



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (MODALIDAD DIRECTA)

TESIS

**“COMPARACIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL
SISTEMA CIRCULATORIO *EX OVO* E *IN OVO* DE *Gallus gallus
domesticus*”**

PRESENTA

Osvaldo Macías Marín

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUTORES

Dra. Alma Lilian Guerrero Barrera

Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores

INTEGRANTE DEL COMITÉ TUTORAL

Dr. Teódulo Quezada Tristán

Aguascalientes, Aguascalientes, 16 junio 2025

CARTA DE VOTO APROBATORIO
COMITÉ TUTORAL

M. en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

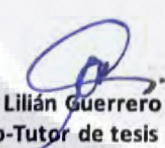
PRESENTE

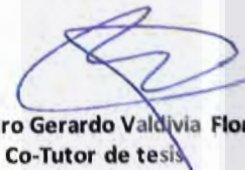
Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **OSVALDO MACÍAS MARÍN** con ID 148856 quien realizó la tesis titulada **COMPARACIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL SISTEMA CIRCULATORIO EX OVO E IN OVO DE *Gallus gallus domesticus***, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

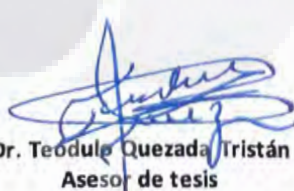
Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 29 de noviembre de 2024.


Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera
Co-Tutor de tesis


Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores
Co-Tutor de tesis


Dr. Teodilo Quezada Tristán
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado

c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-16
Actualización: 00
Emisión: 17/05/19



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 16 de junio de 2025

NOMBRE: Osvaldo Macías Marín ID 148856

PROGRAMA: Doctorado en Ciencias Biológicas, Modalidad Directa LGAC (del posgrado): Toxicología y Bioingeniería Ambiental

TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis () Trabajo Práctico

TÍTULO: Comparación del desarrollo embrionario del sistema circulatorio *ex ovo* e *in ovo* de *Gallus domesticus*

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

El estudio de la incubación *ex-ovo* de *Gallus domesticus* permite establecer modelos experimentales para realizar estudios del desarrollo embrionario aplicables al ser humano, donde se puede estudiar el efecto de teratógenos. Además permite el rescate de especies aviares en peligro de extinción.

INDICAR SI NO N.A. (NO APLICA) SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:	
SI	El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI	La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI	Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI	Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI	Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI	El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI	Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
NO	Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
SI	Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
El egresado cumple con lo siguiente:	
SI	Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI	Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI	Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
N.A.	Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI	Coincide con el título y objetivo registrado
SI	Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI	Tiene el CVU del Conacyt actualizado
SI	Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
En caso de Tesis por artículos científicos publicados	
SI	Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
SI	El estudiante es el primer autor
SI	El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
SI	En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
SI	Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
SI	La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado:

Si X

No

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

Dr. Edgar Eduardo Hernández Cuéllar

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

Dr. Gilberto Alejandro Ocampo Acosta

* En caso de conflicto de Intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

Dr. Alejandro Padilla Díaz

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

Elaborado por: D. Apoyo al Posg.
Revisado por: D. Control Escolar/D. Gestión de Calidad.
Aprobado por: D. Control Escolar/ D. Apoyo al Posg.

Código: DO-SE-FO-15
Actualización: 01
Emisión: 28/04/20

Cartas de aceptación de los artículos

Carta de aceptación del 1º artículo: Study of ex-ovo Embryonic Development of *Gallus gallus domesticus*

De: MARIANO GUILLERMO ARMANDO DEL SOL CALDERON <mariano.delsol@ufrontera.cl>
Enviado: sábado, 13 de agosto de 2022 09:16 p. m.
Para: ALMA LILIAN GUERRERO BARRERA <lilian.guerrero@edu.uaa.mx>
Asunto: IJM 416-22

Dear Dr. Alma Guerrero

I am very pleased to inform you that the paper: "Study of Ex-ovo embryonic development of *Gallus gallus domesticus*", has been accepted by the Scientific Board for publication in *International Journal of Morphology*.

Your article will be published in issue 5, volume 40, 2022.

Very truly yours

Dr. Mariano del Sol
Editor
Int. J. Morphol.



La información contenida en este correo electrónico y cualquier anexo o respuesta relacionada puede contener datos e información confidencial y no puede ser usada o difundida por personas distintas a su(s) destinatario(s). Si usted no es el destinatario de esta comunicación, le informamos que cualquier divulgación, distribución o copia de esta información constituye un delito conforme a la ley chilena. Si lo ha recibido por error, por favor borre el mensaje y todos sus anexos y notifique al remitente.

Las opiniones vertidas en este correo, no contenidas en un documento oficial de la Universidad, son responsabilidad de quien las emite o de quien solicitó su envío, en el ejercicio de su libertad de opinión y de expresión

Carta de aceptación del 2º artículo: Development of external morphological malformations induced by hyperthermia exposure during the blastula stage in an ex-ovo (shell-less) culture of *Gallus gallus domesticus* embryos

26/5/25, 10:58 a.m. [View Letter](#)

Date: May 25, 2025
To: "Alma Lilian Guerrero Barrera" lilian.guerrero@edu.uaa.mx
cc: wkkim@uga.edu
From: "Poultry Science" david.busboom@poultryscience.org
Subject: Decision on submission to Poultry Science

Manuscript Number: PSJ-D-25-00746R1

Development of malformations induced by hyperthermia exposure during the blastula stage in an ex-ovo (shell-less) culture of *Gallus gallus domesticus* embryos

Dear Dr. Guerrero Barrera,

Thank you for submitting your manuscript to Poultry Science.

I am pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication.

My comments, and any reviewer comments, are below.

Your accepted manuscript will now be transferred to our production department. Within the next few weeks you will receive a proof that you will be asked to review, and you will also be asked to complete a number of online forms required for publication. If we need additional information from you during the production process, we will contact you directly.

The 2022 impact factor of Poultry Science is : 4.4, 2022 Journal Citation Reports (Clarivate Analytics, 2023). If you are available to continue to work with the journal as reviewer, we invite you to go to the website <https://www.editorialmanager.com/psj/default.aspx>, click on « change details » and « available as a reviewer », and choose your specialty. The editorial board thanks you in advance.

We appreciate and value your contribution to Poultry Science. We look forward to your continued participation in our journal, and we hope you will consider us again for future submissions.

Kind regards,
Mike Kogut
Editor-in-Chief
Poultry Science



OF. No. CEADI-UAA-09-2022

A quien corresponda

Por este conducto me permito informar que el proyecto titulado “**Desarrollo Embrionario ex-ovo de *Gallus gallus domesticus*, un estudio comparativo**” a cargo del estudiante Macías Marín Osvaldo inscrito en el Doctorado en Ciencias Biológicas del Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, fue evaluado y aprobado, ya que cumple con los requisitos establecidos en la Normatividad Universitaria en términos del Reglamento de Ética para el Uso de los Animales en la Docencia e Investigación de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (CEADI-UAA).

Se extiende la presente en Aguascalientes Ags., a 9 de mayo de 2022

Atentamente “*Se Lumen Proferre*”

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Teódulo Quezada Tristán'.

Dr. Teódulo Quezada Tristán

Presidente del Comité de Ética para el uso de Animales en la docencia e Investigación en la Universidad Autónoma de Aguascalientes (CEADI-UAA).

c.c.p. Expediente

Agradecimientos

Agradezco a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (Secihti) por el apoyo de la Beca Nacional Posgrados (1092436), durante el transcurso del Doctorado.

Agradezco a la Universidad Autónoma de Aguascalientes y al Doctorado en Ciencias Biológicas por los recursos de apoyo económico durante el doctorado y la asesoría académica, al igual por su confianza en permitirme continuar con mis estudios.

Agradezco a mi comité tutorial: Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera, Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores y Dr. Teodulo Quezada Tristan. Por su apoyo académico y como guías para poder realizar y llevar a cabo el proyecto, además por también apoyarme en las situaciones adversas y darme lecciones de vida.

Agradezco a los integrantes del laboratorio de Biología Celular y Tisular y Laboratorio de Preparación de Material Histología y Embriología: Adriana, Fabiola, Flor, Eduardo, Magdalena, Ingrid, Daniela, Leslie, Paloma y Sonia, por todo su apoyo para poder realizar el proyecto de investigación y hacer del laboratorio un segundo hogar.

Agradezco al Laboratorio de Estudios Ambientales, Laboratorio de Control de Calidad y el Laboratorio de Suelos de la posta zootécnica de la UAA, por su apoyo para realizar pruebas fuera del laboratorio.

Agradezco a la empresa Aves libres de patógenos específicos por su apoyo para proveer los huevos esenciales para los experimentos.

Agradezco a mi familia: a mi mamá, mi papá, mi hermana, mi gato, mis tías y mi primo, por darme tanto apoyo y amor a lo largo de mi vida, no tengo palabras para poder expresar lo mucho que me importan.

Agradezco a mis amigas: Daniela, Cristina y Karen, por hacer los últimos 10 años de mi vida, unos de los mejores.

Finalmente agradezco al lector, por su tiempo en ver este documento, espero sea interesante y pueda ayudar en tu investigación.

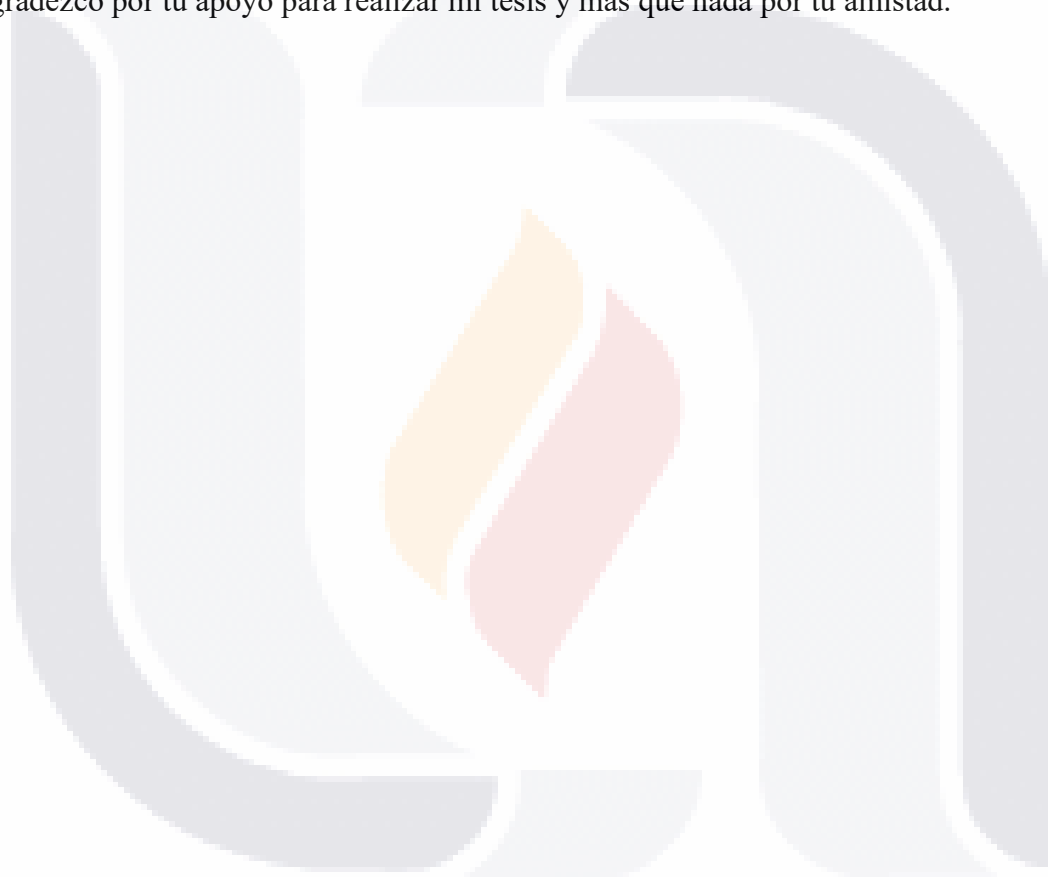
Aquí se plasman 4 años de mi vida.

Dedicatorias

El presente trabajo está dedicado a mi familia, por todo el apoyo y amor que me han dado a lo largo de mi vida, a mi mamá Rosaura, a mi papá Agustín, a mi hermana Gabriela y al pequeño Denis, por ser mi mundo.

El trabajo fue una gran labor de equipo tanto académico como personal, por lo que está dedicado a todos ustedes.

Finalmente, este trabajo es en memoria de mi amiga Adriana Daniela Rodriguez Padilla, te agradezco por tu apoyo para realizar mi tesis y más que nada por tu amistad.



Índice General

1. Acrónimos	4
2. Resumen	5
3. Abstract	5
4. Introducción	6
4.1. Antecedentes	7
4.2. Justificación	9
4.3. Hipótesis	9
4.4. Objetivos	9
5. Capítulo I	10
5.1. Métodos	10
5.1.1. Análisis del contenido de minerales en el cascarón de huevo	10
5.1.2. Análisis comparativo de minerales en cascarón	10
5.1.3. Obtención de los huevos	10
5.1.4. Preparación del recipiente de incubación	11
5.1.5. Montaje de los embriones en el sistema de incubación	12
5.1.6. Análisis de datos	13
5.1.7. Pruebas de incubación ex ovo e in ovo	14
5.1.8. Prueba de incubación con suplementación temprana y tardía de minerales	14
5.1.9. Prueba del desarrollo embrionario ex ovo sin pre-incubación y con rotación manual de 180°	14
5.1.10. Prueba del desarrollo embrionario ex ovo sin pre-incubación y con rotación automatizada	14
5.1.11. Prueba del desarrollo embrionario ex ovo sin pre-incubación y con volteo-pipeteo	15
5.1.12. Comparación de la frecuencia cardíaca ex ovo e in ovo	16
5.1.13. Eutanasia	17
5.1.14. Fijación de los tejidos y tinción histológica	19
5.2. Resultados	19
5.2.1. Cuantificación de los elementos presentes en el cascarón	19
5.2.2. Incubación ex ovo de <i>Gallus gallus domesticus</i>	20
5.2.3. Prueba de incubación ex ovo con suplementación temprana de Ca ²⁺ (48 H) vs tardía (9 días)	21
5.2.4. Incubación ex ovo de <i>Gallus gallus domesticus</i> sin pre-incubación y con rotación 180°	22
5.2.5. Pruebas del desarrollo embrionario ex ovo sin pre-incubación y con Agitación automatizada	23
5.2.6. Pruebas del desarrollo embrionario ex ovo sin pre-incubación con Volteo-pipeteo	23

5.2.7. Comparación morfológica de los embriones.....	25
5.2.8. Comparación histológica del desarrollo embrionario ex ovo de <i>Gallus gallus domesticus</i>	28
5.2.9. Comparación de la frecuencia cardíaca de los embriones ex ovo.....	28
5.3. Discusión.....	29
5.4. Conclusiones.....	31
5.5. Glosario.....	33
5.6. Referencias.....	36
6. Capítulo II.....	40
6.1. Artículo: Study of <i>ex-ovo</i> Embryonic Development of <i>Gallus gallus domesticus</i>	41
6.1.1. Introducción	41
6.1.2. Palabras clave.....	41
6.1.3. Materiales y Métodos	42
6.1.4. Resultados	44
6.1.5. Discusión.....	45
6.1.6. Conclusión	46
6.1.7. Referencias.....	47
7. Capítulo III	48
7.1. Artículo: Development of external morphological malformations induced by hyperthermia exposure during the blastula stage in an ex-ovo (shell-less) culture of <i>Gallus gallus domesticus</i> embryos.....	49
7.1.1. Introducción	49
7.1.2. Palabras clave.....	49
7.1.3. Materiales y Métodos	50
7.1.4. Resultados	51
7.1.5. Discusión.....	52
7.1.6. Conclusión	58

7.1.7. Referencias.....	58
-------------------------	----

Índice de Gráficas y Figuras

1. Figura 1. Esquema del recipiente de incubación	11
2. Figura 2. Preparación del recipiente de incubación <i>ex ovo</i>	12
3. Figura 3. Diagrama del recipiente <i>ex ovo</i> con embrión.....	13
4. Figura 4. Diagrama del protocolo de rotación manual.....	14
5. Figura 5. Diagrama del protocolo de agitación automatizada	15
6. Figura 6. Diagrama del protocolo de rotación-pipeteo	16
7. Figura 7. Sistema de registro de la frecuencia cardíaca.....	17
8. Figura 8. Protocolo de eutanasia para embriones	18
9. Figura 9. Protocolo de eutanasia para fetos	18
10.Figura 10. Diagrama del procesamiento histológico	19
11.Figura 11. Incubación de embriones <i>ex ovo</i>	21
12. Figura 12. Gráfica de supervivencia de embriones <i>ex ovo</i> tras la suplementación de minerales.....	22
13.Figura 13. Incubación de embriones con rotación manual 180°.....	22
14.Figura 14. Incubación de embriones con rotación automatizada	23
15.Figura 15. Incubación de embriones con volteo-pipeteo	24
16. Figura 16. Gráfica de comparación del tiempo de desarrollo alcanzado en los 3 métodos de rotación de los embriones	25
17. Figura 17. Comparación morfológica de embriones de 12 y 21 días del organismo completo y del corazón.....	26
18. Figura 18. Gráfica de comparación del peso relativo del corazón en los diferentes días de incubación.....	26
19. Figura 19. Gráfica de comparación del largo del corazón en los	

diferentes días de incubación	27
20. Figura 20. Gráfica de comparación del ancho del corazón en los	
diferentes días de incubación	27
21. Figura 21. Comparación histológica del corazón <i>ex ovo</i> e <i>in ovo</i>	28
22. Figura 22. Gráfica de la comparación de la frecuencia cardíaca en	
organismos incubados de forma <i>ex ovo</i> e <i>in ovo</i>	29

Índice de Tablas

1. Tabla I. Análisis del contenido de minerales en el cascarón de huevo...	19
2. Tabla II. Análisis del contenido de minerales tras el nacimiento	20

1. Acrónimos

°C	Grados Celsius
μL	Microlitros
Ca ²⁺	Calcio
CaCO ₃	Carbonato de calcio
C ₆ H ₁₀ CaO ₆	Lactato de calcio
CO ₂	Dióxido de carbono
FC	Frecuencia cardíaca
g	Gramos
H/E	Hematoxilina y Eosina
H ₂ O	Agua
h	Hora
LPM	Latidos por minuto
mg	Miligramos
mL	Mililitros
O ₂	Oxígeno
P	Fosforo
PET	Tereftalato de Polietileno
PMP	Polimetil penteno
RPM	Revoluciones por minuto
UV	Ultravioleta

2. Resumen

El pollo doméstico (*Gallus gallus domesticus*) es una especie empleada como modelo en la ciencia. La reproducción de la especie es a través de la ovoposición de un huevo fertilizado, el cual en un periodo de 21 días desarrollará un polluelo. El sistema circulatorio es uno de los primeros sistemas que se forman durante la incubación (2° día), llevando a cabo funciones esenciales para el correcto desarrollo del organismo. Existen varios métodos descritos para desarrollar los embriones *ex ovo*, lo que permite la observación del proceso, su manipulación, para una mejor comprensión de las etapas en las que ocurre. Se ha descrito un método para poder llevar a cabo el desarrollo embrionario *ex ovo* de *Gallus gallus domesticus* con una tasa de éxito de incubación de aproximadamente el 50%. Sin embargo, el desarrollo *ex ovo* del embrión del pollo requiere de más estudios para poder comprender los efectos que tiene sobre el organismo en desarrollo. Por lo anterior en la presente tesis se realizó el seguimiento de la incubación *ex ovo* e *in ovo* del desarrollo del sistema circulatorio, evaluando la morfología fisiología e histología del corazón de los polluelos en desarrollo. Se cuantificaron los elementos presentes en el cascarón del huevo, los cuales son esenciales para el correcto desarrollo de los embriones. De esta forma se logró el desarrollo embrionario de los polluelos hasta el día 21, determinando la importancia de los minerales y el oxígeno para este desarrollo. Se observó que el desarrollo del corazón en los embriones incubados *ex ovo* no mostró diferencias significativas con los controles en los primeros 16 días del desarrollo. Respecto a parámetros como morfología, dimensiones y masa, se encontraron diferencias a partir del día 17 como un menor desarrollo que en los controles, información esencial para continuar la estandarización del protocolo de incubación *ex ovo*.

Palabras clave: *Gallus gallus domesticus*; Desarrollo embrionario; *Ex ovo*; Corazón; Histología

3. Abstract

The domestic chicken (*Gallus gallus domesticus*) is a species used as a model in science. The reproduction of the species is through the oviposition of a fertilized egg, which in a period of 21 days will develop into a chick. The circulatory system is one of the first systems to form during incubation (2nd day), conducting essential functions for the proper development of the organism. Several methods have been described to develop embryos *ex ovo*, allowing observation of the process, its manipulation, for a better understanding of the stages in which it occurs. A method has been described to allow the *ex ovo* embryonic development of *Gallus gallus domesticus* with an incubation success rate of approximately 50%. However, the *ex ovo* development of the chicken embryo requires more studies to understand the effects it has on the developing organism. Therefore, in this thesis, the incubation *ex ovo* and *in ovo* of the development of the circulatory system was monitored, evaluating the morphology, physiology, and histology of the heart of the developing chicks. The elements present in the eggshell, which are essential for the proper development of the embryos, were quantified. In this way, embryonic development of the chicks was achieved until day 21, determining the importance of minerals and oxygen for this development. It was observed that the development of the heart in embryos incubated *ex ovo* did not show significant differences with the controls in the first 16 days of development, regarding parameters such as

morphology, dimensions, and mass, showing differences from day 17 indicating less development than in the controls, providing essential information to continue standardizing the protocol.

Keywords: *Gallus gallus domesticus*; Embryonic development; Ex ovo; Heart; Histology

4. Introducción

El pollo doméstico (*Gallus gallus domesticus*) es una especie de ave perteneciente al orden Galliformes, cuyas características fisiológicas y morfológicas son comunes al grupo: vertebrados, amniotas, endotermos, presencia de plumas, extremidades modificadas en alas y desarrollo embrionario dentro de un huevo (Cawthray y Hermes, 2015).

La reproducción es el proceso por medio del cual se originan nuevos individuos a través de la unión de los gametos masculino y femenino de la especie que da origen al nuevo ser. Las células reproductoras o germinales se generan en el aparato reproductor que tiene como función, no sólo producir gametos sino segregar y distribuir algunas de las hormonas que estimulan el desarrollo de las características morfológicas de cada sexo (Vaca, 2014).

El cascarón provee de Ca^{2+} , Mg^{2+} y P^{3-} al embrión en desarrollo, esencial para la ganancia de peso, desarrollo muscular y esquelético. La cáscara de huevo se constituye por 1.6% de agua, 95.1 % de minerales, de los cuales el 93.6% corresponden a carbonato de calcio en forma de calcita, 0.8% de carbonato de magnesio, 0.73% de fosfato tricálcico, y finalmente 3.3% de materia orgánica (Fernández y Arias, 2000).

Respecto al contenido en miligramos de los minerales, el cascarón de huevo de pollo tiene un alto contenido de calcio: $381 \pm 89 \text{ mg Ca}^{2+} / \text{g}$ de cascarón, $4 \text{ mg Mg}^{2+} / \text{g}$ de cascarón y 1.05 mg P/g de cascarón (Brun *et al.*, 2013; Schaafsma *et al.*, 2000).

Todos los organismos que nacen de un huevo fecundado atraviesan por varias fases de desarrollo embrionario, que difiere según la especie, aunque el orden cronológico es igual: primero la fase de división del cigoto o segmentación, fase de la mórula, seguida de la fase de blástula, continuando con el movimiento de las capas celulares hasta formar las capas germinales o gastrulación, seguida de la neurulación que origina el sistema nervioso (Alfonso, 1968), el que continuará con la organogénesis. El desarrollo embrionario de las aves comienza en el oviducto, posterior a la fecundación, donde se originan las primeras segmentaciones celulares en el momento de la formación del cigoto (Sauveur y Reviers, 1992).

Al momento que el huevo fértil es puesto, el embrión está formado por miles de células posicionadas sobre la superficie de la yema; si el huevo es sometido de inmediato a las condiciones de incubación, el proceso de desarrollo continúa sin interrupción y en un periodo de 21 días nacerá el polluelo, cuyo periodo total de desarrollo es de 22 días, este desarrollo ocurre un día dentro del cuerpo del ave y 21 días en el proceso de la incubación dentro del huevo. Para estudiar las diferentes etapas del desarrollo embrionario, éste puede seguirse de forma natural dentro del huevo (*in ovo*) o pueden implementarse modos de observación de este desarrollo a través de una ventana o mediante un seguimiento totalmente fuera del cascarón (*ex ovo*); en caso de que el embrión no se encuentre en las condiciones adecuadas de incubación, se debilitará gradualmente hasta morir (Vaca, 2014).

Antes del desarrollo del sistema nervioso en el embrión, en el día 2.5, a las 48 h del desarrollo el

corazón y vasos sanguíneos se desarrollan y comienzan a funcionar, al final de las 48 h, la cabeza empieza a tomar forma, el corazón es el primer órgano que se forma y empieza a funcionar durante el desarrollo, debido a la importancia que tiene por su función en el proceso de bombeo de sangre, para realizar el intercambio de gases, transporte de nutrientes, termorregulación y transporte de desechos (Tyser *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2023).

Para el cuarto día todos los órganos están presentes, en el quinto día se desarrollan las estructuras sexuales externas, para el treceavo día el esqueleto comienza a calcificarse usando el calcio del cascarón. En el vigésimo primer día, el polluelo está completamente desarrollado y comienza a romper el cascarón. Desde el momento en que el huevo es puesto hasta la eclosión, el polluelo se alimenta del material nutritivo almacenado dentro del huevo (vitelo), el cual penetra en el cuerpo del polluelo a través del cordón umbilical, a diferencia de los mamíferos que se alimentan por aporte sanguíneo de la madre a través del desarrollo de la placenta (North y Bell, 1990).

Los embriones de aves han sido usados a través del tiempo como un eficiente modelo biológico para los estudios genéticos y del desarrollo embrionario en vertebrados, debido a su fácil acceso, disponibilidad y un relativo precio bajo, en particular *G. gallus domesticus*, es la especie más usada debido a su tamaño y accesibilidad (Sequera *et al.*, 2003). En el caso del corazón su morfología comparte características morfológicas que lo equiparan con el corazón de los mamíferos: presentando 4 cavidades (2 aurículas y 2 ventrículos) y de igual forma durante el proceso de la organogénesis los procesos celulares y moleculares son homólogos por lo que es un modelo importante para el estudio de la migración celular y diferenciación (Wittig y Münsterberg, 2016).

El desarrollo embrionario *ex ovo* consiste en la extracción del embrión del cascarón el cual se coloca en un medio que le provee las condiciones necesarias para su desarrollo, facilitando su observación y manipulación (Kamihira *et al.*, 2005; Tahara *et al.*, 2014; Macias-Marien *et al.*, 2023). El método de desarrollo *ex ovo* denominado "pollitos en vaso", permite la observación continua de embriones de ave vivos desde el día 3 hasta el 21 de incubación, mediante este método se puede estudiar la diferenciación de estructuras extraembrionarias, órganos, sistemas y aparatos, así como el comportamiento pre-eclosión (Fisher, 1993).

4.1. Antecedentes

El desarrollo embrionario de *G. gallus domesticus in vitro* ha permitido la extracción de embriones en diferentes etapas del desarrollo para poder estudiarlos histológicamente (Gilbert, 2010). Sin embargo, esta forma de estudiar el desarrollo embrionario no permite la observación directa del mismo. Por lo anterior se ha implementado la apertura de una ventana en el cascarón de los huevos en desarrollo para poder facilitar la observación del desarrollo de los organismos, así como la introducción de genes y otras manipulaciones experimentales (Andacht *et al.*, 2004). Los modelos de desarrollo embrionario *ex ovo* requieren del uso de albumen y vitelo del huevo son de por su aporte nutricional para el desarrollo de dichos organismos (Kharayat *et al.*, 2016).

Perry (1988), reportó un método de cultivo para embriones de ave usando un cascarón sustituto como un recipiente de incubación para el cultivo *ex ovo* del huevo fertilizado en el estadio de una sola célula, el cual fue tomado del oviducto materno. Este método está compuesto por tres sistemas: sistema I para embriones del estadio de una célula hasta la etapa de blastodermo, sistema II para embriones posteriores a la fase del blastodermo hasta el tercer día y el sistema III para embriones del día tres hasta la eclosión. El embrión era desarrollado en cada uno de los sistemas y se luego era

transferido de un recipiente a otro, en el sistema III se empleaba un cascarón de gallina. Sin embargo, con este método el éxito de la incubación fue de aproximadamente 7%.

Otra alternativa para realizar este tipo de estudios se realiza *in vitro*, es decir, el huevo fertilizado es extraído del cascarón e incubado en un medio estéril, en un vaso plástico, a 37.5 °C, para poder así seguir el desarrollo embrionario hasta obtener un animal completo para poder observar en tiempo real ese desarrollo hasta obtener un polluelo (Tahara y Obara, 2014).

En los estudios realizados por Boone (1963), se montaron embriones en vasos de precipitados de 50 y 100 mL y se examinaron los materiales que produjeran un mejor desarrollo de los organismos. Se encontró que es mejor usar recipientes de 100 mL sobre los de 50 mL, pues permiten un mejor desarrollo. Usando plástico film para envolver alimentos se evitó la pérdida de humedad y permitió una alta tasa de intercambio de gases. En estos sistemas el desarrollo embrionario obtenido fue de 8 días.

Dunn (1973), describe una técnica en la cual el contenido del huevo de ave se remueve del cascarón después de 72 h de incubación normal, lo cual permite hasta 15 días de desarrollo embrionario. El huevo se suspende con la ayuda de una envoltura de plástico sobre un recipiente que consiste en un vaso plástico con una solución acuosa para poder mantener la humedad del embrión, mientras que otra envoltura de plástico evitará la desecación del embrión.

Kamihira *et al.* (1998) reportan un método de cultivo sin cascarón en embriones de codorniz usando un recipiente artificial hecho de una membrana de politetrafluoroetileno permeable a gases. Y reportan una eclosión del 43% al suplementar lactato de calcio en el medio. La suplementación de calcio a los embriones desarrollados *in vitro* fue esencial para su desarrollo, porque en el desarrollo normal *in vivo* el calcio es obtenido del cascarón (Kamihira *et al.*, 1998; Dunn, 1981).

La estandarización de un método para poder llevar a cabo el desarrollo *ex ovo* tiene gran importancia pues presenta beneficios para la docencia al permitir la observación de las distintas etapas que del desarrollo embrionario en vivo (Kamihira *et al.*, 1998; Tahara y Obara, 2014), así como la manipulación experimental y genética, y la obtención de animales transgénicos.

La mejor del desarrollo de embriones *in vitro*, requiere del uso de cascarones de huevo sustitutos provenientes de especies de aves más grandes que la especie que a desarrollar (Borwornpinyo y Brake, 2005). Sin embargo, Tahara y Obara (2014), observan las desventajas que tienen estos modelos, como la preparación de los cascarones, la incapacidad de reusarlos y problemas durante la manipulación del embrión.

Los autores Tahara y Obara (2014) y Tahara *et al.*, (2021), describen un método para el desarrollo embrionario de *Gallus gallus domesticus* con una tasa de éxito de incubación de aproximadamente el 57%, utilizando el método de incubación en vaso desechable, el cual es un método fácil, barato y reusable para sucesivos experimentos. Sin embargo, el método de incubación no permite realizar una incubación *ex ovo* desde el primer día, requiriendo de una pre-incubación dentro del huevo para permitir el desarrollo del organismo (Kamihira *et al.*, 1998).

En 2015 Jourdeuil *et al.*, describieron un estudio de comparación del método de incubación *ex ovo* para *Gallus gallus domesticus* con el método de incubación normal, para poder evaluar los efectos del desarrollo *ex ovo* sobre la morfología del pollo, la importancia del calcio en el desarrollo del sistema esquelético, a través de la morfología y la histología del tejido óseo. En estos estudios observaron que el desarrollo *ex ovo* presenta cambios en el desarrollo de los organismos, encontrando problemas de osificación debido a la falta de suplemento de calcio.

Sin embargo, hoy en día no hay más estudios enfocados en los efectos directos que tiene la incubación *ex ovo* sobre el desarrollo de los organismos tanto en su morfología y fisiología, es por ello que este trabajo de tesis se enfocó en poder identificar y describir los principales efectos que tiene la incubación *ex ovo* sobre el desarrollo de los embriones en particular sobre el desarrollo del sistema circulatorio y poder determinar la viabilidad del modelo.

4.2. Justificación

A lo largo del tiempo se han podido realizar distintos avances en el desarrollo de métodos que permitan un desarrollo *ex ovo* hasta el nacimiento del polluelo, sin embargo, actualmente no hay suficientes estudios que aborden los efectos que tiene esta incubación sobre el desarrollo de *Gallus gallus domesticus*, en particular no hay estudios que se enfoquen en el desarrollo del sistema circulatorio, únicamente utilizan el modelo para estudiar afectaciones en el desarrollo, pero no en lo que pueda ocasionar en el embrión.

4.3. Hipótesis

Los avances en técnicas de incubación de pollo *ex ovo*, han permitido el desarrollo embrionario de los organismos durante todo el proceso de desarrollo hasta el nacimiento del polluelo, sin embargo, dichas condiciones de incubación podrían provocar problemas en el organismo, especialmente en el desarrollo de los órganos y tejidos, en comparación de una incubación dentro del cascarón. Al llevar efectuar el desarrollo embrionario *ex ovo* de organismos de *Gallus gallus domesticus*, las limitaciones en la cantidad de Ca^{2+} ocasionarán cambios morfológicos e histológicos a los tejidos, órganos y sistemas del embrión, especialmente se podrán ver efectos en el corazón de los organismos, al compararse con organismos que se desarrollen de forma normal. Los embriones de *Gallus gallus domesticus* incubados de forma *ex ovo* desarrollarán afectaciones en el sistema circulatorio comparados con aquellos incubados de forma *in ovo*, al igual que presentarán un menor desarrollo.

4.4. Objetivos

Objetivo general:

- I. Comparar los efectos que tiene la incubación *ex ovo* sobre el desarrollo embrionario del sistema circulatorio respecto a la incubación *in ovo* de *Gallus gallus domesticus*.

Objetivos específicos:

- I. Determinar las condiciones físicas y químicas que permitan el desarrollo de los embriones de *Gallus gallus domesticus*.
- II. Evaluar los cambios morfológicos y tisulares del sistema circulatorio que presenta el embrión de pollo al incubarse de forma *ex ovo*.
- III. Describir y determinar los efectos del Ca^{2+} en la incubación *ex ovo* de *Gallus gallus domesticus* y su efecto en el desarrollo del sistema circulatorio.

- IV. Determinar el contenido de elementos Ca^{2+} , Mg^{2+} y P, en cascarones de huevo eclosionados de forma normal y aquellos que no estuvieran fertilizados.

5. Capítulo I

Comparación de la incubación embrionaria *ex ovo* e *in ovo*

5.1 Métodos

Se llevó a cabo el desarrollo *ex ovo* y se empleó como control el desarrollo *in ovo* de embriones de *Gallus gallus domesticus*, manipulándolos con el respeto y cuidado, apegándose a los protocolos establecidos por el comité de ética de la institución, se realizó el informe del proyecto para ser evaluado y aprobado por el CEADI-UAA, para poder determinar la viabilidad del proyecto y de igual forma recibir retroalimentación para poder trabajar de la mejor forma posible. El proyecto se evaluó y aprobó, permitiendo el poder continuar con las pruebas.

5.1.1 Análisis del contenido de minerales en el cascarón de huevo de pollo

Se evaluó la presencia de tres minerales en el cascarón: Ca^{2+} , Mg^{2+} y P. Para ello se maceró con un mortero el cascarón de huevo hasta obtener un polvo fino. Se utilizó el método de análisis de minerales descrito por Wright y Riner (1972), y los protocolos establecidos por la Norma Oficial Mexicana para la determinación de cenizas en alimentos (Nmx-f-066-s-1978, 1978). Posteriormente se procedió a calentar en una mufla el cascarón macerado durante 24 h a una temperatura de 700°C , hasta obtener una ceniza blanca que se solubilizó con 5 mL de ácido nítrico concentrado (HNO_3), en agitación constante hasta obtener una solución transparente, finalmente se aforó a 100 mL con agua destilada en un matraz volumétrico.

El Ca^{2+} y Mg^{2+} se analizaron mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica y para el caso del P se realizó mediante un método colorimétrico (Wright y Riner, 1972).

5.1.2 Análisis comparativo del contenido de minerales en cascarón de pollo posterior al nacimiento del polluelo

Para estimar el contenido de minerales consumido por los embriones en desarrollo. Se diseñó el estudio comparativo de los minerales contenidos en un cascarón de un huevo sin incubar y el cascarón obtenido después de desarrollar un polluelo *in vivo*.

El procedimiento se realizó como se describe anteriormente. Para determinar el contenido de minerales del cascarón después de obtener polluelos *in vivo*. Se incubaron 10 huevos fertilizados dentro de la incubadora Nurture Right 360, al finalizar la eclosión, se recolectaron los cascarones y se procesaron eliminando previamente las membranas adheridas al cascarón. Posteriormente los cascarones se maceraron y se procesaron a través de la técnica de Wright y Riner (1972).

5.1.3 Obtención de los huevos

Un total de 450 huevos fertilizados fueron obtenidos de la empresa “Aves Libres de Patógenos

Específicos, S.A. de C.V.’’, (‘ALPES II’’). Estos huevos fértiles tienen una tasa del 80% de fertilidad, así como ausencia de contaminantes y patógenos que pudieran comprometer el desarrollo correcto de los embriones. Posteriormente fueron incubados en la incubadora de ‘‘Nurture Right 360’’, con las condiciones de temperatura (37.5 °C) y humedad relativa (60%) adecuadas, durante 48h. La humedad se mantuvo con agua destilada. En caso de no usarse de inmediato los huevos fertilizados eran almacenados en un cuarto frío a una temperatura entre 15.6 y 18.3 °C, induciendo un estado de diapausa. Posteriormente la incubación fue reanudada al alcanzar una temperatura mayor a 24°C. Los huevos fertilizados pre-incubados 48 h fueron divididos en dos grupos. Grupo Control y Grupo Tratamiento *ex ovo*. El grupo control fue incubado en la incubadora ‘‘Nurture Right 360’’. Para el grupo tratamiento *ex ovo*, los huevos se extrajeron del cascarón y se transfirieron al dispositivo de incubación armado, para posteriormente ser incubados en una incubadora de CO2 Lab-line Modelo 315.

5.1.4 Preparación del recipiente de incubación

Los huevos fertilizados incubados 48h y extraídos fueron transferidos a un recipiente de incubación siguiendo el protocolo descrito por Tahara y Obara (2014), con modificaciones. Brevemente, se usó un vaso desechable de plástico PET de una capacidad de 355 mL (Figura 1), al cual se le formó una cámara cóncava en la cual residiría el embrión en desarrollo, dicha cámara se diseñó usando una membrana de polimetil penteno (película de plástico: FOR WRAP-RIKEN TECHNOS), la cual es permeable a los gases necesarios para un correcto intercambio de gases. En la parte inferior del vaso se colocó una solución compuesta por 39.95 mL de agua destilada y 5 µL de cloruro de benzalconio, la cual mantuvo la humedad dentro del recipiente evitando la desecación del embrión, además mantuvo estéril el aire presente dentro del recipiente. El dispositivo se selló con una tapa de caja de Petri estéril en la parte superior del recipiente, para posteriormente ser esterilizado en una cámara de luz UV (264 nm), puesto que el material usado para el sistema no puede soportar altas temperaturas. El dispositivo se esterilizó durante 1h (Figura 2).



Figura 1. Esquema del recipiente de desarrollo artificial: dimensiones y partes del recipiente de incubación.

5.1.5 Montaje de los embriones en el sistema de incubación

La extracción del embrión (Figura 3) después de 48 h de pre-incubación. La transferencia del embrión al dispositivo de incubación *ex ovo* se realizó en el cuarto de cultivo, dentro de una campana de flujo laminar (Lab Companion Model BC-11H) en presencia de la flama de un mechero de gas. Para armar los dispositivos de incubación, primero se colocó el suplemento de minerales dentro de cada uno de los vasos (en la cámara cóncava de la película plástica), y se agregó 1 mL de agua destilada estéril en la misma. Después, se extrajo el contenido del huevo. Antes de hacerlo cada huevo fue sanitizado con etanol al 70%, posteriormente, se procedió a romper el cascarón, a nivel de la parte ecuatorial del huevo con la ayuda de un micromotor, realizando un corte continuo alrededor del eje ecuatorial, evitando dañar el saco vitelino. Para separar el cascarón se aplicó presión ligera y se separó en dos partes, para extraer el contenido y transferirlo al dispositivo de incubación. Finalmente se realizaron varias perforaciones alrededor de la membrana de la cámara de incubación para permitir el flujo del aire entre ambos espacios (Figuras 3).

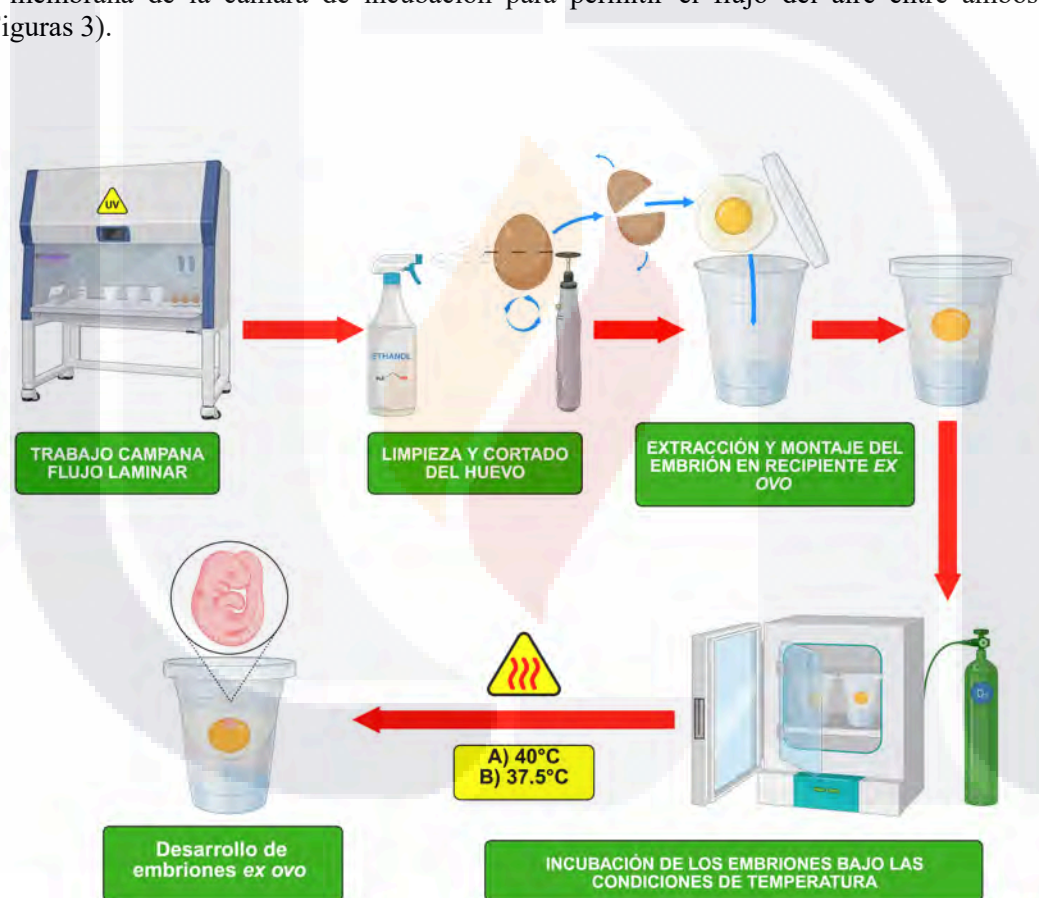


Figura 2. Proceso de preparación del recipiente de incubación *ex ovo* en una campana de flujo laminar, en un recipiente estéril con luz UV, extracción del embrión para su incubación en el recipiente e incubación en condiciones controladas.



Figura 3. Diagrama con la disposición espacial de los contenidos del recipiente de desarrollo artificial para el embrión (Macias-Marin *et al.*, 2025).

Una vez que se terminó de montar todo el sistema, se selló con la tapa de una caja de Petri para evitar contaminación. Finalmente, los recipientes de incubación artificial fueron colocados dentro de la incubadora para continuar con el desarrollo de los organismos. En los días siguientes se realizó la observación del desarrollo de los embriones y se hizo captura de video y fotografías del avance del desarrollo los organismos, de igual forma se registraron los cambios. Se dividieron los embriones en diferentes periodos de tiempo en los que se realizó el análisis comparativo de los organismos (*ex ovo* y control).

5.1.6 Análisis de los datos

El análisis de datos se realizó empleando el software GraphPad Prism 8, usando la prueba *t*, ANOVA, Prueba de Tukey y el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier para comparar los resultados obtenidos en el grupo control y el grupo experimental. Para la determinación del tiempo de desarrollo logrado para cada embrión, los tiempos fueron registrados para cada prueba y se empleó la descripción de las etapas del desarrollo del pollo realizada por Hamburger y Hamilton (1951), para determinar el estadio de desarrollo alcanzado. Se empleó el software ImageJ para determinar el tamaño de los corazones de los organismos, y se empleó una balanza analítica (P-124 Denver Instruments) para determinar el peso.

5.1.7 Pruebas de incubación *ex ovo* e *in ovo*.

5.1.8 Prueba de incubación *ex ovo* con suplementación temprana de minerales (48 h) vs tardía (9 días)

Se evaluó el tiempo preciso durante la incubación en la cual se debe suministrar el suplemento de los minerales en dos tiempos diferentes (n=100): 48 h (50 embriones) y 9 días (50 embriones), con la finalidad de evaluar el tiempo de supervivencia de los embriones mediante el uso de una gráfica de Kaplan-Meier.

5.1.9 Pruebas del desarrollo embrionario *ex ovo* sin pre-incubación y con rotación de 180°

Incubación de embriones (n=100) en el recipiente de incubación *ex ovo* sin realizar la pre-incubación de los huevos, dando una rotación de 180° (Figura 4), con la finalidad de determinar si las condiciones de incubación permiten el desarrollo desde los primeros estadios.



Figura 4. Diagrama del protocolo de rotación manual del recipiente de incubación.

5.1.10 Pruebas del desarrollo embrionario *ex ovo* con agitación y sin pre-incubación

Se realizó la incubación de embriones (n=100) en el recipiente de incubación *ex ovo* dentro de una incubadora con un agitador orbital (Lab Line L.E.D.) a una velocidad de 30 rpm (Figura 5) y sin realizar la pre-incubación de los huevos, con la finalidad de determinar si las condiciones de incubación permiten el desarrollo desde los primeros estadios.



Agitación automatizada (agitador orbital)

Figura 5. Diagrama del protocolo de agitación automatizado mediante el uso de un agitador orbital.

5.1.11 Pruebas del desarrollo embrionario *ex ovo* con “volteo-pipeteo” y sin pre-incubación

Se realizó la incubación de embriones ($n=100$) en el recipiente de incubación *ex ovo*, sin pre-incubación. Durante el desarrollo de los embriones se les realizó el volteo dentro del recipiente *ex ovo*, en un ángulo de 45° (Figura 6), para permitir que el albumen recubra el saco vitelino y el blastodermo, y con el uso de la pipeta se recubrió con albumen el blastodermo en desarrollo.

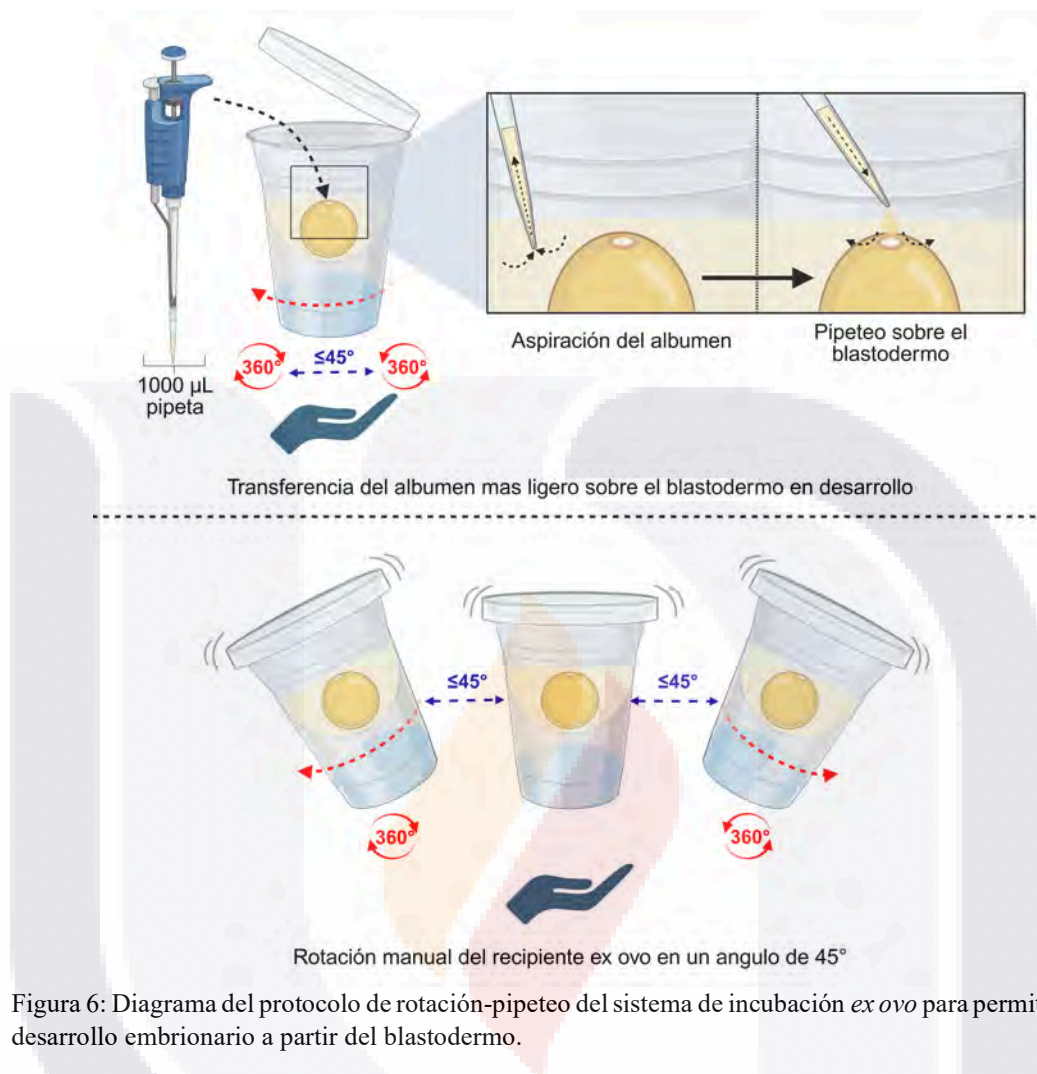


Figura 6: Diagrama del protocolo de rotación-pipeteo del sistema de incubación *ex ovo* para permitir el desarrollo embrionario a partir del blastodermo.

5.1.12 Comparación de la frecuencia cardiaca de los embriones *ex ovo*

Se realizó la determinación de la frecuencia cardiaca tanto en el grupo control (n=25) como con los embriones *ex ovo* (n=25), utilizando una cámara de video (Figura 7) para registrar los latidos por minuto (LPM) del organismo en diferentes días del desarrollo mediante este método no invasivo (Pawlak y Niedziółka, 2011), para los organismos control, se procedió a realizar una abertura en el cascarón como es mencionado por Andacht *et al.*, (2004).

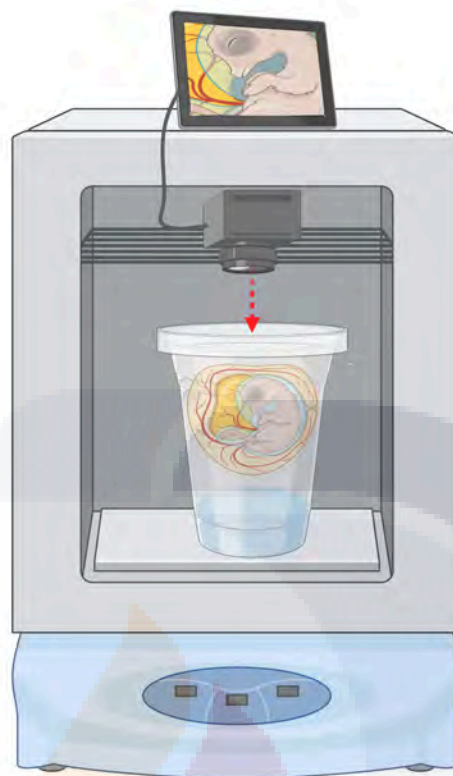


Figura 7: Diagrama del sistema de registro no invasivo de la frecuencia cardíaca de los embriones en desarrollo.

5.1.13 Eutanasia

El protocolo del proyecto se basa en los lineamientos establecidos por la American Veterinary Medical Association (2020) y la Norma Oficial Mexicana (Norma Oficial Mexicana: NOM-062-ZOO-1999, 2001). Los organismos que se encuentren con un periodo de desarrollo menor al 80% de su incubación ($\leq 17/21$ días), se sacrificaron por refrigeración a $< 4^{\circ}\text{C}$ por 4 h (Figura 8). Y para los organismos que alcancen un desarrollo mayor al 80% de su incubación ($\geq 18/21$ días), se sacrificaron por sobredosis de pentobarbital de sodio ($\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$), a una concentración de 120 mg/ kg, por una inyección intravenosa (Figura 9), que en el caso de los embriones *ex ovo* será más fácil debido al mayor acceso al embrión y sus distintas membranas.

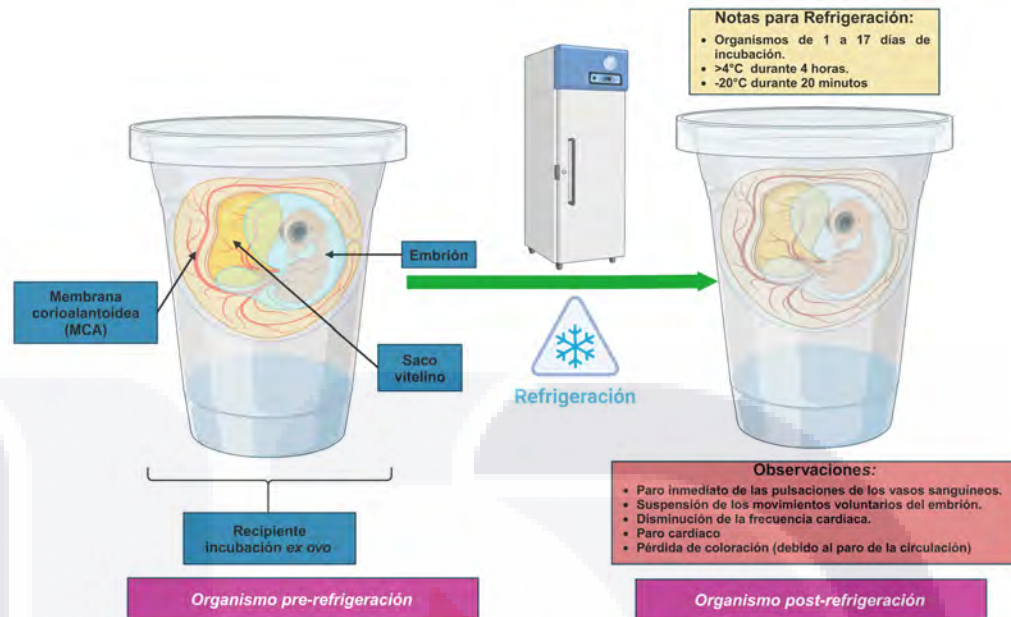


Figura 8. Protocolo de eutanasia para embriones (1-17 días).

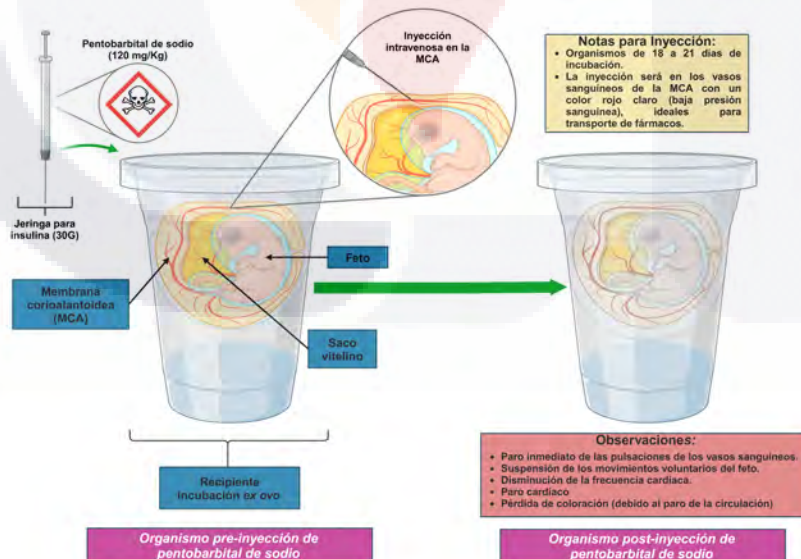


Figura 9. Protocolo de eutanasia para fetos (18-21 días).

5.1.14 Fijación de los tejidos y tinción histológica

Los embriones fueron fijados en solución Bouin. El tiempo de fijación se realizó dependiendo del tamaño del organismo, después se procedió a realizar un lavado con agua destilada para quitar el exceso de fijador Bouin (Ellenburg *et al.*, 2020), los pasos siguientes correspondientes a la deshidratación y aclaración de los tejidos fueron realizadas con el uso de un Histoquinete (Leica TP 1020), se procedió a hacer la inclusión en parafina, para posteriormente realizar los cortes histológicos. Una vez que los cortes se realizaron y montaron en portaobjetos, se tiñeron con hematoxilina y eosina (Luna, 1968), para poder observar y comparar las estructuras presentes en el embrión durante cada uno de los diferentes periodos. Una vez obtenidas las laminillas, se observó y comparó la morfología entre las diferentes tinciones mediante el uso de un microscopio óptico compuesto (Figura 10).

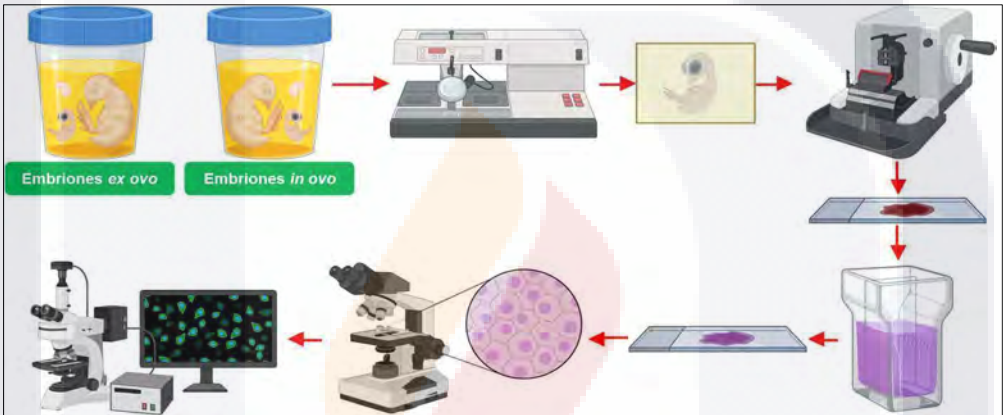


Figura 10. Diagrama del procesamiento histológico de los embriones obtenidos con la finalidad de poder analizar los cambios que se presentarán.

5.2 Resultados

5.2.1 Cuantificación de elementos presentes en el cascarón

Para determinar la cantidad de minerales que presenta el cascarón se realizó la cuantificación de los elementos presentes en el cascarón de huevo de pollo con la técnica de Wright y Riner, 1972, los resultados se resumen en la Tabla I.

Tabla I. Análisis del contenido de minerales en el cascarón de huevo de pollo		
Ca ²⁺	Mg ²⁺	P
323.05 mg/g de cascarón	5.1180 mg/g de cascarón	1.09 mg/g de cascarón
Cantidad de minerales presentes en 900 mg de cascarón macerado		
Ca ²⁺	Mg ²⁺	P
290.7460 mg	4.6062 mg	1.03 mg

De esta forma se obtuvo la cantidad de minerales presentes por gramo de cascarón. Posteriormente

se realizaron ensayos para determinar la cantidad de minerales que permiten el mejor desarrollo embrionario *ex ovo* encontrando que 900 mg del cascarón macerado es la cantidad recomendada en este estudio. Posteriormente se determinó la cantidad de minerales presentes en el cascarón del huevo recolectado después del nacimiento del polluelo. Los resultados se resumen en la Tabla II.

Tabla II. Análisis del contenido de minerales en el cascarón de huevo tras nacimiento		
Ca ²⁺	Mg ²⁺	P
231.8964 mg/g de cascarón	3.3887 mg/g de cascarón	1.02 mg/g de cascarón
Cantidad de minerales presentes en 900 mg de cascarón macerado		
Ca ²⁺	Mg ²⁺	P
208.7068 mg	3.0498 mg	0.97 mg

Con estos datos, se calculó la cantidad de minerales consumidos por el embrión durante el desarrollo embrionario, que fueron 91.1536 mg Ca²⁺ / g de cascarón, 1.7293 mg Mg²⁺/g de cascarón y 0.07 mg P / g de cascarón.

5.2.2 Incubación *ex ovo* de *Gallus gallus domesticus*

Se montaron los dispositivos de incubación *ex ovo* (n=50) como se describió en el apartado de metodología. Los huevos se fertilizados se incubaron a 37°C en una incubadora Labline 315, sin agitación. Con lo cual se logró un desarrollo embrionario hasta el día 5. Por lo anterior se realizó el seguimiento del desarrollo embrionario en los huevos experimentales para determinar las variables que favorecieran el desarrollo a término. El desarrollo embrionario de los huevos control (n=50) se paró de acuerdo con estos resultados preliminares, en orden de poder comparar el desarrollo obtenido en los huevos experimentales.

Posteriormente se incubó *ex ovo* un lote de 50 huevos fertilizados mejorando el suministro de oxígeno (500 mL/min) con la ayuda de un concentrador de oxígeno (CAIRE Companion 5). Los huevos además fueron agitados en un agitador orbital. Con estas mejoras se obtuvo un desarrollo embrionario hasta el día 16 (Figura 11).

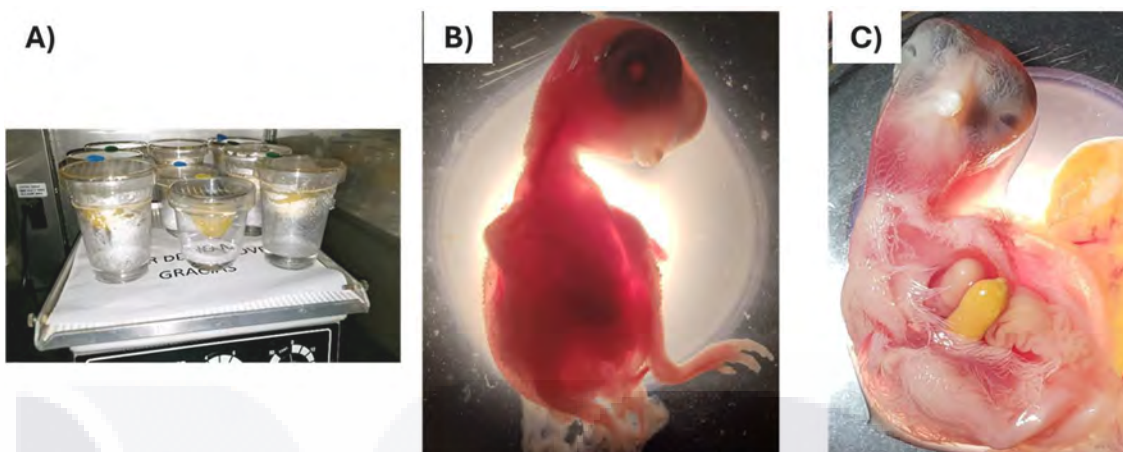


Figura 11. Desarrollo embrionario *ex ovo* puesta en marcha. A) Dispositivos de incubación en agitación, B) Feto de *Gallus gallus domesticus* de 12 días, C) Feto de 16 días de desarrollo obtenidos después de incubarlos en la incubadora Labline 315 (37.5°C).

Para obtener el desarrollo embrionario a término (21 días) se usó una membrana de polimetil penteno (FOR Wrap, Riken Technos) que mejoró el intercambio gaseoso, los huevos fertilizados fueron volteados para semejar el desarrollo natural del embrión, tal como se describe en la metodología. Se les suministraron 90 mg CaCO_3 (Wako, Fujifilm), para cubrir sus requisitos de minerales para la incubación.

5.2.3 Prueba de incubación *ex ovo* con suplementación temprana de Ca^{2+} (48 h) vs tardía (9 días).

Para realizar el seguimiento del desarrollo embrionario *ex ovo* y lograr un desarrollo a término, se probó suplementar en tiempos diferentes del desarrollo el calcio (Tahara y Obara 2014, 2021). Cuando la suplementación se hizo durante las primeras 48 h de incubación, se redujo la supervivencia al 50% en los primeros 5 días del desarrollo, los sobrevivientes sólo alcanzaron el desarrollo al día 19 de incubación. Cuando la fuente de calcio fue suministrada el día 9 del desarrollo embrionario 20% de los embriones llegaron hasta el día 16 del desarrollo. Mientras que el 40% de los huevos fertilizados incubados *ex ovo*, murieron después del día 16 y antes del día 21 del desarrollo embrionario, solamente el 40% de todos los huevos fertilizados incubados *ex ovo* alcanzaron el desarrollo a término (21 días) (Figura 12).

Supervivencia de los organismos con diferentes tiempos de suplementación de minerales

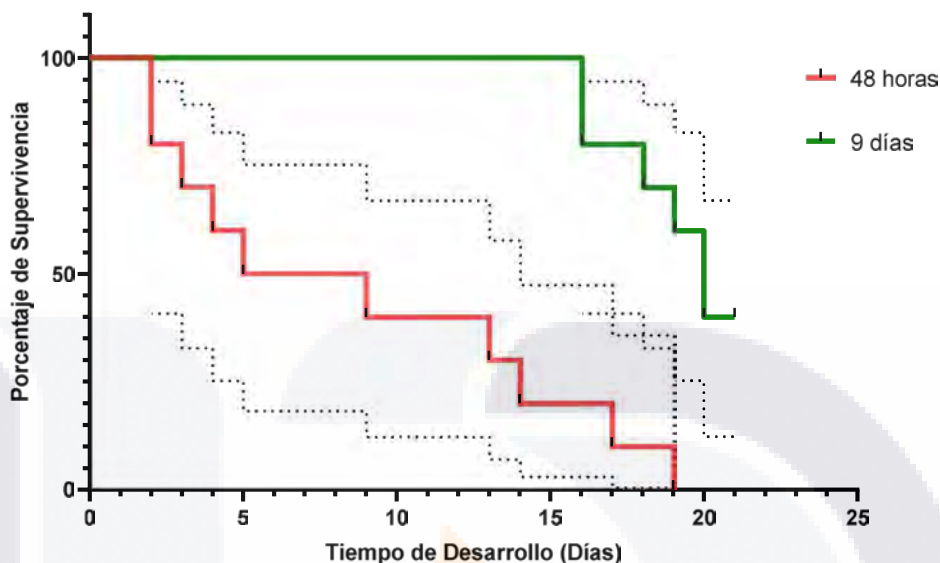


Figura 12. Prueba de incubación *ex ovo* con suplementación temprana de Ca^{2+} (48 h) vs tardía (9 días). Gráfica de supervivencia Kaplan-Meier para los organismos incubados con diferentes tiempos de suplementación de los minerales.

5.2.4 Incubación *ex ovo* de *Gallus gallus domesticus* sin pre-incubación y con rotación 180°

Se incubaron 100 huevos dentro de una incubadora y se realizó la extracción del embrión sin haber comenzado la pre-incubación, para determinar si las condiciones permitirían el desarrollo de los embriones (Figura 13). Sin embargo, no se logró el desarrollo de embriones tras las 25 h de incubación, alcanzando únicamente el desarrollo hasta la gastrulación, inclusive pudiéndose ver la presencia inicial de sangre indicando el proceso de eritropoyesis.

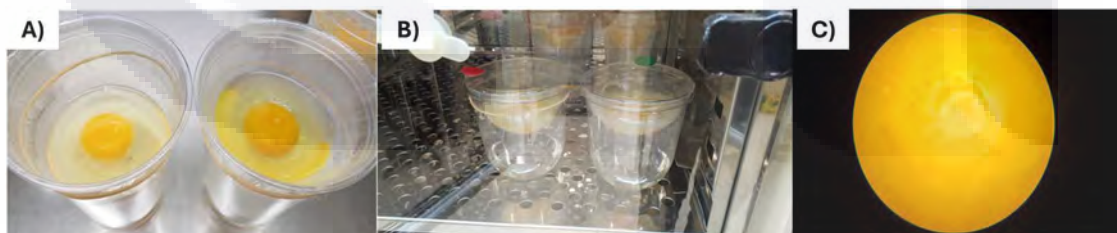


Figura 13. Incubación de embriones sin un periodo de pre-incubación dentro de una incubadora con un 5% de CO_2 . Solo se logró el desarrollo hasta la gastrulación. A)

5.2.5 Pruebas del desarrollo embrionario *ex ovo* sin pre-incubación y con agitación

Se incubaron 100 huevos dentro de una incubadora de forma *ex ovo* y con movimiento automatizado de los embriones con el uso de un agitador orbital a 30 rpm (Figura 14), se desarrollaron embriones a los 5 días del desarrollo. Sin embargo, los embriones desarrollados tienen presentaron diferencias morfológicas notables a la morfología normal. De los embriones incubados, el 52% (n=52), desarrollaron el sistema circulatorio en sus etapas iniciales, únicamente desarrollando los islotes sanguíneos, pero no se encontró el embrión desarrollado.

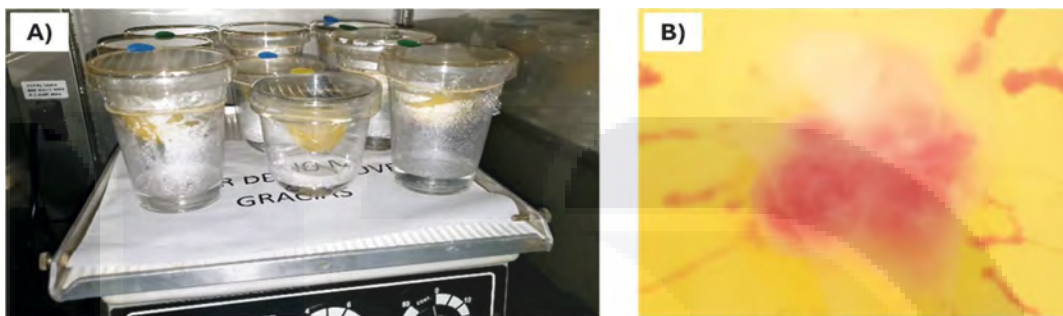


Figura 14. Embriones de *Gallus gallus domesticus* incubados sin llevar a cabo la reactivación celular dentro del cascarón, pero realizando la agitación con el uso del agitador orbital (A), logrando llegar hasta los 5 días del desarrollo (B).

5.2.6 Pruebas del desarrollo embrionario *ex ovo* sin pre-incubación con volteo-pipeteo

Se realizó la incubación de 100 huevos bajo las condiciones de incubación normales. Sin embargo, se llevó a cabo la extracción del embrión en desarrollo para efectuar la pre- incubación y en esta prueba se procedió a realizar un volteo-pipeteo del contenido del huevo dentro del recipiente de incubación. Los movimientos de rotación fueron en un ángulo menor a 45° para cubrir con albumen el embrión. Se hicieron 6 rotaciones-pipeteo en un periodo de 24 h durante los primeros 3 días, para posteriormente reducirse a 2 rotaciones cada 24 h. Gracias a este procedimiento se logró el desarrollo de embriones sin el periodo de pre-incubación *in ovo*, alcanzando los 21 días del desarrollo (Figura 15 y Figura 16).

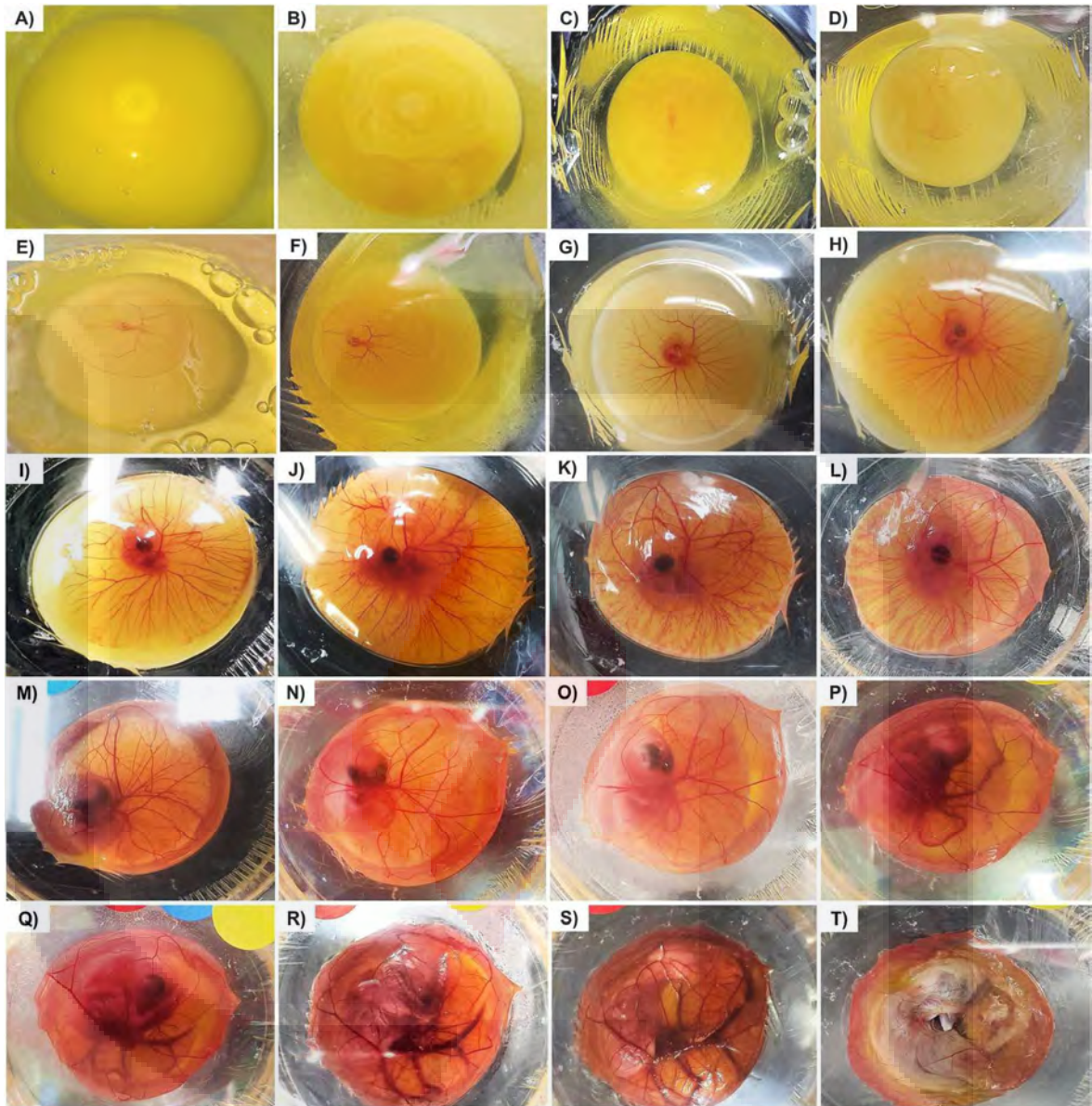


Figura 15. Diferentes estadios de desarrollo embrionario sin periodo de pre-incubación *in ovo*: A) Blastodermo, B) 24 h, C) 36 h, D) 48 h, E) 3 días, F) 4 días, G) 8 días, H) 9 días, I) 10 días, J) 11 días, K) 12 días, L) 13 días, M) 14 días, N) 15 días, O) 16 días, P) 17 días, Q) 18 días, R) 19 días, S) 20 días, T) 21 días.



Figura 16. Comparación del tiempo de desarrollo del polluelo alcanzado debido al tratamiento de pre-incubación. $p < 0.05$

5.2.7 Comparación morfológica de los embriones

Los análisis de comparación morfológica (Figura 17) no muestran anomalías en el desarrollo de los embriones, sin embargo se puede describir hipoplasia del corazón en los organismos desarrollados de forma *ex ovo*, al realizar el análisis comparativo del peso del corazón (Figura 18), entre organismos incubados de forma *ex ovo* e *in ovo* (control), no hay diferencia significativa durante los primeros 11 días del desarrollo, sin embargo a partir del día 12 se reportó una menor masa para los corazones de embriones *ex ovo* relativa a su masa corporal, indicando un menor desarrollo del corazón. Respecto a las dimensiones del corazón (Figura 19 y Figura 20), no se presentó una diferencia significativa durante los primeros 16 días del desarrollo, sin embargo, a partir del día 17 se presentó un patrón similar al análisis comparativo de la masa, aquellos polluelos incubados de forma *ex ovo*, presentaban dimensiones cardíacas menores que aquellos organismos incubados *in ovo*.

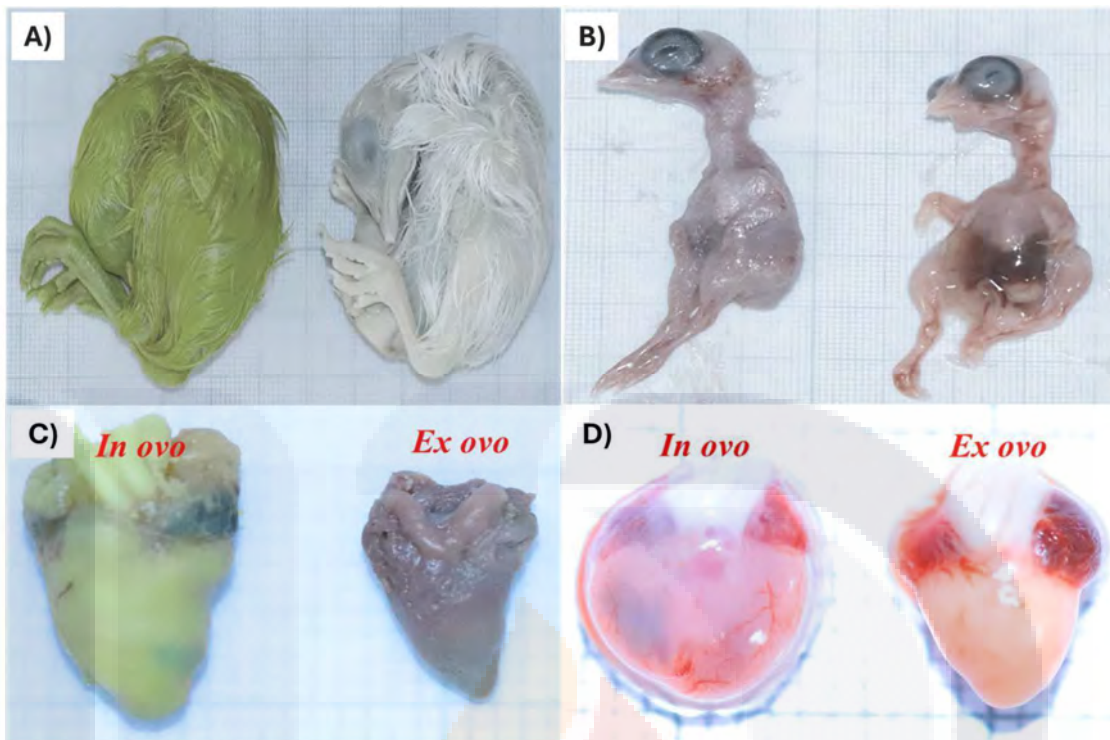


Figura 17- Comparación morfológica del corazón presente en organismos incubados de forma *Ex ovo* e *In ovo*. A) Polluelo con 21 días de desarrollo. B) Embriones de pollo con 12 días de desarrollo, C) Corazones de polluelo con 21 días del desarrollo, D) Corazones de embrión de pollo con 12 días del desarrollo.

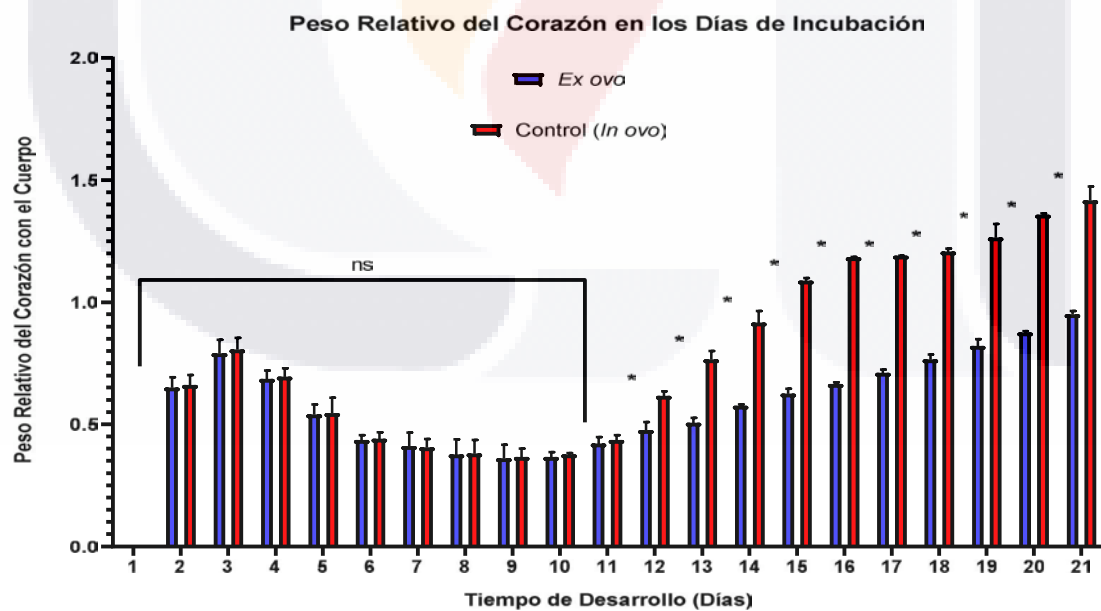


Figura 18: Comparación del peso del corazón presente en organismos incubados de forma *Ex ovo* e *In ovo*. $p < 0,05$

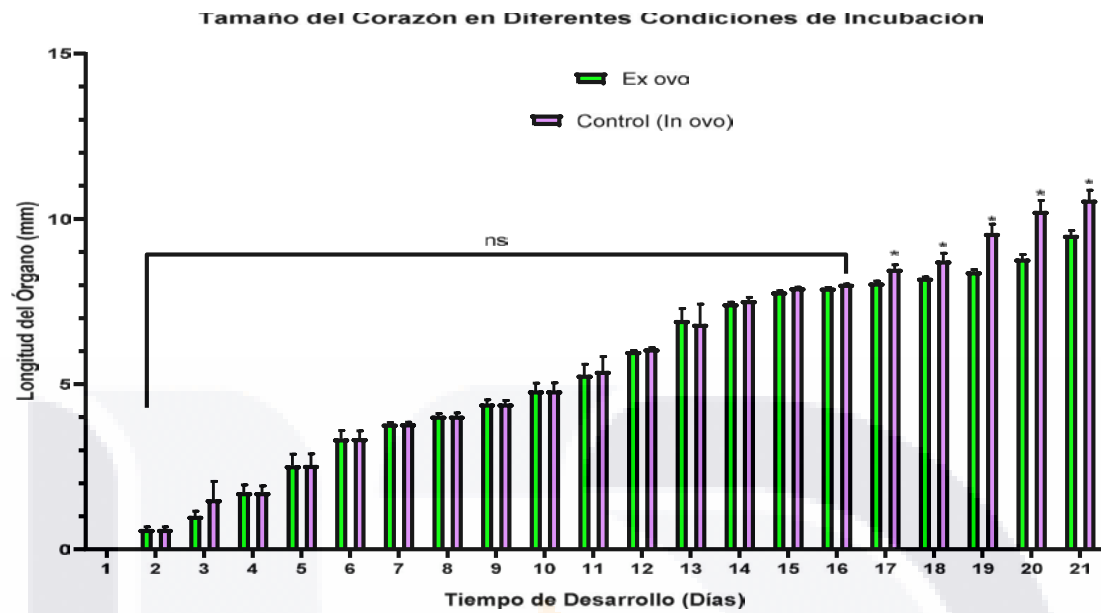


Figura 19: Comparación morfológica del corazón presente en organismos incubados de forma *Ex ovo* e *In ovo*.
 $p < 0.05$

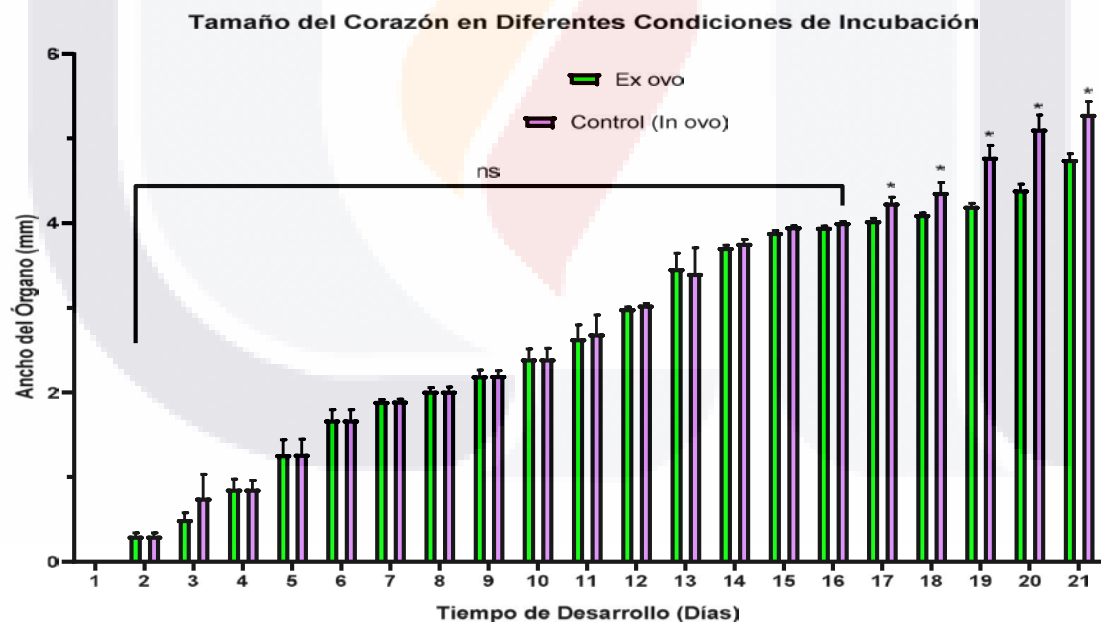


Figura 20: Comparación morfológica del corazón presente en organismos incubados de forma *Ex ovo* e *In ovo*.
 $p < 0.05$

5.2.8 Comparación histológica del desarrollo embrionario *ex ovo* de *Gallus gallus domesticus*

Se caracterizó la anatomía de los embriones mediante cortes sagitales del embrión completo para analizar los cambios histológicos en el cuerpo y el corazón de los embriones. No se identificaron daños dentro del órgano y sus tejidos (Figura 21), indicando que la técnica de incubación *ex ovo* no ocasiona cambios tisulares durante el periodo de incubación.

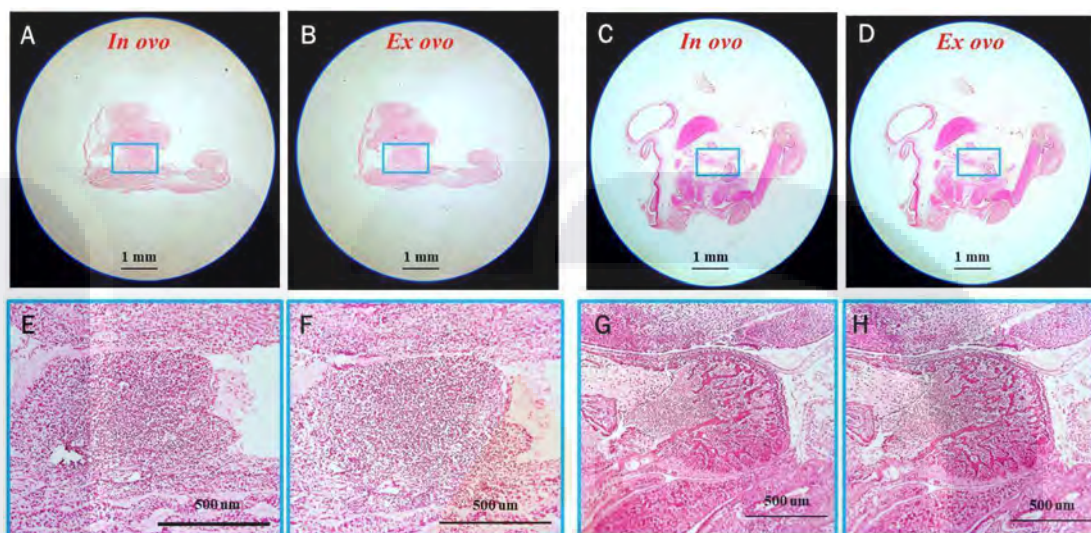


Figura 21: Comparación histológica del corazón. A) Embrión de 3 días incubado de forma *in ovo* (10x), B) Embrión de 3 días incubado de forma *ex ovo* (10x), C) Embrión de 4 días incubado de forma *in ovo* (10x), D) Embrión de 4 días incubado de forma *ex ovo* (10x).

5.2.9 Comparación de la frecuencia cardíaca de los embriones *ex ovo*

Pruebas comparativas de la frecuencia cardíaca en los embriones *ex ovo* e *in ovo* en condiciones normales de incubación (Figura 22).

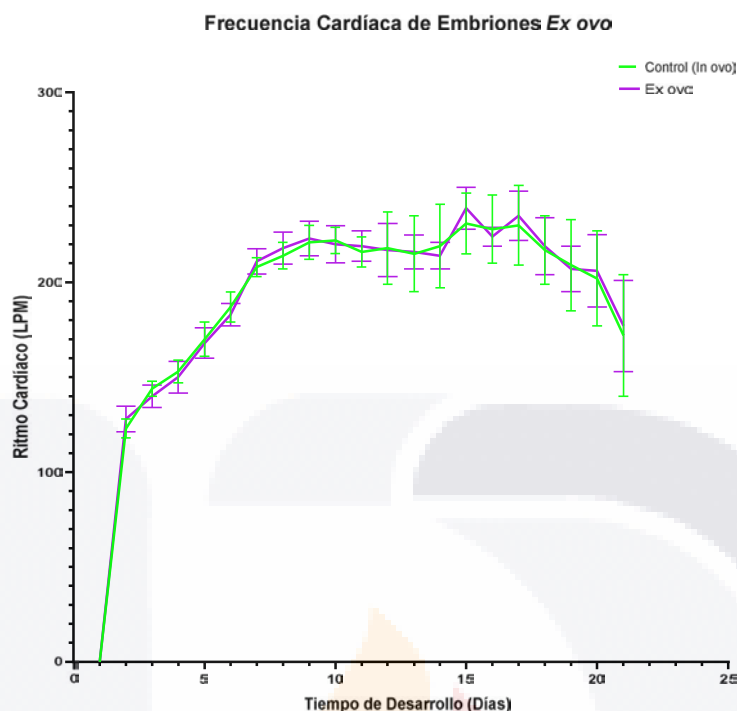


Figura 22. Análisis de la Frecuencia Cardíaca de embriones de *Gallus gallus domesticus* incubados *ex ovo*, el análisis se realiza mediante el uso de técnicas no invasivas.

5.3 Discusión

Fernández y Arias (2000) indican que el cascarón de huevo se encuentra constituido por 1.6% de agua, 95.1% de minerales, de los cuales 93.6% corresponden a carbonato de calcio en forma de calcita, 0.8% de carbonato de magnesio y 0.73% de fosfato tricálcico y finalmente 3.3% de materia orgánica. En otros estudios el cascarón de huevo de pollo tiene un alto contenido de calcio: 381 ± 89 mg Ca^{2+} / g de cascarón, 4 mg Mg/g de cascarón y 1.05 mg P/g de cascarón (Brun *et al.*, 2013; Schaafsma *et al.*, 2000). A pesar de que el contenido del cascarón llega a variar entre cada huevo debido a la dieta y condiciones ambientales en los que se encuentran las gallinas para poder realizar la ovoposición, los resultados obtenidos se encontraban en el rango de valores descritos (Tabla I y Tabla II). De acuerdo con lo descrito por Jourdeuil *et al.*, (2015), la incubación *ex ovo* de embriones de *Gallus gallus domesticus* ocasiona niveles de calcio menores a los que se encontrarían en organismos control, por lo que mediante este estudio cuantitativo del consumo de minerales se podrán diseñar las condiciones de incubación que permitan el mejor desarrollo de los organismos, especialmente debido a que las pruebas descritas para llevar a cabo el desarrollo *ex ovo* consisten en el uso limitado de minerales comparados con los que son consumidos por el embrión.

El tiempo del suplemento de los minerales al embrión es un periodo clave para el desarrollo de los organismos, Tahara y Obara (2014), indican que el suministro de los minerales se debe realizar al momento de extraer el embrión del huevo. Sin embargo, como se observó en las pruebas realizadas (Figura 12), existe un alta de letalidad para los embriones a los que se les dio el suplemento a las 48 h, contrastando con lo reportado por las investigaciones. Halgrain *et al.*, (2022), indican que, durante la incubación normal, durante los primeros 11 días del desarrollo, el embrión se sustenta a través del saco vitelino y el albumen, por lo que al suplementar los minerales durante las primeras 48 h de incubación, se ocasiona un estado de hipercalcemia, por lo que se aumenta la mortalidad de los embriones. Como se observa en la Figura 12, al suministrar los minerales al día 9 se logra una mayor tasa de desarrollo de los organismos, logrando que cerca del 50% de los embriones alcance el día 21 de incubación.

Se logró el desarrollo de los embriones *ex ovo* a partir del estadio de blastodermo, lo cual había sido indicado como inviable por parte de otros autores. Este avance es importante para seguir estandarizando protocolos de incubación *ex ovo* y realizar diferentes estudios del desarrollo embrionario. Tahara y Obara (2021), reportan que la incubación *ex ovo* requiere del proceso de pre-incubación para permitir el desarrollo embrionario *ex ovo* a partir del blastodermo. Al realizar las pruebas sin pre-incubación se comprobó que mediante agitación y rotación no se logra el desarrollo de los embriones, únicamente al realizar un volteo en el cual se mantiene hidratado el blastodermo, pues se recubre con el albumen al realizar el movimiento, lo cual permite el desarrollo *ex ovo*. Dunn (2023), menciona la importancia de mantener hidratada la superficie del saco vitelino para permitir el desarrollo de los embriones, anteriormente se pensaba que había cofactores para el desarrollo embrionario presentes en las membranas y cascarón del huevo para permitir el desarrollo desde blastodermo. Sin embargo, se pudo comprobar que únicamente mediante la rotación-pipeteo se desarrolla el embrión desde el blastodermo hasta el día 21. Asimismo, caben mencionar los inconvenientes del protocolo, pues es un trabajo completamente manual, por lo que por el momento requiere de un cuidado personal, el cual toma tiempo para efectuarse, lo cual reduce el número de embriones que se incuban de forma apropiada y de igual forma requiere de mantenimiento constante durante los primeros 3 días, reduciendo su rendimiento, pero resulta un buen desarrollo de los embriones incubados.

Con la hipótesis planteada se esperaba que los organismos de *Gallus gallus domesticus* desarrollados de forma *ex ovo* presentarían una morfología diferente en sus órganos debido al nivel de calcio que será diferente al que se utiliza normalmente para el desarrollo *in ovo*. El calcio es empleado en el metabolismo del organismo, al igual que interviene en muchas funciones metabólicas esenciales, y se puede comparar su efecto en la formación de los huesos por el proceso de calcificación, por lo que los efectos de deficiencia en el desarrollo *ex ovo*, se podrán comprobar al hacer la comparación con los organismos control, demostrando la importancia del calcio en la formación correcta del corazón, al actuar como un ion esencial para las funciones vitales. En el trabajo de Jourdeuil *et al.*, 2015, reportaron una menor osificación para los embriones incubados de forma *ex ovo*, indicando la importancia del suplemento de minerales para permitir el correcto desarrollo de los organismos. El tipo de suplemento de minerales y el tiempo exacto para suministrar el contenido de minerales es necesario para volver la incubación *ex ovo* más eficiente.

Las diferencias morfológicas en la incubación *ex ovo* e *in ovo* parecen inexistentes durante los primeros días de incubación (Figura 17 - 20), inclusive con análisis histológico (Figura 21). Sin embargo, al continuar con los siguientes días del desarrollo se hacen evidentes los cambios morfológicos, en los cuales los embriones *ex ovo* presentan menores dimensiones y peso, mostrando una diferencia significativa entre los grupos de incubación. Cabe mencionar que los datos obtenidos para los embriones *in ovo* presentan una baja dispersión, sin embargo, en los huevos *ex ovo*, presentan una mayor dispersión de sus datos, mostrando una mayor variabilidad en la incubación de estos durante los últimos estadios del desarrollo. Este cambio puede estar fundamentado en los días del desarrollo alcanzados, debido a que el organismo presenta más cambios metabólicos, requiriendo más nutrientes para su desarrollo, y como reportan Halgrain *et al.*, (2022), al pasar del día 11 el saco vitelino ya no puede suministrar todos los minerales al embrión en desarrollo, por lo que requiere de los minerales presentes en el cascarón. Es importante recordar que el calcio es de gran importancia para el proceso del desarrollo embrionario y el desarrollo del sistema circulatorio, pues modula muchos procesos celulares, esenciales para un correcto funcionamiento (Tyser et al., 2016; Baqi et al., 2022), por lo que su ausencia o un déficit de ellos podrán afectar el desarrollo del organismo y el correcto funcionamiento de su sistema circulatorio.

El recipiente de incubación *ex ovo* permite la observación en tiempo real de los embriones y también se puede cuantificar visualmente el ritmo cardíaco hasta el día 12 del desarrollo, debido que a partir del día 13 se termina de cerrar la cavidad torácica, por lo que ya no se pudo observar tan fácilmente el corazón, pues se requiere del uso de lámparas para hacer una iluminación de contraste para poder visualizar la actividad del corazón. Respecto a los días en que se pudo cuantificar el ritmo cardíaco, se obtuvo el análisis de los LPM de los embriones, los cuales coinciden con lo reportado por Pawlak y Niedziółka, (2004), indicando que el ritmo cardíaco normal no se ve afectado por la incubación *ex ovo* (Figura 22). Cabe resaltar que fue más fácil la observación en los recipientes *ex ovo* que en el huevo, debido principalmente a que el embrión se encuentra menos apretado, facilitando su observación y registro de la actividad del corazón, al igual que el vaso de plástico permite un mayor paso de luz para realizar el contraste, lo cual no se puede hacer tan fácil en el huevo, debido a la opacidad del cascarón.

5.4 Conclusiones

Se determinaron las concentraciones óptimas y el tiempo del suministro para el suplemento de minerales, logrando estandarizar una incubación completa del periodo embrionario y logrando el desarrollo de los embriones hasta los 21 días de incubación, sin embargo a pesar de que no se logró el nacimiento de ningún organismo, se mostró la versatilidad de la técnica de incubación *ex ovo* para poder realizar investigación sobre el desarrollo embrionario y fetal de los organismos, permitiendo observar a los organismos en tiempo real y directamente durante toda su incubación, de igual forma

permitiendo la manipulación de este, abriendo paso a diferentes metodologías como la realizada para comparar el sistema circulatorio.

Se estandarizó un protocolo para llevar a cabo la incubación y desarrollo de embriones *ex ovo* desde el periodo del blastodermo, el cual estaba previamente descrito como inviable por autores anteriores. De esta forma se permite el desarrollo *ex ovo* desde periodos iniciales del desarrollo y abre posibilidades de llevar a cabo protocolos de fertilización in vitro.

Respecto a las pruebas comparativas del sistema circulatorio, no hay diferencia significativa entre la incubación *ex ovo* e *in ovo* durante los primeros 16 días de incubación, sin embargo, al llegar al día 17 se aprecia diferencia entre las dimensiones (ancho y largo) de los corazones, y en el caso de la masa de los órganos, hasta el día 11 no se presentaban diferencias significativas. Todo esto indica que la técnica de incubación *ex ovo* si trae alteraciones al desarrollo del organismo. No obstante, al realizar pruebas de fisiología al comparar la frecuencia cardíaca de los organismos no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos de embriones, lo cual indica que, pese a las alteraciones morfológicas, el corazón conserva un óptimo funcionamiento.

Se demostró la efectividad del uso de la incubación *ex ovo* como modelo para estudiar directamente alteraciones ocasionadas por factores externos a la incubación como es el uso de teratógenos, en particular los efectos de la hipertermia y como afectan el desarrollo normal de los organismos, alterando su morfología y dando paso a una variedad de malformaciones, algunas de las cuales no estaban previamente descritas para la especie (cefalotoracopago y heteropago).

Existen ciertas perspectivas futuras a considerar para continuar con los estudios de la incubación *ex ovo*, como se mencionó anteriormente, el uso del modelo para estudiar teratógenos es interesante debido a la facilidad para observar y manipular al embrión, tal podría ser el caso del uso de los embriones para determinar la toxicidad de compuestos antimicrobianos. Asimismo, al estandarizar el protocolo de incubación se podrá lograr el desarrollo hasta termino de los organismos, permitiendo su aplicación para la incubación y desarrollo de organismos, lo cual también podría emplearse con técnicas de fertilización in vitro para probar la efectividad del modelo como sistema de incubación sustituto.

5.5 Glosario

Agua: sustancia cuya molécula está compuesta por dos átomos de hidrogeno y uno de oxígeno.

Albumen (clara): nombre común que hace referencia al líquido semitransparente que contienen los huevos. Se caracteriza por un alto contenido de proteínas.

Anoftalmia: trastorno del desarrollo en el cual se presenta una ausencia de uno o ambos ojos.

Autoclave: recipiente de presión metálico de paredes gruesas con un cierre hermético que permite trabajar a alta presión para realizar una esterilización con vapor de agua a fin de esterilizar materiales e instrumentos quirúrgicos.

Autósito: en casos de gemelos siameses, corresponde al gemelo que presenta un desarrollo normal.

Bovans White: raza de pollo doméstico.

Calcio: elemento químico de símbolo Ca, es un metal. Se encuentra en el medio interno de los organismos como ion calcio o formando parte de otras moléculas; en algunos seres vivos se halla precipitado en forma de esqueleto interno o externo. Los iones de calcio actúan de cofactor en muchas reacciones enzimáticas, intervienen en el metabolismo del glucógeno y, junto al potasio y el sodio, regulan la contracción muscular.

Calcita: mineral formado por carbonato de calcio.

Cámara de luz UV: recipiente empleado para esterilizar usando la radiación de luz ultravioleta.

Carbonato de calcio: compuesto químico cuya fórmula es CaCO_3 , es muy abundante en la naturaleza, formando rocas, y es el principal componente de conchas y esqueletos de muchos organismos o de las cáscaras de huevo.

Cascarón de huevo: parte dura externa de un huevo. La estructura material suele variar según las especies, es una matriz de proteína alineada con cristales minerales, generalmente calcio en compuestos químicos como el carbonato de calcio, que se encuentra presente al 94%.

Cefalotoracopago: gemelos siameses unidos a nivel cefálico y cervical, separándose en dos cuerpos individuales.

Cloruro de Benzalconio: desinfectante tensioactivo, bactericida e inhibidor de la actividad viral.

Corazón ectópico: trastorno del desarrollo en el cual el corazón del organismo se encuentra fuera de la cavidad torácica

Cuarto de cultivo: espacio designado para realizar trabajos de microbiología, manteniendo un ambiente libre de contaminantes y patógenos.

Desarrollo embrionario: periodo que se produce tras la fecundación del ovulo femenino y el espermatozoide masculino, formando un cigoto el cual presentara continuas divisiones celulares, al igual que diferenciación celular en tres etapas conocidas como blastulación, gastrulación y organogénesis. Al concluir el desarrollo embrionario, el organismo resultante recibe el nombre de feto y completara su desarrollo hasta el momento del parto.

Diapausa: estado de dormancia en el cual el desarrollo y la actividad se encuentran temporalmente suspendidos en respuesta a las condiciones ambientales (incubación).

Encefalocele: malformación congénita en la cual el tejido cerebral sobresale a través del cráneo.

Embrión: etapa inicial del desarrollo de un ser vivo mientras se encuentra en el huevo o en el útero de la hembra.

Ex ovo: del latín “fuera del huevo”. Métodos empleados para desarrollar embriones fuera del cascarón en recipientes artificiales.

Focomelia: anomalía del desarrollo donde las extremidades se encuentran malformadas.

Frecuencia cardíaca: es el número de latidos del corazón por unidad de tiempo, usualmente se expresa como latidos por minuto (LPM).

Gastroquisis: malformación congénita en la cual se presenta una abertura abdominal por la cual los intestinos se encuentran protruidos.

Gemelo parasitario: gemelo presente en los casos de heteropagos, en el cual el organismo requiere del autósito para poder subsistir.

Gemelos siameses: organismos que se desarrollan unidos de forma corporal.

Heteropago: gemelos unidos de forma asimétrica en el cual un gemelo autósito es el principal y se encarga de proveer el soporte vital a un gemelo incompleto o parasitario.

Hidrocefalia: acumulación de líquido dentro de las cavidades del cerebro del organismo.

Hipoplasia: desarrollo incompleto de un órgano, tejido o estructura del organismo.

Humedad: se denomina al agua que impregna un cuerpo o al vapor presente en la atmósfera.

Incubación: mantenimiento de los huevos puestos por un animal a una temperatura de calor constante, por medios naturales o artificiales, para que los embriones se desarrollen.

Incubadora: aparato cuya función es crear un ambiente con la humedad y temperatura adecuadas para el crecimiento o reproducción de seres vivos.

In ovo: del latín “dentro del huevo”, protocolo de incubación del ave dentro de su mismo huevo.

Ión: es una partícula cargada eléctricamente constituida por un átomo o molécula que no es eléctricamente neutro.

Luz UV: tipo de radiación electromagnética con ondas más cortas que el de la luz visible por el ojo humano, con un largo de aproximadamente 400 nanómetros.

Microftalmia: trastorno del desarrollo en el cual uno o ambos ojos presentan un menor desarrollo.

Minerales: las sales minerales son compuestos inorgánicos fundamentalmente iónicos. En general son combinaciones de cationes y aniones. Tienen función estructural y funciones de regulación del pH, de la presión osmótica y de reacciones bioquímicas, en las que intervienen iones específicos. Participan en reacciones químicas a niveles electrolíticos.

Pollo doméstico (*Gallus gallus domesticus*): es una especie de ave galliforme de la familia Phasianidae y una de las cuatro especies dentro del género conocido como *Gallus*, está considerada como una de las aves más populares del planeta tierra. Es un ave doméstica que se cría fundamentalmente por su carne y los huevos que producen.

Regresión caudal: malformación congénita que afecta el desarrollo de la parte inferior del organismo, afectando la columna y extremidades.

Temperatura: grado o nivel térmico de un cuerpo o de la atmosfera.

Teratógeno: cualquier agente biótico o abiótico que mediante acción física o química afecta el correcto desarrollo embrionario o fetal, ocasionando el desarrollo de malformaciones, cáncer, toxicidad y la muerte.

Tinción H/E (Hematoxilina-Eosina): método de laboratorio común en el que se usan dos tintes llamados hematoxilina y eosina para observar mejor las diferentes partes de la célula al microscopio. La hematoxilina tiñe de violeta azulado intenso los ribosomas, la cromatina (material genético) dentro del núcleo y otras estructuras. La eosina tiñe de rosa anaranjado o rojizo el citoplasma, la pared celular, el colágeno, el tejido conjuntivo y otras estructuras que rodean y sostienen la célula. La tinción con hematoxilina y eosina ayuda a identificar diferentes tipos de células y tejidos, y a obtener información importante sobre las características, la forma y la estructura celular de una muestra de tejido. Se usa para el diagnóstico de enfermedades como el cáncer. También se llama tinción H/E.

Vitelo (yema): parte del citoplasma del cigoto que contiene elementos nutritivos tales como lípidos o gránulos de carbohidratos, aportado en su mayoría por el óvulo.

5.6 Referencias

- Alfonso H. (1968). *Blastogénesis: compendio y atlas de embriología*. Atika. España
- Andacht T., Hu W. e Ivarie R. (2004). *Rapid and improved method for windowing eggs accessing the stage X chicken embryo*. *Molecular Reproduction and Development*, 69 (1): 31-34. doi: 10.1002/mrd.20155
- Baqi, D. H., Ahmed, S. F., Baba, H. O., Fattah, F. H., Salih, A. M., Ali, R. M., Saed, D. H. A. H., & Kakamad, F. H. (2022). Hypocalcemia as a cause of reversible heart failure: A case report and review of the literature. *Annals of medicine and surgery (2012)*, 77, 103572. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2022.103572>
- Boone M. (1963). *A method of growing chick embryos in vitro*. *Poultry Science*. 42: 916-921
- Borwornpinyo S. y Brake J. (2005). *Culture of chicken embryos in surrogate eggshells*. *Poultry Science*, 84: 1477-1482 doi:10.1093/ps/84.9.1477
- Brun, L. R., Lupo, M., Delorenzi, D. A., Di Loreto, V. E., y Rigalli, A. (2013). Chicken eggshell as suitable calcium source at home. *International journal of food sciences and nutrition*, 64(6), 740–743. <https://doi.org/10.3109/09637486.2013.787399>
- Cawthray A. y Hermes J. (2015). *Chicken and egg: raising chickens to get the eggs you want*. Ivy Press Limited. Estados Unidos.
- Chen, S., Zhou, KY., Hua, YM., Wang, C., Wang, J., Sun, K. (2023). Circulatory System. In: Sun, K. (eds) *In Utero Pediatrics*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-19-9538-5_7
- Deeming C. y Ferguson M. (2004). *Egg incubation: its effects on embryonic development in birds and reptiles*. Cambridge University Press. Reino Unido
- Dunn B. (1974). *Technique for shell-less culture of the 72-hour avian embryo*. *Poultry Science* 53: 409-412
- Dunn, B.E., Fitzharris, T.P., Barnett, B.D., 1981. Effects of varying chamber construction and embryo pre-incubation age on survival and growth of chick embryos in shell-less culture. *Anat. Rec.* 199, 33–43. <https://doi.org/10.1002/ar.1091990105>.
- Dunn, B.E., 2023. Shell-less culture system for chick embryos from the blastoderm stage to hatching. *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Integr. Physiol.* <https://doi.org/10.1002/jez.2686>.
- Ellenburg, J. L., Kolettis, P., Drwiega, J. C., Posey, A. M., Goldberg, M., Mehrad, M., Giannico, G., y Gordetsky, J. (2020). Formalin Versus Bouin Solution for Testis Biopsies: Which Is the Better Fixative? *Clinical Pathology*, 13, 2632010X1989726. <https://doi.org/10.1177/2632010x19897262>

- Fisher C. (1993). *Chick embryos in shell-less culture*. Association for Biology Laboratory Education. Canada
- Gilbert S. (2010). *Developmental Biology*. 9° ed. Sinauer Associates Inc. Massachusetts, Estados Unidos.
- Halgrain, M., Georgeault, S., Bernardet, N., Hincke, M. T., y Réhault-Godbert, S. (2022). Concomitant Morphological Modifications of the Avian Eggshell, Eggshell Membranes, and the Chorioallantoic Membrane During Embryonic Development. *Frontiers in physiology*, 13, 838013. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.838013>
- Hamburger V. y Hamilton H. (1951). *A series of normal stages in the development of the chick embryo*. Developmental Dynamics. 195: 231-272
- Kamihira M., Oguchi S., Tachibana A., Kitagawa Y., e Iijima S. (1998). *Improved hatching for in vitro quail embryo culture using surrogate eggshell and artificial vessel*. Development, Growth & Differentiation, 40: 449-455
- Kamihira M., Ono K., Esaka K., Nishijima K., Kigaku R., Komatsu H., Yamashita T., Kyogoku K. e Iijima S. (2005). High-level expression of scFv-Fc fusion protein in serum and egg white of genetically manipulated chickens by using a retroviral vector. *Journal of Virology*, 79: 10864-10874
- Kharayat N. S., Chaudhary, G.R., Katiyar, Rahul, B, Balmurugan, Patel, Maulikkumar, S, Uniyal, M, Raza y Mishra, Girish. (2016). *Significance of Artificial Insemination in Poultry*. Research y Reviews: Journal of Veterinary Science and Technology. 5: 2319-3441.
- Kluver H., y Barrera E. (1953). *A method for the combined staining of cells and fibers in the Nervous system*. J. Nueropath. Exp. Neurol. 12: 400-403
- Lee I., Rassoul B. A., Holub A. S., Lejeune A., Enke R. A. y Timp W. (2017). *Whole genome DNA methylation sequencing of the chicken retina, cornea, and brain*. Scientific Data. 2017 Oct 10;4:170148. doi: 10.1038/sdata.2017.148.
- Luna, L. G. (1968). Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 3rd Ed. New York: McGraw-Hill; pp. 111–112.
- Macías-Marín, O., Guerrero-Barrera, A.L., Gerardo, A., Teódulo Quezada Tristán, F.R., Javier Avelar-González, M., Soto-Perezchica, M.A., Salazar de-Santiago, A.I., 2023. Study of ex-

- ovo embryonic development of *Gallus gallus domesticus*. *Int. J. Morphol.* 41 (2), 668–674. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022023000200668>.
- Macias-Marin, O., Guerrero-Barrera, A. L., Valdivia-Flores, A. G., Teodulo Quezada-Tristan, Ramirez-Castillo, F. Y., Moreno-Flores, A. C., Galindo-Guerrero, F., Avelar-Gonzalez, F. J., y Rodriguez-Padilla, A. D. (2025). Development of external morphological malformations induced by hyperthermia exposure during the blastula stage in an ex-ovo (shell-less) culture of *Gallus gallus domesticus* embryos. *Poultry Science*, 104(8), 105341–105341. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2025.105341>
- Noiva R., Menezes A. y Peleteiro M. (2014). Influence of temperature and humidity manipulation on chicken embryonic development. *BMC veterinary research*, 10, 234. doi:10.1186/s12917-014-0234-3
- Norma Oficial Mexicana [NMX-F-066-S-1978]. (1978), Determinación de Cenizas en Alimentos. México. Diario Oficial de la Federación. DOF: 04/08/1978. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4721127&fecha=04/08/1978#gsc.tab=0.
- Norma Oficial Mexicana [NOM-062- ZOO-1999]. (2001), Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. México. Diario Oficial de la Federación. DOF: 22/08/2001. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=762506&fecha=22/08/2001&print=true.
- North M., y Bell D. (1990). *Commercial chicken Production Manual*. Van Norstand Reinhold. Estados Unidos
- Pawlak, K., y Niedziółka, J. (2011). Non-invasive measurement of chick embryo cardiac work. *Czech Journal of Animal Science*, 49(No. 1), 8–15. <https://doi.org/10.17221/4265-cjas>
- Perry S. (1988). *A complete culture system for the chick embryo*. *Nature*, 331: 70-72. doi: 10.1038/331070a0
- Sauveur B. y Reviers M. (1992). *Desarrollo embrionario: reproducción de las aves*. Editorial Mundi-Prensa. España
- Schaafsma, A., Pakan, I., Hofstede, G. J., Muskiet, F. A., Van Der Veer, E., y De Vries, P. J. (2000). Mineral, amino acid, and hormonal composition of chicken eggshell powder and the

evaluation of its use in human nutrition. *Poultry science*, 79(12), 1833–1838.
<https://doi.org/10.1093/ps/79.12.1833>

Sequera, D., Ercolino J. y Álvarez M. (2003). *Embrión de pollo: un modelo con cadiovideograma para el estudio de la toxicidad experimental inducida por Tfevatia peruviana*. Revista de Toxicología en línea, 28: 37-48

Sheehan H. (1980). *Theory and Practice of Histotechnology*. Estados Unidos. The Mosby Comp.

Tahara Y., y Obara K. (2014). *A novel shell-less culture system for chick embryos using a plastic film as culture vessels*. Japan Poultry Science Association. 51: 307-312

Tahara, Y., Obara, K., y Kamihira, M. (2021). Calcium carbonate supplementation to chorioallantoic membranes improves hatchability in shell-less chick embryo culture. *Journal of bioscience and bioengineering*, 131(3), 314–319. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.11.001>

Tyser, R. C., Miranda, A. M., Chen, C. M., Davidson, S. M., Srinivas, S., & Riley, P. R. (2016). Calcium handling precedes cardiac differentiation to initiate the first heartbeat. *eLife*, 5, e17113. <https://doi.org/10.7554/eLife.17113>

Vaca L. (2014). *Producción avícola*. Editorial Universidad Estatal a Distancia. Costa Rica

Wittig, J. G., & Münsterberg, A. (2020). The Chicken as a Model Organism to Study Heart Development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 12(8), a037218. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a037218>

6. Capítulo II

Artículo 1

International Journal of Morphology



“Study of *ex-ovo* Embryonic Development of *Gallus gallus domesticus*”.

Study of *ex-ovo* Embryonic Development of *Gallus gallus domesticus*

Estudio Inicial del Desarrollo Embrionario *ex-ovo* de *Gallus gallus domesticus*

Osvaldo Macías Marín¹; Alma Lilian Guerrero Barrera¹; Arturo Gerardo Valdivia Flores²; Teodulo Quezada Tristan²; Francisco Javier Avelar Gonzalez³; María Magdalena Soto Perezchica¹ & Alfredo Salazar de Santiago⁴

MACÍAS, M. O.; GUERRERO, B. A. L.; VALDIVIA, F. A. G.; QUEZADA, T. T.; AVELAR, G. F. J.; SOTO, P. M. M. & DE SANTIAGO, A. S. Study of *ex-ovo* embryonic development of *Gallus gallus domesticus*. *Int. J. Morphol.*, 41(2):668-674, 2023.

SUMMARY: The domestic chicken is a species of bird that has been extensively studied in regard to its biology and as a model organism for science. The reproduction of the species is by the laying of fertilized eggs, which in a period of 21 days will develop a chick inside. Several methods have been described to develop embryos *ex-ovo*, allowing the observation and manipulation of the organism. This work has the propose to standardize a method that allows the development of the embryos inside the artificial incubation system, which has a low cost and is easy to make. In this work, 100 chicken eggs were used to study the effects of humidity, mineral supplementation, and the preincubation time of the egg on the incubation *ex-ovo* of the embryos. Embryo development was documented through the different days. Pulverized eggshell was selected as an optimal source to provide calcium, magnesium, phosphorus, and other minerals to the developing embryo. By providing 900-1200 mg of pulverized eggshell, 40 mL of the 0.001 % solution of benzalkonium chloride, and a preincubation time of approximately 56 h, the embryos were able to develop until 19 days, and even though they did not reach hatching, the incubation conditions that allowed the survival and development of embryos until late stages were achieved. Thus, due to the conditions established for calcium, humidity and preincubation time, in the present work, the chicks reached 19 days of development.

KEY WORDS: Birds; Embryonic development; *ex-ovo* incubation; *Gallus gallus domesticus*; incubation conditions.

INTRODUCTION

Bird embryos have been used throughout time as an efficient biological model for the study of embryonic development in vertebrates, such as in genetic studies, due to their availability, low price, and easy manipulation. *Gallus gallus domesticus* is the most commonly used species due to its size and the accessibility of its embryo. The embryos are extracted in different developmental stages, and then samples, slides, and histological preparations can be made to study each stage (Vilches-Moure, 2019). Before the establishment of artificial cultures for the development of organisms by an *ex-ovo* technique, a common practice was the “window” aperture in the eggshell to facilitate the observation of the organism in development as well as to facilitate the introduction of genes and to perform other manipulations (Andacht *et al.*, 2004). Perry (1988) reported a culture method for chick embryos using a surrogate eggshell as an incubation system for the *ex-ovo* culture of

the fertilized egg; with this method, the hatching rate was approximately 7 %.

Ex-ovo embryonic development is the extraction of the embryo from the eggshell, which is placed in a medium that will provide the necessary conditions for its development, thereby helping the observation and manipulation of the organism (Kamihiro *et al.*, 2005). In the studies performed by Boone (1963), the embryos were incubated in 50 and 100 mL beakers, and the different materials that could provide better development for the organisms were examined. It was found that the use of 100 mL beakers favored better development than the use of 50 mL beakers, and the use of a plastic wrap halted the humidity loss and provided the right gas exchange. With these conditions, a development time of 8 days was achieved. Dunn (1974) described a technique in which the content of the

¹ Laboratorio de Biología Celular y Tisular, Departamento de Morfología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico.

² Departamento de Ciencias Veterinarias, Centro de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico.

³ Departamento de Fisiología y Farmacología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico.

⁴ Unidad Académica de Odontología, Área de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas, Mexico.

bird egg is removed after 72 hours of incubation, which could be developed for extended periods of time until Day 15. The egg content is supported with the help of a plastic wrap over a plastic cup with the water solution to maintain the humidity of the embryo. Kamihira *et al.* (1998) reported an *ex-ovo* method for quail embryos using a plastic cup and plastic wrap; by this method, nearly 43 % of the embryos were developed and hatched with the supplementation of calcium lactate.

The supplementation of calcium to the *in vitro* developing embryos is essential for its development. The embryos that are developed naturally inside the eggshell obtain their calcium from the eggshell that protects them during embryo development until hatching (Kamihira *et al.*, 2005).

The *ex-ovo* development method named ‘‘chicks in cup’’ allows the continuous observation of live bird embryos from the third day of the development until the eighteenth; by using this method, organogenesis, extra-embryonic membranes, and prehatching behavior can be studied (Fisher, 1993). In another work, Tahara & Obara (2014) reported a technique for *ex-ovo* embryonic development that allowed the hatching of chicks (57.1 %).

There have been different improvements in the *ex-ovo* development of embryos; however, most of these methods require the use of surrogate eggshells from larger bird species (Borwompinyo *et al.*, 2005). On the other hand, Tahara *et al.* (2021) argue that the use of this method has disadvantages because of the preparation of the eggshells, inability to reuse them, and poor operability.

The standardization of a method that could allow *ex-ovo* development implies great importance because it poses a great utility for teaching purposes by allowing the observation of the different stages that comprise the embryonic development of a chordate (Kamihira *et al.* 2005). This method could also facilitate the creation of transgenic chickens and other genetic manipulations used in regenerative medicine, and it could support cell cultures by obtaining stem cells and the mass production of compounds in bioreactors (Tahara & Obara, 2014).

Table I. Quantity of minerals per milligram of pulverized eggshell.

Quantity of grounded eggshell (mg)	Quantity of minerals (mg)		
	Ca ²⁺	Mg ²⁺	P
300	97.0980	1.5383	0.3270
600	194.1960	3.0765	0.6540
900	291.2940	4.6148	0.9810
1200	388.3920	6.1530	1.3080
2500	809.1500	12.8188	2.7250
5000	1618.3000	25.6375	5.4500

The objective of this study was to establish the experimental conditions to improve the *ex-ovo* incubation and the conditions of *Gallus gallus domesticus* embryos.

MATERIAL AND METHOD

The current study was approved by the institutional ethics committee (CEADI-UAA). The *ex-ovo* development of *Gallus gallus domesticus* embryos was carried out with respect and care.

Procedure for obtaining and preparing embryos. Fertilized chicken eggs (n=100) were obtained from a farm. Once collected, they were placed inside a CO₂ incubator (Lab-Line Model 315) at a constant temperature of 37.5 °C and a relative humidity of 60 %. In the case that the eggs were not incubated immediately, they were stored between 15.6 and 18.3 °C so that the embryo would enter a diapause state and would resume its development when it was returned to the incubation temperature (Pokhrel *et al.*, 2021).

Mineral supplement preparation. The chicken eggshell was selected as a source of Ca²⁺, Mg²⁺, P, and other essential minerals for the correct development of the embryos. After being obtained, they were washed thoroughly with distilled water to remove all residues of the egg white and to clean the surface. Then, they were dried in an oven at 90 °C for 30 minutes. The eggshell was pulverized with a mortar, and the various amounts to be tested were weighed on an analytical balance. Then, they were stored in centrifuge tubes with a screw cap to avoid contamination and facilitate manipulation. They were finally sterilized using an autoclave and UV light.

Quantitative analysis of the mineral composition of the supplement. To determine the contents of Ca²⁺, Mg²⁺, and P in the eggshells used as mineral supplements (Table I), the methods described in NMX-066 (1978) were used.

Preparation of the incubation system and placement of the embryo. The transfer and placement of the embryo was performed in an *ex-ovo* incubation system, following the method described by Tahara & Obara (2014). An artificial incubation system consisted of a plastic cup (PET plastic) with

a capacity of 355 mL. Subsequently, a concave chamber was developed in which the embryo could be placed for its development. This chamber was designed using a Teflon plastic wrap (plastic film). This allows the gas exchange required for adequate oxygenation. At the cup's bottom, an aqueous solution of 0.001 % benzalkonium chloride (BKC) was placed to maintain the humidity in the cup, avoid embryo desiccation, and to keep the cup clean and sterile. Once the

incubation system was built, it was sealed with the top of a Petri dish to be sterilized in a UV light chamber for a period between 12 and 24 h. Finally, before proceeding with the embryo extraction, the pulverized eggshell for the mineral supplement test was added to 1 mL of distilled water to allow the gradual assimilation of the minerals by the embryo (Fig. 1).

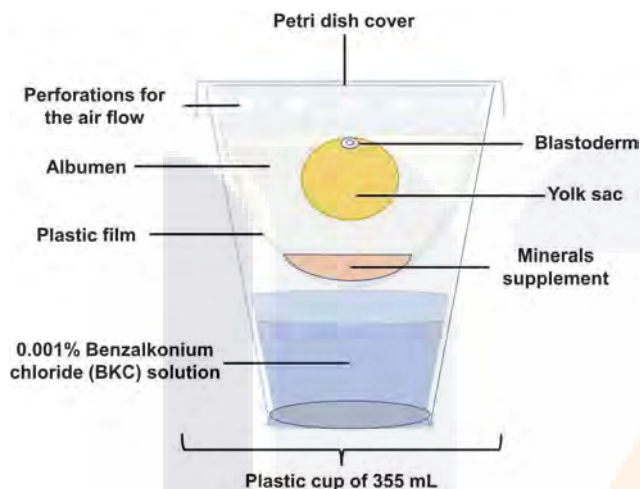


Fig. 1. Diagram of the *ex-ovo* incubation system.

Before extracting the embryos, the surface of the eggshell was sterilized with a sterile gauze pad impregnated with 70 % ethyl alcohol and cleaned in a single direction. Then, in a sterile space, the eggs were placed horizontally to allow the yolk sac to move to the top of the egg. After that, the eggs were quickly turned over 180°, and using a spatula, the eggs were cracked in the middle section to avoid embryo damage. The content of the eggs was placed in the incubation chamber of the *ex-ovo* incubation system and then closed with a Petri dish top. Finally, the incubation systems were placed inside the incubator to continue with embryonic development.

Three different tests were performed to evaluate the necessary conditions that allowed optimal development of the chick embryos:

Mineral supplement test (Ca^{2+} , Mg^{2+} , P). Experimental groups with five embryos each were implemented to test the effect of different amounts of pulverized eggshell as a mineral supplement (Table II): 300, 600, 900, 1200, 2500 and 5000 mg were tested. A volume of 40 mL of 0.001 % BKC solution and a preincubation time of 56 h were used.

Humidity test. Experimental groups with five embryos each were implemented to test the effect of the 0.001 % BKC solution volume (Table III): 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 and 70 mL. All the incubation systems were enriched with 900 mg of pulverized eggshells and a preincubation time of 56 h.

Preincubation time test. Experimental groups with ten embryos each were used to test the effect of preincubation time (Table IV): 32, 56 and 80 h were tested. After that, they were incubated at 37.5 °C with 900 mg of pulverized eggshell and 40 mL of 0.001 % BKC solution.

Table II. Average development time reached with different quantities of pulverized eggshell.

Incubation system number	Quantity of grounded eggshell (mg)	Days of development reached
1 - 5	300	5.2
6 - 10	600	8.8
11 - 15	900	16
16 - 20	1200	12.8
21 - 25	2500	2.2
26 - 30	5000	1.2

Table III. Average development time reached with the 0.001 % benzalkonium chloride solution treatment.

Incubation system number	Volume of 0.001% BKC solution (mL)	Days of development reached
1 - 5	0	1.5
6 - 10	10	2.3
11 - 15	20	5.3
16 - 20	30	10.5
21 - 25	40	16.5
26 - 30	50	11.8
31 - 35	60	4
36 - 40	70	1.8

Tissue processing and histological staining. Four embryos, corresponding to four different stages of development (52 h, 3 d, 4 d and 19 days), were fixed in Bouin solution (Ellenburg *et al.*, 2020). The fixation time varied depending on the organism size to correctly fix the tissue. Afterward, the embryos were washed with water to remove excess Bouin fixative. The next steps regarding dehydration and clearing of the tissues were performed with the use of a Tissue Processor (Leica model TP1020). Then, paraffin infiltration was performed for sectioning. The slides were stained with hematoxylin-eosin, Masson's trichrome and Klüver-Barra (Kluver & Barrera, 1953) to observe and compare the structures that are present during each different stage. An optical microscope (Nikon Eclipse NI-SS) was used.

Data analysis. For the determination of the age of the organisms, the methodology proposed by Hamburger & Hamilton (1992) was used for the embryo development stages. This result was also corroborated by the time of incubation registered for each organism. Statistical analysis was performed by t test using GraphPad Prism 8.00 software (GraphPad Software, San Diego, California USA).

RESULTS

A total of 100 eggs were used, of which 18 were not fertilized or suffered damage during the extraction of the embryo. In the *ex-ovo* incubation, different development times were achieved, from 0 (Fig. 2A), 3 (Fig. 2B), and 4 (Fig. 2C) days of development to 19 days of development (Fig. 2F). It was also possible to observe the morphology and ethology of the organisms and their different stages.

When performing the quantitative analysis of the minerals present in the eggshell, an average of 323.66 mg Ca^{2+} /g eggshell, 5.1275 mg Mg^{2+} /g eggshell and 1.09 mg P/g eggshell was determined. In the mineral supplement test (Fig. 3A), the tests with 900 mg of pulverized eggshell reached the longest development time with an average of 16 days, followed by the test with 1200 mg with an average of 12.8 days. However, the statistical analysis (with a P value of 0.984 with a confidence level of 95 %) indicated that there was no significant difference between 900 and 1200 mg; rather, embryos that received these 2 levels of eggshell achieved the same development time.

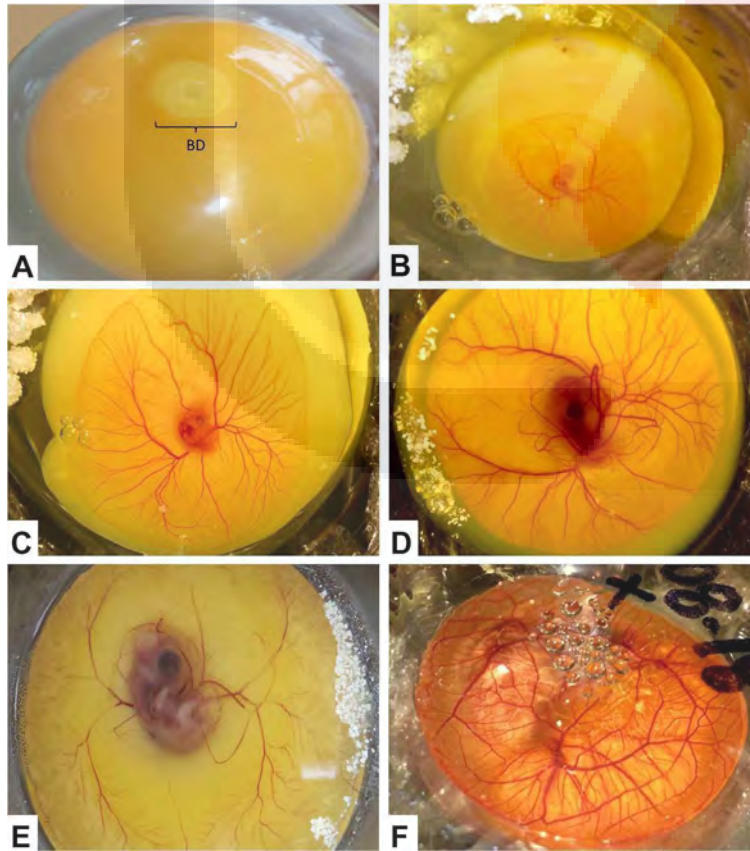


Fig. 2. Different stages of the *G. gallus domesticus* embryos used in the *ex-ovo* development: A) fertilized egg with blastoderm (BD), B) embryo of 3 days (Stage 18 HH), C) embryo of 4 days (Stage 23 HH), D) embryo of 7 days (Stage 30 HH), E) embryo of 8 days (Stage 34 HH), F) embryo of 19 days (Stage 45 HH).

For the humidity test (Fig. 3B), forty eggs were incubated; however, seven eggs were not fertilized. From the five tests, 40 mL of a 0.001 % solution of BKC allowed the longest development time, with an average of 16.5 days.

For the preincubation test (Fig. 3C), thirty eggs were incubated, but only nineteen were fertilized or did not suffer damage during the extraction. The preincubation time under 32 hours gave an average of only 2 days of development; in contrast, a preincubation of 56 hours reached an average of 15 days of development, and by performing the 80 hours

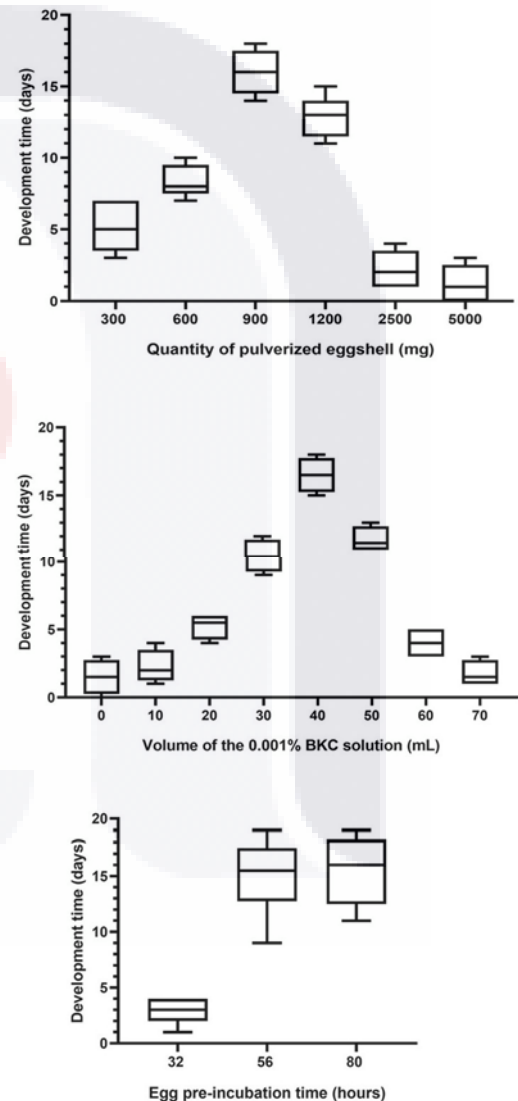


Fig. 3. Graphics of the *ex-ovo* incubation tests; A) embryo development time reached by the quantity of pulverized eggshell, B) embryo development time reached by the quantity of the 0.001 % BKC solution volume, C) embryo development time reached with the egg preincubation time. Made with GraphPad Prism 8 software.

preincubation time, the test reached an average of 15.5 days of development. In the statistical analysis of the 56 and 80 h periods, the results showed a P value of 0.7952 with a confidence level of 95 %; therefore, there was no statistically

significant difference between the two periods. Through histological processing (Fig. 4), the anatomy of the embryos and the tissues during embryonic development could be compared (Fig. 5).

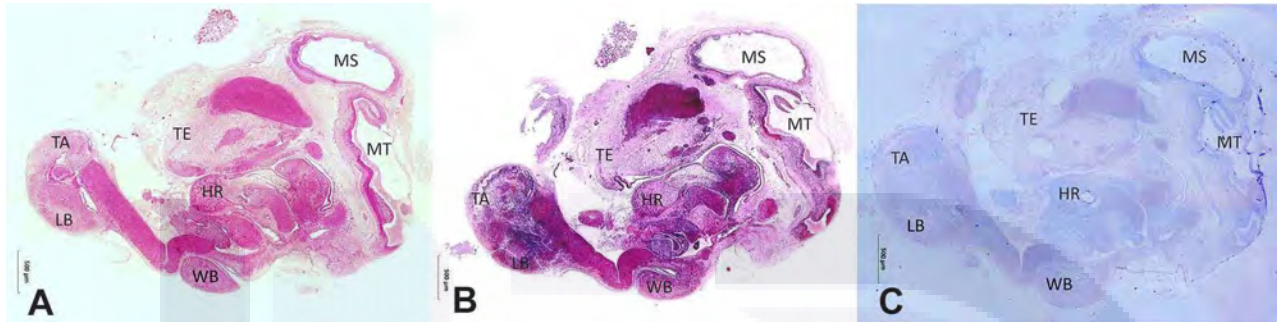


Fig. 4. Embryo (sagittal plane) with 3 days of development (Stage 18 HH). Three stains: A) hematoxylin-eosin, B) Mason's trichrome, C) Klüver-Barrera. Heart (HR), telencephalon (TE), mesencephalon (MS), metencephalon (MT), wing bud (WB), leg bud (LB) and tail (TA).

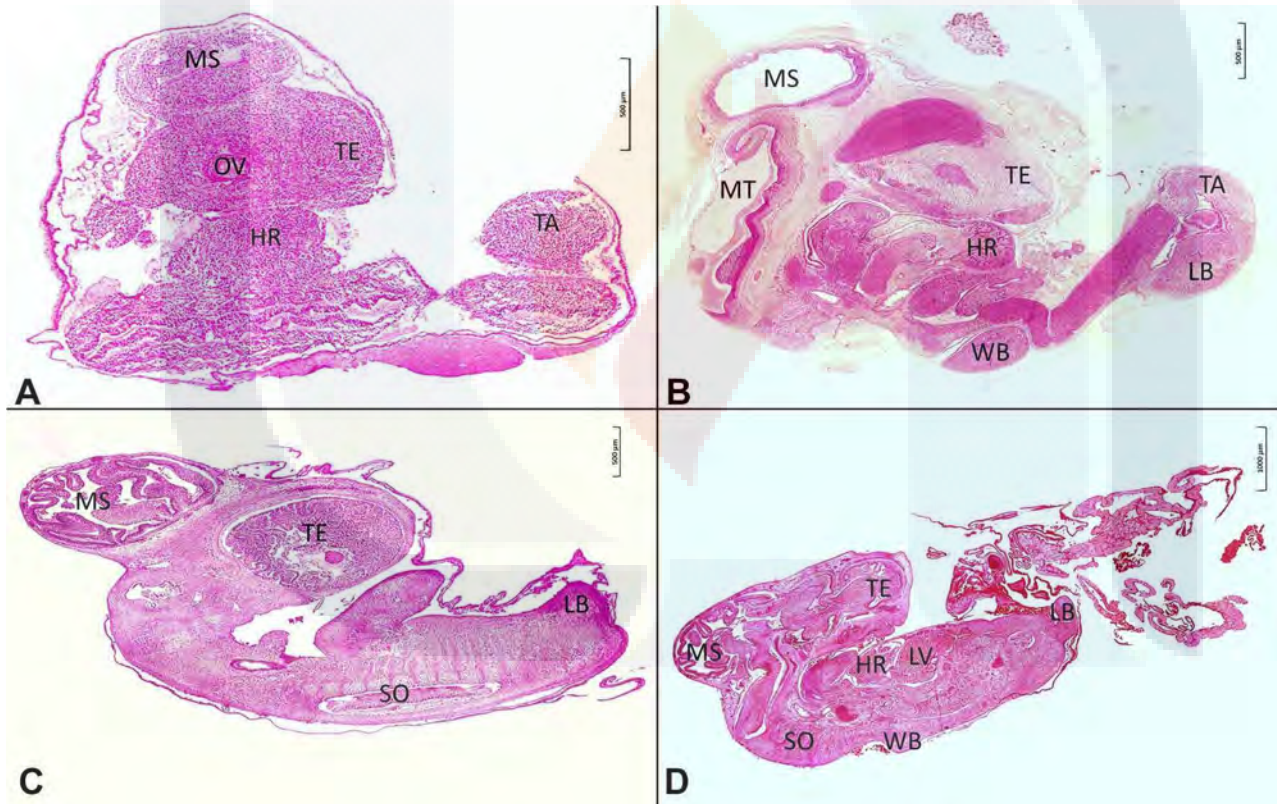


Fig. 5. Embryos (sagittal plane) with different days of development: A) 36 hours, B) 3 days, C) 4 days, D) 5 days. Heart (HR), telencephalon (TE), mesencephalon (MS), metencephalon (MT), wing bud (WB), leg bud (LB), tail (TA), optical vesicle (OV), somites (SO) and liver (LV).

DISCUSSION

Initially, the sterilization of the pulverized eggshell was performed inside a UV light chamber for one day; however, this resulted in contamination of the incubation systems, so it

was decided to use an autoclave machine for 15 minutes at a temperature of 120 °C and a pressure of 15 psi. Once the process was performed, the tubes were stored inside the UV

light chamber until they were needed for the tests. In the subsequent tests, there were no contamination problems.

The absence of fertilized eggs complicated some tests because the embryos were extracted during the initial stages of development, so techniques such as egg candling (Adegbenjo *et al.*, 2020) could not be used to determine fertilization. Another factor that affected the tests was damage to the yolk sac during the extraction, causing the death of the organism. In the articles that were reviewed, there was not a clear mention of the correct method for embryo extraction, so we tried different tools and found positive results with the use of a spatula. By performing the preincubation test (Table IV), a certain pattern was observed regarding the fragility of the yolk sac through the preincubation time. After 80 h of preincubation, despite the precautions taken, four out of ten eggs were broken. By examining the broken eggs, it was found that the consistency of the yolk sac was more fragile because of the effects of vascularization. After 56 h of preincubation, when the embryo was less developed, there were no effects present; similarly, preincubation for 32 h had no complications in the extraction. In this test, although 56 and 80 h were statistically equal, the higher risk of damage in the yolk sac of the egg preincubated at 80 h showed complications, and by using the 56 h period, the embryos could be easily extracted and reached a development time of 19 days. In their tests, Tahara & Obara (2014) reported that in a preincubation of less than 48 hours, a development of only 8 days could be reached, and with a period of 56 h, a development time of 17 days could be reached.

Pulverized eggshell, which was used by Kamihira *et al.* (1998) for the *ex-ovo* development of quail embryos, yielded positive results, but the embryos had a low hatchability. In our tests, the pulverized eggshell provided an effective mineral supplement for achieving late development stages. Tahara *et al.* (2021) used calcium carbonate directly in chorioallantoic membranes and reported the importance of the position of the mineral supplement for the correct absorption by the embryo. In the tests performed in the present study, the pulverized eggshell was placed near the yolk sac, so it is possible that not all the minerals were correctly absorbed. In the quantitative analysis of the minerals of the eggshell, Brun *et al.* (2013) reported a high content of calcium, 381 $\pm$ 89 mg Ca²⁺/g

eggshell, as well as 4 mg Mg/g eggshell and 1.05 mg P/g eggshell. These quantities were consistent with the values that were obtained in the analysis.

The 0.001 % BKC solution helped to maintain the normal levels of humidity needed for the organisms not to desiccate despite the fact that the incubation system was sealed. By not applying an appropriate amount of the BKC solution, the embryo could die due to excess humidity or a lack of humidity, as shown in Table III. A solution of 40 mL allowed a longer development time.

Temperature is an incubation factor that impacts the development of embryos. As mentioned by Vilches-Moure (2019), chicken embryos are poikilothermic during their early stages of life, so they require an external heat source for correct development. The optimal incubation temperature for chicks is 37.5 °C, as it helps in the metabolism of the embryo (Noiva *et al.*, 2014). In the experiments, the use of a digital thermometer helped to accurately determine the temperature necessary in the incubation chamber for appropriate development. Another important factor for the correct incubation of the chicks involves the use of oxygen; however, for this study, there was no oxygen employed in the methods that would allow the correct supplementation to the embryos. In the work done by Tahara & Obara (2014), it was reported that 14 eggs were supplied with oxygen, but only 8 (57.1 %) survived, thanks to this method, and the ones that did not have oxygen supplementation could not develop further. These results could explain why there were complications in the development of chicks and why none could hatch, but more studies that could establish the optimal incubation conditions are needed.

In the different tests, it could be seen how while the development time was passing by, the survivability of the incubated embryos decreased, as was reported by Andacht *et al.* (2004). By performing an *ex-ovo* incubation of the embryos, the hatchability tended to be reduced; however, by supplying the correct conditions, the development time achieved could be improved, as reported by Tahara & Obara (2014).

CONCLUSION

To be able to carry out the *ex-ovo* embryonic development of *Gallus gallus domesticus*, it is necessary to provide adequate conditions for its development, appropriate mineral supplements, oxygen, humidity, and temperature. However, the correct procedure for the creation of the incubation system and the periods of incubation of the embryo should also be considered to achieve a successful

Table IV. Average development time reached using different times of preincubation.

Incubation system number	Egg pre-incubation time (hours)	Days of development reached
1 - 10	32	2.9
11 - 20	56	15
21 - 30	80	15.5

extraction, which will allow a longer development time to be reached. Despite that in all experiments done, none of the incubated organisms reached the end of their development, and significant progress was made in the standardization of a method that allows *ex-ovo* embryonic development until 19 days. Additionally, this versatile study of *ex-ovo* development has provided methods for different preparation techniques with the purpose of evaluating the effects of these different incubation procedures on the tissues of the developing organisms.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Adriana Cecilia Moreno Flores and Fabiola Galindo Guerrero from the Cellular and Tissue Biology Laboratory and technician Sonia Sofia Cruz Muñoz from the Morphology Laboratory for their support during the histological preparations. We would also like to thank Biol. Araceli Adabache Ortiz for her support in the imaging of the stained slides.

MACÍAS, M. O.; GUERRERO, B. A. L.; VALDIVIA, F. A. G.; QUEZADA, T. T.; AVELAR, G. F. J.; SOTO, P. M. M. & DE SANTIAGO, A. S. Estudio inicial del desarrollo embrionario *ex-ovo* de *Gallus gallus domesticus*. *Int. J. Morphol.*, 41(2):668-674, 2023.

RESUMEN: El pollo doméstico es una especie de ave que ha sido ampliamente estudiada en cuanto a su biología y como organismo modelo para la ciencia. La reproducción de la especie es por la puesta de huevos fecundados, que en un período de 21 días desarrollarán un polluelo en su interior. Se han descrito varios métodos para desarrollar embriones *ex-ovo*, permitiendo la observación y manipulación del organismo. Este trabajo tuvo como objetivo estandarizar un método que permita el desarrollo de los embriones dentro del sistema de incubación artificial, el cual tiene un bajo costo y es fácil de realizar. En este trabajo se utilizaron 100 huevos de gallina para estudiar los efectos de la humedad, la suplementación mineral y el tiempo de preincubación del huevo sobre la incubación *ex-ovo* de los embriones. El desarrollo embrionario se documentó a través de los diferentes días. Se seleccionó la cáscara de huevo pulverizada como una fuente óptima para proporcionar calcio, magnesio, fósforo y otros minerales al embrión en desarrollo. Al suministrar 900-1200 mg de cáscara de huevo pulverizada, 40 mL de la solución de cloruro de benzalconio al 0.001 % y un tiempo de preincubación de aproximadamente 56 h, los embriones lograron desarrollarse hasta los 19 días, y aunque no llegaron a eclosionar, los embriones lograron desarrollarse hasta los 19 días. Se lograron condiciones de incubación que permitieron la supervivencia y desarrollo de los embriones hasta etapas tardías. Así, debido a las condiciones establecidas de calcio, humedad y tiempo de preincubación, en el presente trabajo los pollos alcanzaron los 19 días de desarrollo.

PALABRAS CLAVE: Aves; Desarrollo embrionario; Incubación *ex ovo*; *Gallus gallus domesticus*; Condiciones de incubación.

REFERENCES

- Adegbenjo, A. O.; Liu, L. & Ngadi, M. Non-destructive assessment of chicken egg fertility. *Sensors (Basel)*, 20(19):5546, 2020.
- Andacht, T.; Hu, W. & Ivarie, R. Rapid and improved method for windowing eggs accessing the stage X chicken embryo. *Mol. Reprod. Dev.*, 69(1):31-4, 2004.
- Boone, M. A method of growing chick embryos in vitro. *Poult. Sci.*, 42(4):916-21, 1963.
- Borwompinyo, S.; Brake, J.; Mozdziak, P. E. & Petite, J. N. Culture of chicken embryos in surrogate eggshells. *Poult. Sci.*, 84(9):1477-82, 2005.
- Dunn, B. E. Technique for shell-less culture of the 72-hour avian embryo. *Poult. Sci.*, 53(1):409-12, 1974.
- Ellenburg, J. L.; Kolettis, P.; Drwiega, J. C.; Posey, A. M.; Goldberg, M.; Mehrad, M.; Giannico, G. & Gordetsky, J. Formalin versus bouin solution for testis biopsies: which is the better fixative? *Clin. Pathol.*, 13:2632010X19897262, 2020.
- Fisher, C. *Chick Embryos in Shell-Less Culture*. Toronto, Association for Biology Laboratory Education, 1993.
- Hamburger, V. & Hamilton, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Dev. Dyn.*, 195(4):231-72, 1992.
- Kamihira, M.; Oguchi, S.; Tachibana, A.; Kitagawa, Y. & Iijima, S. Improved hatching for in vitro quail embryo culture using surrogate eggshell and artificial vessel. *Dev. Growth Differ.*, 40(4):449-55, 1998.
- Kamihira, M.; Ono, K.; Esaka, K.; Nishijima, K.; Kigaku, R.; Komatsu, H.; Yamashita, T.; Kyogoku, K. & Iijima, S. High-level expression of single-chain Fv-Fc fusion protein in serum and egg white of genetically manipulated chickens by using a retroviral vector. *J. Virol.*, 79(17):10864-74, 2005.
- Kliver, H. & Barrera, E. A method for the combined staining of cells and fibers in the Nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 12(4):400-3, 1953.
- NMX-066. *Determinación de Cenizas en Alimentos*. Ciudad de México, Dirección General de Normas, 1978.
- Noiva, R. M.; Menezes, A. C. & Peleteiro, M. C. Influence of temperature and humidity manipulation on chicken embryonic development. *BMC Vet. Res.*, 10:234, 2014.
- Perry, M. M. A complete culture system for the chick embryo. *Nature*, 331(6151):70-2, 1988.
- Tahara, Y. & Obara, K. A novel shell-less culture system for chick embryos using a plastic film as culture vessels. *Japan Poult. Sci. Assoc.*, 51(3):307-12, 2014.
- Tahara, Y.; Obara, K. & Kamihira, M. Calcium carbonate supplementation to chorioallantoic membranes improves hatchability in shell-less chick embryo culture. *J. Biosci. Bioeng.*, 131(3):314-9, 2021.
- Vilches-Moure, J. G. Embryonic chicken (*Gallus gallus domesticus*) as a model of cardiac biology and development. *Comp. Med.*, 69(3):184-203, 2019.

Corresponding author:

Alma Lilian Guerrero Barrera
Laboratorio de Biología Celular y Tisular
Departamento de Morfología
Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes
Av. Universidad #940 Aguascalientes
MÉXICO

E-mail: lilian.guerrero@edu.uaa.mx

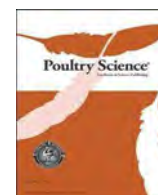
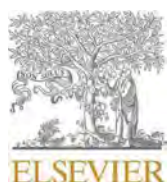
7. Capítulo III

Artículo 2

Poultry Science



“Development of external morphological malformations induced by hyperthermia exposure during the blastula stage in an ex-ovo (shell-less) culture of *Gallus gallus domesticus* embryos”.



Full-Length Article

Development of external morphological malformations induced by hyperthermia exposure during the blastula stage in an ex-ovo (shell-less) culture of *Gallus gallus domesticus* embryos

Osvaldo Macias-Marin ^a, Alma L. Guerrero-Barrera ^{a,*}, Arturo G. Valdivia-Flores ^b, Teodulo Quezada-Tristan ^b, Flor Y. Ramirez-Castillo ^a, Adriana C. Moreno-Flores ^a, Fabiola Galindo-Guerrero ^a, Francisco J. Avelar-Gonzalez ^c, Adriana D. Rodriguez-Padilla ^d

^a Laboratory of Cell and Tissue Biology, Department of Morphology, Basic Sciences Center, Autonomous University of Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico

^b Department of Veterinary Sciences, Agricultural Sciences Center, Autonomous University of Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico

^c Laboratory of Environmental Studies, Department of Physiology and Pharmacology, Basic Sciences Center, Autonomous University of Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico

^d Department of Statistics, National Institute of Statistics and Geography, Aguascalientes, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Embryonic development
Ex-ovo incubation
Hyperthermia
Malformation
Teratogen

ABSTRACT

The chicken is a valuable model to study embryonic development, genetic manipulation, regenerative medicine, tumorigenesis, vaccine development, toxicology, and teratology research. Different methods have been described for incubating chicken embryos outside the eggshell (ex-ovo or shell-less incubation). To date, no studies have focused on using ex-ovo incubation as a model to study the effects of hyperthermia as a teratogen. In this work, a total of 350 fertile chicken eggs were used to study the development of congenital malformations in an ex-ovo and in-ovo incubation system exposed to normal (37.5°C) and hyperthermia conditions (40°C). In the ex-ovo hyperthermia test, all ex-ovo embryos ($n = 50$) developed malformations; only 0.02 % reached 5 days of development. In the ex-ovo normal temperature group, none of the ex-ovo embryos developed malformations, and 48 % reached 21 days of development; there was no significant morphological difference between the ex-ovo normal temperature and the in-ovo normal temperature group. The time of exposure to hyperthermia conditions is crucial for the development of malformations, with the blastula stage (0 h) being the most susceptible. Blastula stage malformations, neural tube defects, microphthalmia, amelia, gastroschisis, caudal regression, and the development of twinning were identified. The ex-ovo incubation system does not increase the risk of the development of malformations, and it is a viable model for studying the effects of teratogens, as well as the morphology and physiology of the embryo.

Introduction

Throughout history, the chicken has been a valuable model to study embryonic development in vertebrates due to its availability, low price, and easy accessibility to the embryo (Mok et al., 2015; Vilches-Moure, 2019; Wittig and Münsterberg, 2016). The culture of chicken embryos has also been applied to embryo genetic manipulation, regenerative medicine, tumorigenesis, vaccine development, toxicology, and teratology research (Naik et al., 2018; Tahara et al., 2021). The field of teratology studies congenital anomalies or malformations and the external factors (biological agents, drugs, chemicals, radiation,

temperature) that cause them, which are called teratogens (Vargesson and Fraga, 2017; Wachholz et al., 2021).

Several studies have shown the effects of temperature as a teratogen in the development of bird species (Noiva et al., 2014); the incubation temperature is a crucial determinant for successful incubation; chicken embryos require an incubation temperature range of $37.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ for an optimal hatching rate (Tona et al., 2022). Research has shown that a 1°C change from the incubation temperature can significantly affect the organisms (French, 1994). Hyperthermia is an abnormally high body temperature caused by diverse sources, like an infection or exposure to a heat source (Edwards, 1986). Research has proven that hyperthermia is

* Corresponding author.

E-mail address: lilian.guerrero@edu.uaa.mx (A.L. Guerrero-Barrera).

<https://doi.org/10.1016/j.psj.2025.105341>

Received 19 March 2025; Accepted 25 May 2025

Available online 26 May 2025

0032-5791/© 2025 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of Poultry Science Association Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

a teratogen causing severe malformations, embryonic death, and growth retardation in birds, amphibians, reptiles, fish, and mammals, including humans, however, there have not been enough studies and focus on the effects on humans (Haghighi et al., 2021; Krausova and Peterka, 2007; Nariñç et al., 2016). The most frequent malformations after exposure to hyperthermic temperatures $\geq 40^{\circ}\text{C}$, are neural tube defects, anencephaly, microphthalmia, microcephaly, amelia, skeletal defects, and resorption of the embryo (Davey et al., 2018; Krausova and Peterka, 2007). Chicken embryos are classified as poikilothermic, meaning that their metabolism relies on the incubation temperature, which influences

the use of egg nutrients and embryo development, making them more susceptible to the effects of hyperthermia (Yalcin et al., 2022).

The ex-ovo culture (shell-less) is an incubation technique that allows the development of avian embryos like chicken and quails (Kamihira et al., 1998) in an in vitro incubation system to allow the observation of embryogenesis (Dunn et al., 1981; Macías-Marin et al., 2023; Tahara and Obara, 2014). This incubation technique consists of removing the embryo, yolk sac, and albumen to be incubated outside the egg and discarding the eggshell and the membranes (Boone, 1963; Dunn, 2023; Tahara and Obara, 2014; Tahara et al., 2021). The authors Tahara and Obara (2014) developed a simple and inexpensive culture method with a high hatchability; the artificial vessel was made with an ordinary plastic cup (PET), a polymethyl pentene (PMP) plastic film as the incubation chamber and supplying different culture conditions such as calcium and water supplementation and oxygen aeration.

Previous studies required the ex-ovo incubation to have a period of pre-incubation at 37.5°C within the egg (in-ovo) for the first 55–70 h to allow a successful development of the embryo and incubation, thus preventing the incubation from the blastula stage in the ex-ovo incubation system, and early embryo development research (Auerbach et al., 1974; Dunn, 1981; Kamihira et al., 1998; Tahara and Obara, 2014; Tahara et al., 2021). Ono et al. (2005) developed blue-breasted quail from the blastoderm stage to hatch using a chicken surrogate eggshell. The author Dunn (2023) described a method for successful ex-ovo incubation of chicken embryos without a pre-incubation period in-ovo, using a disc of Milli-Wrap membrane to allow embryo development from the blastoderm stage until hatching.

To date, no studies have focused on using ex-ovo incubation as a model to study the effects of hyperthermia as a teratogen. This research aimed to assess the impact of hyperthermia exposure on embryos incubated in an ex-ovo system, determine if the ex-ovo incubation caused the development of malformations, and finally demonstrate the importance of the ex-ovo incubation system as a model to study teratogens and research the real-time development of malformed embryos.

Materials and methods

Chicken eggs

Fertile specific pathogen-free (SPF) Bovans White eggs ($n = 350$) were sourced from "Specific pathogen-free poultry" ("ALPES", Sanfer, Mexico).

The temperature and mass of the eggs were measured before incubation. If the eggs were not incubated immediately, they were stored between 15.6 and 18.3°C to pause embryo development (diapause) until the incubation temperature was increased (Pokhrel et al., 2021).

The eggs were grouped in the ex-ovo (experimental group: hyperthermia and normal temperature) incubation tests and the in-ovo (control group: hyperthermia and normal temperature). This division aimed to determine whether the development of malformations could be correlated with the ex-ovo incubation system or the temperature (Table 1).

The in-ovo normal temperature eggs ($n = 50$) were placed in an automatic egg incubator (Harris Farms Nuture Right 360, Manna Pro®, Chesterfield, MO) set to a constant temperature of 37.5°C and a RH of 60

Table 1

Hyperthermia tests: embryo incubation groups.

Tests	In-ovo		Ex-ovo	
	Hyperthermia	Normal temperature	Hyperthermia	Normal temperature
Incubator	Nuture Right 360	Nuture Right 360	Labline 315	Labline 315
Number of eggs	50	50	50	50
Temperature	40°C	37.5°C	40°C	37.5°C
Relative Humidity	50–60 %	50–60 %	50–60 %	50–60 %
Egg turning	Automatic (90°/h)		Manual Rotation + Albumen Pipetting (every 4 h)	

%). For the in-ovo hyperthermia group, the eggs ($n = 50$) were placed in the automatic egg incubator set to a constant temperature of 40°C and a RH of 60 %.

The ex-ovo eggs were not pre-incubated before the extraction to allow an incubation outside the egg from the blastula stage (first day of incubation).

Preparation of the ex-ovo incubation system

The ex-ovo incubation systems were done following the method described by Tahara and Obara (2014) and with modifications described by Macías-Marin et al. (2023). The incubation system consisted of a polyethylene terephthalate (PET) plastic cup (Solo® TP12 Ultra Clear™ 12 oz, Mason, Michigan) filled with an aqueous solution (40 mL) of 0.01 % benzalkonium chloride (cat. no. 311040, Dermocleen®, degasa, Mexico), to maintain the internal RH. Above the solution, a chamber was placed to incubate the embryo, this chamber was made with a poly-methyl pentene (PMP) plastic wrap (F.O.R. WRAP, Riken Technos, Japan), stretched into a concave shape. The incubation system was closed with the bottom of a plastic or glass Petri dish; once the system was completed (Fig. 1), it was sterilized in a UV-C light chamber (222 nm wavelength) for 1 h.

Ex-ovo embryo incubation

The extraction of the embryo was performed inside a laminar flow cabinet (Lab Companion model BC-11H, Jeio Tech, South Korea), which was sterilized by spraying 70 % ethanol, subsequently, the ex-ovo incubation systems were placed inside it to be sterilized once again by UV light exposure for 15 min. Once the sterilization cycle was completed, the eggs were prepared for extraction; first, the eggs were placed horizontally to allow the movement of the yolk sac to the top of the egg, after that the surface of the eggs was disinfected by using 70 % ethanol wipes, wiping down and drying the surface in one direction, in accordance to the protocols described by Tahara et al. (2021) and Dunn (2023). Once the eggs were dry, they were immediately cut around the middle section using a rotatory tool (Dremel® 7760, Dremel Tools, Mount Prospect, IL) equipped with a dental circular saw, after the cut was made, a sterile scalpel was used to cut the egg's inner and outer membrane to help in the extraction, finally the eggs were opened inside the incubation chamber of the ex-ovo system, checking the presence and upper position of the blastoderm to determine a fertile egg. Finally, the system was closed with the Petri dish and placed inside the CO_2 incubator (Labline® model 315, Springfield, IL) coupled with an oxygen concentrator (CAIRE® Companion 5, CAIRE Inc., Ball Ground, GA) to provide 500 mL/h of O_2 to the embryos from day 14th until 21st, The O_2 levels were fixed at 21 % with a sensor (BH-90A Single Gas Detector, Henan Bosc Electronic CO., LTD, China). Another gas sensor (Aranet4 Home, SAF Tehnika JSC, Latvia) was placed inside the incubator to maintain the CO_2 levels around 1.0 % (measuring an average of 10013 ppm) during the initial incubation period (from day 1–10) and hatching (from day



Fig. 1. Diagram of the ex-ovo incubation system.

18–21), in the middle incubation period (day 11–17) the CO_2 levels were decreased to 0.4 % as described by Tong et al. (2015) and Liu et al. (2022), to achieve a better incubation and hatching. For calcium supplementation, 250 mg of calcium carbonate (cat. no. 030-00385, Fuji-film Wako Pure Chemical Corporation, Japan) was supplied directly over the chorioallantoic membrane (CAM) on the 10th day of incubation. Due to the inaccessibility of Milli-Wrap membrane (Dunn, 2023), a two-stage process was done to allow the development of the embryos from the blastula stage (Fig. 2): (1) Transfer of the egg's outer thin albumen to cover and humidify the blastoderm and yolk sac surface (until 6 d), (2) Manual rotation (360°) of the ex-ovo culture by tilting it at a 45° angle (until 18 d), ensuring a proper movement of the yolk sac to detach it from the walls of the incubation chamber. The temperatures were measured using a thermal camera (FLIR ONE® Edge Pro, Teledyne Technologies, Thousand Oaks, CA) and a digital thermometer/hygrometer (Digital Combo, Zoo Med Laboratories Inc., San Luis Obispo, CA) placed inside the incubator to get more accurate readings.

Hyperthermia test

In a previous study (Macías-Marin et al., 2023), we observed the development of embryos with malformations at an incubation temperature of 40°C and RH of 60 % (data not shown); for these tests, we continue with that temperature and RH set value. Experimental group to determine the effects of a hyperthermia incubation (Table 1): Ex-ovo hyperthermia ($n = 50$, 40°C , RH 60 %, Labline 315), Ex-ovo normal temperature ($n = 50$, 37.5°C , RH 60 %, Labline 315), In-ovo hyperthermia ($n = 50$, 37.5°C , RH 60 %, Nurture Right 360 Incubator), and In-ovo normal temperature ($n = 50$, 37.5°C , RH 60 %, Nurture Right 360 Incubator). The normal temperature group was developed to verify that the development of malformations is correlated to the incubation temperature and not the ex-ovo incubation system. To compare the development ex-ovo, the control group was prepared in-ovo to analyze the morphological differences in the incubation (Figs. 3A and 4).

Hyperthermia exposure time test

Test of experimental groups to determine the effects of hyperthermia incubation in an ex-ovo incubation during three different incubation times (Table 2): 0 h ($n = 50$, 40°C , RH 60 %, Labline 315), 24 h ($n = 50$, 40°C , RH 60 %, Labline 315), and 48 h ($n = 50$, 40°C , RH 60 %, Labline 315). These tests were developed to verify the sensitivity of the embryo in different stages to develop malformations (Fig. 3B and D).

Euthanasia of the organisms

Following the strict national and international guidelines for the care of chicken embryos and fetuses, the protocol for euthanasia of embryos that had achieved 80 % incubation (17 d) was cooling at $<4^\circ\text{C}$ in a fridge for 4 h. For the remaining days (18–21 d), electroencephalogram (EEG) activity suggests the potential for pain perception in conscious embryos (AVMA, 2020), so the appropriate protocol was the use of an anesthetic overdose (intravenous dose on the CAM of 120 mg/Kg of pentobarbital). To reduce the sacrifice of organisms, the organisms that reached the hatching period were examined, their mass and size measured and finally relocated to a farm to continue their growth.

Morphological analysis and malformations scoring

Once the euthanasia process was completed, an external morphological analysis and a visual scoring was performed on the organisms to determine the presence and identify the type of external malformation in the incubated embryos, using the in-ovo normal temperature embryos as control (Figs. 4 and 6), the data was corroborated with several articles that reported malformations on chicken embryos, and even research papers that reported malformations in other species that had not yet been described before for the chicken embryos (cojoined twins). To determine the age of the organisms, the results were corroborated with the times of incubation recorded, and the chicken development stages (HH) by Hamburger and Hamilton (1951) were used.

Tissue processing

The embryos were preserved by immersion in Bouin's fixative solution (HT10132-1 L, Sigma-Aldrich) for 24 h and stored in sample tubes.

Data analysis

Statistical analysis was performed using the t -test and one-way ANOVA using GraphPad Prism 8.00 software (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

Results

The technique employed for the “turning” of the ex-ovo incubation system (Fig. 2) allowed the development of embryos from the blastula stage, enabling ex-ovo incubation experiments without the in-ovo pre-

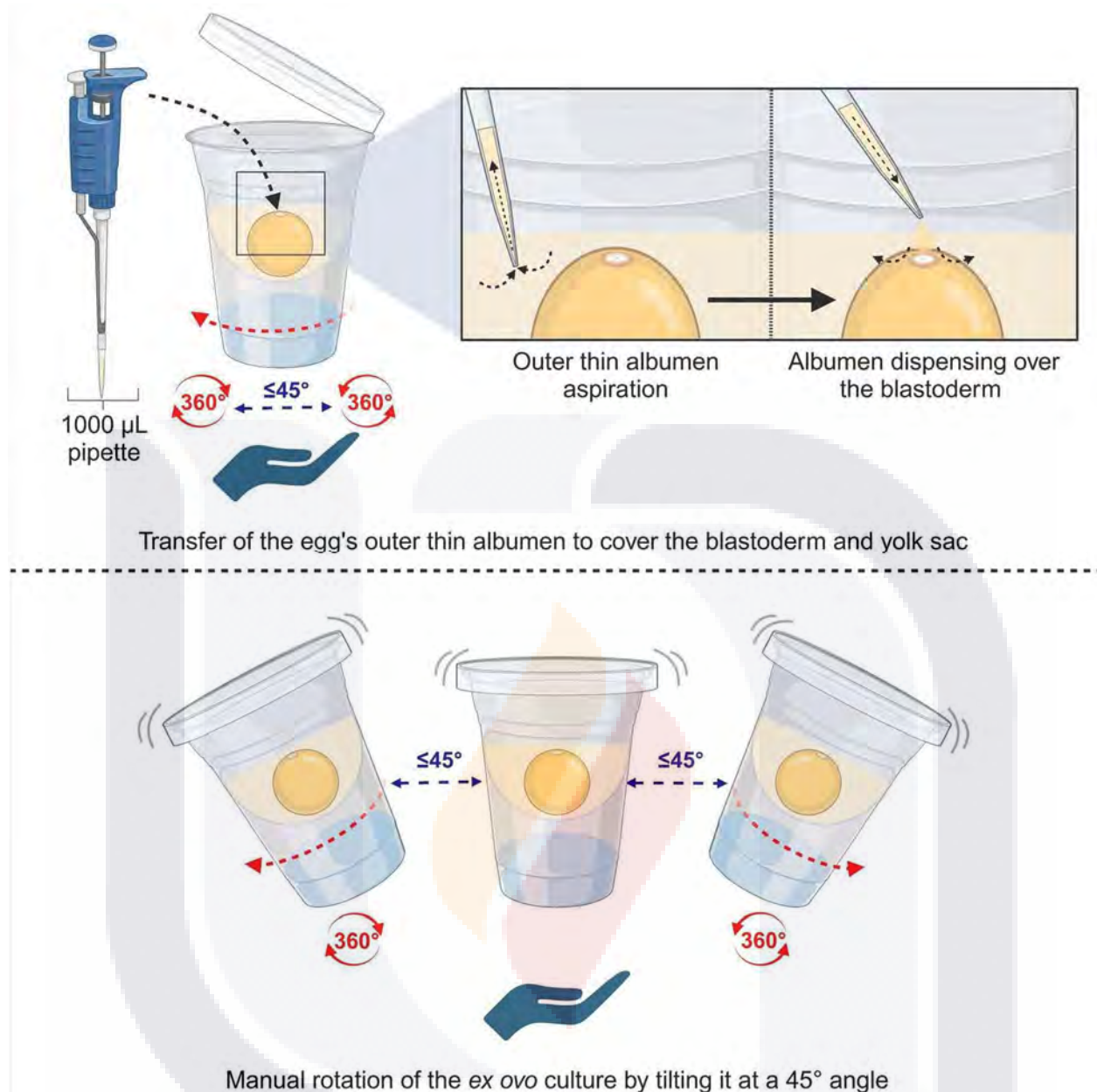


Fig. 2. Method for the rotation of the ex-ovo incubation system and humidification of the blastoderm to develop embryos without an in-ovo pre-incubation.

incubation.

A total of 150 eggs were used for the Hyperthermia test (Table 1), all the embryos ($n = 50$) of the ex-ovo hyperthermia group developed malformations, and only 0.02 % (1/50) reached 5 days of development (Fig. 3A), by comparison in the ex-ovo normal temperature group, none of the embryos developed malformations, and 48 % (24/50) reached 21 days of development. In the in-ovo normal temperature group, none of the embryos developed malformations, and there was a hatching of 96 % (48/50).

In the hyperthermia exposure time test, four groups of 50 eggs each were used (Table 2). The days of development reached by the embryos were measured (Fig. 3B), and there was a significant difference ($P \leq 0.05$) between the viability of the 0 – 48 h incubation times. However, when analyzing the malformations developed, there was a difference between the incubation times; by exposing the embryos during the blastula stage (0 h), all developed malformations; on the other hand, the frequency of malformations decreased by increasing the days of incubation (Fig. 4D).

A total of 169 embryos with malformations were identified (Figs. 5, 6 and Table 3): patterning defect (31.36 %), microcephaly (9.46 %), microphthalmia (26.62 %), heteropagus (0.59 %), cephalothoracopagus (0.59 %), amelia (11.24 %), encephalocele (4.73 %), ectopic heart (21.89 %), neural tube defects (28.40 %), caudal regression (7.69 %), polymelia (0.59 %), gastroschisis (12.42 %), anophthalmia (6.50 %), phocomelia (3.55 %) and hydrocephalus (8.28 %). The development of the embryos was observed and registered in vivo with the ex-ovo incubation system (Fig. 5). Necropsy analysis of the embryos helped with the identification of the malformations (Fig. 6).

Discussion

The development of a method that allowed the ex-ovo incubation of the embryos from the blastula stage enabled studies that required that development period, like the study of the effects of hyperthermia as a teratogen. Previous studies show that a method for the ex-ovo incubation of the blastoderm was not viable; authors reported major difficulties

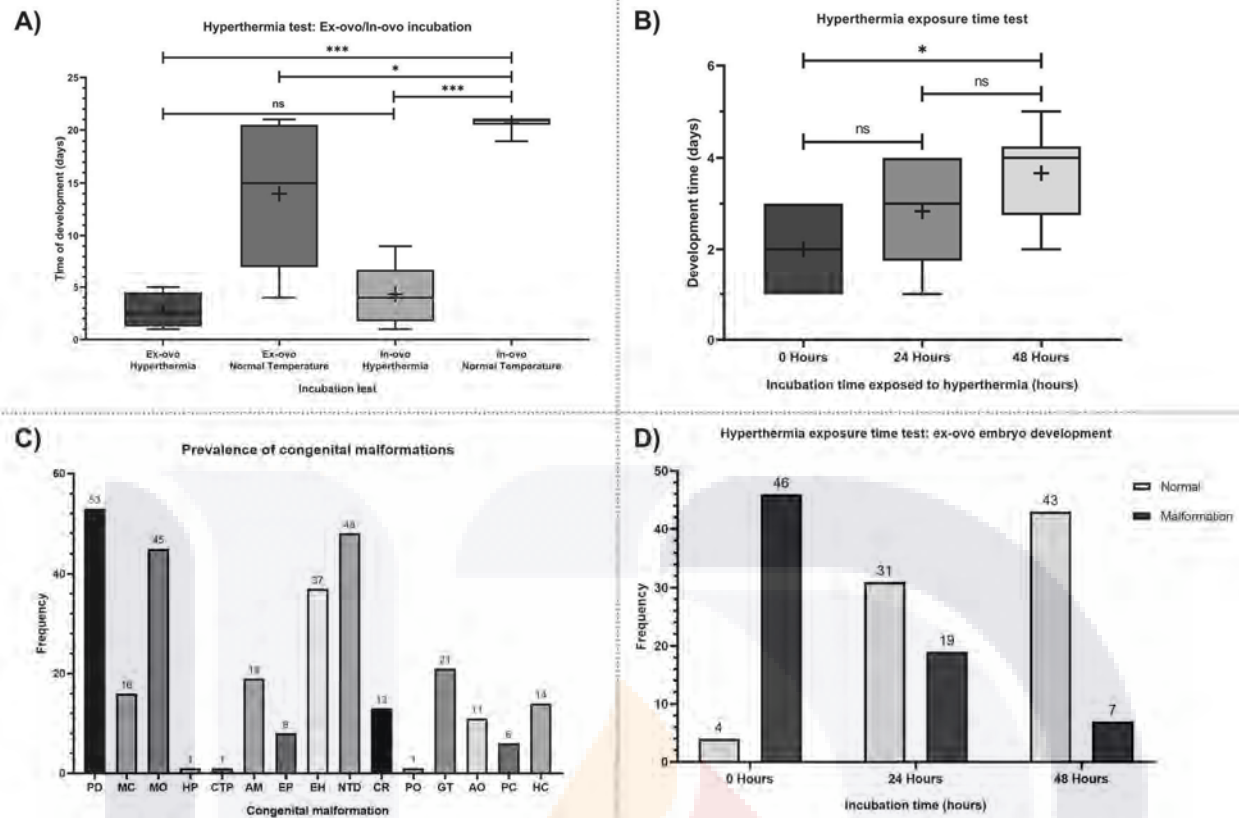


Fig. 3. Graphs of the ex-ovo incubation tests: (A) Hyperthermia test on the ex-ovo incubation, there is a significant difference ($P \leq 0.001$) between the days of development reached by the in-ovo normal temperature (21 d), the ex-ovo hyperthermia (5 d), and the in-ovo hyperthermia group (9 d). (B) Ex-ovo hyperthermia exposure time test, the 0 h and 24 h are non-significant ($P > 0.05$), the 24 h and 48 h exposure times are non-significant ($P > 0.05$), there is a significant difference $P \leq 0.05$ between the 0 h and 48 h tests. (C) Prevalence of the malformations on the ex-ovo incubation (PD: patterning defect, MC: microcephaly, MO: microphthalmia, HP: heteropagus twin, CTP: cephalothoracopagus twin, AM: amelia, EP: encephalocele, EH: ectopic heart, NTD: neural tube defect, CR: caudal regression, PO: polymelia, GT: gastroschisis, AO: anophthalmia, PC: phocomelia, HC: hydrocephalus), (D) Ex-ovo embryo development under a hyperthermia exposure time test (46/50 embryos developed malformations during the first 24 h, after the first day only 19/50, and finally after the second day only 7/50).

in maintaining the humidity of the blastoderm and yolk sac surface because the yolk sac tends to float to the surface of the incubation vessel above the surface level of the albumen, causing it to dry out. During the in-ovo incubation, the blastoderm requires the humidity, nutrients, and ions present in the albumen to secrete fluid downward from the surface albumen into the underlying yolk sac and embryo, allowing the metabolic processes the developing embryo requires (Dunn, 2023; New, 1956). Perry (1988) reported success in preventing the drying out of the blastoderm by bathing the yolk sac with the egg's albumen, thus allowing the development of the embryos, however, the incubation technique used a surrogate eggshell, not in an ex-ovo system. In the ex-ovo incubation systems, this technique of bathing the yolk sac with albumen proved ineffective in developing the embryos from the blastula stage until Dunn (2023) reported successful ex-ovo incubation from the blastula stage using a disc of Milli-Wrap membrane to maintain humidity and allow gas exchange.

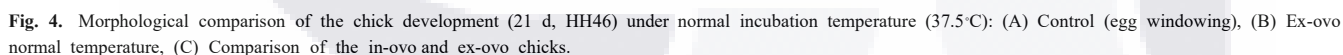
Here was used a modified method of bathing the yolk sac described by Perry (1988) to develop the embryo by pipetting albumen to cover and hydrate the blastoderm and yolk sac in combination with a rotation of the incubation system (Fig. 2); we achieved the development of the embryos from the blastula stage, reaching 21 days of development although none of the ex-ovo chicks hatch. The principal factor for the successful incubation was the frequency of the pipetting of albumen and rotation of the vessel (every 4 h), guaranteeing the proper humidification of the blastoderm and yolk sac surface, thus far allowing an incubation without alterations or malformations (Fig. 4B) compared with the control group (Fig. 4A–C). However, it must be noted that this procedure

was entirely manual, which takes more time to maintain each embryo and must be repeated every 4 h, thus reducing the number of embryos that could be incubated without compromising the optimal incubation care. An automated procedure that ensures the ex-ovo development from the blastula stage, like the one described by Dunn (2023) and Silver (1960), must be considered to allow a standardized high-throughput incubation.

One of the major advantages of an ex-ovo incubation from the blastula stage without a pre-incubation period is the ability to do research during these crucial stages of development and facilitate the extraction of the embryo for the ex-ovo incubation, as mentioned by Macías-Marín et al. (2023) during the in-ovo incubation as time progresses the yolk sac becomes more delicate and easy to break during the extraction, in contrast with the yolk sac during the initial stages of development which is more durable and resistant, thus improving the yield of ex-ovo incubation cultures that can be made.

One factor that could increase the risk of development of malformations is the time in which the eggs are incubated after being laid, as mentioned by Janikovičová et al. (2019), when time passes by and the eggs are not incubated promptly but stored (15–18°C, 75 % RH), there is an increase of malformations and mortality in the embryos. To reduce this risk, all the eggs were incubated on the same day the package of eggs arrived at the laboratory (approximately 2 days since the eggs were laid).

In the hyperthermia test, four incubation groups were analyzed; there was a significant difference between the time of development reached by the normal temperature ex-ovo incubation group and the



Tests	Exposure time		
	0 h	24 h	48 h
Number of eggs	50	50	50
Temperature	40°C	40°C	40°C
Relative Humidity	50–60 %	50–60 %	50–60 %
Egg turning	Manual Rotation + Albumen Pipetting (every 4 h)		

hyperthermia group ($P \leq 0.001$), and only the hyperthermia group embryos developed malformations. By comparing the two hyperthermia groups (ex-ovo and in-ovo), the results of the days of incubation reached were non-significant ($P > 0.05$); however, in the in-ovo incubation, three embryos did not show any external malformation, and one reached 9 days of development (Fig. 6V), without any major malformations besides a slight gastroschisis. This result could be attributed to the thermal properties of the eggshell compared to the plastic cup, or the presence of components in the egg's membranes that help in the development of the embryo; however, more research is needed to determine a difference in the incubation techniques, and also the use of biochemical or molecular procedures to identify the presence of non-morphological abnormalities.

The in-ovo normal temperature (control group) allowed for the best incubation of embryos; there was a significant difference ($P \leq 0.05$) between the in-ovo normal temperature and ex-ovo normal temperature groups, however by doing a morphological analysis in vivo by employing the windowing technique (Andacht et al., 2004) for the

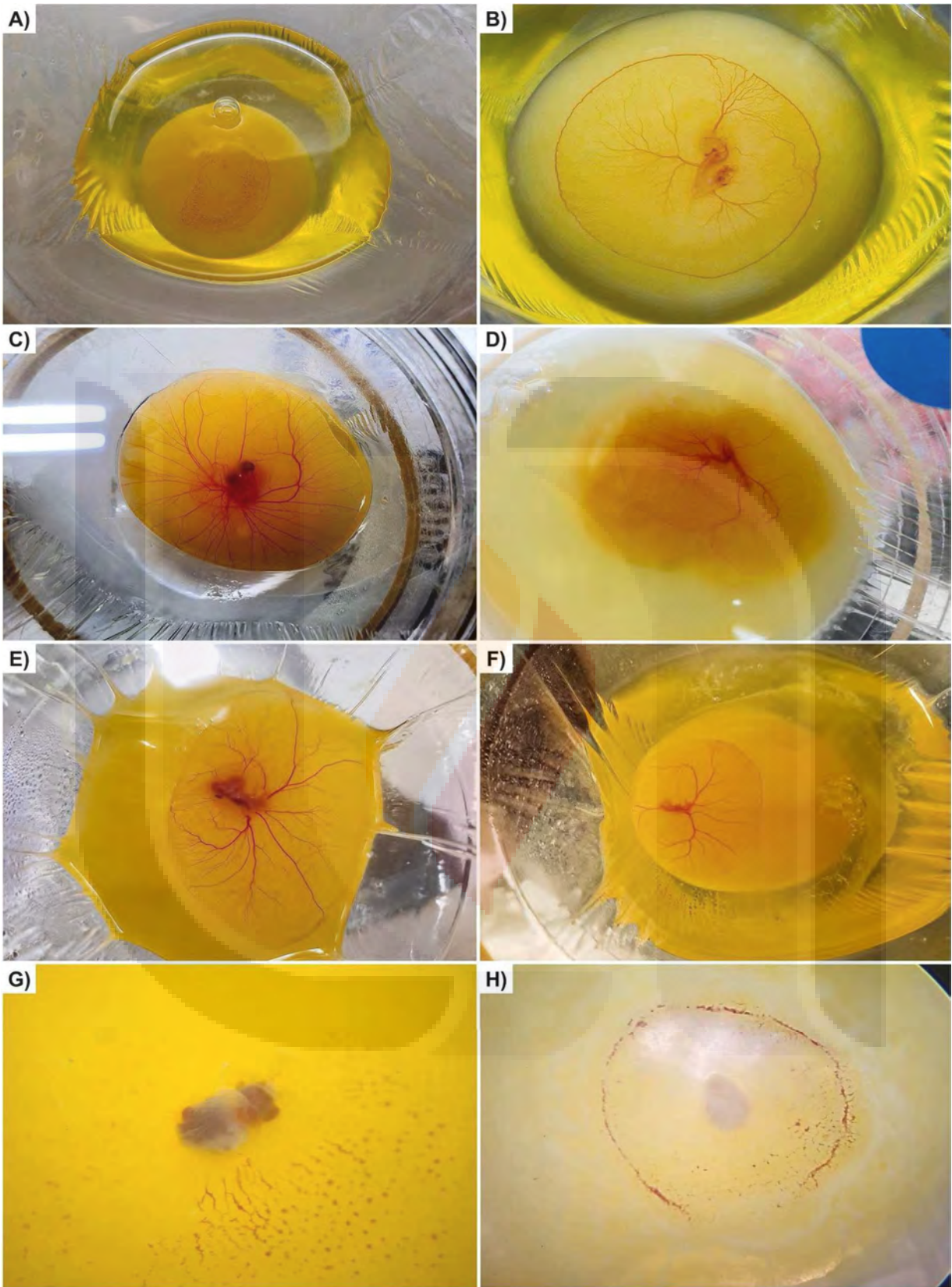


Fig. 5. Comparison of malformations in ex-ovo incubated embryos under hyperthermia conditions: (A) Patterning defect embryo (2 d, HH13), (B) Heteropagus twin embryo (3 d, HH23, an alteration of the left-right asymmetry can be observed), (C) Embryo with midbrain malformation and hypoplasia of the legs (4 d, HH24), (D) Cephalothoracopagus twin embryo (3 d, HH21), (E) Embryo with midbrain malformation and microphthalmia (4 d, HH25), (F) Embryo with midbrain malformation and amelia (3 d, HH19), (G) Embryo with a patterning defect (2 d, HH13), (H) Embryo with neural tube malformation (36 h, HH10).

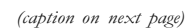


Fig. 6. Anatomical comparison of embryos incubated under hyperthermia conditions that developed malformations: (A) Control embryo (36 h, HH26), (B) Ex-ovo embryo with a neural tube defect (36 h, HH26), (C) Ex-ovo embryo with a neural tube defect (36 h, HH26), (D) In-ovo embryo with a neural tube defect (36 h, HH26), (E) Control embryo (48 h, HH 13), (F) Ex-ovo embryo with a patterning defect (48 h, HHI 3), (G) Ex-ovo embryo with a neural tube defect (48 h, HH 13), (H) In-ovo embryo with a patterning defect (48 h, HHI3), (I) Control embryo (3 d, HH18), (J) Ex-ovo cephalothoracopagus embryo (3 d, HH18), (K) Ex-ovo embryo with multiple malformations (3 d, HHI 8), (L) Control embryo (4 d, HH23), (M) Ex-ovo embryo with multiple malformations (4 d, HH23), (N) In-ovo embryo with multiple malformations (4 d, HH23), (O) Control embryo (5 d, HH26), (P) Ex-ovo heteropagus embryo (5 d, HH26), (Q) Ex-ovo embryo with multiple malformations (5 d, HH26), (R) Control embryo (6 d, HH28), (S) Ex-ovo embryo with multiple malformations (6 d, HH28), (T) In-ovo embryo with multiple malformations (6 d, HH28), (U) Control embryo (9 d, HH35), (V) In-ovo embryo with gastroschisis (9 d, HH35). Abbreviations: AN (Anterior neuropore), BK (Beak), BR (Brain), CAM (Chorioallantoic membrane) EY (Eye), FB (Forebrain), HT (Heart), HB (Hindbrain), HN (Hensen's node), IT (Intestines), LG (Leg), LLB (Lower limb bud), MB (Midbrain), NF (Neural folds), NT (Neural tube), OC (Optic cup), OCV (Oral cavity), OV (Optic vesicle), PN (Posterior neuropore), PS (Primitive streak), SO (Somites), TL (Tail), TF (Tail fold), ULB (Upper limb bud), WG (Wing).

Table 3
Types and frequency of morphological malformations in the hyperthermia ex-ovo/in-ovo embryos.

Malformation	Description	Frequency	
		(No.)	(%)
Anophthalmia	Absence of one or both eyes	11	6.51
Amelia	Absence of one or more limbs	19	11.24
Caudal Regression	Abnormal development of the lower part of the body (sacrum and lumbar spine)	13	7.69
Cephalothoracopagus	Imperfect fusion of the head and chest of conjoined twins, with separated columns, limbs, and pelvis		0.59
Ectopic heart	Abnormal location of the heart, either partially or completely outside of the thorax	37	21.89
Encephalocele	Protrusion of the brain	8	4.73
Gastroschisis	A congenital defect in which the intestines extend outside of the abdomen	21	12.43
Heteropagus	Asymmetrical conjoined twinning, in which a 'parasitic' twin is dependent on the main twin (autosite)		0.59
Hydrocephalus	Accumulation of fluid in the brain, enlarging the head	14	8.28
Microcephaly	Abnormally small head and brain size	16	9.47
Microphthalmia	A disorder in which one or both eyes are abnormally small	45	26.63
Neural Tube Defect	Category of neurological disorders related to malformations of the spinal cord	48	28.40
Patterning defect	Disruption of embryonic development, preventing the proper formation of body structures and organs	53	31.36
Phocomelia	Abnormally short length of the limbs	6	3.55
Polymelia	Presence of accessory limbs attached to various body regions		0.59

control group eggs, the development of the embryos was optimal (Fig. 4A–B), in the necropsy of 21-day old chickens (Fig. 4C), there were no significant differences in the external morphology of the control and the ex-ovo normal temperature embryos. Although there were no external malformations or differences in the anatomy of the normal temperature group, it must be noted that past studies have identified alterations in the organisms incubated by the ex-ovo technique, causing alterations in the ossification (Jourdeui et al., 2015).

In the hyperthermia exposure time tests, there was a non-significant difference in the days of development reached between the 0–24 h and 24–48 h, but there was a significant difference ($P \leq 0.05$) between the 0–48 h; however, there was an interesting pattern proving the critical factor that is the exposure time to hyperthermia (Fig. 3B), the embryo is more susceptible during the first stages of development (Janikovícová et al., 2019; Krausová and Peterka, 2007), causing an increase in the development of malformations, but by increasing the days of development in which the embryos would be exposed to the hyperthermia, the malformation rate decreased (Fig. 6D). Hyperthermia disrupts the normal cell development in the embryo, particularly during the critical initial stages, through mechanisms like protein denaturation, apoptosis, and impairing cell migration (Buckiova et al., 1998; Edwards et al.,

1997). One of the main problems of hyperthermia is that it causes a high rate of early embryo mortality (Fig. 3A).

As the mortality rate increased, so did the malformations (Fig. 3C); the most frequent malformation was at the blastula stage (Fig. 6C, E, F, H). Initially, these malformations were classified as early mortality for the embryo due to early development of the circulatory system blood islands (Fig. 5A, G, H); however, upon closer inspection with the stereoscopic microscope, the embryo was visualized, and the presence of malformations was discovered, in some embryos the development stopped during neurulation (Fig. 6B), and in other cases, the underdeveloped embryo appeared to be dead; however, the heart was still beating (Fig. 6F).

Other external malformations were identified, such as microphthalmia, neural tube defects, gastroschisis, and ectopic heart, which were present in conjunction with other malformations as shown in Fig. 6K the embryo presents the three anomalies of the development and only reached 3 days of development (HH18). These results are consistent with the reports of various in-ovo hyperthermia research studies; the authors Krausová and Peterka (2007) reported a high frequency of microphthalmia (7.3 %), although, in our research, we had a higher frequency (26.62 %). Various authors also reported gastroschisis (Krausová and Peterka, 2007; Peterka et al., 1996), with a frequency of 7 %; however, in our research, we also report a higher frequency (12.42 %).

We reported the development of two rare twinning malformations incubated ex-ovo under a period of hyperthermia during the blastula stage (0 h): a heteropagus parasitic twin (Figs. 5B and 6P) and a cephalothoracopagus twin (Fig. 5D and D). We observed the development of these two cases since the blastula stage, in which we initially did not notice anything abnormal in the blastoderm, yolk sac, or albumen, however as the development time increased, the malformations were observed and described in vivo (Figs. 5B and 6J), thanks to the capability to observe the development of the embryo in the ex-ovo system.

A heteropagus is the development of asymmetric conjoined twins in which the parasitic twin's tissues depend on the main organism called the "autosite" (Sharma et al., 2010; Zhu et al., 2023). The heteropagus parasitic twin (Fig. 6P) reached 5 days of development; the autosite presented its normal morphology; however, in the ventral abdominal region (epigastric), it presented the parasitic twin, as mentioned by Sharma et al. (2010), the parasitic twin was completely dependent on the circulatory system of the main twin, each twin had its own functioning heart but shared the dorsal aorta. There are no previous reports of this chicken malformation.

Cephalothoracopagus embryos are conjoined twins who share parts or are fused in their heads, necks, and bodies (Bates and Dodd, 1999; Maurer et al., 2012). The cephalothoracopagus twin (Fig. 6J) reached 3 days of development; the twins shared the same head, neck, and heart but were separated into two bodies with their respective limb buds, somites, and tails. Maurer et al. (2012) reported a case of chicken cephalothoracopagus twins and hypothesized that since the abnormal development started until the neurulation, the embryo should be considered as a single embryo instead of conjoined twins; in our tests, we could support this theory by the description of only one blastoderm, that due to the effects of the hyperthermia caused the alteration during the

development.

Jin et al. (2024) described fission as a model to support the development of monozygotic twins, which we can support with our results by reporting only one blastoderm and yolk sac present in each egg (heteropagus and cephalothoracopagus), and not the partial fusion of two zygotes. The alterations that cause the fission process (Anca et al., 2015) could be related to the effects of hyperthermia, which causes multiple alterations (apoptosis, protein denaturation, alterations in cell migration), during the development of the organisms due to the heat stress (Edwards et al., 1997; Janikovičová et al., 2019; Noiva et al., 2014).

The effects of hyperthermia as a teratogen seem to be limited to the initial stages of development; however, during the rest of the development and post-hatching, it increases the morbidity and mortality of the organisms (Haghighi et al., 2021; Krausova and Peterka, 2007; Nariņš et al., 2016). In the case of avian species there is no known risk of developing malformations due to infections during pregnancy like in humans (Sass et al., 2017), due to the type of incubation and embryonic development, however, in recent years, the environmental temperature has proven to be a major healthcare concern for most species. As the global temperature rises each year (Lindsey and Dahlman, 2024; NCEI, 2023), longer and more extreme heatwaves have been reported (US EPA, 2024) causing frequent periods of hyperthermia, which could increase the risk of development of malformations and mortality in humans and animals (livestock and wildlife), causing major economic losses.

The ex-ovo incubation allowed us to observe the embryonic development directly (morphology and ethology) and, as seen in the tests, the development of malformations; these advantages help us to do more research in the fields of toxicology and teratology using the standardized ex-ovo incubation system (Dunn, 2023; Macias-Marín et al., 2023; Tahara et al., 2014, 2021). A hyperthermia incubation temperature range test and an exposure time (short-term and long-term) test during the blastula stage should be considered for further research to help us understand the exact temperature and time threshold required to promote the development of malformations.

We reported the development of malformations starting from an incubation temperature of 40°C. Krausova and Peterka (2007), reported that temperatures from 42 to 44°C induced a higher rate of malformations and embryo toxicity, this temperature difference could be attributed to insulation properties of the materials (eggshell and plastic cup), which could have different heat exchange values, making the embryos that are incubated ex-ovo more susceptible to the changes on the incubation temperature. Further research should study the thermal properties of the incubation vessel materials (plastic cup) to help determine if the vessel increases or decreases the internal temperature of the embryo, to achieve an optimal incubation temperature.

The research focused solely on the external morphological malformations, which were abundant in the tests done; however, molecular and biochemical methods should be included in future research to identify and determine the malformations present in the embryos, like: immunohistochemistry, quantitative PCR, and fluorescence in situ hybridization (FISH). Genetic and metabolic alterations can be studied using these methods of identification (Boije et al., 2012), which would be ignored by only doing a morphological analysis. As we limited the research to the external morphology, internal abnormalities are highly likely to be present, like congenital heart defects (CHD), which are common (Houyel and Meilhac, 2021; Tikkanen and Heinonen, 1991) and can be identified with histological and biochemical procedures. An analysis of the expression of heat shock response (Sakatani et al., 2012) should be done in the embryos that developed malformations and in the embryos that did not develop severe external morphological malformations (Fig. 6), to determine if those embryos had a higher resistance to the effects of the hyperthermia and could adapt to the incubation condition. Most of the hyperthermia malformations identified (microphthalmia, amelia, twinning, etc.) originate from neural tube alterations (Moradi et al., 2017); such hyperthermia defects can be identified with

RT-PCR by an induced upregulation of connexin-43 (CX43, GJA1) in the neural tube (Zhang et al., 2012). Connexins are proteins that construct gap junctions between cells and have an important role in regulating cellular differentiation and proliferation during embryonic development (Liu et al., 2006; Zhang et al., 2012), the overexpression of these proteins disrupts the gap junction channels, causing neural tube defects.

In conclusion, the ex-ovo incubation system does not cause the development of malformations; hyperthermia incubation increases the risk. Hyperthermia (40°C) is a teratogen that causes a variety of malformations in chicken embryos: blastula stage malformations, neural tube defects, microphthalmia, amelia, and the development of parasitic twins. The exposure to 40°C during the blastula stage of incubation (0 h) developed malformations in all the embryos; however, this rate decreased as the incubation days continued. The use of the albumen pipetting technique, in addition to the manual rotation of the ex-ovo culture (every 4 h), allows to reactivate the embryo development from the blastula stage by humidifying the blastoderm and yolk sac, therefore allowing the development of a standardized technique for the ex-ovo incubation from the blastula stage to hatching. The ex-ovo incubation system is a viable model for studying the effects of teratogens on the development of chicken embryos, allowing real-time observation and manipulation of the embryo from the blastula stage until the last day of incubation (21 d). More research is needed to understand the whole effects of temperature as a teratogen in human and animal healthcare.

Ethics approval

The current study was reviewed and approved by the Autonomous University of Aguascalientes Institutional Ethics Committee for Animal Experimentation (Permit Number of Protocol: CEADI-UAA-09-2022). The experiments were performed in strict accordance with national and international (Norma Oficial Mexicana: NOM-062-ZOO-1999, 2001; American Veterinary Medical Association, 2020; National Research Council, 2011) guidelines for the use, care, and euthanasia of research animals.

Funding sources

OMM was supported by SECITHI (Education, Science, Innovation, Technology, Humanities and Research Secretary, Mexico) (CVU 1092436). This work was supported by PIB24-3, and the Resources of the Doctorate in Biological Sciences of the Autonomous University of Aguascalientes, Mexico.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This article is in loving memory of my dear friend Adriana Daniela Rodriguez Padilla (03/03/96-05/11/24). May your spirit live on in all those who loved you.

References

- Anca, F.A., Negru, A., Mihart, A.E., Grigoriu, C., Bohiltea, R.E., 2015. Special forms in twin pregnancy - asymmetric conjoined twins. *J. Med. Life* 8 (Spec Issue), 115–118. *Spec Issue*.
- Andacht, T., Hu, W., Ivarie, R., 2004. Rapid and improved method for windowing eggs accessing the stage X chicken embryo. *Mol. Reprod. Dev.* 69 (1), 31–34. <https://doi.org/10.1002/mrd.20155>.
- Auerbach, R., Kubai, L., Knighton, D., Folkman, J., 1974. A simple procedure for the long-term cultivation of chicken embryos. *Dev. Biol.* 41, 391–394. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(74\)90316-9](https://doi.org/10.1016/0012-1606(74)90316-9).

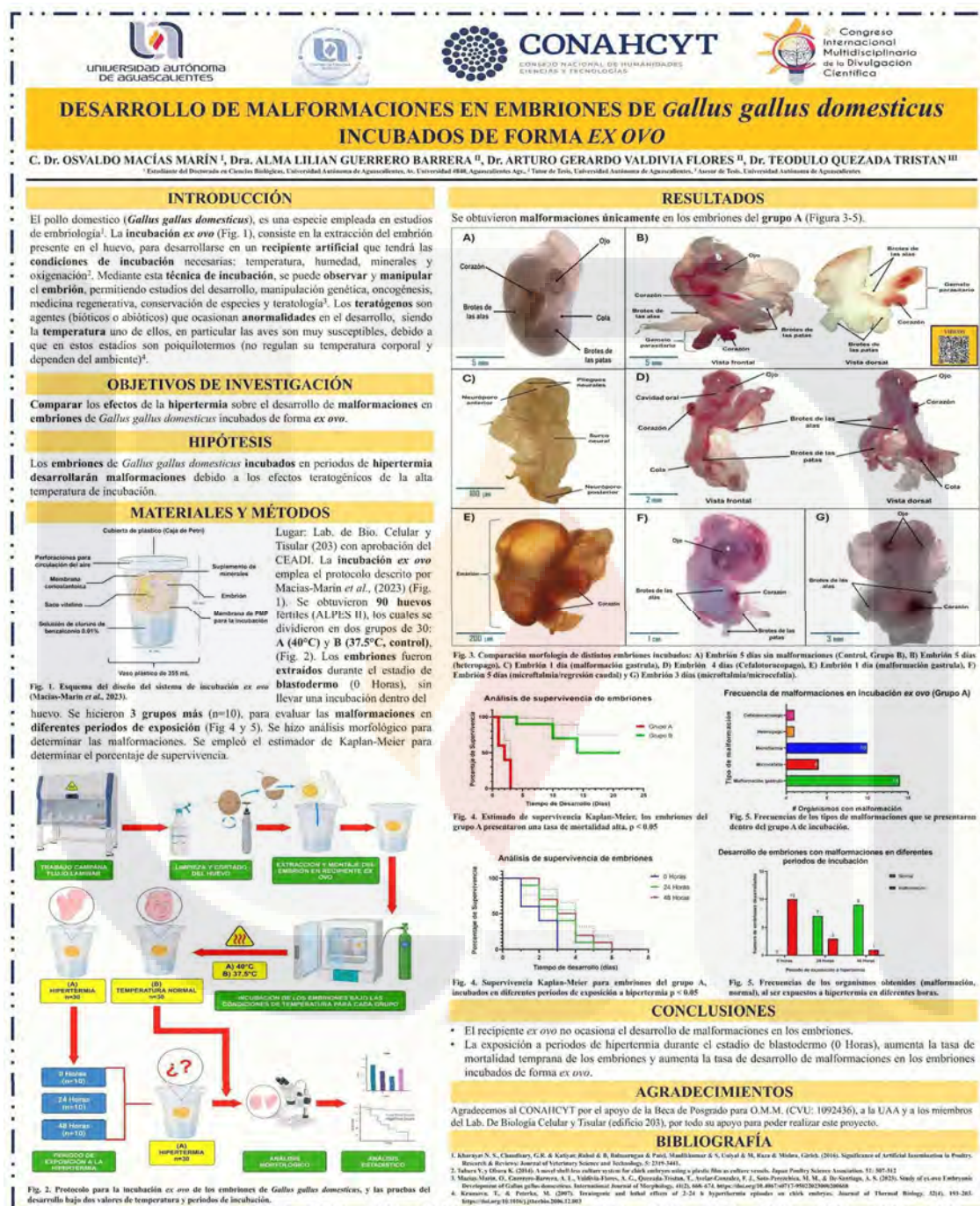
- 59

11. Anexos

Cartel: Comparación del Desarrollo Embrionario del Sistema Circulatorio *Ex ovo* e *In ovo* de *Gallus gallus domesticus*



Cartel: Desarrollo de Malformaciones en Embriones de *Gallus gallus domesticus* Incubados de Forma *Ex ovo*



Microtomografías rayos X de los embriones con malformaciones

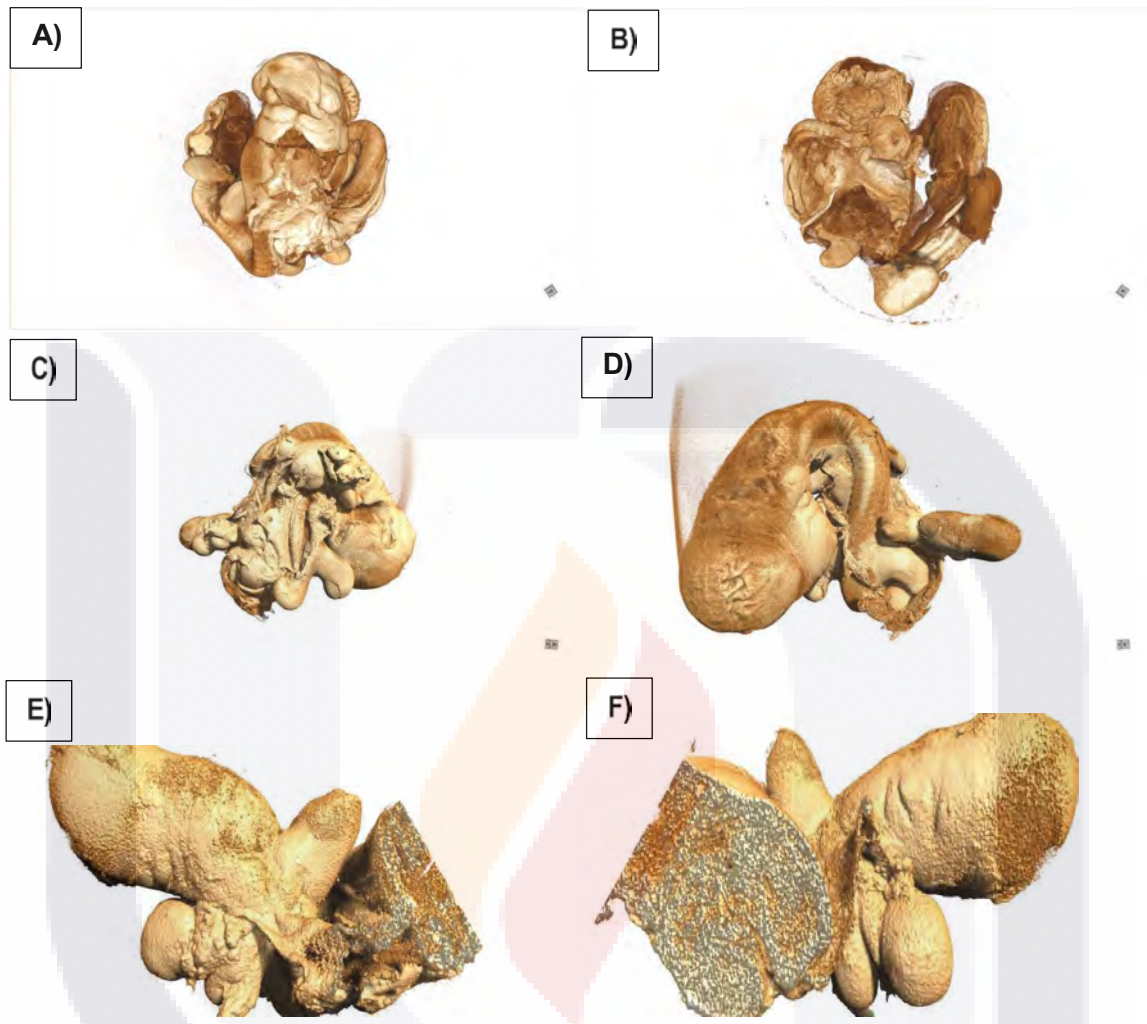


Figura: Microtomografía de Rayos X: A) Cefalotoracopago (Vista frontal), B) Cefalotoracopago (Vista dorsal), C) Heteropago (Vista frontal), D) Heteropago (Vista dorsal), E) Heteropago (Gemelo parasitario, Vista Lateral Izquierda), F) Heteropago (Gemelo parasitario, Vista Lateral Derecha).