

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

**EFECTO DEL ESTRÉS ADRENÉRGICO SOBRE LA CALIDAD DE
LA CÁSCARA DEL HUEVO DE LAS GALLINAS**

CRISTIAN ALONSO PRADENAS AUSPONT

**Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas**

PROFESOR GUÍA: MARIA SOLEDAD FERNÁNDEZ

SANTIAGO-CHILE

2001

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

**EFFECTO DEL ESTRÉS ADRENÉRGICO SOBRE LA CALIDAD DE
LA CÁSCARA DEL HUEVO DE LAS GALLINAS**

CRISTIAN ALONSO PRADENAS AUSPONT

**Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas**

Proyecto Fondap 11980002

PROFESOR GUÍA: MARIA SOLEDAD FERNÁNDEZ

**SANTIAGO-CHILE
2001**

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

**EFFECTO DEL ESTRÉS ADRENÉRGICO SOBRE LA CALIDAD DE
LA CÁSCARA DEL HUEVO DE LAS GALLINAS**

CRISTIAN ALONSO PRADENAS AUSPONT

**Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas**

		Calificación	Firma
Profesor Guía:	María Soledad Fernández	_____	_____
Prof. Consejeros:	Dr. José Luis Arias	_____	_____
	Dr. Héctor Hidalgo	_____	_____

**SANTIAGO-CHILE
2001**

*A mi familia, en especial
a mis padres que me han dado
todas las herramientas para
surgir en la vida. A Karen, mi
amor, que siempre me apoyó.*

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos a Evelyn, Cinthya, Sandra, Víctor y Helio que siempre estuvieron dispuestos a colaborar cuando necesité de su valiosa ayuda.

Especiales agradecimientos a María Soledad Fernández, al doctor José Luís Arias y al doctor Héctor Hidalgo por su disponibilidad y disposición para trabajar, discutir y resolver los problemas que aparecieron durante la realización de esta memoria.

INDICE

Páginas preliminares.....	ii-vi
Resumen.....	vii-ix
Introducción.....	1
Revisión Bibliográfica.....	4
Objetivos.....	25
Material y Métodos.....	25
Resultados.....	29
Discusión.....	51
Conclusiones.....	57
Bibliografía.....	58

RESUMEN

Con el continuo crecimiento de la población mundial, la constante preocupación por el bienestar animal y la apertura de los mercados internacionales, la industria avícola se ha visto en la obligación de reducir sus costos al máximo para así poder entregar un producto lo más económico posible al consumidor, sin descuidar la calidad del mismo. Esta disminución de costos no puede llevarse a cabo a través del aumento en la densidad de las aves por jaula, lo que implica un menor bienestar, ya que la legislación es cada día más exigente al respecto. Es por esto, que se hace indispensable minimizar los costos de producción y uno de ellos son las pérdidas producidas por la ruptura de la cáscara del huevo.

El proceso de biomineralización de la cáscara del huevo es realizado por poblaciones celulares especializadas del oviducto, que actúan como una línea de ensamblaje a medida que el huevo avanza a través de éste. Esta biocerámica resulta de la interacción controlada entre una fase orgánica y una inorgánica.

Estructuralmente la cáscara del huevo está constituida por cuatro capas, las cuales del interior al exterior son: capa de las membranas de la cáscara, capa mamilar, capa en empalizada, capa cuticular.

Durante su formación, la cáscara del huevo es altamente susceptible a ser alterada por diversos factores, entre ellos el estrés. Los factores estresantes son responsables de una serie de defectos en la calidad de la cáscara del huevo que

disminuyen su valor comercial e incluso pueden llevar a la pérdida total en algunos casos.

Desde hace muchos años diversos autores han evaluado la calidad de la cáscara del huevo tomando en consideración diversas características, distintas condiciones ambientales y usando una gran variedad de técnicas tanto directas como indirectas.

Para el presente estudio se utilizaron gallinas White Leghorn, las cuales fueron divididas en subgrupos e inyectadas con 1 mg de adrenalina por vía subcutánea a distintas horas post oviposición para evaluar el efecto del estrés adrenérgico sobre la calidad de la cáscara del huevo. Las características evaluadas fueron resistencia y espesor de la cáscara con y sin membranas, las cuales se compararon mediante una prueba de t de dos colas. Mediante microscopía electrónica de barrido se analizó la ultraestructura de estas cáscaras de huevo.

El análisis de los resultados muestra que no existe diferencia estadísticamente significativa entre el grupo tratado y el control, tanto para resistencia a la compresión mecánica como para el espesor de la cáscara con y sin membranas, sin embargo al realizar un estudio ultraestructural de las cáscaras de los huevos de las gallinas que efectivamente respondieron al tratamiento con adrenalina se observaron diversas alteraciones que explicaban su baja resistencia y espesor de cáscara.

Esta falta de diferencia significativa podría deberse a la gran variación individual que existe en la respuesta al tratamiento y en el tiempo de recuperación. No obstante lo

anterior el análisis ultraestructural mostró que las alteraciones observadas, como presencia de cuerpos A y B, confluencia de mamilas, líneas de fractura, columnas de distinto grosor y tamaño, alteraciones en las membranas de la cáscara, presencia de cristales de calcita entre las columnas, concordaban con el tiempo post ovipostura en que las gallinas eran tratadas y la estructura del huevo que estaba en formación.

Niveles de estrés agudo, comparables a los producidos por la administración de adrenalina, se producen al disturbar a las gallinas por incursiones no habituales de personal, aves silvestres u otros animales en los galpones de postura.

INTRODUCCIÓN

En el comienzo de un nuevo siglo, la población humana es cada vez más numerosa, aumentando las necesidades alimenticias del planeta.

Este punto junto con la apertura de los mercados internacionales, tanto a nivel continental como mundial, han tornado imprescindible lograr una máxima eficiencia productiva disminuyendo los costos y diversificando productos y mercados.

Estos son desafíos difíciles de conseguir, pero necesarios para obtener alimentos de confiabilidad y calidad probada.

Uno de los grandes costos de la industria avícola son sus pérdidas por concepto de la calidad de la cáscara del huevo. En Estados Unidos los menoscabos por ruptura del huevo en el lugar de producción eran de un 7,77% (Roland, 1977). Las pérdidas ocurridas desde la recolección hasta que llegan al consumidor se estiman en un 6,37%, la suma de éstas dio un perjuicio total de US\$ 47 millones en 1992 (Madison y Pérez, 1994). En Chile se producen aproximadamente 2.000 millones de huevos al año, con una pérdida por ruptura, atribuible a calidad de la cáscara, de un 5% a 8 %, que significan US\$ 3 millones al año (Hidalgo, 2000. Comunicación personal).

La calidad de la cáscara está influenciada por diversos factores entre ellos el estrés, siendo la formación de la cáscara un proceso continuo de ensamblaje de componentes en un tiempo muy preciso, por lo que resulta interesante determinar en que

momento de su formación el estrés es más determinante y de que manera éste altera la calidad de la cáscara del huevo resultante.

La cáscara del huevo debe ser mirada desde dos puntos de vista, el primero como cámara embrionaria y por lo tanto debe cumplir los requisitos necesarios para el nacimiento del polluelo como son permitir el intercambio gaseoso, aportar minerales para el crecimiento del embrión, una solidez que resista los impactos propios del proceso de incubación y que a la vez permita una fácil eclosión del ave. Por otro lado está el punto de vista del productor y el consumidor que ven en la cáscara un envase, por lo que debe ser una barrera adecuada contra los microorganismos y resistir diversos impactos mecánicos sufridos antes de llegar a la mesa del consumidor (Solomon, 1991; Arias et al., 1994).

La calidad de la cáscara, que refleja la armonía del ave con su medio interno y externo (Solomon, 1991), está influenciada por diversos factores como son la edad, nutrición, genética, tiempo de ovipostura, el ambiente o las patologías asociadas (Fraser, 1996); los cuales han ido disminuyendo en importancia con el progreso y desarrollo de la industria aviar. Sin embargo, este desarrollo ha llevado a un mayor confinamiento de las aves lo que podría traducirse en un mayor estrés, el cual, entre otras cosas, causa un retraso en la ovipostura (Hughes et al., 1986). Este estrés produce cáscaras con características anormales y estas pérdidas se evidencian aún antes que se produzca una disminución en la producción (Hughes et al., 1986).

Tomando en consideración el confinamiento animal, no podemos dejar de hablar del bienestar de las aves, término que tiene muchas definiciones como son la completa salud física y mental o estado en el cual el animal es capaz de estar en armonía con su medio ambiente (citados por Fraser, 1996). Respecto a este tema la comunidad económica europea tiene una legislación bastante exigente y en el futuro lo será aún más con el fin de mejorar las condiciones en que son explotadas las aves de interés

comercial. Sin embargo existe evidencia que demuestra que los huevos provenientes de aves alojadas en jaulas, aunque presentan peor calidad física externa, como cáscaras salpicadas de calcio, ultraestructuralmente son de calidad superior a los provenientes de sistemas alternativos (Fraser, 1996).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

BIOMINERALIZACIÓN DE LA CÁSCARA DEL HUEVO

El proceso de mineralización biológica está ampliamente distribuido en la naturaleza, puede encontrarse en especies de distintos reinos. El resultado del depósito de mineral en los sistemas biológicos está representado por la formación de huesos, dientes, cáscaras, caparzones, corales, perlas, etc. (Fernández y Arias, 2000).

La biomineralización puede ser definida como una secuencia de eventos en los cuales los minerales secretados en solución por células particulares cristalizan y se estructuran juntos según un plan de construcción definida. Todos los elementos resultantes de este proceso tienen una característica común: están compuestos por una fase inorgánica, frecuentemente minerales de calcio (aragonita, calcita, dahlita o hidroxiapatita), y una fase orgánica que puede estar compuesta por proteínas (fosfoproteínas, glicoproteínas), polisacáridos, lípidos y frecuentemente por una mezcla de ellos (Simkiss y Wilburu, 1989; Fernández y Arias, 2000).

La velocidad de depósito de la parte inorgánica varía desde unos pocos gramos al año hasta el extremo de cinco gramos de calcio por día como ocurre en la formación de la cáscara del huevo (Fernández y Arias, 2000). Esto hace de la cáscara de huevo un modelo muy conveniente para el estudio de la biomineralización (Arias et al., 1993).

La biomineralización de la cáscara del huevo se realiza por poblaciones celulares especializadas del oviducto, estas células forman una biocerámica resultante de la

interacción controlada entre fases orgánicas e inorgánicas (Heuer et al., 1992). El oviducto actúa como una línea de ensamblaje en la medida que el huevo avanza a través de éste (Heuer et al., 1992; Arias et al., 1993). Por lo tanto la interferencia en el desarrollo de la cáscara en momentos precisos de su formación resultará en distintos tipos de alteraciones que nos darán luces de la posible causa de las distintas anomalías obtenidas.

Químicamente esta biocerámica está compuesta de 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 ella ocurre nucleación heterogénea primaria y secundaria a partir de las mamilas (Arias et al., 1991a; Fernández y Arias, 2000).

Estructuralmente la cáscara del huevo de las gallinas está constituida por cuatro capas, las cuales del interior al exterior son:

1.- **Capa de las membranas de la cáscara**: Son las primeras estructuras que se forman rodeando a la albúmina. Se forman en la región del istmo y están divididas en dos subcapas, externa e interna, que en conjunto pesan 145 mg, la capa interna tiene aproximadamente 20 μm de grosor, mientras que la externa mide 50 μm (Fernández y Arias, 2000), ambas permanecen íntimamente unidas a través de toda la superficie interna de la cáscara, excepto en el lado obtuso del huevo donde se separan formando la cámara de aire.

Cada membrana está formada por una red de fibras dispuestas de forma paralela a la superficie de la cáscara. En un corte transversal cada fibra está compuesta por un centro proteico rodeado de un manto de mucopolisacáridos (Simons y Wiertz, 1963; Candlich, 1972), con un diámetro de alrededor de 70 nm (Simkiss y Taylor, 1971).

Las estructuras fibrilares que forman ambas subcapas están compuestas principalmente por colágeno tipo X (Fernández et al., 1997a), que es secretado por las células glandulares del istmo (Arias et al., 1991b). Esta proteína se encuentra en el centro de las fibras de las membranas de la cáscara (Fernández y Arias, 2000). El colágeno tipo X presente en estas membranas, impide el depósito de calcio en ellas (Arias et al., 1997).

La secreción de colágeno en el istmo comienza aproximadamente 3,5 horas después de ocurrida la ovipostura del huevo anterior, aunque el huevo llega a esta región solo a las 4,25 horas post ovipostura, momento en que se inicia la formación de la membrana interna de la cáscara (Fernández et al., 1997a, 1997b, 2001). Las fibras de colágeno adquieren paulatinamente una superficie uniforme lo que sugiere un proceso secuencial de fibrilogénesis (Fernández y Arias, 2000). La superficie interna de la membrana es lisa y homogénea (Simons y Wiertz, 1963), lo que impide el paso de albúmina hacia los espacios entre las fibras.

Aproximadamente a las 5 horas post ovipostura, cuando la membrana externa está formada comienza la secreción de queratán sulfato en el istmo (Fernández et al., 2001), uno de los principales componentes de los botones mamilares.

La integridad y normal composición química de las membranas son esenciales para la normal deposición y función de los botones mamilares que componen la siguiente capa de la cáscara (Baumgartner et al., 1978; Klingensmith et al., 1988).

2.- **Capa mamilar**: Esta capa se forma sobre la membrana externa de la cáscara y corresponde a menos de un tercio del grosor total de la cáscara (100 μm). Está constituida por las mamilas a partir de las cuales se inicia la mineralización. Las mamilas son pequeñas masas de material orgánico distribuídas de manera discreta, que tienen una disposición de los grupos químicos cargados tal que proveen un molde sobre el cual los iones calcio y carbonato se fijan originando la trama de cristales de calcita. Su formación comienza en el tercio terminal del istmo (istmo rojo) (Arias et al., 1993; Fernández et al., 1997b).

El queratán sulfato, principal componente de los botones mamilares, está involucrado fundamentalmente en la nucleación de los primeros cristales de carbonato de calcio en la capa mamilar, hecho que ocurre en el istmo rojo aproximadamente 5,25 a 5,5 horas post ovipostura (Fernández et al., 1997a), aunque también se describe su presencia en el centro de las fibras de la membrana externa de la cáscara en las fibras que están más cercanas a los botones mamilares. (Fernández et al., 2001). El crecimiento de los cristales de calcio hacia el interior del huevo está limitado por las membranas de la cáscara (Arias et al., 1991c).

Dentro de la mamila se distingue una zona basal (Dieckert et al.,1989), en contacto con las membranas de la cáscara, llamada región de reserva de calcio (CRA: calcium reserve assembly) y por sobre esta región la corona. La CRA representa la fuente primaria de calcio para el embrión. Dentro del CRA se distingue una placa basal, que es la porción en íntimo contacto con la membrana externa de la cáscara, y un cuerpo de reserva de calcio. La CRA es la zona de la mamila que sufre la descalcificación a partir de la segunda mitad del desarrollo del embrión, lo que demuestra su calidad de reservorio de calcio (Dieckert et al., 1993).

La estructura y la conformación de la capa mamilar son los factores determinantes de la solidez de la cáscara. Existe, en efecto, una correlación entre la densidad de las mamilas (n° de mamilas por cm²) y la solidez de la cáscara (Fujii, 1974; Parson, 1982).

3.- **Capa en empalizada**: Se estructura a partir de las mamilas, donde ocurre la nucleación de los primeros cristales de carbonato de calcio en forma de calcita, constituyendo la base para la formación de las columnas (Arias et al., 1993).

Esta capa corresponde a la capa más gruesa de la cáscara del huevo (200-350 μm), está compuesta por una porción inorgánica, en base a carbonato de calcio en forma de calcita y una orgánica, constituída principalmente por dermatán sulfato, que ayuda a la orientación, crecimiento y morfología de la empalizada (Fernández et al., 1997a) y que se conoce como matriz de la cáscara.

La secreción de dermatán sulfato por las células epiteliales del istmo rojo y de la glándula de la cáscara propiamente tal comienza 2 horas antes de que el huevo alcance esta zona (Fernández et al., 1997a).

La formación de esta capa ocurre en la glándula de la cáscara propiamente tal, aproximadamente a partir de las 6 horas post ovipostura. En esta zona del oviducto el huevo permanece aproximadamente 20 horas, donde no sólo ocurre la mineralización de la cáscara sino que también existe hidratación de las proteínas de la clara lo que hace que el huevo tome estrecho contacto con la pared de esta región (Solomon, 1991).

Estudios morfológicos y cristalográficos de la capa en empalizada revelan 3 subzonas (Terepka, 1963; Perrot et al., 1981; Sharp y Silyn-Roberts, 1984):

Zona de los conos: Es la zona más interna y está formada por cristales que presentan una menor orientación preferencial (Arias et al., 1993). Los cristales de esta zona son los primeros en depositarse durante la formación de la cáscara.

Zona central: En esta zona, los cristales adoptan una orientación más preferencial. Entre los cristales se encuentran abundantes vesículas de 250-300 nm que contienen dermatán sulfato (Fernández et al., 2001).

Zona externa o de cristales verticales: Esta zona tiene un grosor de 3-8 μm y en ella se encuentra una orientación vertical de los cristales. Se ha sugerido que en esta zona el depósito de calcio se haría en ausencia de matriz (Fujii, 1974; Arias et al., 1991a). Sin embargo recientemente se ha descrito que en esta zona la matriz orgánica cambia de la

disposición paralela rica en vesículas de 450 nm de diámetro de la capa central a una matriz orientada perpendicular a la superficie de la cáscara, esta matriz se hace más estrechamente empaquetada en la interfase entre la capa de los cristales verticales y la cutícula (Dennis et al., 1996; Fraser et al., 1998).

Posteriormente, con el crecimiento de las columnas, estas se fusionan lateralmente lo que contribuye a aumentar la resistencia a la deformación mecánica, si esta fusión no se lleva a cabo la cáscara será más débil (Solomon, 1991). De lo anterior se desprende que el desarrollo de las mamilas es fundamental para tener una cáscara de calidad.

En los lugares donde no ocurre fusión de las columnas con sus vecinas se forman los poros, los cuales atraviesan verticalmente esta capa. Tienen forma de embudo con su base amplia dirigida hacia la superficie y presentan un diámetro, en el extremo que enfrenta las membranas de la cáscara, de 6 μm y de 65 μm en el extremo que enfrenta la cutícula (Fernández y Arias, 2000). Se estima que el número de poros varía entre 100-300 por cm^2 de cáscara (Fernández y Arias, 2000).

4.- **Capa cuticular**: Corresponde a la última capa de la cáscara. Su grosor es de 10 μm y cubre los poros preservando el interior del huevo de la contaminación microbiana (Fernández y Arias, 2000). La región más interna de la cutícula tiene agregados esféricos de cristales que corresponden a hidroxiapatita (Dennis et al., 1996).

Al microscopio electrónico de barrido la cutícula muestra fisuras, con aspecto de barro seco, producto de la deshidratación y la oxidación de los grupos SH de las proteínas presentes en ella (Fernández y Arias, 2000).

Queratán sulfato también ha sido identificado en la cutícula, aunque no necesariamente idéntico al descrito en las mamilas (Arias y Fernández, 1995). En efecto este aparece después de 18 horas post ovipostura, coincidiendo con el tiempo en que se forma la cutícula (Fernández et al., 2001).

De esta capa dependen algunas propiedades fundamentales de la cáscara, como son poner término al depósito de calcio, regulación de la humedad, el intercambio hídrico y gaseoso y la presencia o ausencia de pigmentación del huevo (Arias et al., 1993).

La detención de la mineralización podría deberse a la secreción de un factor inhibidor de ésta. La presencia de fósforo, inhibidor de la formación de calcita en las capas superficiales y la modificación de la morfología de los cristales en la capa superficial refuerza esta hipótesis. El hecho que en la cutícula se encuentre hidroxiapatita (fosfato de calcio) es una evidencia del rol competidor del fosfato sobre el carbonato por el ion calcio (Dennis et al., 1996).

	M m	I	IR	G C
1:00		KS - Col -	KS - DS -	KS +++ DS -
3:30		KS - Col ++	KS - DS -	KS - DS +
5:00		KS + Col ++++	KS + DS -	KS - DS ++
5:15		KS +++ Col ++	KS +++ DS + 	KS - DS +++
6:00		KS ++ Col -	KS + DS ++	KS - DS ++++
18:00		KS + Col -	KS - DS -	KS - DS -

Figura 1. Esquema de la formación del huevo, donde se muestra el lugar y tiempo post ovipostura en que se secretan algunos de los componentes de la cáscara del huevo (Fernández et al., POZNAN, 1997). M= magnum, I= istmo, I R= istmo rojo, G C= Glándula de la cáscara; KS= queratán sulfato, DS= dermatán sulfato, Col= colágeno tipo X.

El proceso de formación de la cáscara del huevo toma más de 80% del tiempo que demora la formación total del huevo (figura 1) y por lo tanto, abarca un periodo altamente susceptible de recibir influencias que alteran su calidad.

EFEECTO DEL ESTRÉS

Diversos autores coinciden en señalar al estrés como un factor importante que produce alteraciones en la calidad de la cáscara del huevo (Hughes et al., 1986; Solomon et al., 1987; Reynard y Savory, 1999). Este vocablo ha sido muy utilizado en el último tiempo, sin tener aún una traducción clara. Egaña (1963), define estrés como la necesidad de adaptarse al medio en que vive un individuo, para lo cual debe mantener en función toda la actividad homeostática del organismo.

Durante los períodos de estrés repentinos existe una hipersecreción de corticosteroides y adrenalina. Este incremento de los corticosteroides se debe a la estimulación del hipotálamo que produce liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) la que a su vez actúa sobre la hipófisis liberando la hormona adrenocorticotropina (ACTH) con el consecuente aumento de la actividad de la corteza adrenal. Por otro lado el alza de la adrenalina es causada por la estimulación que ejerce el hipotálamo sobre los nervios simpáticos que llegan a la médula adrenal impulsando la liberación de catecolaminas. El aumento de las catecolaminas produce un incremento del gasto cardíaco, disminución del umbral del sistema reticular activante, vasoconstricción en piel y riñones, dilatación de los vasos sanguíneos de músculo y cerebro, apertura de las vías respiratorias y estímulo de la glucógenolisis. Todo esto hace que el individuo esté más alerta, preparado para la lucha o presto para escapar con rapidez.

Estos efectos se producen gracias a la presencia de los receptores α y β adrenérgicos que se encuentran en los distintos órganos. Dentro de estos órganos también se cuenta el oviducto, el cual presenta distribución dispar de los receptores con una mayor concentración de receptores α en infundíbulo y magnum en comparación a la glándula de la cáscara que posee principalmente receptores β (Crossley et al., 1980). Esta distribución implica que la liberación de adrenalina tenga distintos efectos sobre la musculatura oviductal con un aumento de las contracciones en la parte más craneal (infundíbulo y magnum) y relajación de la musculatura en la porción caudal (glándula de la cáscara) (Crossley et al., 1980).

Consecuentemente, la aplicación de adrenalina exógena produciría un efecto similar al del estrés dando como resultado cáscaras con alteraciones o malformaciones, que incluyen tanto aquellas claramente visibles a simple vista como también aquellas que requieren de técnicas más refinadas para evidenciarlas, al impedir que el oviducto actúe correctamente como una línea de ensamblaje.

Hughes et al. (1986) al inyectar 40 gallinas, separadas en 5 grupos, con distintas dosis de adrenalina evidenció una gran variedad de alteraciones como son huevos con cáscaras aplanadas o achatadas, cáscaras delgadas, huevos color pastel y cáscaras salpicadas de calcio. Solomon et al. (1987) al inyectar por vía subcutánea 1 mg de adrenalina a 3 gallinas, una hora antes de la hora probable de postura indujo retención del huevo y alteraciones similares a las encontradas por Hughes et al. (1986) en los siguientes huevos. Además, a nivel ultraestructural se encontraron alteraciones en membranas de la cáscara, mamilas y cutícula. Estas alteraciones dependerán de cada gallina, ya que existe una gran variación individual en la respuesta a los factores estresantes. El tiempo de recuperación también varía para cada gallina (Solomon, 1991).

Algunas alteraciones de la cáscara del huevo son:

A) **Cáscaras traslúcidas**. Son cáscaras con zonas irregulares al trasluz en forma de manchas o líneas conocidas como marcas de agua, las que se encuentran al interior de la cáscara. Estas líneas son producto de una mala formación de la capa mamilar, lo que altera la normal confluencia de las columnas dejando un mayor espacio que se llena de electrolitos y de agua (Arias et al., 1993). Esto se traduce finalmente en una menor resistencia a los impactos, ya que la organización estructural de la capa

mamilar influencia tanto la resistencia al impacto inicial como la propagación de la fractura, ya que esta propagación sigue los planos de menor resistencia.

B) **Cáscaras malformadas**. Estas cáscaras presentan claras alteraciones a su forma normal.

B.i.- Cáscaras con pliegues: Presentan pliegues en su superficie producto del estrés durante su formación. Consiste en una línea continua de sollevamientos originados en deformaciones profundas en el origen de las columnas (Solomon, 1991).

B.ii.- Cáscaras aplanadas o achatadas: Estas cáscaras presentan un achatamiento lateral. El estrés en este caso produce una larga retención del huevo, lo que hace que se encuentren dos huevos simultáneamente en la glándula de la cáscara. Como consecuencia de esto existe un estrecho contacto entre los huevos, generándose en el huevo retardado un depósito extra de calcio en forma de una banda circular más blanca. El segundo huevo, que normalmente está bañado completamente en el fluido de la glándula de la cáscara en este caso está impedido de hacerlo ya que existe una barrera física imposibilitando una correcta mineralización, por lo que este huevo presenta un achatamiento lateral con cáscara de menor espesor, cutícula escasa e imperfecta y sus mamilas presentan una gran confluencia (Solomon, 1991).

B.iii.- Cáscaras con protuberancia ecuatorial o interrupciones: La cáscara de estos huevos se ha roto mientras se encontraba en la glándula de la cáscara, siendo parcialmente reparada mediante una calcificación adicional. Estos huevos muestran una

protuberancia de bordes irregulares en el plano ecuatorial del huevo. La capa mamilar en estos casos muestra severas líneas de fracturas (Solomon, 1991).

Claramente estas cáscaras presentan mayor fragilidad.

B.iv.- Cáscaras salpicadas de calcio: Estas cáscaras presentan agregaciones múltiples en su superficie mostrando el aspecto de un papel de lija (Solomon, 1991). El análisis ultraestructural de estas agregaciones en conjunto con otras técnicas como el análisis con infra rojo y el microanálisis de rayos X, han mostrado que esta cobertura extracuticular es de fosfato de calcio.

El grado de depósito refleja el tiempo y magnitud del estrés al que fueron sometidas las gallinas. Así, si el estrés fue corto y severo, y ocurrió durante el periodo tardío de formación de la cáscara, después del depósito de la cutícula, entonces las acreencias se dispondrán azarosamente como agrupaciones discretas sobre la superficie. La adecuación a un periodo de estrés moderado y prolongado resultará, por el contrario, en acreencias parejas en la superficie del huevo. Estos depósitos generalmente están en la superficie de la cáscara sobre la zona en que ha habido una inadecuada formación de las columnas por formación de los cuerpos B (Solomon, 1991).

B) **Huevos fracturados**. La fractura de los huevos se puede deber a muchos factores entre ellos el estrés. Las fracturas más frecuentes se clasifican en puntiformes que pueden ser producto de un impacto puntiforme proveniente del ambiente o por

causas intrínsecas. En el segundo caso son producto de la presencia de una pequeña zona no mineralizada de la cáscara, en forma de un orificio, que penetra totalmente la cáscara. Este canal se debe al depósito de una burbuja de aire sobre las membranas de la cáscara, debido al mal funcionamiento del oviducto, impidiendo la formación de mamilas en el área ocupada por la burbuja de aire (Solomon, 1991). El normal depósito de la cutícula recubre el orificio finalmente. También se presentan fracturas estrelladas o lineales de acuerdo con la naturaleza, magnitud y propagación del impacto o debido a causas estructurales (Solomon, 1991).

C) **Cáscaras delgadas o blandas**. Son consecuencia de diversos factores estresantes que disminuyen el espesor y calidad de la cáscara. Los huevos con cáscaras delgadas intactos pueden ser vendidos a público, sin embargo, los huevos blandos aún cuando presentan algún depósito de calcio en la cáscara deben ser usados sólo industrialmente.

E) **Huevos rosados o lilas**. También son producto del efecto del estrés (Hughes et al., 1986). Se describen en huevos que normalmente debieran ser blancos. Si estos huevos son puestos lentamente, algunas de las acreencias de calcio pueden desprenderse dando huevos de coloración pastel (Solomon, 1991). La producción de estos colores pasteles también puede deberse a una reflexión de la luz entre la cutícula y los depósitos extra de calcio.

A nivel ultraestructural se describen otras alteraciones como son:

F) **Cuerpos A y B.** Las mamilas normales se ensamblan estrechamente con las fibras de la membrana externa de la cáscara. Con respecto a esto existen mamilas anormales denominadas cuerpos A y B. Los cuerpos A pueden ocurrir solos o en grupo y corresponden a mamilas mineralizadas de base lisa y que no presentan buena relación con las membranas, dando origen a columnas incompletas que no aportan totalmente al espesor de la cáscara (Solomon, 1991).

Los cuerpos tipo B, que son más frecuentes que los cuerpos tipo A, tienen un relativo buen contacto con las membranas de la cáscara, pero son estructuras de forma redonda que no se desarrollan mayormente y por lo tanto contribuyen mínimamente al espesor real de la cáscara (Solomon, 1991).

Estos cuerpos se presentan en aves jóvenes o sometidas a estrés. En estas últimas es posible encontrar cristales de aragonita que presentan gran fragilidad (Solomon, 1991).

G) **Confluencia de mamilas.** La capa mamilar no siempre presenta una distribución discreta. Los huevos puestos por gallinas jóvenes o los provenientes de gallinas estresadas, invariablemente muestran largos sitios de fusión en esta capa. Esta confluencia altera la distribución de los poros e influencia la formación de la capa en empalizada (Solomon, 1991).

H) **Mala fusión de las columnas**. Fusiones tardías generan grandes áreas de discontinuidad entre las columnas, mientras fusiones tempranas se traducen en una excesiva confluencia, lo que aumenta el tamaño de las columnas disminuyendo el número de poros que son vitales para el intercambio gaseoso, alterando, por otra parte, la estructura de la cáscara. Este último caso se observa principalmente en aves jóvenes o sometidas a estrés dando huevos con zonas planas (Solomon, 1991).

I) **Columnas decapitadas**. Son columnas cuya base, que se encuentra en relación con las membranas, está ausente. Esto puede deberse a un medio rico en azufre (Solomon, 1991) o por efecto del estrés, lo que produce un debilitamiento en la relación entre membranas, conos y empalizada.

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LA CÁSCARA DEL HUEVO DE LAS GALLINAS

Desde comienzos de siglo diversos autores han descrito distintas técnicas para evaluar la calidad de la cáscara del huevo (Herrasti, 1916; Kennard, 1925; Alder, 1927). Los métodos utilizados para medir la calidad de la cáscara se dividen en métodos indirectos como la gravedad específica del huevo o la deformación no destructiva y en métodos directos como compresión cuasi estática, test de puntura y ensayos de impacto. La principal ventaja de los métodos indirectos son las múltiples mediciones que se pueden realizar en el mismo huevo ya que éste no se rompe, subsecuentemente el huevo puede ser incubado, en cambio con los métodos directos se simula de mejor manera el tipo de daño que recibe el huevo bajo condiciones de campo (Hamilton et al., 1979) y da una medición precisa de la fuerza requerida para quebrar la cáscara.

Los métodos más utilizados para medir la calidad de la cáscara del huevo son:

Transiluminación o encandilamiento (candling)

Este método, que ha jugado un rol fundamental en la industria de los huevos por más de 60 años, consiste en transiluminar cada huevo con una fuente de luz artificial para evaluar la condición de la cáscara y su contenido (Overfield, 1995). Dentro de la cáscara se pueden apreciar fracturas filiformes o estrelladas y parches de translucidez. Las fracturas filiformes se presentan frecuentemente a lo largo o ancho de la cáscara y corresponden a largas zonas de hileras paralelas de mamilas tardíamente fusionadas, que aunque no alcanzan la superficie de la cáscara se constituyen en zonas de alta fragilidad a los impactos.

Con respecto a los parches translúcidos se debe considerar que mientras la cantidad de éstos disminuye al aumentar la edad del ave, su diámetro es progresivamente mayor. Esto dice relación con la temprana fusión de los botones mamilares que ocurre en los huevos pequeños provenientes de gallinas al comienzo de la postura, en comparación con lo que sucede en los huevos de mayor tamaño, donde la fusión de las columnas cristalinas adyacentes ocurre más tardíamente durante la etapa de formación de la cáscara (Arias, 1998).

Lamentablemente este método clásico es inapropiado ya que requiere una gran preparación de los operarios para identificar las fallas de la cáscara, es difícil de realizar en huevos muy frescos y la velocidad de los modernos equipos de recolección exceden la capacidad de toma de decisiones de la mayoría de los operadores.

Deformación no destructiva

Estos test consisten en comprimir el huevo, en condiciones cuasi estáticas, pero con una fuerza constante a baja velocidad, midiendo la magnitud de la deformación de la cáscara sin que ésta se rompa.

Para estos efectos la cáscara del huevo se comporta como un elemento Hookeano o resorte, es decir, ésta sufre una deformación elástica, lo que significa que la deformación se recupera luego de retirar la fuerza que la produjo (Voisey y Hunt, 1974).

La deformación no destructiva puede ser usada para estimar la fuerza requerida para quebrar la cáscara del huevo (Hamilton, 1982), siendo un mejor predictor que la gravedad específica o la medición del espesor de la cáscara (Voisey y Hamilton., 1977); Además por el hecho de no destruir el huevo es altamente apropiado para evaluar la incubabilidad de éste, siendo un método más rápido y preciso que la medición de la gravedad específica (Arias, 1998).

Ensayos cuasi estáticos

Estos métodos consisten en comprimir el huevo con fuerzas crecientes entre dos superficies lisas, una fija y otra móvil, hasta que éste se fracture (en ensayos de compresión) o entre una superficie fija y otra móvil de pequeño diámetro (ensayo de puntura). A pesar de que la fuerza de fractura en el primer caso se debe a un esfuerzo de tensión en el interior de la cáscara y en el segundo caso, a una fuerza cortante (Voisey y Hunt, 1974), ambas fuerzas están relacionadas. El huevo, normalmente es comprimido

en el ecuador con el polo axial paralelo a las superficies de compresión, porque la cáscara del huevo es más débil en el ecuador (Voisey y Hunt, 1964). Sin embargo, existe una gran variación en la fuerza de la cáscara alrededor del ecuador del huevo (Voisey y Foster, 1970).

Los resultados obtenidos mediante estos ensayos, al igual que en los de deformidad, varían dependiendo de la temperatura, de esta manera al aumentar la temperatura ambos disminuyen (Voisey et al., 1979).

La realización de diversos estudios biomecánicos ha permitido dilucidar la fuerza más recomendable a aplicar sobre el huevo para realizar los test de compresión, esta es de 3 mm/seg. (Voisey y Hunt, 1969).

Estos ensayos tienen amplias ventajas sobre la determinación de la gravedad específica, en el sentido que permiten determinaciones cuantitativas precisas de valor estadístico confiable y los valores obtenidos no son influenciados por el tamaño de la cámara de aire (Arias, 1998).

Ensayos dinámicos o de impacto

Estos métodos consisten en dejar caer un objeto sobre el huevo y variar la fuerza aplicada cambiando la altura desde donde se deja caer el objeto, cambiando el peso del objeto, impactando varias veces el huevo con un objeto de peso único o modificando el ángulo de un plano inclinado por el que se deja caer un huevo estrellándose contra un borde hasta que éste se rompa (Hamilton, 1982).

Estos test están altamente correlacionados con los cuasi estáticos, pero están limitados por razones prácticas ya que son más lentos y no es fácil discriminar el efecto acumulativo que se produce al tener que impactar el huevo varias veces (Hamilton, 1982). Tyler y Moore (1965) encontraron que los golpes no producían un daño visible, pero causaban un daño considerable en el interior de la cáscara.

Espesor de la cáscara

El espesor es el principal factor involucrado en la resistencia y deformidad de la cáscara del huevo, otros factores como la forma (curvatura) dan cuenta de un porcentaje importante de la resistencia y de la deformidad, estos parámetros también dependen de factores no muy bien estudiados entre los que se encuentran la disposición estructural de las mamilas y la composición de la matriz orgánica de la cáscara (Voisey y Hunt, 1967).

La medición directa del espesor de la cáscara se puede realizar a través de un práctico instrumento llamado micrómetro, el cual lamentablemente es muy lento y se requiere ser cuidadoso en la elección del lugar de la medición y el número de éstas (Overfield, 1995). Las superficies de medición del micrómetro no pueden ser achatadas si se quiere medir el espesor de superficies curvas, para estos efectos idealmente deben usarse puntas esféricas (Voisey y Hunt, 1974)

La medición del espesor debe realizarse en el ecuador, que a pesar de ser la parte más delgada de la cáscara es la más uniforme (Tyler y Geake, 1965); pero no solo el espesor varía dentro de la cáscara, también lo hacen la densidad, la estructura de los

cristales, porosidad, rugosidad de la superficie, dureza y composición química de ésta (Voisey y Hunt, 1974).

OBJETIVOS

General: Evaluar el efecto de la inyección de adrenalina, como agente estresante, sobre la calidad de la cáscara del huevo de las gallinas.

Específico: Determinar en que momento de la formación de la cáscara del huevo la inyección de adrenalina es más determinante en la calidad de dicha estructura.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico: Los huevos a estudiar fueron obtenidos de 25 gallinas White Leghorn de 34 semanas de edad, las cuales fueron pesadas previamente de manera de homogeneizar el grupo, mantenidas con un fotoperíodo de 16 horas/luz/día; alimentadas con alimento estándar para ponedoras y agua *ad libitum*.

Previo al inicio del experimento se estudiaron los huevos de todas las gallinas bajo las mismas variables físico-mecánicas y ultraestructurales que los huevos provenientes de éstas una vez comenzado el experimento, para verificar la calidad de las cáscaras.

Procedimiento experimental: Se constituyeron cinco subgrupos de tres gallinas cada uno, que fueron tratadas con 1 mg de adrenalina, en un volumen total de 1 ml (Hughes et al., 1986; Solomon et al., 1987), aplicada mediante inyección subcutánea y

con dosis única a distintas horas post ovipostura (**h p.o.**), es decir, lapso de tiempo que media entre el último huevo puesto por la gallina y la hora de inyección.

El subgrupo A fue inyectado a las 3 horas post ovipostura, el B a las 4,5 horas post ovipostura, el C a las 5,5 horas post ovipostura, el subgrupo D a las 10 horas y el E a las 15 horas post ovipostura.

El resto de las aves constituyeron cinco subgrupos de dos gallinas cada uno, que fueron el control de cada tratamiento y que fueron inoculadas con 1 ml de agua bidestilada estéril por vía subcutánea, siguiendo la misma división de subgrupos y horario de inyección que el grupo de aves tratadas.

Las aves tratadas y control fueron sometidos a las mismas condiciones ambientales y de alimentación.

En todos los subgrupos se analizaron los tres huevos consecutivos a la inyección. Pasados 10 días de la inyección se examinaron los huevos puestos por las gallinas de cada subgrupo para descartar un efecto residual del estrés producido por la inyección de adrenalina. Una vez comprobado esto las gallinas fueron rotadas de subgrupo en forma aleatoria para repetir el procedimiento experimental anteriormente descrito en una oportunidad más, y de esta manera completar en total 6 huevos por día post inyección por subgrupo, siendo la unidad de muestreo cada huevo.

Previo a ser analizados, los huevos se observaron por transiluminación o encandilamiento (candling) con el objeto de discriminar la presencia de fracturas en la cáscara del huevo. Esto se efectuó mediante una fuente de luz artificial con ampolleta de 60 Watt.

En todos los huevos se analizaron variables fisico-mecánicas y ultraestructurales:

1.- Variables físico-mecánicas.

1.1.- Resistencia: La medición de la resistencia se hizo mediante un método directo que utiliza la compresión cuasi estática a baja velocidad (3 mm/seg) en un durómetro TSS QC-SPA Shell Analyser. El método consiste en comprimir el huevo con fuerza creciente entre dos superficies, una fija y la otra móvil, hasta que se fracture, debiéndose la fuerza de la fractura a un esfuerzo de tensión en el interior de la cáscara. El huevo es comprimido por su parte más débil, que corresponde al ecuador, con su eje mayor paralelo a las superficies de compresión. En general la fuerza de fractura o de resistencia de la cáscara del huevo aviar varía entre 2,0 a 3,5 kg (20 – 30 N). La medición se expresó en gramos (g).

1.2.- Espesor de la cáscara: El espesor de la cáscara del huevo es un buen predictor de la resistencia de ésta. La medición se realizó en la región ecuatorial donde la cáscara es más delgada y por lo tanto donde se produce la fractura de ésta. Se consideró el espesor en presencia y ausencia de las membranas de la cáscara, las cuales se extrajeron con una solución de hipoclorito de sodio 50%. Para la medición se utilizó un micrómetro digital Mitutoyo, expresándose el espesor en milímetros (mm).

Las variables físico-mecánicas fueron comparadas estadísticamente mediante prueba de t de dos colas.

2.- **Ultraestructura.**

Se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (S.E.M.).

De los huevos provenientes de las gallinas tratadas y controles se extrajo un trozo de cáscara de la región ecuatorial vecino al lugar de la fractura, el cual fue sombreado con oro y posteriormente se observó en un microscopio electrónico de barrido Tesla BS 343 A. La observación de la cáscara se hizo con y sin membranas para ver la base de las columnas. Para eliminar las membranas se utilizó hipoclorito de sodio al 50%.

RESULTADOS

La observación de los huevos post transiluminados no mostró alteraciones significativas dependientes de los distintos horarios de inyección de adrenalina, sin embargo en ocasiones se observaron huevos con parches de calcio o protuberancias ecuatoriales.

Al analizar los datos, tanto de gallinas control como de las tratadas con adrenalina, se observó una gran correlación entre los valores de resistencia y el espesor de la cáscara con y sin membranas (Tabla 1). Una correlación aún mayor se observó cuando se comparó el espesor de la cáscara con membranas y el espesor de ésta sin membranas (Tabla 1).

Tabla 1: Valores de correlación entre resistencia y espesor de la cáscara de huevo de gallina con y sin membranas.

CORRELACIÓN	Resistencia	Espesor con MB
Espesor con MB	0,8678	
Espesor sin MB	0,8357	0,9846

MB= Membranas de la cáscara.

Valores obtenidos de gallinas control y tratadas con adrenalina.

Los huevos provenientes de gallinas inyectadas con agua bidestilada estéril no presentaron diferencias estadísticamente significativas para sus valores de resistencia, independiente del tiempo post ovipostura en que se sometieron al procedimiento (Tablas 2, 3, 4, 5 y 6).

En el caso de las gallinas tratadas con 1 mg de adrenalina a distintos tiempos post ovipostura, las cáscaras de sus huevos tampoco presentaron diferencias estadísticamente significativas para la resistencia a la fractura comparada con los valores previos a la inyección, siendo esto independiente de la hora post ovipostura en que son tratadas (Tablas 2, 3, 4, 5 y 6).

Tabla 2: Resistencia a la fractura de la cáscara de los huevos, expresada en gramos, obtenidos de gallinas inyectadas con agua bidestilada o adrenalina a 3 h p.o. *

	Resistencia preinyección	Resistencia huevo 1	Resistencia huevo 2	Resistencia huevo 3	Resistencia huevo día 10
Iny. 3 h p.o. Control	2416 ± 580,94	2160 ± 519,65	2236 ± 382,53	2636 ± 494,72	2627 ± 714,11
Iny. 3 h p.o. Tratado	2692,4 ± 496,08	1848 ± 1537,64	2714 ± 1068,21	2362,6 ± 1317,68	2428,8 ± 1384,76

* Los valores no muestran diferencias estadísticamente significativa. $P < 0,05$.

h p.o.= Horas post ovipostura. Control= inyección con agua bidestilada. Tratado= inyección con adrenalina.

Tabla 3: Resistencia a la fractura de la cáscara de los huevos, expresada en gramos, obtenidos de gallinas inyectadas con agua bidestilada o adrenalina a 4.5 h p.o. *

	Resistencia preinyección	Resistencia huevo 1	Resistencia huevo 2	Resistencia huevo 3	Resistencia huevo día 10
Iny. 4,5 h p.o. Control	2416 ± 580,94	2532,2 ± 1053,06	2367 ± 925,59	2413 ± 584,91	1961,2 ± 391,83
Iny. 4,5 h p.o. Tratado	2692,4 ± 496,08	2417,6 ± 501	2617,8 ± 765,88	2133,3 ± 703,26	2184 ± 722,34

* Los valores no muestran diferencias estadísticamente significativa. $P < 0,05$.

h p.o.= Horas post ovipostura. Control= inyección con agua bidestilada. Tratado= inyección con adrenalina.

Tabla 4: Resistencia a la fractura de la cáscara de los huevos, expresada en gramos, obtenidos de gallinas inyectadas con agua bidestilada o adrenalina a 5.5 h p.o. *

	Resistencia preinyección	Resistencia huevo 1	Resistencia huevo 2	Resistencia huevo 3	Resistencia huevo día 10
Iny. 5,5 h p.o. Control	2416 ± 580,94	2659,5 ± 462,10	2676,5 ± 486,80	2357,5 ± 423,05	2171,7 ± 597,68
Iny. 5,5 h p.o. Tratado	2692,4 ± 496,08	2084 ± 487,76	2107,6 ± 562,54	2471 ± 500,28	1742,3 ± 423,75

* Los valores no muestran diferencias estadísticamente significativa. $P < 0,05$.

h p.o.= Horas post ovipostura. Control= inyección con agua bidestilada. Tratado= inyección con adrenalina.

Tabla 5: Resistencia a la fractura de la cáscara de los huevos, expresada en gramos, obtenidos de gallinas inyectadas con agua bidestilada o adrenalina a 10 h p.o. *

	Resistencia preinyección	Resistencia huevo 1	Resistencia huevo 2	Resistencia huevo 3	Resistencia huevo día 10
Iny. 10 h p.o. Control	2416 ± 580,94	2108 ± 299,92	2499,2 ± 960,92	2844,2 ± 980,90	2519,7 ± 634,25
Iny. 10 h p.o. Tratado	2692,4 ± 496,08	2555,4 ± 983,87	2293 ± 596,53	2399,8 ± 613,04	3218,2 ± 546,13

* Los valores no muestran diferencias estadísticamente significativa. P < 0,05.

h p.o.= Horas post ovipostura. Control= inyección con agua bidestilada. Tratado= inyección con adrenalina.

Tabla 6: Resistencia a la fractura de la cáscara de los huevos, expresada en gramos, obtenidos de gallinas inyectadas con agua bidestilada o adrenalina a 15 h p.o. *

	Resistencia preinyección	Resistencia huevo 1	Resistencia huevo 2	Resistencia huevo 3	Resistencia huevo día 10
Iny. 15 h p.o. Control	2416 ± 580,94	2917,2 ± 576,10	2486,2 ± 359,33	3087,7 ± 304,66	3117,5 ± 665,33
Iny. 15 h p.o. Tratado	2692,4 ± 496,08	2686 ± 392,54	2643,5 ± 280,68	2704,3 ± 419,81	2799,5 ± 546,13

* Los valores no muestran diferencias estadísticamente significativa. P < 0,05.

h p.o.= Horas post ovipostura. Control= inyección con agua bidestilada. Tratado= inyección con adrenalina.

Por su parte, los valores de espesor de cáscara con y sin membrana, tanto para gallinas control como para las tratadas, no presentaron diferencias estadísticamente significativas indiferentemente de la hora post ovipostura en que fueron inyectadas (Tablas 7, 8, 9, 10 y 11).

Tabla 7: Espesor de la cáscara de los huevos, expresado en mm, obtenidos de gallinas inyectadas con agua bidestilada o adrenalina a 3 h p.o.*

	Espesor con mb preinyección	Espesor con mb Huevo 1	Espesor con mb huevo 2	Espesor con mb huevo 3	Espesor con mb huevo día 10
Iny. 3 h p.o. Control	0,296 ± 0,034	0,288 ± 0,033	0,296 ± 0,035	0,287 ± 0,022	0,299 ± 0,025
Iny. 3 h p.o. Tratado	0,343 ± 0,036	0,221 ± 0,149	0,308 ± 0,053	0,280 ± 0,103	0,314 ± 0,068
	Espesor sin mb preinyección	Espesor sin mb Huevo 1	Espesor sin mb huevo 2	Espesor sin mb huevo 3	Espesor sin mb huevo día 10
Iny. 3 h p.o. Control	0,288 ± 0,032	0,278 ± 0,030	0,284 ± 0,030	0,277 ± 0,020	0,287 ± 0,022
Iny. 3 h p.o. Tratado	0,311 ± 0,032	0,200 ± 0,158	0,291 ± 0,049	0,258 ± 0,130	0,298 ± 0,063

* Los valores no muestran diferencias estadísticamente significativa. $P < 0,05$.

h p.o.= Horas post ovipostura. m.b.= Membranas de la cáscara.

Control= inyección con agua bidestilada. Tratado= inyección con adrenalina.

Tabla 8: Espesor de la cáscara de los huevos, expresado en mm, obtenidos de gallinas inyectadas con agua bidestilada o adrenalina a 4.5 h p.o. *

	Espesor con mb preinyección	Espesor con mb Huevo 1	Espesor con mb huevo 2	Espesor con mb huevo 3	Espesor con mb huevo día 10
Iny. 4,5 h p.o. Control	0,296 ± 0,034	0,288 ± 0,056	0,284 ± 0,049	0,298 ± 0,056	0,292 ± 0,043
Iny. 4,5 h p.o. Tratado	0,343 ± 0,036	0,305 ± 0,030	0,314 ± 0,048	0,305 ± 0,056	0,270 ± 0,040
	Espesor sin mb preinyección	Espesor sin mb Huevo 1	Espesor sin mb huevo 2	Espesor sin mb huevo 3	Espesor sin mb huevo día 10
Iny. 4,5 h p.o. Control	0,288 ± 0,032	0,260 ± 0,047	0,270 ± 0,049	0,279 ± 0,056	0,277 ± 0,049
Iny. 4,5 h p.o. Tratado	0,311 ± 0,032	0,291 ± 0,031	0,298 ± 0,039	0,287 ± 0,037	0,255 ± 0,043

* Los valores no muestran diferencias estadísticamente significativa. $P < 0,05$.

h p.o.= Horas post ovipostura. m.b.= Membranas de la cáscara.

Control= inyección con agua bidestilada. Tratado= inyección con adrenalina.

Tabla 9: Espesor de la cáscara de los huevos, expresado en mm, obtenidos de gallinas inyectadas con agua bidestilada o adrenalina a 5.5 h p.o. *

	Espesor con mb preinyección	Espesor con mb huevo 1	Espesor con mb huevo 2	Espesor con mb huevo 3	Espesor con mb huevo día 10
Iny. 5,5 h p.o. Control	0,296 ± 0,034	0,324 ± 0,021	0,317 ± 0,022	0,317 ± 0,032	0,285 ± 0,036
Iny. 5,5 h p.o. Tratado	0,343 ± 0,036	0,272 ± 0,031	0,279 ± 0,032	0,286 ± 0,031	0,238 ± 0,032
	Espesor sin mb preinyección	Espesor sin mb huevo 1	Espesor sin mb huevo 2	Espesor sin mb huevo 3	Espesor sin mb huevo día 10
Iny. 5,5 h p.o. Control	0,288 ± 0,032	0,302 ± 0,017	0,301 ± 0,028	0,300 ± 0,028	0,269 ± 0,040
Iny. 5,5 h p.o. Tratado	0,311 ± 0,032	0,259 ± 0,033	0,264 ± 0,039	0,273 ± 0,033	0,223 ± 0,036

* Los valores no muestran diferencias estadísticamente significativa. $P < 0,05$.

h p.o.= Horas post ovipostura. m.b.= Membranas de la cáscara.
Control= inyección con agua bidestilada. Tratado= inyección con adrenalina.

Tabla 10: Espesor de la cáscara de los huevos, expresado en mm, obtenidos de gallinas inyectadas con agua bidestilada o adrenalina a 10 h p.o. *

	Espesor con mb preinyección	Espesor con mb huevo 1	Espesor con mb huevo 2	Espesor con mb huevo 3	Espesor con mb huevo día 10
Iny. 10 h p.o. Control	0,296 ± 0,034	0,323 ± 0,025	0,314 ± 0,065	0,324 ± 0,060	0,305 ± 0,051
Iny. 10 h p.o. Tratado	0,343 ± 0,036	0,304 ± 0,020	0,279 ± 0,027	0,291 ± 0,027	0,278 ± 0,088
	Espesor sin mb preinyección	Espesor sin mb huevo 1	Espesor sin mb huevo 2	Espesor sin mb huevo 3	Espesor sin mb huevo día 10
Iny. 10 h p.o. Control	0,288 ± 0,032	0,310 ± 0,025	0,299 ± 0,059	0,307 ± 0,051	0,280 ± 0,051
Iny. 10 h p.o. Tratado	0,311 ± 0,032	0,288 ± 0,016	0,267 ± 0,019	0,272 ± 0,020	0,261 ± 0,095

* Los valores no muestran diferencias estadísticamente significativa. P < 0,05.

h p.o.= Horas post ovipostura. m.b.= Membranas de la cáscara.
Control= inyección con agua bidestilada. Tratado= inyección con adrenalina.

Tabla 11: Espesor de la cáscara de los huevos, expresado en mm, obtenidos de gallinas inyectadas con agua bidestilada o adrenalina a 15 h p.o. *

	Espesor con mb preinyección	Espesor con mb huevo 1	Espesor con mb huevo 2	Espesor con mb huevo 3	Espesor con mb huevo día 10
Iny. 15 h p.o. Control	0,296 ± 0,034	0,331 ± 0,012	0,322 ± 0,025	0,357 ± 0,036	0,345 ± 0,028
Iny. 15 h p.o. Tratado	0,343 ± 0,036	0,319 ± 0,039	0,339 ± 0,031	0,328 ± 0,039	0,331 ± 0,034
	Espesor sin mb preinyección	Espesor sin mb huevo 1	Espesor sin mb huevo 2	Espesor sin mb huevo 3	Espesor sin mb huevo día 10
Iny. 15 h p.o. Control	0,288 ± 0,032	0,316 ± 0,009	0,309 ± 0,019	0,340 ± 0,032	0,330 ± 0,029
Iny. 15 h p.o. Tratado	0,311 ± 0,032	0,305 ± 0,037	0,329 ± 0,032	0,311 ± 0,038	0,312 ± 0,037

* Los valores no muestran diferencias estadísticamente significativa. P < 0,05.

h p.o.= Horas post ovipostura. m.b.= Membranas de la cáscara.
Control= inyección con agua bidestilada. Tratado= inyección con adrenalina.

Al hacer un análisis cualitativo se observó que esta falta de diferencia estadísticamente significativa se debía a la gran variación individual de respuesta de las gallinas tanto frente a la inyección control como al tratamiento con adrenalina. De hecho al analizar la respuesta individual se apreció que hay un número de gallinas que no responde efectivamente a la inyección de agua bidestilada o adrenalina, mientras que otro grupo disminuyó los valores de resistencia o espesor de la cáscara por debajo del valor promedio presentado por los huevos obtenidos previo a las inyecciones.

Al realizar un análisis ultraestructural de las cáscaras de huevos de aquellas gallinas que respondieron a la inyección disminuyendo sus valores de resistencia y espesor de la cáscara, ya sea con agua destilada o adrenalina, y compararlos con las cáscaras de huevos de estas mismas gallinas previo a la inyección (figuras 2a y 2b), se observó que existe una diferencia entre tratadas y control.

En el caso de las gallinas control que presentaban una disminución de los valores de resistencia y espesor de la cáscara no se evidenciaba con alteraciones visibles al microscopio electrónico de barrido; a excepción de un caso en el que una gallina inyectada a las 15 horas post ovipostura (h p.o.) presentó en el segundo huevo una disminución notable de su resistencia y esto se acompañó con la presencia de una gran cantidad de cuerpos B en la cáscara del huevo (figura 3).

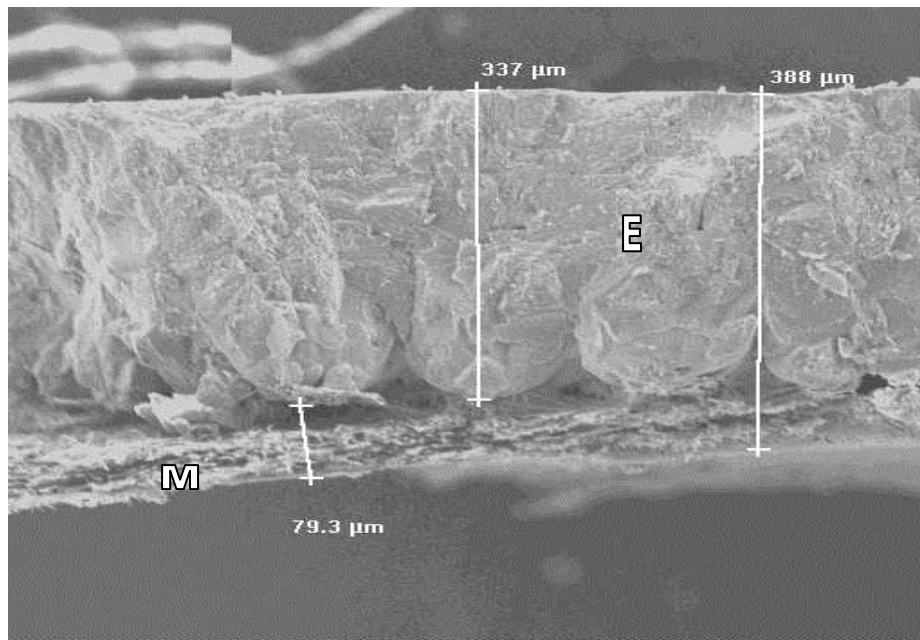


Figura 2a. Microscopía electrónica de barrido (M.E.B.), corte transversal de la cáscara de huevo de una gallina normal. Se especifica el espesor de los distintos

componentes de la cáscara. (170x). E= empalizada, M= membranas de la cáscara.

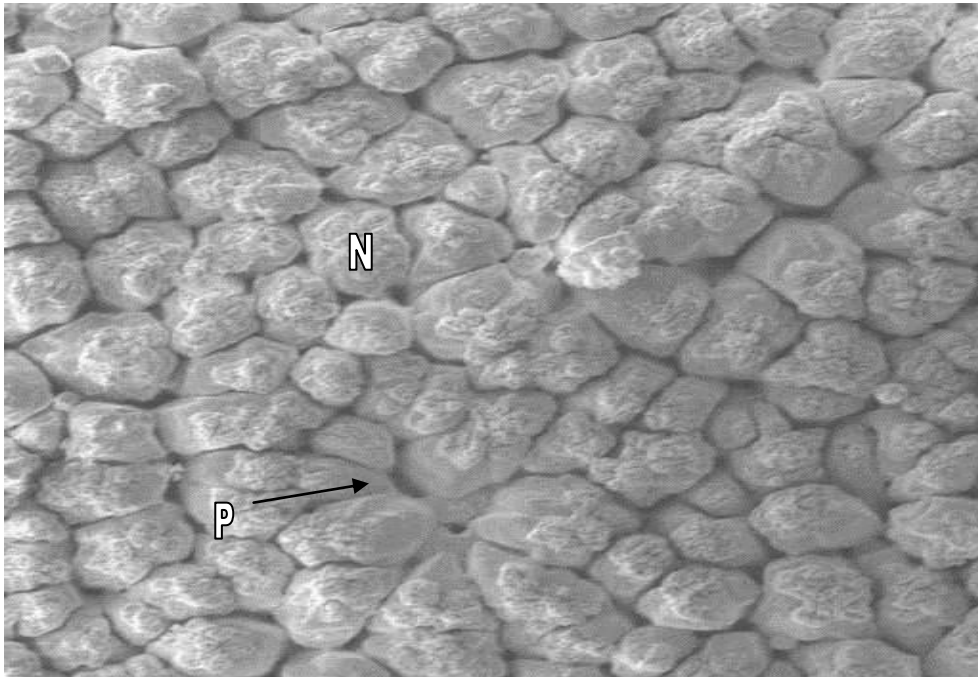


Figura 2b. Microscopía electrónica de barrido de una cáscara de huevo de gallina antes de ser inyectada, en la cual se ha retirado las membranas con hipoclorito de sodio para observar la base de las mamilas y sus columnas de diámetro homogéneo. (170x). N= mamila, P= poro.

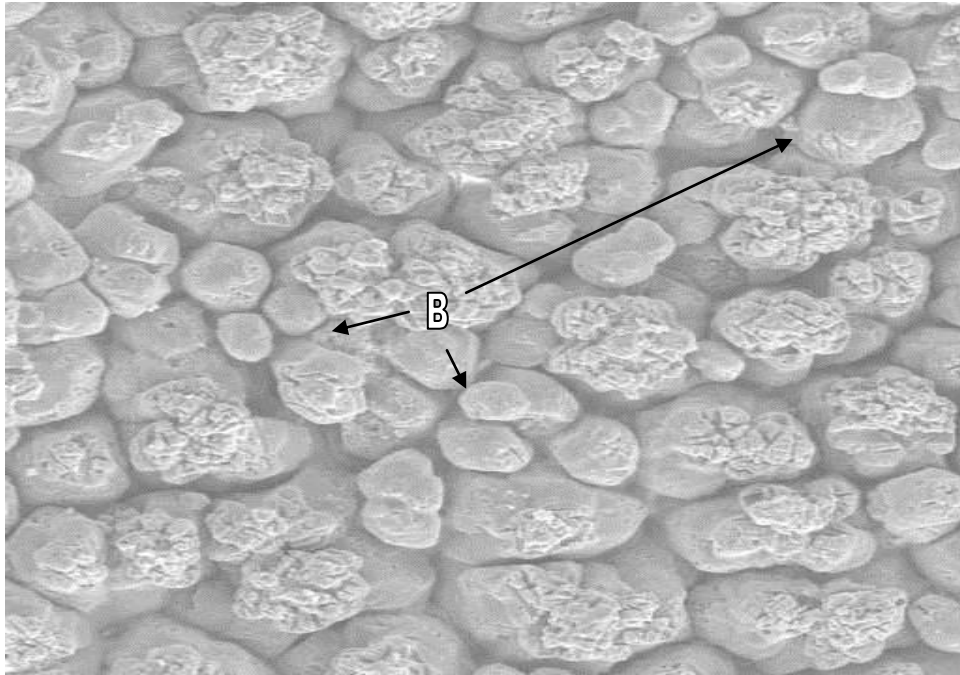


Figura 3. . Microscopía electrónica de barrido de cáscara de huevo proveniente de una gallina control inyectada a las 15 h p.o., que es la excepción de las gallinas control, presentando gran cantidad de cuerpos B en su cáscara. (330x). B= cuerpo B.

En el caso de las gallinas tratadas con adrenalina la respuesta al tratamiento y las alteraciones que se observaron variaban dependiendo de la gallina y de la hora post ovipostura en que eran inyectadas.

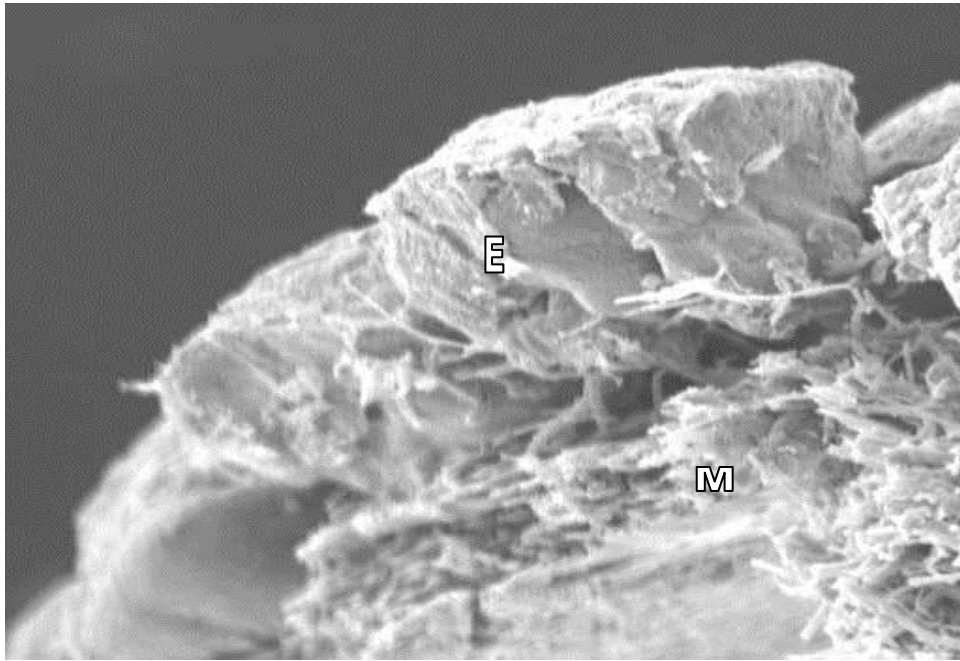
De las 6 gallinas inyectadas con adrenalina a 3 h p.o., 3 no respondieron al tratamiento, manteniendo los valores de resistencia y espesor de la cáscara similar a los obtenidos en los huevos de estas gallinas previo al tratamiento, tampoco se observó variación en la apariencia ultraestructural. Las restantes 3 gallinas respondieron cada una de forma distinta, presentándose en la gallina 1 la oviposición de dos huevos incapaces de resistir el contenido y sus cáscaras parecían de papel (figuras 4 y 5). El tercer huevo tenía bajos valores de resistencia y espesor de la cáscara.



Figuras 4 y 5. “Cáscaras de papel”, que fueron incapaces de resistir su contenido, puestas por gallinas tratadas con adrenalina a 3 h p.o.

Ultraestructuralmente las “cáscaras de papel” presentaban columnas extremadamente cortas y membranas malformadas (figura 6); no obstante, eran cáscaras

a término ya que presentaban cutícula. El tercer huevo de esta gallina mostraba líneas de



fractura con gran separación entre las columnas y presencia de cuerpos B (figura 7).

Figura 6. Microscopía electrónica de barrido de cáscara de huevo obtenida de una gallina tratada con adrenalina a 3 h p.o. en que se observan columnas cortas. (670x). M= membranas de la cáscara, E= empalizada.

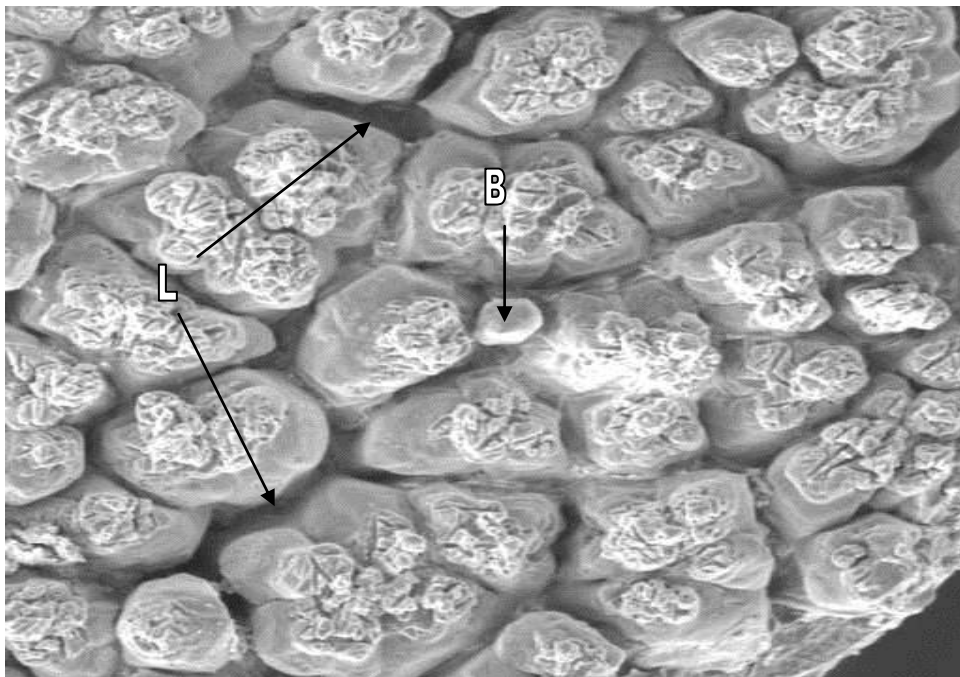


Figura 7. Microscopía electrónica de barrido se observan líneas de fractura y presencia de cuerpos B en la cáscara de huevo obtenida de una gallina tratada con adrenalina a 3 h p.o. (330x). B= cuerpo B, L= línea de fractura.

En la gallina 2 existió una disminución de los valores muy similar en los 4 huevos estudiados e incluso el huevo puesto el décimo día post inyección estaba quebrado. A nivel ultraestructural se observaron columnas separadas e irregulares (figura 8), columnas decapitadas (figura 9) y de pequeño tamaño (figura 10).

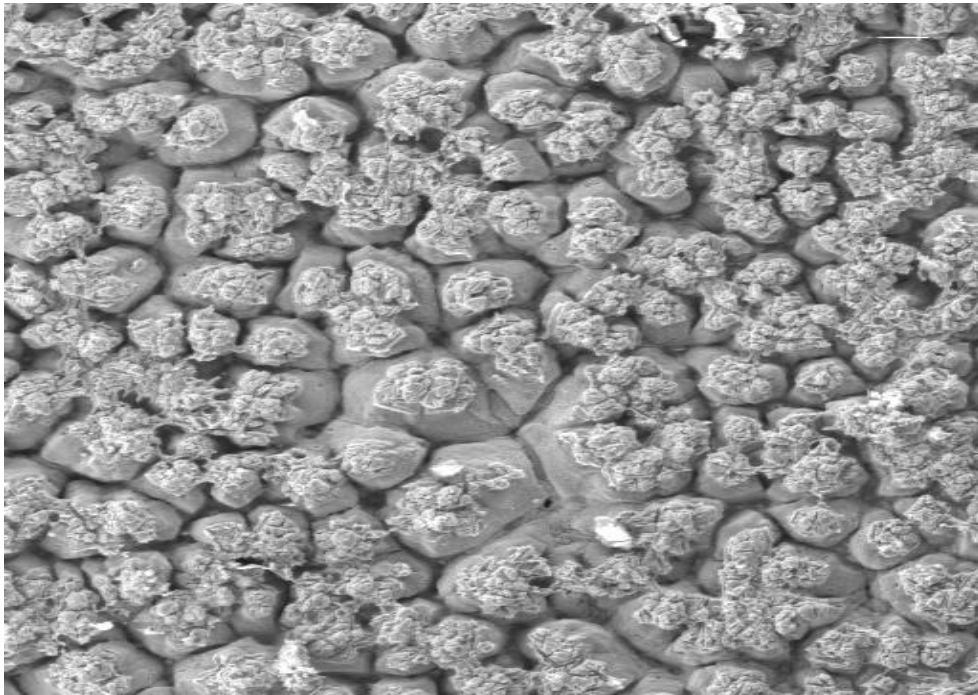


Figura 8. Microscopía electrónica de barrido de cáscara de huevo proveniente de una gallina tratada con adrenalina a 3 h p.o. en que se observa las columnas separadas e irregulares. (170x).

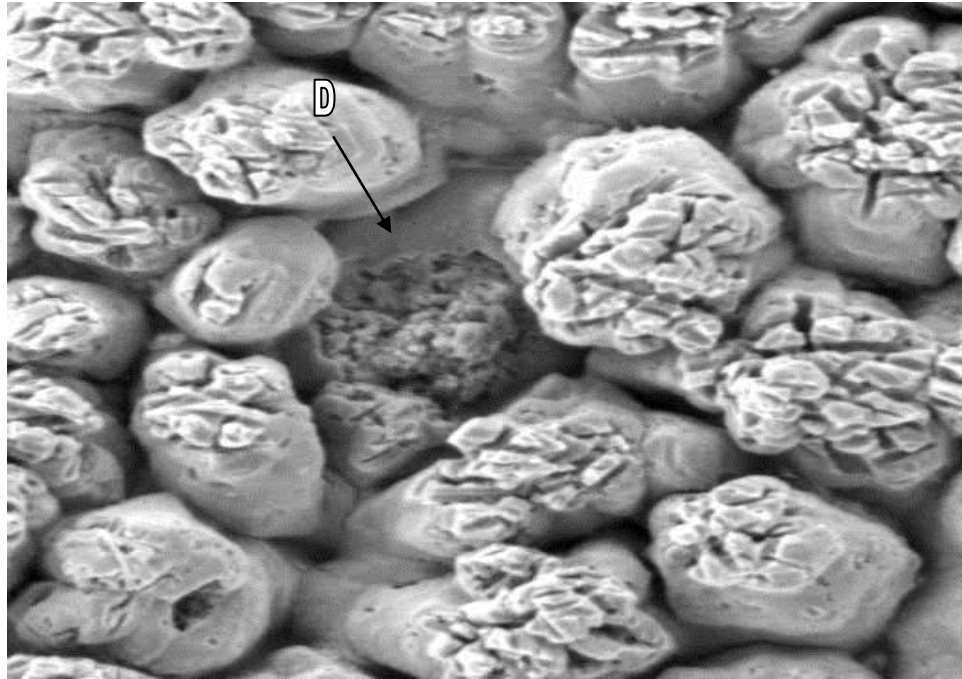


Figura 9. Microscopía electrónica de barrido de columnas decapitadas por efecto del estrés adrenérgico sobre la cáscara de huevo de una gallina tratada a 3 h p.o. (670x). D= columna decapitada.

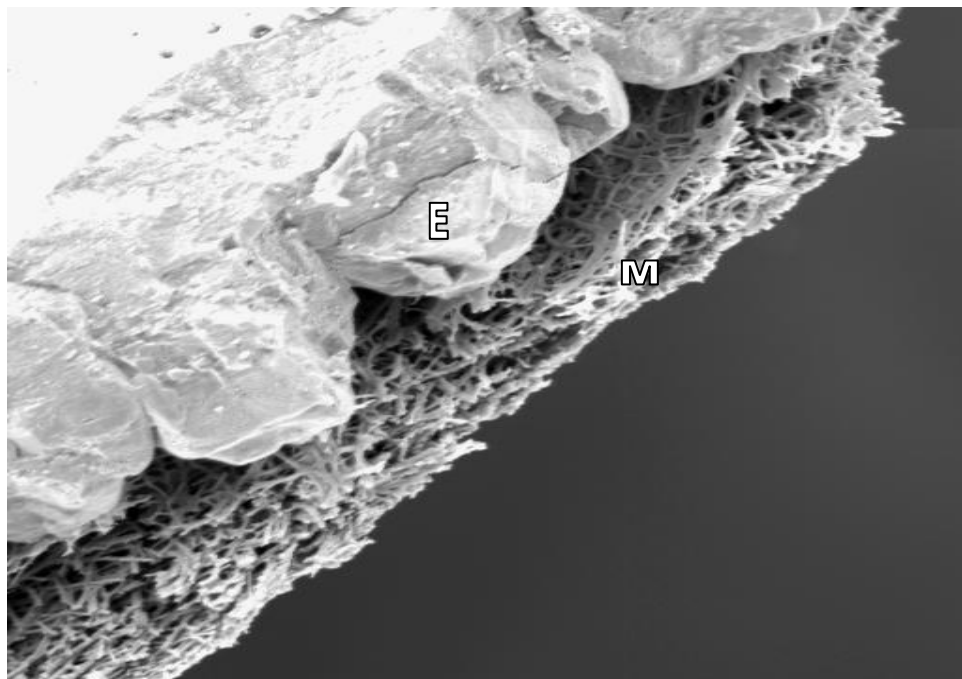


Figura 10. Microscopía electrónica de barrido de cáscara de huevo obtenido de una gallina tratada con adrenalina a 3 h p.o. donde se muestra el pequeño tamaño de las columnas de la capa en empalizada (670x). M= membranas de la cáscara, E= empalizada.

La gallina 3 que respondió al ser inyectada con adrenalina a 3 h p.o. presentó un adelanto de aproximadamente 15 horas en la postura del primer huevo post inyección, el cual tenía una cáscara que no estaba a término por lo que fue incapaz de resistir su contenido. Ultraestructuralmente las membranas de la cáscara estaban bien formadas y las mamilas mostraban aglomeraciones de calcio con la forma rombohédrica clásica de los cristales de calcita (figuras 11, 12, 13). Los restantes huevos presentaron valores de resistencia a la fractura y espesor de la cáscara dentro de los valores promedios previos al tratamiento, no obstante, también presentaban alteraciones ultraestructurales como presencia de cuerpos A y B, columnas delgadas y cristales de calcita entre las columnas.

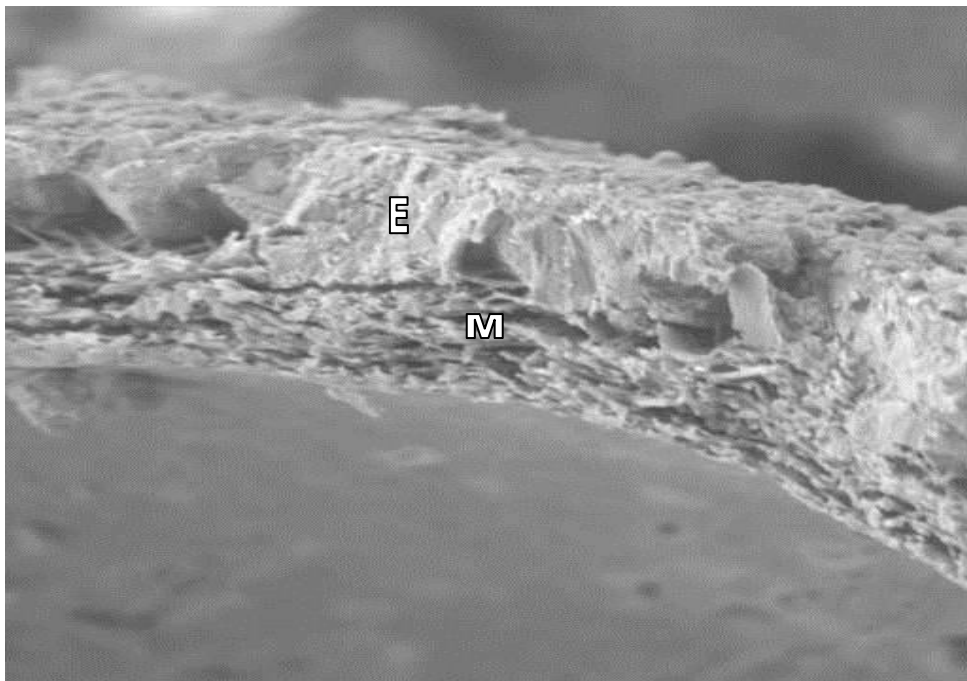


Figura 11. Microscopía electrónica de barrido de cáscara de huevo obtenida de una gallina inyectada con adrenalina a 3 h p.o. en que se muestra la escasa calcificación

que alcanzó a concretarse antes de que el huevo fuera expulsado. (670x). M= membranas de la cáscara, E= empalizada.

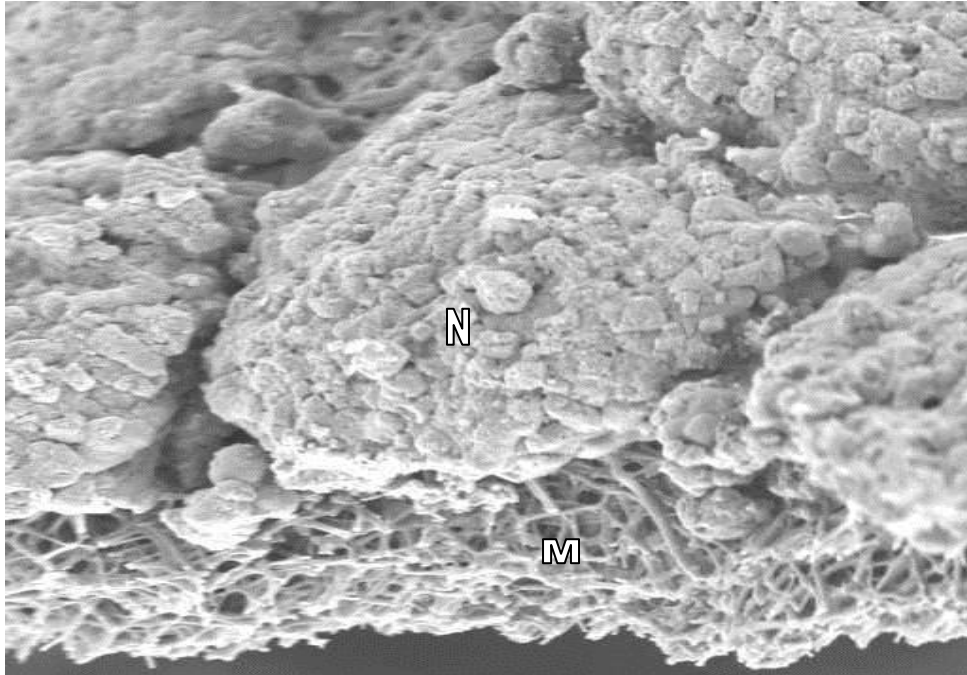


Figura 12. Microscopía electrónica de barrido de cáscara de huevo obtenida de una gallina tratada con adrenalina a 3 h p.o. en que se observa la buena formación de las membranas y las aglomeraciones de calcio sobre las mamilas. (670x). M= membranas de la cáscara, N= mamilas.

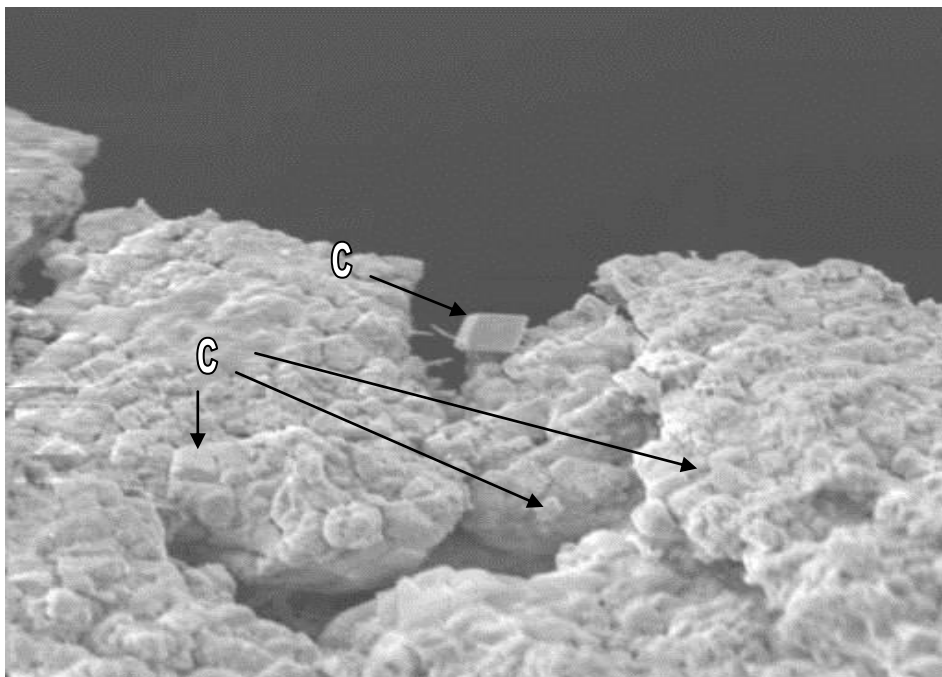


Figura 13. Microscopía electrónica de barrido de cáscara de huevo de una gallina inyectada con adrenalina a 3 h p.o. Muestra cristales de calcita con su clásica forma, sobre las mamilas de la cáscara, (670x). C= cristales de calcita.

Las gallinas inyectadas a 4,5 h p.o. no presentaron alteración de los parámetros físico-mecánicos en 3 de los 6 casos. En los otros casos en que si hubo respuesta al tratamiento la disminución de los valores de resistencia a la fractura y espesor de la cáscara se observaron desde el primer huevo hasta el huevo puesto el día 10 post inyección. A nivel ultraestructural se observó presencia de cuerpos A (figura 14) y B (figura 15), cristales de calcita entre las columnas, líneas de fracturas (figura 16), columnas de grosor desuniforme y membranas delgadas.

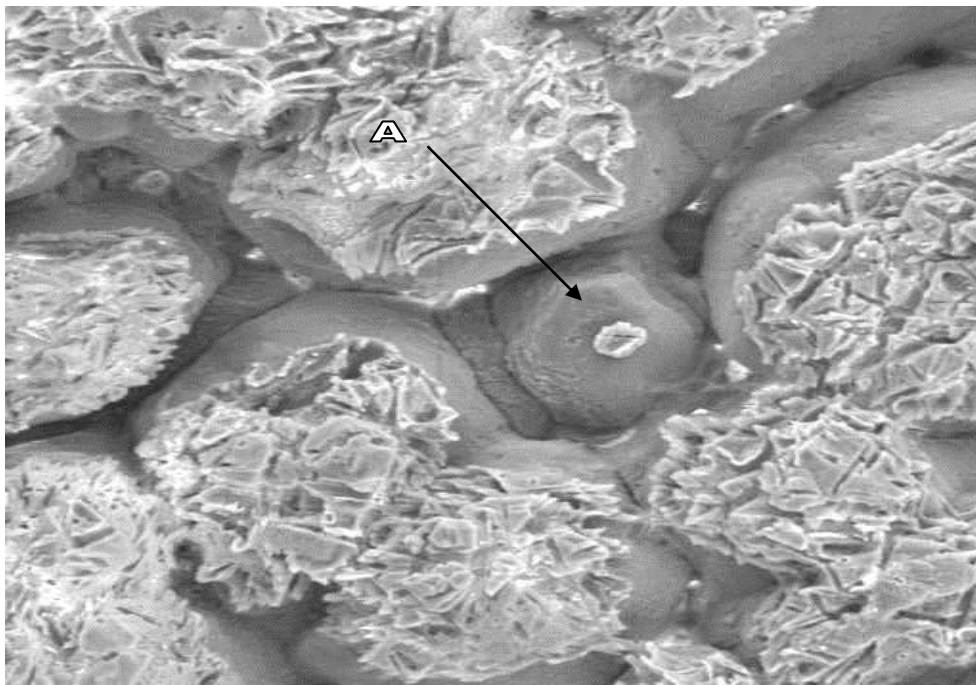


Figura 14. Microscopía electrónica de barrido de cáscara de huevo obtenida de una gallina inyectada con adrenalina a 4,5 h p.o. en la que se observa la presencia de cuerpo A. (670x). A= cuerpo A.

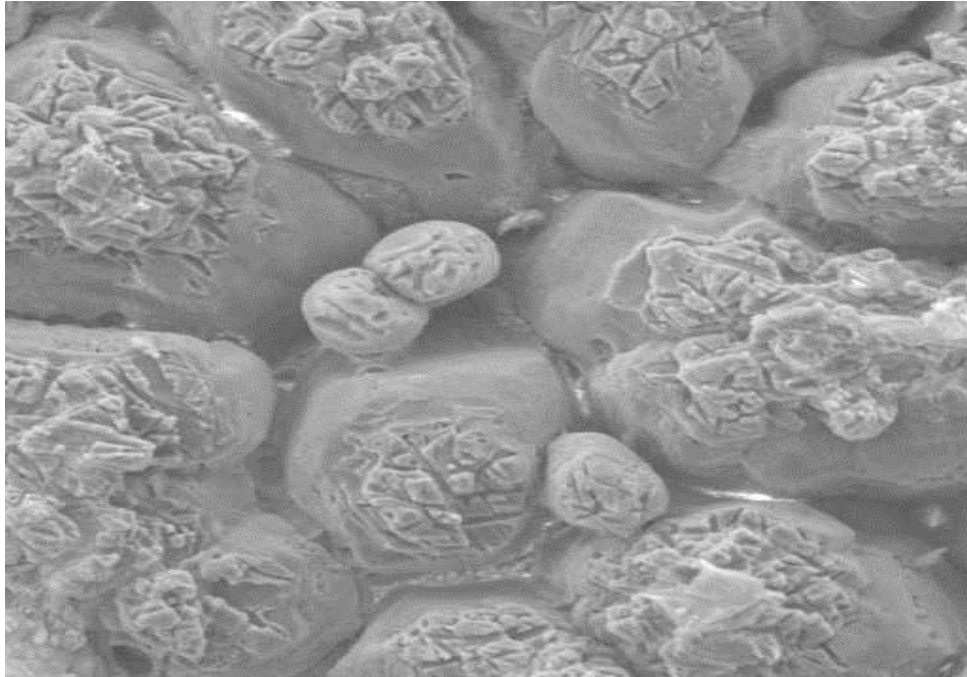


Figura 15. Microscopía electrónica de barrido donde se observan cuerpos B entre las columnas de la cáscara de un huevo proveniente de una gallina inyectada con adrenalina a 5 h p.o. (670x). B= cuerpo B.

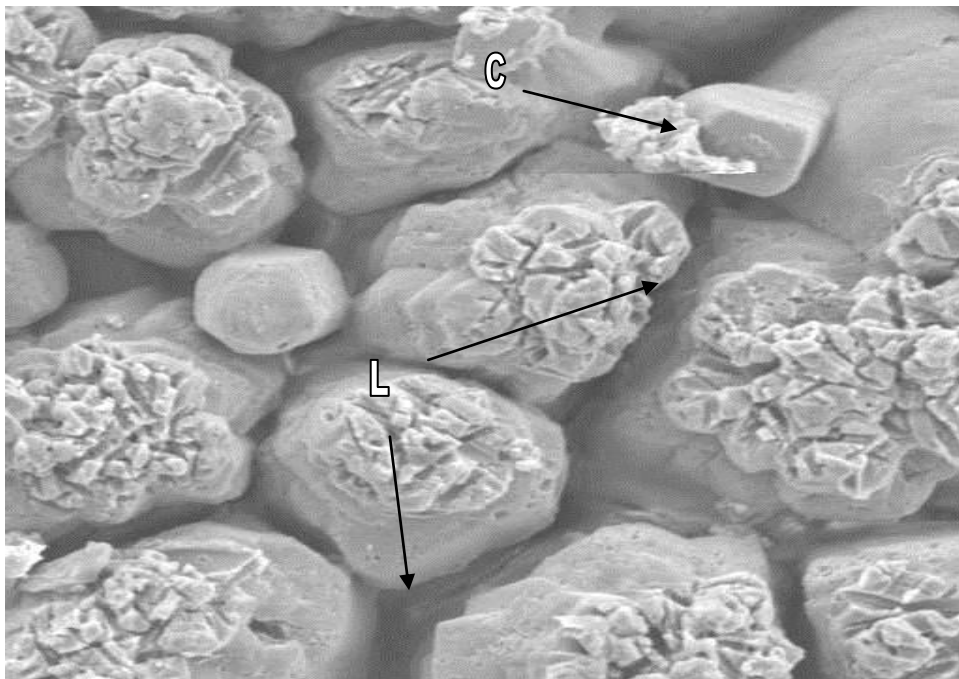


Figura 16. Microscopía electrónica de barrido de cáscara de huevo de una gallina inyectada con adrenalina a 4,5 h p.o. en la cual se observa la presencia de cristales de calcita y líneas de fracturas. (670x). C= cristales de calcita, L= líneas de fractura.

Al tratar a las gallinas a 5,5 h p.o. se observó que 2 de ellas no respondían al tratamiento tomando en cuenta las variables físico-mecánicas y que las otras 4 si lo hacían, aunque no todas en la misma magnitud. Las principales alteraciones a nivel ultraestructural fueron presencia de cuerpos A (figura 17) y B (figura 18), columnas separadas e irregulares, confluencia de mamilas (figura 19) y líneas de fractura (figura 20).

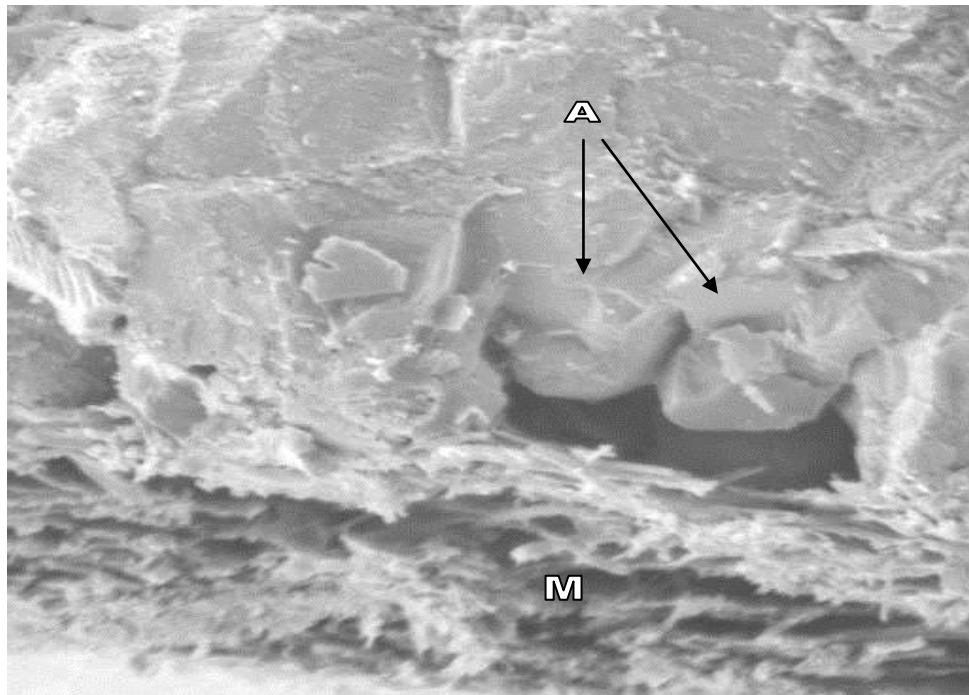


Figura 17. Microscopía electrónica de barrido donde se observan columnas sin contacto con las membranas de la cáscara (cuerpos A) en la cáscara de un huevo proveniente de una gallina tratada con adrenalina a 5,5 h p.o. (670x). A= cuerpos A, M= membranas de la cáscara.

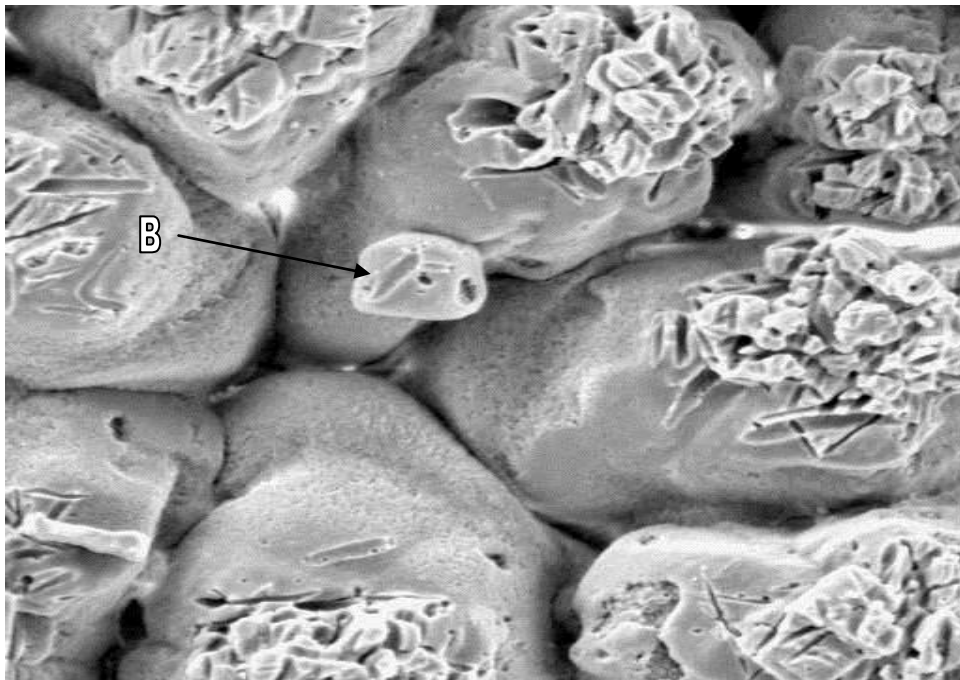


Figura 18. Microscopía electrónica de barrido donde se observa la presencia de cuerpo B en la cáscara de huevo proveniente de una gallina tratada con adrenalina a 5,5 h p.o. (670x). B= cuerpo B.

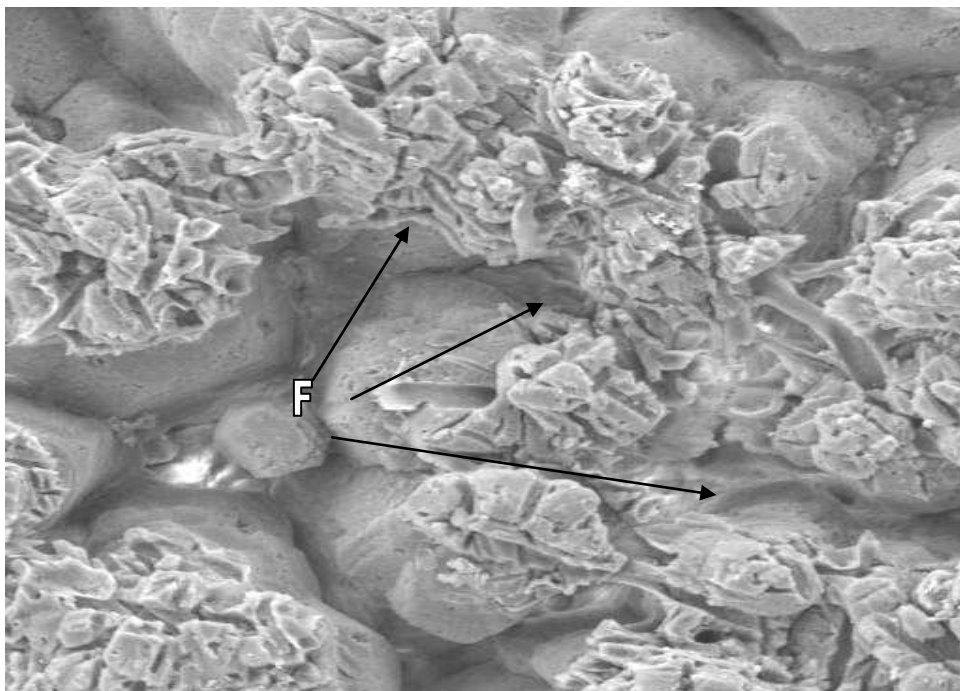


Figura 19. Microscopía electrónica de barrido donde se muestra confluencia de las mamilas, lo que produce una disminución de la resistencia, cáscara de huevo proveniente de una gallina tratada con adrenalina a 5,5 h p.o. (670x). F= confluencia.

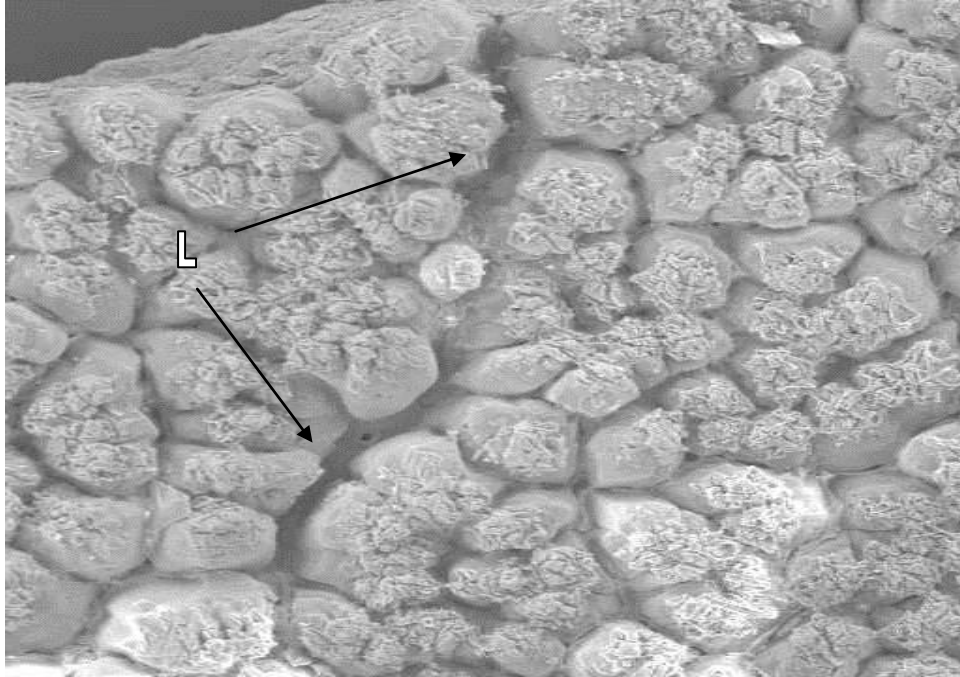


Figura 20. Microscopía electrónica de barrido de cáscara de huevo proveniente de una gallina tratada con adrenalina a 5,5 h p.o. en la cual se observa una gran línea de fractura. (330x). L= línea de fractura.

De las 6 gallinas tratadas a 10 h p.o. sólo 2 no presentaron alteraciones de los valores físico-mecánicos estudiados. Las 4 aves restantes disminuyeron los valores por debajo del promedio obtenido previo a la inyección de adrenalina, mostrando en el microscopio electrónico de barrido escasa relación de sus columnas con las membranas de la cáscara (figura 21), presencia de cuerpos A (figura 21) y B (figura 22), columnas de distinto grosor y forma (figura 23), cristales de calcita entre las columnas (figura 24), confluencia de mamilas (figura 25) y columnas decapitadas (figura 26).

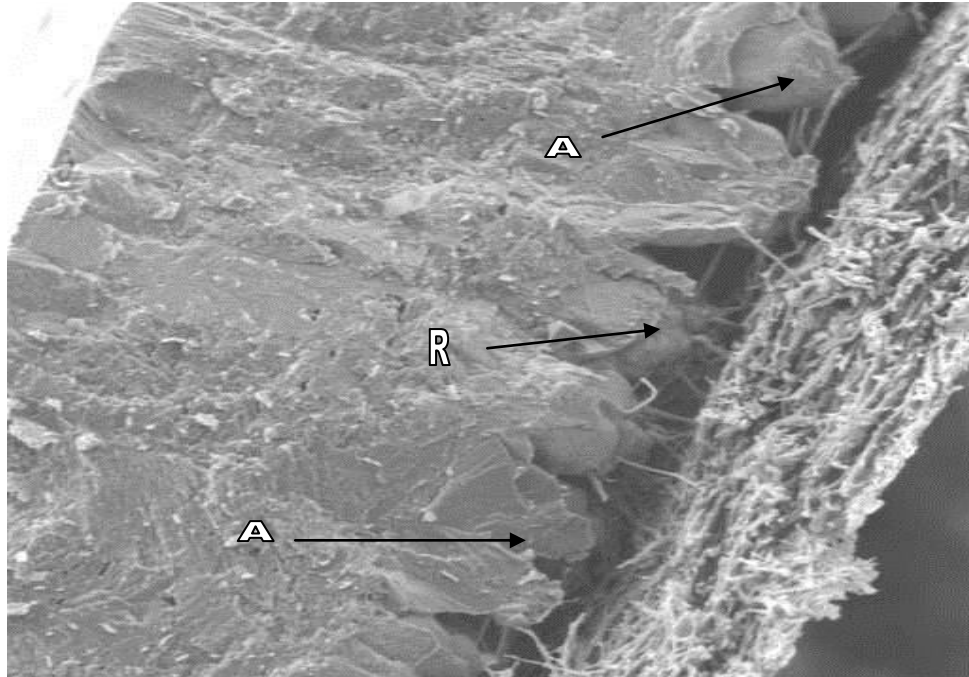


Figura 21. Microscopía electrónica de barrido donde se observa la presencia de cuerpos A y mala relación de las columnas con las membranas. Cáscara de huevo obtenida de una gallina tratada con adrenalina a 10 h p.o. (330x). A= cuerpo A, R= mala relación entre las columnas y membranas.

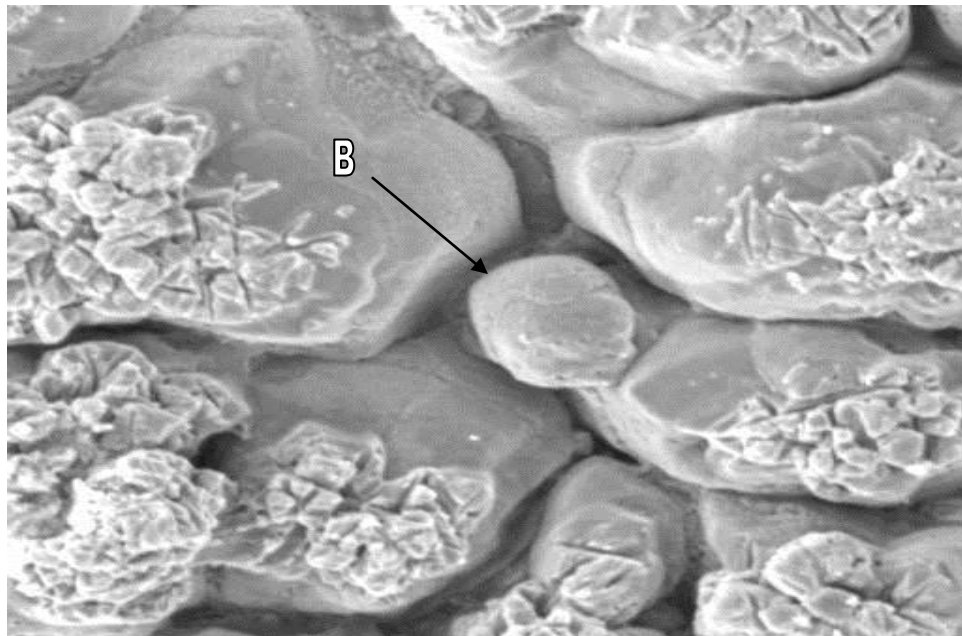


Figura 22. Microscopía electrónica de barrido mostrando la presencia de cuerpo B en una cáscara de huevo proveniente de una gallina tratada con adrenalina a 10 h p.o. (670x). B= cuerpo B.

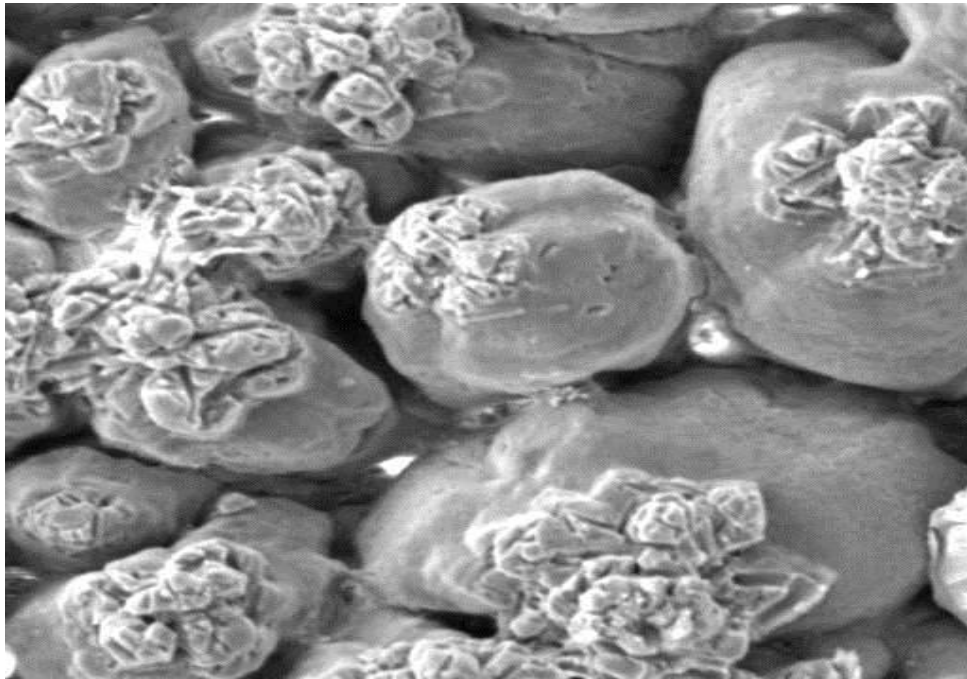


Figura 23. Microscopía electrónica de barrido de cáscara de huevo obtenida de una gallina tratada con adrenalina a 10 h p.o. en la cual se observan columnas de distinto grosor y forma. (670x).

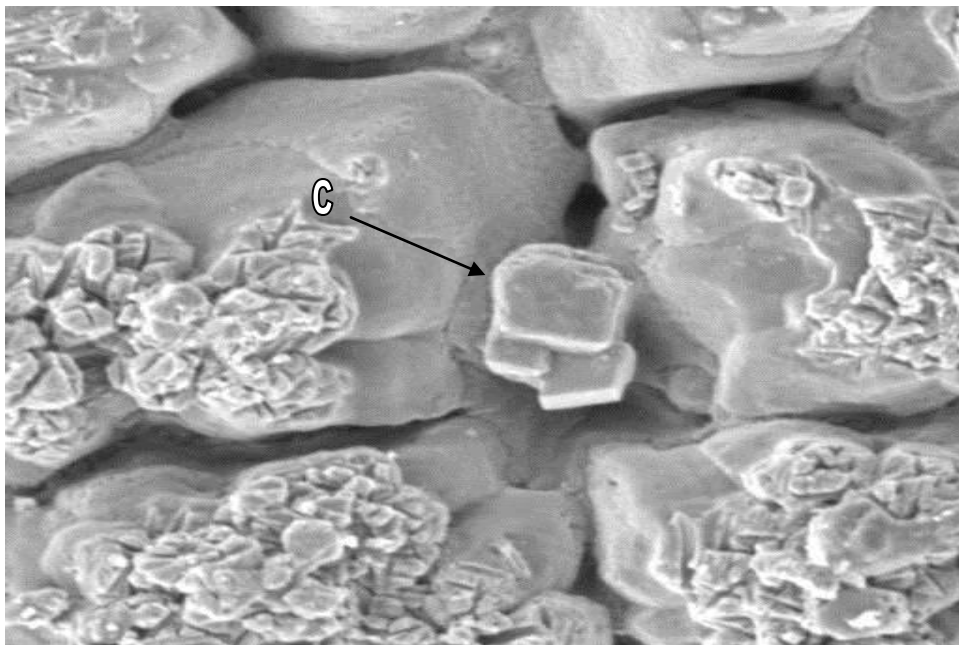


Figura 24. Microscopía electrónica de barrido donde se observan cristales de calcita entre las columnas de la cáscara de huevo obtenida de una gallina inyectada con adrenalina a 10 h p.o. (670x). C= cristales de calcita.

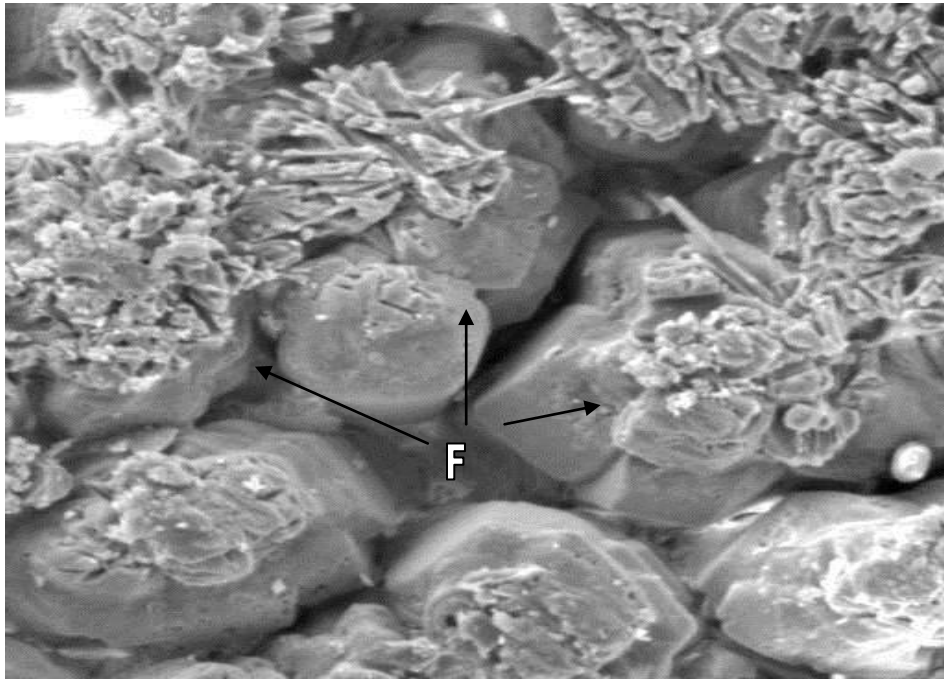


Figura 25. Microscopía electrónica de barrido de cáscara de huevo obtenida de una gallina inyectada con adrenalina a 10 h p.o. en la que se observa confluencia de las mamilas, naciendo varias columnas de una misma mamila. (670x). F= confluencia de mamilas.

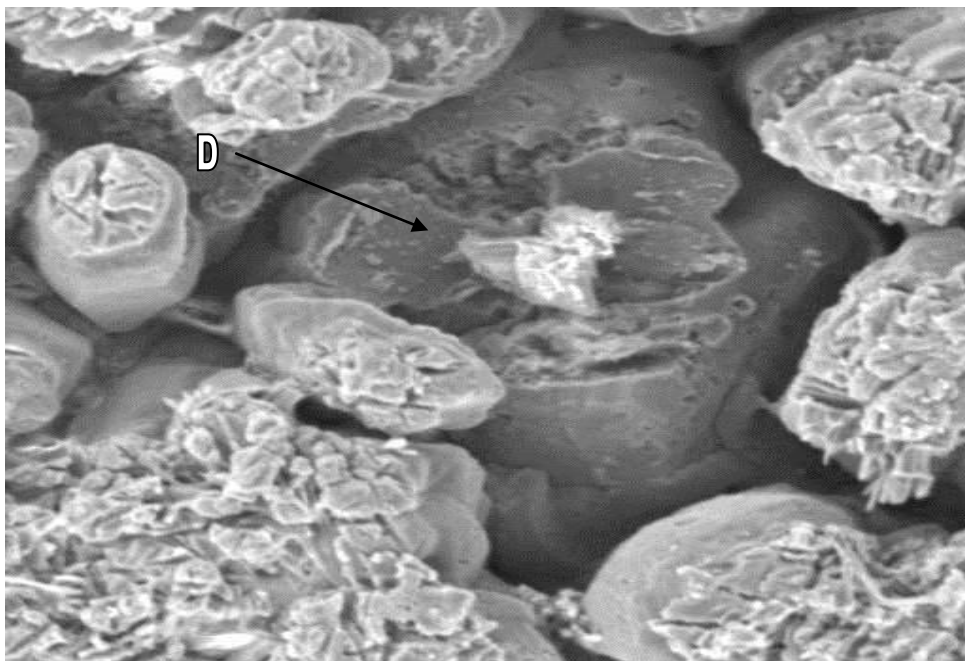


Figura 26. Microscopía electrónica de barrido de cáscara de huevo obtenida de una gallina inyectada con adrenalina a 10 h p.o. en que se observa una columna

decapitada entre columnas de distinto tamaño, forma y grosor. (670x). D= columna decapitada.

Finalmente, las 6 gallinas inyectadas con adrenalina a 15 h p.o. no presentaron variación significativa de ninguno de los parámetros físico-mecánicos estudiados. A nivel ultraestructural las cáscaras de los huevos obtenidos de estas gallinas se observaron como normales.

DISCUSIÓN

En las últimas dos décadas ha habido una gran preocupación por evaluar los efectos del estrés sobre el bienestar, producción y mortalidad de las aves domésticas (Craig et al., 1986; Mench et al., 1986; Koelkebeck et al., 1987; Reynard y Savory, 1997, 1999; Puvadolpirod y Thaxton, 2000a,b,c,d). Los diversos autores han adoptados variadas estrategias experimentales para provocar estrés, entre las que se destacan: 1) modificaciones en el manejo, especialmente modificando la densidad de animales por jaula o sometiendo a los animales a estrés social, esto es provocando contacto con nuevos animales, 2) modificaciones en la temperatura o en la formulación dietaria, 3) administración de esteroides, adenocorticotrofina o diversas preparaciones farmacológicas como reserpina, propranolol, adrenalina, serotonina y DOPA.

En el presente trabajo hemos adoptado la administración de adrenalina como agente estresante. En trabajos previos que han utilizado esta metodología de generación del estrés en aves se ha observado que la inyección de adrenalina produce alteraciones variables en la formación de la cáscara del huevo en aquellas gallinas que efectivamente responden a ésta, demostrándose que los cambios apreciados dependen de la dosis empleada, presentación y vía de administración del fármaco, sugiriéndose que también estos dependerían de su momento de administración, aún cuando no se hayan diseñado los protocolos experimentales para dilucidar este aspecto (Hughes y Gilbert, 1984; Hughes et al., 1986; Solomon et al., 1987).

A diferencia de lo observado por Solomon et al. (1987), quienes encontraron en los huevos siguientes al huevo retenido huevos con depósitos de calcio, bandas blancas y cáscaras delgadas en los huevos provenientes de las tres gallinas sometidas al tratamiento, nuestros resultados muestran que la respuesta de las aves tiene un fuerte componente de variación individual. Efectivamente, alrededor de un 50% de las treinta gallinas tratadas respondieron al tratamiento mostrando disminuciones notables en la resistencia y espesor de la cáscara del huevo junto con alteraciones en la ultraestructura de ésta. Esto hace que al analizar el conjunto de datos de las variables físico-mecánicas obtenidos de gallinas tratadas y controles no se encuentren diferencias significativas. Sin embargo, si se evalúan por separado aquellos animales que efectivamente respondieron al tratamiento y se comparan con los valores de los huevos previo al tratamiento, las diferencias resultan evidentes y la naturaleza de las alteraciones que presentan se relaciona estrechamente con el momento de administración de la adrenalina durante el ciclo de formación del huevo. Esta falta de diferencias estadísticamente significativa también podría explicarse, aunque en un pequeño porcentaje, por aquellas gallinas que entraron en la laguna de postura cuando fueron tratadas, no existiendo en el oviducto un huevo en formación para ser alterado.

Cuando la inyección de adrenalina se realiza a las 3 h p.o. las alteraciones de las características físicas-mecánicas de los huevos obtenidos de las gallinas que respondieron al tratamiento, se acompaña de modificaciones ultraestructurales dramáticas en algunos casos, como es la aparición de cáscaras que no llegan a mineralizarse y con apariencia de papel, alteraciones que podrían deberse a una deficiente formación de las membranas de la cáscara que ocurre aproximadamente a

partir de este período (Fernández et al., 1997a; Fernández et al., 2001). La formación inadecuada de las membranas de la cáscara por otra parte también altera la consiguiente formación de las mamilas lo que se manifiesta en la aparición de columnas separadas. El efecto más drástico se observó al producirse el adelanto de la oviposición con la consecuente formación incompleta de la cáscara. Podemos suponer entonces que el estrés inducido a las 3 horas que se mantiene posiblemente durante una hora actúa en un período crítico para la formación de las membranas de la cáscara.

Cuando la inyección se realizó a las 4,5 h p.o. la alteración de las variables físico-mecánicas de los huevos obtenidos de las gallinas que responden al tratamiento, se vio acompañada de cambios ultraestructurales que aún demuestran alteraciones en la formación de las membranas. De hecho éstas se presentaron disminuidas en grosor en algunos casos, pero además el estrés inducido en este caso altera claramente la formación de las mamilas lo que queda demostrado por la presencia de cuerpos A, como los descritos por Solomon (1991), que corresponden a puntos donde no existe una buena unión de las membranas con las mamilas. Se observan además cuerpos B que corresponden a mamilas que no participan en la formación posterior de columnas de la capa en empalizada. También se evidenció la presencia de líneas de fractura que corresponde a una disposición inadecuada de mamilas que dejan espacio libre entre ellas.

Cuando la inyección de adrenalina se realiza a las 5,5 h p.o. los efectos se reflejan nuevamente en la formación inadecuada de mamilas ya que aún en este período éstas están en formación, el huevo se encuentra aún en el Istmo Rojo (Fernández et al.,

1997a; Fernández et al., 2001). Esta inadecuada formación de mamilas se refleja en la aparición de cuerpos A y B, en la presencia de columnas separadas y en algunos casos confluencia de mamilas o separación de las mamilas representadas por líneas de fractura.

Si la inyección se realiza a las 10 h p.o., es decir en el período en que el huevo se encuentra en la glándula de la cáscara y en el cual el proceso de mineralización se encuentra en pleno desarrollo (Fernández et al., 1997a; Fernández et al., 2001), las alteraciones de este proceso se traducen en la presencia de columnas de distinto grosor y forma, cristales de calcita entre las columnas, columnas que se fusionan tempranamente y columnas débiles que se decapitan fácilmente. Todas estas alteraciones demuestran que el proceso de mineralización se encuentra alterado. Mientras que si la inyección de adrenalina se realiza a las 15 h p.o. no se observa efecto negativo en la formación de la cáscara. Esto es esperable ya que en esta etapa del proceso las columnas se encuentran formadas y el proceso prácticamente terminado (Fernández et al., 1997a; Fernández et al., 2001).

Los hallazgos de esta tesis demuestran que en aquellas gallinas que son afectadas por la inyección de adrenalina las alteraciones producidas varían de acuerdo a la hora del tratamiento y por otra parte que existen notables diferencias individuales con respecto a la presencia o ausencia de respuesta de las gallinas a la inyección de adrenalina. Esto último concuerda con las apreciaciones de Puvadolpirod y Thaxton (2000a) quienes indican que no existe hasta el momento un modelo confiable para el estudio del estrés en

animales, especialmente por su falta de repetibilidad en el tratamiento y de respuestas predecibles en un tiempo determinado.

Sin embargo, la administración de adrenalina es esperable que remede de alguna manera el efecto de un estímulo estresante agudo como aquel al que se ven sometidas las aves de corral en determinadas circunstancias.

El problema del estrés en aves de corral ha despertado notable interés debido a que, dependiendo de la fuente y duración de éste, se producen huevos con cáscaras que muestran diversas alteraciones macroscópicas que llevan a la depreciación del producto. Es así que luego de un estrés prolongado se produce retraso en la ovipostura, lo que se traduce en que al día siguiente el segundo huevo presiona sobre el huevo retrasado. De esta manera la cáscara del huevo retrasado muestra una banda de carbonato de calcio extra, mientras que el nuevo huevo muestra una depresión de la cáscara en el lugar en que se ha producido el contacto entre ambos huevos (Scott, 1940; van Middelkoop, 1971).

Sin embargo en el presente trabajo hemos mostrado que el estrés agudo, remedado por la inyección de adrenalina, aunque no produce mayores alteraciones macroscópicas apreciables en la cáscara, sí genera modificaciones ultraestructurales que en último termino se reflejan en la formación de cáscaras más frágiles, lo que aumenta la probabilidad de su ruptura durante la cadena de producción - distribución, determinando de esta manera su rechazo por el consumidor.

Niveles de estrés agudo, comparables a los producidos por la administración de adrenalina, se producen al disturbar a las gallinas por incursiones no habituales de personal, aves silvestres u otros animales en los galpones de postura. Tales disturbios deberían minimizarse sobre todo en las horas que coinciden con las etapas tempranas de formación de la cáscara del huevo.

CONCLUSIONES

Existe una gran variación individual en la respuesta a la adrenalina y en el tiempo de recuperación que presentan las gallinas al tratamiento.

Las gallinas que son afectadas por la adrenalina presentan alteraciones que varían de acuerdo a la hora del tratamiento.

La hora más crítica para la formación de la cáscara del huevo es cuando se están formando las membranas de la cáscara, ya que al alterarse su formación las capas superiores no tienen una buena base para su correcto desarrollo.

Si bien, la inyección de adrenalina no produce mayores alteraciones macroscópicas sí genera modificaciones ultraestructurales que en último término se reflejan en la formación de cáscaras más frágiles que llevan a una depreciación del producto.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ALDER, B.**, 1927. The use of calcite and other natural deposits of calcium carbonate in the ration of laying hens. *World Poultry Congress* 231.
2. **ARIAS, J.L., FERNÁNDEZ, M.S., LARAIA, V.J., JANICKI, J., HEUER, A.H., CAPLAN, A.I.**, 1991a. The avian eggshell as a model of biomineralization. *Mat. Res. Symp. Proc.* 218:193-201.
3. **ARIAS, J.L., FERNÁNDEZ, M.S., DENNIS, J.E., CAPLAN, A.I.**, 1991b. The fabrication and collagenous substructure of the eggshell membrane in the isthmus of the hen oviduct. *Matrix* 11: 313-320.
4. **ARIAS, J.L., FERNÁNDEZ, M.S., CAPLAN, A.I.**, 1991c. Absence from avian eggshell membranes of epitopes recognized by antikeratin antibodies. *Poultry Sci.* 70: 1647-1650.
5. **ARIAS, J.L., FINK, D.J., XIAO, S.Q., HEUER, A.H., CAPLAN, A.I.**, 1993. Biomineralization and eggshell: cell-mediated acellular compartments of mineralized extracellular matrix. *Inter. Rev. Cytol.* 145: 217-250.
6. **ARIAS, J. L., FERNÁNDEZ, M. S., HIDALGO, H.**, 1994. Calidad de la cáscara del huevo: nuevo enfoque a un viejo problema. *Informaciones avícolas* 194: 12-25.
7. **ARIAS, J.L., FERNÁNDEZ, M.S.**, 1995. Role of extracellular matrix on eggshell formation. *Proc. VI Eur. Symp. Egg Qual. Egg Prod., Zaragoza, España.* Pp. 86-96.
8. **ARIAS, J.L., NAKAMURA, O., FERNÁNDEZ M.S., WU, J.J., KNIGGE, P., EYRE, D.R., CAPLAN, A.I.**, 1997. Role of type X collagen on experimental mineralization of eggshell membranes. *Connect. Tissue Res.* 36: 21-33.

9. **ARIAS J.L.**, 1998. Informaciones avícolas y porcinas, Chile. Edición 218. Agosto-Septiembre. Pp. 8-15.
10. **BAUMGARTNER, S., BROWN, D.J., SALEVSKY, E., LEACH, R.M.**, 1978. Copper deficiency in the laying hen. *J. Nutr.* 108: 804-811.
11. **CANDLICH, J.K.**, 1972. The role of the shell membranes in the functional integrity of the egg. In: Egg formation and production. (B.M. Freeman, P.E. Jacke, eds.). Edinburgh, *Br. Poultry Sci.* pp. 87-105.
12. **CRAIG, J.V., CRAIG, J.A., VARGAS, J.V.**, 1986. Corticosterone and other indicators of hen's well-being in four laying-house environments. *Poultry Sci.* 65: 856-863.
13. **CROSSLEY, J. C., FERRANDO, G., EILER, H.**, 1980. Distribution of adrenergic receptors in the domestic fowl oviduct. *Poultry Sci.* 59: 2331-2335.
14. **DENNIS, J.E., XIAO, S.Q., AGARWAL, M., FINK, D.J., HEUER, A.H., CAPLAN, A.I.**, 1996. Microstructure of matrix and mineral components of eggshell from White Leghorn chicken (*Gallus gallus*). *J Morphol.* 228: 287-306.
15. **DIECKERT, J.W., DIECKERT, M.C., CREGER, C.R.**, 1989. Calcium reserve assembly: a basic structural unit of calcium reserve system of the eggshell. *Poultry Sci.* 68: 1569-1584.
16. **DIECKERT, J.W., DIECKERT, M.C., CREGER, C.R.**, 1993. The rise and fall of the calcium reserve assemblies of the avian eggshell: source of calcium for the embryo, and modelling principles for synthesis of novel ceramic material. *S.A.A.S. Bull. Biochem. Biotech.* 6: 256-262.
17. **EGAÑA, E.**, 1963. Fisiopatología general. I Ed., Ed. Andrés Bello, Chile. 135-141pp.

18. **FERNÁNDEZ, M.S., ARAYA, M., ARIAS, J.L.**, 1997a. Eggshell are shaped by a precise spatio-temporal arrangement of sequentially deposited macromolecules. *Matrix Biol.* 16: 13-20.
19. **FERNÁNDEZ, M.S., MOYA, A., ARIAS, J.L.**, 1997b. Secretion pattern of extracellular matrix molecules in the oviduct during eggshell formation. *Proc. VII Eur. Symp. Egg Qual. Egg Prod.*, Poznan, Poland. pp. 182-189.
20. **FERNÁNDEZ, M.S., ARIAS, J.L.**, 2000. La cáscara del huevo: Un modelo de biomineralización. *Monografías de medicina veterinaria*, Universidad de Chile. Vol. 20 (2): 50-60.
21. **FERNÁNDEZ, M.S., MOYA, A., ARIAS, J.L.**, 2001. Secretion pattern, ultrastructural localization and function of extracellular matrix molecules involved in eggshell formation. *Matrix Biol.* 19 (8): 793-803.
22. **FRASER, A.C.**, 1996. Environmental and physiological factors influencing the formation of the eggshell of the domestic fowl. Ph. D. Thesis, University of Glasgow, Scotland 199 pp.
23. **FRASER, A.C., BAIN, M.M., SOLOMON, S.E.**, 1998. Organic matrix morphology and distribution in the palisade layer of eggshell sampled at selected periods during lay. *Br. Poultry Sci.* 39: 225-228.
24. **FUJII, S.**, 1974. Further morphological studies on the formation and structure of hen's eggshell by scanning electron microscopy. *J. Fac. Fish Anim. Husb.* 13: 29-56.
25. **HAMILTON, R. M. G., HOLLANDS, K. G., VOISEY, P. W., GRUNDER, A. A.**, 1979. Relationship between egg shell quality and shell breakage and factors that affect shell breakage in the field. Review. *World's Poultry Sci. J.* 35: 177-190.

26. **HAMILTON, R. M. G.**, 1982. Methods and factors that affect the measurement of egg shell quality. *Poultry Sci.* 61: 2022-2039.
27. **HERRASTI, G.**, 1916. The strength of eggshell. *Sci. Am.* 115: 321
28. **HEUER, A.H., FINK, D.J., LARAIA, V.J., ARIAS, J.L., CALVERT, P.D., KENDALL, K., MESSING, G.L., BLACKWELL, J., RIEKE, P.C., THOMPSON, D.H., WHEELER, A.P., VEIS, A., CAPLAN, A.I.**, 1992. Innovative materials processing strategies: a biomimetic approach. *Science* 255, 1098-1105.
29. **HUNT, J. R.**, 1963. Predicting percent shell and thickness from egg weight and specific gravity. *Poultry Sci.* 42: 1398.
30. **HUGHES, B.O., GILBERT, A.B.**, 1984. Induction of egg shell abnormalities in domestic fowls by administration of adrenaline. *IRCS Medical Sci.* 12: 969-970.
31. **HUGHES, B.O., GILBERT, A.B. BROWN, M.F.**, 1986. Categorisation and causes of abnormal egg shells: relationship with stress. *Br. Poultry Sci.* 27: 325-338.
32. **KENNARD, D. C.**, 1925. Essential minerals for chicks and laying hens. *Poultry Sci.* 4: 109.
33. **KLINGENSMITH, P. M., MC COMBS, J. R., ADDISON, I. B.**, 1988. Gas chromatographic analysis of shell membrane amino acids from hard-shelled, soft-shelled and shell-less eggs. *Poultry Sci.* 67: 1203-1209.
34. **KOELKEBECK, K.W., AMOSS, M.S., CAIN, J.R.**, 1987. Production, physiological and behavioral responses of laying hens in different environments. *Poultry Sci.* 66: 397-407.

35. **MADISON, M. E., PEREZ, A. M.**, 1994. U.S. egg and poultry statistical series, 1960-1992. United States, Department of Agriculture, statistical bulletin N° 872 USDA, Washington, D.C.
36. **MENCH, J.A., TIENHOVEN, A., McCORMICK, C.C., CUNNINGHAM, D.L., BAKER, R.**, 1986. Effects of cage and floor pen management on behavior, production and physiological stress responses of laying hens. *Poultry Sci.* 65: 1058-1069.
37. **NYS, Y., HINCKE, M.T., ARIAS, J.L., GARCIA-RUIZ, J.M., SOLOMON, S.E.**, 1999. Avian eggshell mineralization. *Poultry Avian Biol. Rev.* 10: 142-166.
38. **OLSSON, N.**, 1934. in O. Harrassowitz (ed.). Studies on specific gravity of hen's eggs. A new method for determining the percentage of shell on hen's eggs. Agric. School, Hammenhog, Sweden. p. 1
39. **OVERFIELD, N. D.**, 1995. Egg quality assessment techniques at laboratory and field level. *Proc. VI Eur. Symp. Egg Qual. Egg Prod., Zaragoza, Spain.* pp. 11-22.
40. **PARSON, A.H.**, 1982. Structure of the eggshell. *Poultry Sci.* 61: 2013-2021.
41. **PERROT, H.R., SCOTT, V.D., BOARD, R.G.**, 1981. Cristal orientation in the shell of the domestic fowl. An electron study. *Calc. Tiss. Int.* 33: 119-120.
42. **PUVADOLPIROD, S., THAXTON, J.P.**, 2000a. Model of physiological stress in chickens 1. Response parameters. *Poultry Sci.* 79: 363-369.
43. **PUVADOLPIROD, S., THAXTON, J.P.**, 2000b. Model of physiological stress in chickens 2. Dosimetry of adrenocorticotropin. *Poultry Sci.* 79: 370-376.
44. **PUVADOLPIROD, S., THAXTON, J.P.**, 2000c. Model of physiological stress in chickens 3. Temporal patterns of response. *Poultry Sci.* 79: 377-382.

45. **PUVADOLPIROD, S., THAXTON, J.P.**, 2000d. Model of physiological stress in chickens 5. Quantitative evaluation. *Poultry Sci.* 79: 391-395.
46. **REYNARD, M., SAVORY, C.J.**, 1997. Oviposition delays induced by social stress are reversed by treatment with the β -adrenergic blocking agent propranolol. *Poultry Sci.* 76: 1315-1317.
47. **REYNARD, M., SAVORY, C.J.**, 1999. Stress-induced oviposition delays in laying hens: duration and consequences for eggshell quality. *Br. Poultry Sci.* 40: 585-591.
48. **ROLAND, D. A.**, 1977. The extent of uncollected egg due to inadequate shell. *Poultry Sci.* 56: 1517-1521.
49. **SCOTT, H.M.**, 1940. A note on abnormal shape of egg. *American Naturalist*, 751: 185-188.
50. **SHARP, R.M., SILYN-ROBERTS, H.**, 1984. Development of preferred orientation in the eggshell of the domestic fowl. *Biophys. J.* 46: 175-180.
51. **SIMKISS, K., TAYLOR, T.G.**, 1971. Shell formation. In: physiology and biochemistry of the domestic fowl. (D.J. Bell, B.M. Freeman, eds.). Acad. Press, London, vol. 3: 1331-1343.
52. **SIMKISS, K., WILBURU, K.M.**, 1989. Biomineralization, Acad. Press, San Diego, 337 pp.
53. **SIMONS, P.C.M., WIERTZ, G.**, 1963. Notes on the structure of membranes and shell in the hen's egg: an electron microscopical study. *Z. Zellforsch.* 59: 555-567.
54. **SOLOMON, S.E., HUGHES, B.O., GILBERT, A.B.**, 1987. Effect of a single injection of adrenaline on shell ultrastructure in a series of eggs from domestic hens. *Br. Poultry Sci.* 28: 585-588.

55. **SOLOMON, S.E.**, 1991. *Egg and eggshell quality*. Wolfe publ. Ltd., London, England. 149 pp.
56. **TEREPKA, A.R.**, 1963. Structure and calcification in avian eggshell. *Exp. Cell Res.* 30: 171-182.
57. **TYLER, C., MOORE D.**, 1965. Types of damages caused by various cracking and crushing methods used for measuring egg shell strength. *Br. Poultry Sci.* 6:175-182.
58. **TYLER, C., GEAKE, F. H.**, 1965. Egg shell thickness patterns as shown by individual domestic hens. *Brit. J. Poultry Sci.* 6:235.
59. **VAN MIDDELKOOP, J.H.**, 1971. Shell abnormalities due to the presence of 2 eggs in the shell gland. *Archiv fur Geflugelkunde*, 35: 122-127.
60. **VOISEY, P. W., HUNT, J. R.**, 1964. A technique for determining approximate fracture propagates rates of egg shell. *Can. J. Anim. Sci.* 44: 347-350.
61. **VOISEY, P. W., HUNT, J. R.**, 1967. Physical properties of egg shells. 4. Stress distribution in the shell. *Br. Poultry Sci.* 8: 263-271.
62. **VOISEY, P. W., HUNT, J. R.**, 1969. Effect of compression speed on the behaviour of eggshells. *J. Agr. Eng. Res.* 14: 40.
63. **VOISEY, P. W., FOSTER W. F.**, 1970. A non-destructive eggshell strength tester. *Can. J. Anim. Sci.* 50: 390-396.
64. **VOISEY, P. W., HUNT, J. R.**, 1974. Measurement of eggshell strength. *Rev. J. of Texture Studies* 5: 135-182.
65. **VOISEY, P. W., HAMILTON, R. M. G.**, 1977. Observations on the relationship between non-destructive egg shell deformation and resistance to fracture by quasi-static compression for measurement of egg shell strength. *Poultry Sci.*56: 1463-1467.

66. **VOISEY, P. W., HAMILTON, R. M. G., THOMPSON, B. K.**, 1979. The effect of temperature on the resistance of the hen's egg shell to fracture under impact and compression and to deformation under non-destructive forces. *Poultry Sci.* 58: 1149-1153.