiciones evidentes cerca del final de la incubación son causa reconocida de METa. De los embriones que murieron a partir del día 18, casi el 50% presentaron alguna malposición que hizo extremadamente difícil o

highest EM mortality and infertility rate was provided by breeder flock at 64 weeks. However, other studies attribute the increase of these parameters directly to the effect of age, and not to the laying sequence (26).

Regarding other findings, malpositions near the end of incubation are a cause of LEM. From those embryos who died from day 18 on, almost 50% manifested some malposition that made extremely difficult or impossible to hatch because the chicken could not reach the air chamber, was unable to pip the shell due to lack of movement, or for the combination of both reasons. This matches with other previous reports where between 50 and 85% of embryos that did not hatch, showed some malposition (27).

The increase of malpositions is related to fails in the egg turning, abnormal temperature during incubation, genetic influences, and even the presence of environmental contaminants (27). The above leads to think that malposition is not always the primary cause of death, but it may be the result of unfavorable environmental conditions or lethal factors (1).

The present malformations observed could be due to genetic alterations of low lethality, which allow development of the embryo up to advanced incubation states. However, all embryos with any malformation are not necessarily related to genetic anomalies given that, in a greater proportion, they are due to adverse incubation conditions such as abnormal temperature, O₂ excess or restriction and excessive quantities of CO₂ (1). The percentage of embryos with structural abnormalities (such as anophthalmia, exencephaly or limbs alteration) was 0.54%, value considered too low as to be attributed to abnormal handling conditions. If that was the case, a larger number of affected embryos could be expected, fact which does not match to present data, and allows to consider that there is a relation between malformations and genetics.

On the other side, malformations are intimately linked to EEM. Heart, head, eyes, thorax or other vital organs defects from embryos who died in the "blood ring" state of development with visible embryo. It was evident that embryos from broiler strains showed a higher amount of structural abnormalities compared to the laying strains (10). This, however, was not presently found, since only visual inspection was performed and on early development states is not always feasible to watch in detail these anomalies.

In conclusion, to define the EM behavior, allows to have a base to measure any variation of a key

imposible la eclosión porque el pollo no pudo acceder a la cámara de aire, fue incapaz de perforar la cáscara por restricción del movimiento, o por la combinación de ambas razones. Esto coincide con reportes previos en los que entre el 50 y 85% de los embriones que no eclosionan tuvieron alguna malposición (27).

El incremento de malposiciones está relacionado con fallas en el volteo del huevo, temperatura anormal durante la incubación, genética, e incluso con presencia de contaminantes ambientales (27), lo que hace pensar que la malposición no siempre es la causa primaria de muerte, sino también puede ser secundaria a condiciones ambientales desfavorables o a otros factores letales (1).

Las malformaciones observadas en el embriodiagnóstico podrían ser un reflejo de alteraciones genéticas de baja letalidad, que permiten el desarrollo del embrión hasta estadios más avanzados en la incubación. Sin embargo, es un error garantizar que los embriones con alguna malformación están relacionados con anomalías genéticas, ya que se sabe que en mayor proporción se relacionan con condiciones adversas de incubación como temperatura anormal, exceso o restricción de O₂ y excesivas cantidades de CO₂ (1). Aun así, el porcentaje de embriones con anomalías estructurales (como anoftalmia, exencefalia o alteración en las extremidades) fue 0.54%, valor que podría considerarse muy bajo como para atribuirse a condiciones de manejo anormales. De ser así, podría esperarse un mayor número de embriones afectados, lo cual no concuerda con los hallazgos del presente estudio y permite considerar que hay una relación entre las malformaciones y el factor genético.

Por otro lado, las malformaciones están ligadas íntimamente con la MET. En un estudio se reportaron defectos en el corazón, la cabeza, los ojos, el tórax, entre otros órganos vitales de embriones que murieron en estadio de anillo de sangre con embrión visible. Fue evidente que los embriones de estirpes de pollo de engorde presentaron una mayor cantidad de anomalías estructurales comparadas con los de estirpes de ponedora comercial (10). Sin embargo, esta característica no fue observada en esta investigación, ya que sólo se realizó inspección visual y en estadios de desarrollo temprano no siempre es factible observar en detalle estas anomalías.

En conclusión, definir el comportamiento de la ME, permite tener una base para medir el comportamiento de un parámetro clave en incubación y ejercer control ante la evidencia de cambios anormales y condiciones adversas que puedan alterar cada una de las etapas de desarrollo

parameter regarding incubation and to perform control before the evidence of abnormal changes and adverse conditions that may alter each and every one of the development stages of the embryo, and that are subject to change facing corrective implementation measures.

Although this study was performed under industrial incubation conditions, the EM biphasic behaviour was evidenced as described in the literature, but minor variations were found regarding the specific day of EM occurrence from the two peaks of mortality. Hence, it is clear that particular incubation conditions of any industrial company, may alter EM occurrence, but the biological mechanisms tendency inherent to the chick embryo are conserved.

del embrión, y que además, estén sujetas a modificación ante la implementación de medidas correctivas.

Aunque este estudio se realizó en condiciones de incubación industrial, se pudo evidenciar el comportamiento bifásico de la ME descrito en la literatura, aunque se encontraron variaciones leves en cuanto al día específico de ocurrencia de los dos picos de mortalidad. Lo que pone en evidencia que existen condiciones de incubación propias de cada empresa que pueden alterar el comportamiento de la curva de mortalidad, aunque se conserve una tendencia propia de los mecanismos biológicos inherentes al embrión de pollo.

REFERENCES

- Romanoff AL. Critical periods and causes of death in avian embryonic development. *The Auk* 1949; 66(3):264–270.
- Jassim EW, Grossman M, Koops WJ, Luyckx RAJ. Multiphasic analysis of embryonic mortality in chickens. *Poult Sci* 1996; 75(4):464–471.
- Liptói K, Hidas A. Investigation of possible genetic background of early embryonic mortality in poultry. *Worlds Poult Sci J* 2006; 62(2):326–337.
- Yassin H, Velthuis AGJ, Boerjan M, van Riel J, Huirne RBM. Field study on broiler eggs hatchability. *Poult Sci* 2008; 87(11):2408–2417.
- Ulmer-Franco AM, Fasenko GM, O’Dea Christopher EE. Hatching egg characteristics, chick quality, and broiler performance at 2 breeder flock ages and from 3 egg weights. *Poult Sci* 2010; 89(12):2735–2742.
- Yahav S, Brake J. Chick embryogenesis: a unique platform to study the effects of environmental factors on embryo development. *J Stem Cells* 2014; 9(1):17–37.
- Hamburger V, Hamilton H. Appendix II: Normal table of Hamburger and Hamilton (1951; 1992). In: Bellairs R, Osmond M (eds.). *Atlas of Chick Development*. 3th edition. United Kingdom: Elsevier Academic Press, 2014; 603-621.
- Payne LF. Distribution of mortality during the period of incubation. *Poult Sci* 1919; 52-6(2):9–12.
- Kuurman W, Bailey B, Koops W, Grossman M. A model for failure of a chicken embryo to survive incubation. *Poult Sci* 2003; 82(2):214–222.
- Scott TA, Mackenzie CJ. Incidence and classification of early embryonic mortality in broiler breeder chickens. *Br Poult Sci* 1993; 34(3):459–470.
- Bellairs R, Osmond M. Endocrine glands. In: Bellairs R, Osmond M (eds.). *Atlas of Chick Development*. 3th edition. United Kingdom: Elsevier Academic Press, 2014; 111-113.
- Elibol O, Brake J. Effect of flock age, cessation of egg turning, and turning frequency through the second week of incubation on hatchability of broiler hatching eggs. *Poult Sci* 2006; 85(8):1498–1501.
- Lourens A, Molenaar R, van den Brand H, Heetkamp MJW, Meijerhof R, Kemp B. Effect of egg size on heat production and the transition of energy from egg to hatchling. *Poult Sci* 2006; 85(4):770–776.
- Fasenko GM. Egg storage and the embryo. *Poult Sci* 2007; 86(5):1020–1024.
- Khabisi MM, Salahi A, Mousavi SN. The influence of egg shell crack types on hatchability and chick quality. *Turk J Vet Anim Sci* 2012; 36(3):289-295.

16. Almeida J, Vieira S, Reis R, Berres J, Barros R, Ferreira A, et al. Hatching distribution and embryo mortality of eggs laid by broiler breeders of different ages. *Rev Bras Cienc Avic* 2008; 10(2):89–96.
17. Solomon SE. The eggshell: strength, structure and function. *Br Poult Sci* 2010; 51(sup1):52–59.
18. Gualhanone A, Furlan R, Fernandez-Alarcon M, Macari M. Effect of breeder age on eggshell thickness, surface temperature, hatchability and chick weigh. *Rev Bras Cienc Avic* 2012; 14(1):09–14.
19. McDaniel GR, Roland DA, Coleman MA. The effect of egg shell quality on hatchability and embryonic mortality. *Poult Sci* 1979; 58(1):10–13.
20. El-Hanoun AM, Rizk RE, Shahein EHA, Hassan NS, Brake J, T. BD, et al. Effect of incubation humidity and flock age on hatchability traits and posthatch growth in Pekin ducks. *Poult Sci* 2012; 91(9):2390–2397.
21. Schmidt G, Figueiredo E, Saatkamp M, Bomm E. Effect of storage period and egg weight on embryo development and incubation results. *Rev Bras Cienc Avic* 2009; 11(1):1–5.
22. Mortola JP, Al Awam K. Growth of the chicken embryo: Implications of egg size. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol* 2010; 156(4):373–379.
23. Elibol O, Brake J. Effect of egg weight and position relative to incubator fan on broiler hatchability and chick quality. *Poult Sci* 2008; 87(9):1913–1918.
24. Gabrielli MG, Accili D. The chick chorioallantoic membrane: a model of molecular, structural, and functional adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010. DOI: 10.1155/2010/940741
25. Reijrink IAM, Meijerhof R, Kemp B, Van Den Brand H, Arora KL, Kosin IL, et al. The chicken embryo and its micro environment during egg storage and early incubation. *Worlds Poult Sci J* 2008; 64(04):581–598.
26. Zakaria AH, Plumstead PW, Romero-Sanchez H, Leksrisompong N, Brake J, A. FN, et al. The effects of oviposition time on egg weight loss during storage and incubation, fertility, and hatchability of broiler hatching eggs. *Poult Sci* 2009; 88(12):2712–2717.
27. Herring G, Ackerman JT, Eagles-Smith CA. Embryo malposition as a potential mechanism for mercury-induced hatching failure in bird eggs. *Environ Toxicol Chem* 2010; 29(8):1788–1794.