

**FORMACIÓN DE  
HUESO MEDULAR Y  
CÁSCARA DE HUEVO** **COMO MODELO DE  
PROCESOS DINÁMICOS  
E INTERRELACIONADOS  
DE BIOMINERALIZACIÓN**

**Nazaret Domínguez Gasca**

**TESIS DOCTORAL  
Granada, 2017**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autora: Nazaret Domínguez Gasca

ISBN: 978-84-9163-385-3

URI: <http://hdl.handle.net/10481/47790>



**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**Facultad de Ciencias**

**Departamento de Mineralogía y Petrología**



**Formación de hueso medular y cáscara de huevo  
como modelo de procesos dinámicos e  
interrelacionados de biomineralización**

**Programa de Doctorado: Ciencias de la Tierra**

**TESIS DOCTORAL**

**Nazaret Domínguez Gasca**

Granada, 2017



**Departamento de Mineralogía y Petrología**

**Facultad de Ciencias**

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**



Programa Doctorado  
Ciencias de la Tierra

**Formación de hueso medular y cáscara de huevo como  
modelo de procesos dinámicos e interrelacionados de  
biomineralización**

Programa de Doctorado: Ciencias de la Tierra

Memoria presentada por NAZARET DOMÍNGUEZ GASCA, Licenciada en  
Biología, para optar al grado de Doctora por la Universidad de Granada.

Granada, 02 de junio de 2017

VºBº del director

Fdo. Nazaret Domínguez Gasca

Fdo. Alejandro Rodríguez Navarro

El doctorando Nazaret Domínguez Gasca y el director de la tesis Alejandro Rodríguez Navarro garantizamos al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

En Granada, a 02 de junio de 2017.

Director de la Tesis

Doctorando

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'A. Rodríguez Navarro', written in a cursive style.A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Nazaret Domínguez Gasca', written in a cursive style.

Fdo. Alejandro Rodríguez Navarro

Fdo. Nazaret Domínguez Gasca

# *Índice*

<b>Agradecimientos.</b>	<b>7</b>
<b>Resumen/ Abstract.</b>	<b>11</b>
<b>1. Introducción.</b>	<b>17</b>
1.1. La cáscara de huevo como modelo de biomineralización.	18
1.1.1. Funciones.	19
1.1.2. Formación de la cáscara y estructura.	19
1.2. Tejido óseo.	28
1.2.1. Tipos de hueso.	28
- Hueso cortical.	
- Hueso trabecular.	
- Hueso medular.	
1.2.2. Composición.	34
A) Fase Mineral.	35
B) Fase Orgánica.	37
- El colágeno.	
- Proteínas no colágenas.	
- Lípidos.	
C) Células óseas.	41
- Osteoblastos.	
- Osteocitos.	
1.2.3. Formación del hueso.	42
- Osificación intramembranosa.	



- Osificación endocondral.	
1.2.4. Mineralización del tejido óseo.	47
1.2.5. Remodelación del tejido óseo.	49
<b>2. Objetivos.</b>	<b>53</b>
<b>3. Material y Métodos.</b>	<b>55</b>
3.1. Material.	56
3.1.1. Material empleado para el apartado: formación y estructura de la cáscara de huevo.	56
3.1.2. Material empleado para el apartado: la cutícula de la cáscara de huevo.	57
3.1.3. Material empleado para el apartado: importancia de la cutícula para evitar la contaminación bacteriana por <i>Salmonella</i> .	58
3.1.4. Material empleado para el apartado: evolución del hueso medular de gallinas ponedoras durante el proceso de formación de la cáscara de huevo.	60
3.1.5. Material empleado para el apartado: estudio de la calidad del tejido óseo en gallinas ponedoras.	62
3.2. Métodos.	62
3.2.1. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier en modo Reflectancia Total Atenuada (ATR-FTIR).	62
3.2.2. Espectroscopia Raman.	66
3.2.3. Espectroscopia de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES).	67
3.2.4. Análisis Termogravimétrico (TGA).	67
3.2.5. Difracción de Rayos X (DRX).	69
3.2.6. Microscopía óptica.	71
3.2.7. Microscopía electrónica.	72

3.3. Análisis estadísticos y programas utilizados para el tratamiento de los datos.	74
<b>4. Resultados y Discusión.</b>	<b>75</b>
4.1. Formación y estructura de la cáscara de huevo.	76
4.2. La cutícula de la cáscara de huevo.	90
4.3. Importancia de la cutícula para evitar la contaminación bacteriana por <i>Salmonella</i> .	100
4.4. Evolución del hueso medular de gallinas ponedoras durante el proceso de formación de la cáscara de huevo.	110
4.5. Estudio de la calidad del tejido óseo en gallinas ponedoras.	124
<b>5. Conclusiones/ Conclusions.</b>	<b>135</b>
<b>6. Bibliografía.</b>	<b>143</b>
<b>7. Anexo I. Artículos publicados.</b>	<b>163</b>
7.1. Change in the chicken eggshell cuticle with hen age and egg freshness.	164
7.2. Importance of eggshell cuticle composition and maturity for avoiding trans-shell <i>Salmonella</i> contamination in chicken eggs.	174
<b>8. Anexo II. Artículo aceptado.</b>	<b>183</b>
8.1. Quality assessment of the cuticle of chicken eggshell by infrared spectroscopy and staining techniques: A comparative study.	184
<b>9. Anexo III. Artículo pendiente de publicación.</b>	<b>213</b>
9.1. Influence of genetic selection and physical activity on bone quality parameters of laying hens.	214

## *Agradecimientos*

Una vez acabada mi Tesis Doctoral, es imposible no pararme un momento a pensar y dedicar unas líneas a todas las personas que me han ayudado y apoyado cada día durante estos años de trabajo, personal y académicamente hablando. Gracias a todos por vuestra paciencia, ánimo y dedicación.

A mi director de tesis:

Alejandro Rodríguez Navarro, primordial para la realización de esta tesis doctoral. Gracias por confiar en mí, por enseñarme a caminar en la investigación, por tu apoyo incondicional en los malos y buenos momentos, por tus consejos. Gracias por enseñarme cada día que cuando una persona tropieza se tiene que levantar más fuerte, que todos tenemos defectos y que no por ello somos mejores o peores personas, mejores o peores investigadores. Por ser tan humilde, tan buena persona y por tratarnos a todos como uno más. Por formar esos “equipazos” de compañeros y amigos, por ayudarnos en todo momento y por cuidarnos. Gracias por ser como eres, sin ti esto no habría sido posible.

Mi agradecimiento al Departamento de Mineralogía y Petrología de la Universidad de Granada. A su director, Dr. Nicolás Velilla Sánchez y Dr. Miguel Ortega Huertas, director del grupo de investigación RNM-179, por su ayuda y confianza. A Inmaculada Palomo, Carlos Rodríguez, Carolina Cardell, Encarnación Ruiz, Kerstin Elert, Antonio Sánchez, Claudio Marchesi, Antonio García, Fernando Nieto, Giuseppe Cultrone, Fernando Gervilla, Eduardo Sebastián, Anna Arizzi, Daniel Martín, Salvador Morales, Concepción Lázaro y Pepe Torres. Gracias por vuestra ayuda.

Gracias a Pedro Álvarez, Inés Pascual, Jesús Montes y Eduardo Molina por vuestra amabilidad y ayuda, por resolverme todas las dudas que me han surgido a lo largo de todos estos años y por hacerlo siempre con una sonrisa en la boca.

De igual modo, agradezco la ayuda del personal del CIC de la Universidad de Granada, especialmente a “mi Bendi”, por ayudarme en todo lo que ha podido de manera incondicional, por aguantarme durante tantas horas, tantos días. Por aconsejarme personal y académicamente, por esos ratos que hemos pasado juntas, buenos y malos, por todo. Nunca te olvidaré. A “mi Yoli”, gracias por ser como eres, por sacarnos a todos una sonrisa en los peores momentos, por compartir tú vida con nosotros. A Pepe Romero, por preocuparte por mí, por contarme un chiste o una película de los tuyas y sacarme una sonrisa en cualquier momento. A mis niños del HPLC, Juan, José Miguel y Samuel. Gracias al personal de microscopía electrónica, Alicia González, Isabel Sánchez, Isabel Tschuschke y María José Martínez, por vuestra ayuda y dedicación. Y gracias al personal del laboratorio de preparación de muestras, en especial a ti Juan De Dios, por tu ayuda incondicional, por tu preocupación y por tus consejos.

A mis jefes del Roslin Institute, Ian Dunn, Heather McCormack y Robert Fleming. Gracias por acogerme como a una más y enseñarme cada día una cosa nueva, por esas cenas y por vuestros consejos. Heather, Bob, para mí habéis sido como una familia durante mis estancias en Edimburgo. Gracias de corazón.

A Ramón Carmona, todo esto no hubiera sido posible sin ti. Gracias por ser la primera persona durante mi carrera universitaria en confiar en mí. Por enseñarme que todo lo que tenemos, lo conseguimos con nuestro trabajo, que con fuerza y perseverancia conseguimos todo lo que nos propongamos. Gracias por apoyarme en todo momento, por preocuparte siempre y por no dejarme sola nunca. Por esos momentos que nunca olvidaré: “pescando truchas”, esquivando avispa... GRACIAS en mayúsculas.

Gracias Concepción Jiménez por prestarme tú ayuda siempre que la he necesitado, por confiar en mí, por aconsejarme y por animarme siempre.



A ti, Arantxa, o mejor dicho hermana. Empezamos juntas en esta carrera sin conocernos ni de oídas, pero te has convertido en una más de mi familia. No tendría papel para agradecerte todo lo que has hecho por mí, académica y personalmente. Gracias por ser como eres, por acogerme en tu familia como una más. Gracias mil. Gracias Annika por ayudarme y aconsejarme en todo. Por confiar en mí, por tu gran comprensión y por considerarnos tu familia.

A mis compañeros, mejor dicho, a mis amigos de despacho o mejor a “los pendejos”. Alejandro, qué decir de ti, eres un “crack” en todos los sentidos, algo perturbado (es broma) pero un pedazo de compañero. Gracias por ser como eres, por ayudarme en todo lo que he necesitado y por apoyarme en muchos momentos aunque nos hayamos ganado alguna que otra bronca sin merecerla. Gracias por ser tan grande. Agustín, “abu” para los amigos, gracias por todos los buenos momentos que nos haces pasar. Por tu diccionario de palabras que nos hacen retorcernos de risa, aunque no tengamos ni ganas de mirarnos al espejo; por esas frases históricas que quedarán para el recuerdo y por ser la alegría de la huerta. Gracias por toda la ayuda que he recibido de tu parte. Fulvio y Fede, nuestros italianos, gracias por ser como sois, unas bellísimas personas con las que se pueden contar para todo, gracias por vuestra confianza. A Catalina, por ser un gran apoyo durante esta etapa tan complicada para las dos. A Luisillo, la nueva incorporación al grupo de los pendejos, gracias por tu forma de ser y por tu confianza.

Gracias a “mis niñas”, mi equipazo. Estefanía, qué decirte en tan pocas palabras, eres una gran trabajadora, una gran persona y sobre todo una gran amiga. Siempre he recibido de tu parte ayuda, apoyo y ánimo. Hemos vivido cosas muy importantes para mí, en silencio y sin nadie más. Gracias por el cariño, por el apoyo recibido siempre, pero en esos momentos más. Espero que pronto giremos la balanza hacia un sí. Gracias por ser tan GRANDE. Te quiero bonita y te mereces todo lo bueno que te pase. A mi “peteña”

Cristina. Llevamos poco tiempo trabajando juntas, pero solo dos semanas me bastaron para saber que eres mi lección de vida. Gracias por enseñarnos cada día a ser más fuerte, a no rendirnos y a confiar más en nosotras. Gracias por esos mensajes de ánimo, de preocupación y de cariño. Te adoro Cristina. Sois, las dos, parte de mi familia.

A mis padres, sin ellos nada de esto habría sido posible. Gracias por enseñarme a ser como soy, por apoyarme en todo, en lo bueno y en lo malo, y por no dejarme nunca. Por animarme en los momentos más duros y por darlo todo por y para mí. No tengo palabras para describiros, sois los mejores. Os quiero mucho a los dos. A mis abuelos, mis segundos padres, fundamentales en mi vida. Gracias por estar siempre a mi lado, por ayudarme, por aconsejarme y por quererme. Gracias de corazón, os quiero. A mi tío, mi “tata” y a mis primos, gracias por ser como sois, por ayudarme y apoyarme siempre, y cuando digo siempre es siempre, por quererme y por pensar siempre en mí. Gracias FAMILIA.

Y por último, gracias a mi compañero de vida, Montxo, mi marido. Gracias por ser como eres, por protegerme, por ayudarme, por apoyarme, por aguantarme y tranquilizarme cuando la tila no hace efecto y por contar hasta 10. Por esos incontables viajes de ida y vuelta; y por esas noches en vela de estudio. Hemos vivido muchos momentos a lo largo de estos años que me han dejado claro que la mejor decisión que tomé fue pasar el resto de mi vida contigo. TE QUIERO.

## *Resumen.*

El objetivo principal de esta tesis es el estudio de la mineralogía, estructura y funcionalidad de los tejidos calcificados. En particular, nos hemos centrado en dos tejidos calcificados, formados por las aves hembras durante el periodo reproductivo, muy importantes y relacionados entre sí: el hueso medular y la cáscara de huevo. Durante la deposición de la cáscara de huevo, las aves hembras, y las gallinas ponedoras en particular, necesitan movilizar grandes cantidades de calcio (2 gramos), que equivale a cerca del 10% del calcio total del cuerpo. Para ello, durante el periodo de puesta, las gallinas desarrollan un tipo especial de hueso, el hueso medular, que puede ser fácilmente reabsorbido para una rápida liberación y suministro de calcio necesario para la formación de la cáscara del huevo. La mineralización de la cáscara de huevo de gallina es el proceso de calcificación más rápido conocido en la naturaleza, y dentro de los procesos de biomineralización, es uno de los más interesantes. El resultado de este proceso es la formación de una estructura mineral con excelentes propiedades mecánicas cuyas principales características pueden modificarse por diferentes factores, como la edad, la dieta o enfermedad. Para entender los procesos que controlan la formación, mineralización y estructura de estos materiales, se ha estudiado de una manera exhaustiva mediante técnicas analíticas como la espectroscopia infrarroja (ATR-FTIR), la difracción de rayos X y la microscopía electrónica. Por otra parte, se ha estudiado como la cutícula de la cáscara de huevo actúa como barrera física contra la penetración bacteriana y juega un papel muy importante en la seguridad alimentaria del huevo. Al igual que la cáscara de huevo, las propiedades de la cutícula (grado de recubrimiento, espesor y composición química), dependen de la edad, factores genéticos, dieta y su hábitat. Con respecto al estudio de la formación de la cáscara de huevo, los resultados demuestran que la calcificación de la cáscara comienza con la deposición de partículas de carbonato cálcico

amorfo con una estructura proto-calcítica que facilita su conversión directamente a calcita. Por otra parte, se muestra como la microestructura de las cáscaras de huevo varía en diferentes especies provocando que las propiedades mecánicas de la cáscara cambien notablemente. Con respecto a la cutícula, la técnica de espectroscopia infrarroja (ATR-FTIR) utilizada para evaluar la calidad de la cutícula y su composición química, nos ha permitido determinar que su composición es altamente dependiente de la edad de la gallina y de la frescura de los huevos. Además del factor edad, la funcionalidad de la cutícula depende en gran medida de su composición química y del grado de madurez, siendo los huevos recién puestos aquellos que presentan una cutícula más inmadura y menos efectiva frente a la penetración bacteriana.

Durante el periodo de calcificación de la cáscara de huevo y debido a la alta demanda de calcio que presentan, las gallinas producen un tipo especial de hueso, conocido como hueso medular. El hueso medular, es un tipo especial de hueso esponjoso no estructural, formado por cristales de apatito depositados de manera aleatoria sobre las fibras de colágeno, y localizado en las cavidades de la médula de los huesos de las gallinas ponedoras. Se trata de un hueso metabólicamente muy activo que se renueva en tan solo 3 días. El único problema es que durante este periodo, las células productoras de tejido óseo, los osteoblastos, dejan de producir hueso estructural (cortical) para producir un tipo de hueso mecánicamente más débil, hueso medular. Durante este proceso, las gallinas ponedoras pueden desarrollar un tipo de osteoporosis que genera la pérdida progresiva de hueso cortical (hueso estructural). Para entender mejor la mineralización del hueso medular durante la calcificación de la cáscara de huevo, muestras de tibia de gallinas ponedoras correspondientes a cada una de las etapas de formación de la cáscara de huevo y determinadas en función de la localización del huevo en el oviducto han sido analizadas. Asimismo, se ha estudiado como contribuye el hueso medular a las propiedades



mecánicas del hueso. Tanto la cantidad de hueso medular como sus propiedades dependen de factores genéticos y ambientales (ejercicio y movilidad)

En conclusión, el objetivo principal de esta tesis es el estudio de la mineralogía, estructura y funcionalidad de los tejidos calcificados (cáscara de huevo y hueso medular), así como determinar su evolución y qué mecanismos están implicados en su control. Las técnicas analíticas empleadas en este estudio han permitido conocer de manera detallada la composición mineral y estructural de la cáscara de huevo y del tejido óseo. Además, los resultados obtenidos revelan que la espectroscopia infrarroja (ATR-FTIR) utilizada para el análisis composicional de los tejidos, puede ser de gran utilidad para los programas de selección dirigidos a mejorar la seguridad y calidad de los huevos y reducir el impacto de la osteoporosis en gallinas ponedoras.

## *Abstract.*

The main objective of this thesis is the study of the mineralogy, structure and functionality of calcified tissues. In particular, we have focused in two calcified tissues formed by female birds during the reproductive period, very important and related to each other: hen's eggshell and medullary bone. During egg shell deposition, female birds and laying hens in particular, need to mobilize large amounts of calcium (> 2 grams) that equals about 10% of the total body calcium. To do this, during the laying period hens develop a special type of bone, the medullary bone, which can be easily reabsorbed for a rapid release and supply of calcium necessary for the eggshell formation. Hen eggshell mineralization is the fastest calcification process known in nature and one of the most interesting biomineralization processes. The result of this process is the formation of a mineral structure with excellent mechanical properties whose main characteristics can be modified by different factors, such as age, diet or disease. For a fuller understanding of the processes that control the formation, mineralization and structures of these materials, we've conducted a detailed study using a wide array of analytical techniques such as attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy, energy dispersive X-rays, X-ray diffraction and electron microscopy. Regarding the study of eggshell formation, the results show that the eggshell calcification begins with the deposition of amorphous calcium carbonate particles with a proto-calcitic structure that make easier their conversion directly into calcite. On the other hand, it's showed how the eggshell microstructure varies in different species causing the mechanical properties of the shell change significantly. On the other hand, we've studied how the eggshell cuticle acts as an effective physical barrier against bacterial penetration and plays an important role in safety of egg. As well as the eggshell, the cuticle properties (degree of coverage, thickness and chemical composition) are highly dependent on hen age, genetics, diet or habitat.

Regarding the cuticle, ATR-FTIR data, use to evaluate cuticle quality, indicated that its composition is highly dependent on hen age and egg freshness. In addition to the age factor, the functionality of the eggshell cuticle is highly dependent on its chemical composition and the maturity of the cuticle, being the risk of bacterial penetration highest in freshly laid eggs with an immature cuticle. As mentioned before, during eggshell calcification and due to high demand for calcium, laying hens produce a special type of bone, known as medullary bone. The medullary bone is a special type of non-structural spongy bone constituted by randomly collagen fibrils and apatite crystals and located in bone marrow cavities in long bones. It is a highly metabolically active bone and has a high turnover rate (only 3 days). During this period, osteoblasts (bone formation cells) function switches from producing cortical bone to produce a mechanically weaker bone, medullary bone. Laying hens develop a type of osteoporosis that arises from a progressive loss of cortical bone (structural bone). To better understand the mineralization of medullary bone during eggshell calcification, tibiae samples corresponding to each stage of eggshell formation and determined as a function of egg location in oviduct have been analyzed. At the same time, it has been studied how the medullary bone contributes to bone mechanical properties being the amount of medullary bone and its properties determined by genetic and environmental factors (physical activity and mobility).

In conclusion, the main objective in this thesis is the study of the mineralogy, structure and functionality of calcified tissues (eggshell and medullary bone), as well as to determine this evolution and what mechanisms are involved in their control. Analytical techniques used in this study allow us to know in detail mineral and structural composition of eggshell and bone tissue. In addition, results show that infrared spectroscopy (ATR-FTIR) used to analyze chemical composition of tissues, can be very

useful for selection programs aimed to improve the safety and quality of eggs and reducing the impact of osteoporosis in laying hens.



# *Introducción*

---

## *1. Introducción.*

### *1.1. La cáscara de huevo como modelo de biomineralización.*

La cáscara de huevo es una capa mineral que contiene al huevo y representa aproximadamente del 9 al 12% del peso total de este. Su proceso de formación, está altamente regulado siendo al mismo tiempo uno de los procesos más rápidos de biomineralización conocidos en la naturaleza, depositándose 6 gramos de carbonato cálcico en menos de 24 horas.

Como en todo composite biomineral podemos distinguir dos fases: una orgánica y otra mineral. La fase orgánica constituye aproximadamente un 3% del peso total de la cáscara de huevo y está compuesta principalmente de proteínas (fosfoproteínas, glicoproteínas), polisacáridos y lípidos. La fase mineral, por su parte, es un agregado de cristales de calcita y representa el 95% del peso de la cáscara (Fernández & Arias., 2000; Gautron et al., 2007).

La formación de la cáscara de huevo es un proceso altamente regulado que ocurre a temperaturas relativamente bajas (40°C). Su fase mineral se deposita mayoritariamente en el útero de la gallina que tiene en su epitelio células especializadas que aportan bicarbonato y calcio. Sobre unas estructuras primarias orgánicas (núcleos mamilares) localizadas sobre la membrana externa de la cáscara se inicia la mineralización con la nucleación los cristales de calcita. Por otra parte, el epitelio del útero segrega moléculas orgánicas especializadas que ayudan a regular la nucleación, la selección de la fase polimórfica y el crecimiento de los cristales de calcita. A partir de los núcleos mamilares, los cristales de calcita crecen hacia el exterior dando lugar a un material con una microestructura columnar característica (Arias et al., 1993; Rodríguez Navarro et al., 2007). Sin embargo, la evolución de la mineralogía en las primeras etapas de formación

no se conoce bien. Es por ello que se ha estudiado en detalle la evolución de la mineralogía y estructura de la cáscara en las primeras etapas de formación.

### *1.1.1. Funciones.*

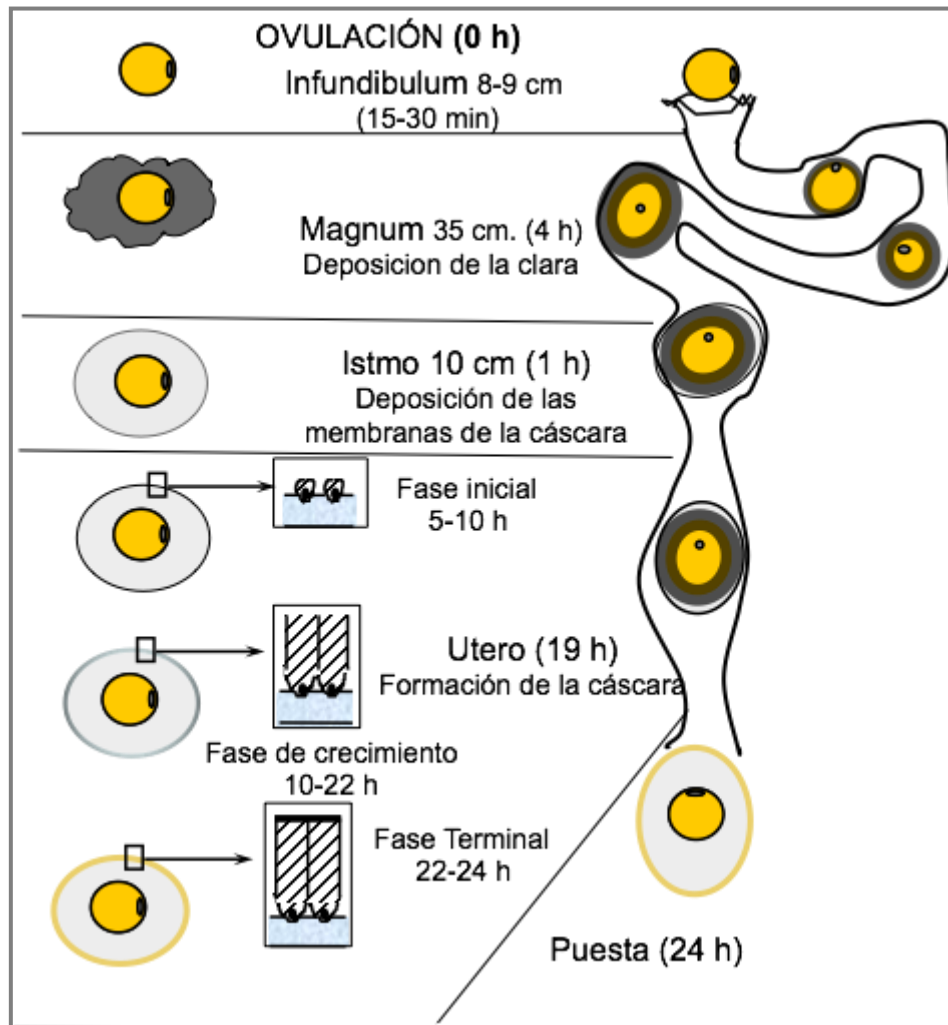
La función principal de la cáscara de huevo es proteger el contenido del huevo de determinados impactos mecánicos externos y de la contaminación microbiana. Además, y gracias a su estructura porosa permite el intercambio por difusión de agua y gases durante el desarrollo extra uterino del embrión. Para desempeñar estas funciones, la cáscara debe ser un material fuerte que resista el peso de la gallina, así como los ataques externos de los predadores, pero a la vez lo suficientemente frágil como para lograr la eclosión del embrión (Fink et al., 1992; Nys et al., 1999).

Por último, y no por eso menos importante, cuando las reservas de la yema de huevo se agotan, la cáscara actúa como fuente principal de calcio para el completo desarrollo del esqueleto del embrión (Nys et al., 2004).

### *1.1.2. Formación de la cáscara y estructura.*

El sistema reproductor de las gallinas está formado por un ovario funcional, el izquierdo y un oviducto. El ovario contiene más de 4000 óvulos microscópicos. De ellos sólo un número reducido llegarán a madurar completamente y pasarán al oviducto para completar su desarrollo (huevo.org.es). El oviducto es un órgano tubular que se extiende desde el ovario hasta la cloaca. Mide entre 60-80 cm y pesa aproximadamente 40 gramos (Fernández & Arias., 2000). Morfológicamente hablando, el oviducto se divide en cuatro regiones: infundíbulo, magnum, istmo y útero o glándula de la cáscara. Estas regiones

se representan en la figura 1 junto con las funciones que desempeñan cada una de ellas en la formación del huevo y el tiempo que permanecen en ellas.



**Figura 1.** Esquema del oviducto de la gallina. Función de cada una de las regiones y tiempo de permanencia (Nys et al., 2004).

Una vez que tiene lugar el proceso de ovulación en el ovario de las gallinas ponedoras, el óvulo, que corresponde a la yema, entra en la primera porción del oviducto, el infundíbulo.

### **Infundibulum**

Es la región del oviducto más proximal al ovario y la más corta (8-9 cm de largo). Su forma de embudo le permite capturar la yema en el momento de la ovulación del ovario para que tenga lugar la fecundación del óvulo. Estructuralmente, el infundibulum se divide en tres zonas. La zona anterior, compuesta por una mucosa con pliegues longitudinales y células ciliadas no secretoras y la porción media y final con un epitelio pseudoestratificado y células ciliadas y secretoras no ciliadas. La secreción por parte de las células de una mucina gruesa y gelatinosa genera la formación de la primera capa de albúmina y las chalazas, hebras de albúmina situadas en cada polo del huevo que anclan la yema al centro. En este segmento, la yema solo permanece durante unos 15 ó 30 minutos (Solomon, 1991; Fernández & Arias., 2000).

### **Magnum**

Es la porción más larga del oviducto (35 cm de longitud) y en ella el huevo permanece durante unas 3-4 horas. En este caso, los pliegues de la mucosa son prominentes y las células que lo tapizan (ciliadas y no ciliadas) se hacen más altas a medida que se desciende en la región. Con el paso del huevo a través del magnum, los pliegues laterales de la mucosa se comprimen y se estimula a las células productoras de la albúmina (Solomon, 1983). Se han descrito tres tipos de células, las células de tipo A encargadas de la producción de la ovoalbúmina, proteína principal de la clara de huevo (54%), las de tipo B productoras de lisozima (3.4%) antibacteriana y las de tipo C que secretan ovomucina (3.5%) y avidina (0.05) (Kohler et al., 1968; Oka & Schimke, 1969; Wilburn et al., 1970). Además de estas proteínas también forman parte de la clara de huevo la ovotransferrina (12%), ovomucoides (11%) y ovoglobulinas (4%) (Stadelman et al., 1995).

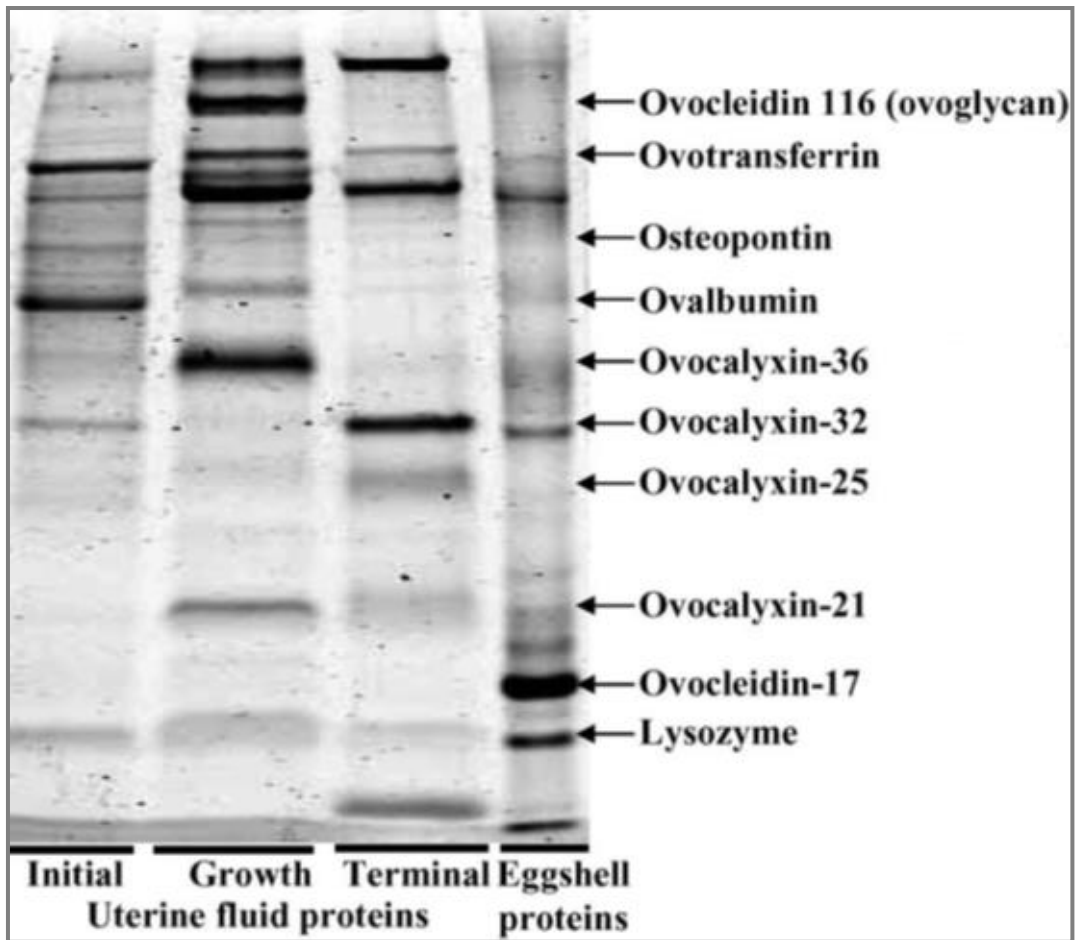
## **Istmus**

Es la zona del oviducto donde tiene lugar la formación de las membranas interna y externa de la cáscara. Mide aproximadamente 10 cm de longitud y el huevo permanece en esta región 1-2 horas. Las glándulas tubulares, encargadas de sintetizar el componente principal de las membranas (colágeno tipo X), se caracterizan por presentar un epitelio pseudoestratificado columnar de células ciliadas y no ciliadas. Una vez formadas las membranas, el huevo avanza por el oviducto hasta una región conocida con el nombre de *istmus rojo o glándula tubular de la cáscara*. En este punto, las células de las glándulas tubulares secretan sobre la membrana externa queratán sulfato. El queratán sulfato es un glicosaminoglicano que forma los núcleos mamilares también conocidos como centros de nucleación o mamilari conos sobre los que nuclean los primeros cristales de carbonato de calcio (Fink et al., 1992; Arias et al., 1993, Fernández et al., 1997).

## **Útero**

El útero también conocido como la glándula de la cáscara es el sitio de formación/mineralización de la cáscara de huevo. Esta zona mide 8 cm de longitud y en ella el huevo permanece entre 18 o 20 horas. La mucosa de la glándula de la cáscara se caracteriza por la presencia de una serie de pliegues y glándulas tubulares. Al igual que en el istmo, el epitelio que recubre a los pliegues está formado por células ciliadas y no ciliadas, responsables de la producción de dermatán sulfato, componente de la matriz orgánica de la cáscara (Solomon, 1983). Cuando el huevo llega al útero, tiene lugar un proceso conocido con el nombre de “plumping”. En él, como su propio nombre indica, el agua es bombeada hacia el albumen a través de las membranas con el fin de doblar su volumen e hidratar las proteínas de la clara de huevo. Además, con este proceso se corrigen las imperfecciones que presentan las membranas al abandonar la zona del istmo y se asegura su correcto funcionamiento (Nys et al., 1999). El segundo fenómeno y de

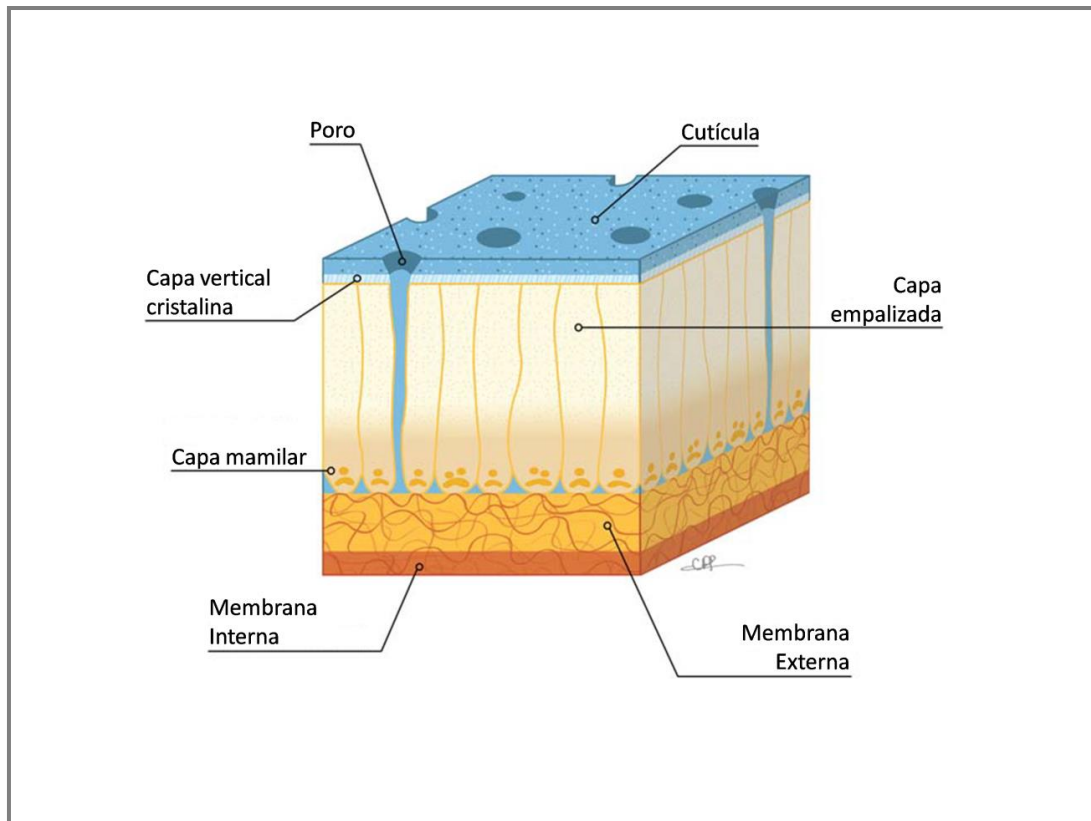
mayor importancia es la mineralización de la cáscara de huevo mediante la precipitación controlada de carbonato cálcico sobre la membrana externa. Durante este proceso, el fluido uterino contiene iones de calcio y bicarbonato en exceso que genera que se precipite espontáneamente el carbonato cálcico en forma de calcita. Además, componentes orgánicos como las proteínas, glicoproteínas y proteoglicanos regulan el proceso de selección polimórfica, nucleación y crecimiento de los cristales de calcita. Entre estos componentes, existen una serie de proteínas que se incorporan progresivamente a la cáscara mineralizada (Figura 2) (Nys et al., 1991; Gautron et al., 1997; Fernández et al., 2001). La ovoalbúmina, la ovotransferrina y la lisozima, además de ser las principales proteínas de la clara de huevo, son las más predominantes en el fluido uterino de la gallina durante la etapa inicial de calcificación. La ovocleidina-17, proteína secretada por las células del epitelio de las glándulas tubulares, está presente en todas las etapas de formación, aunque es más abundante durante la etapa de crecimiento lineal de la cáscara. Su función principal junto con las ovocalixinas es regular la mineralización de la cáscara y actuar como defensa antibacteriana. Las ovocalixinas (de 21, 25, 32 y 36 KDa) por su parte, también están presentes durante la etapa de crecimiento, aunque su etapa predominante es la final. Es por ello que se piensa que terminan el proceso de mineralización aun cuando el fluido uterino está altamente sobresaturado con respecto a la calcita (Nys et al., 2004).



*Figura 2. Perfil de electroforesis del fluido uterino en las tres etapas de formación de la cáscara de huevo y del extracto orgánico de la propia cáscara (Nys et al., 2004).*

Tras 24 horas y una vez concluida la formación de la cáscara, el huevo sale al exterior a través de la vagina de la gallina. A partir de este momento, y como muestra la figura 3 la cáscara del huevo presenta una estructura interna totalmente organizada en varias regiones (del interior al exterior): membranas de la cáscara, capa mamilar (con los conos mamilares), capa empalizada, capa transicional (cristales verticales) y la cutícula .





**Figura 3.** Esquema de la estructura interna de la cáscara de huevo (Hincke et al., 2012.)

### Membranas de la cáscara

La capa más interna de la cáscara del huevo está formada por dos membranas íntimamente relacionadas entre sí que actúan como barrera limitante entre el contenido interno del huevo y la cáscara. Cada membrana está constituida por una malla de fibras dispuestas de manera aleatoria que alcanza un espesor de 48  $\mu\text{m}$  en la parte externa y de 22  $\mu\text{m}$  en la interna (Simons, 1971). En cuanto a las características estructurales, ambas membranas están formadas por fibras que contienen un centro proteico rodeado por un manto de mucopolisacáridos. Entre las proteínas más abundantes se encuentra el colágeno tipo V más presente en la membrana interna y el colágeno tipo X secretado por las células glandulares del istmo (Arias et al., 1997b; Fink et al., 1992; Hincke et al., 2012).

### Capa mamilar

La capa mamilar de aproximadamente 100 micras de espesor está constituida por un conjunto de conos también conocidos como mamilas o núcleos mamilares a partir de los cuales tiene lugar el inicio de la mineralización de la cáscara. Cada uno de los conos está compuesto por un núcleo de materia orgánica donde nucleon cristales de calcita y cuyo componente principal es el queratán sulfato (Panheleux et al., 1999). A su vez, este queratán sulfato forma parte de un proteoglicano sin caracterizar que recibe el nombre de mamilán (Fernández et al., 2001). Cada una de las mamilas, se caracteriza por presentar en su zona basal una región de reserva de calcio formada por microcristales de calcita que facilita la disolución del mineral y la movilización del calcio necesario para la nutrición del embrión (Nys et al., 2004; Chien et al., 2008). A medida que los cristales de calcita van creciendo, estos se fusionan lateralmente con los cristales vecinos otorgándole a la cáscara un mayor grado de resistencia. Sin embargo, cuando la fusión entre cristales no tiene lugar, se generan en su lugar poros que atraviesan verticalmente la capa y cuya función es facilitar la difusión de gases y agua a través de la cáscara para el correcto desarrollo del embrión (Solomon, 1991; Hincke et al., 2012).

### Capa empalizada

Es la capa más gruesa de la cáscara del huevo, con un espesor aproximado de 200-350  $\mu\text{m}$ . Se caracteriza por la presencia de cristales columnares de calcita perpendiculares a la superficie de la cáscara que crecen desde los núcleos mamilares hasta la capa vertical de cristales. La parte inorgánica de esta zona está formada por carbonato cálcico en forma de calcita, mientras que la orgánica está constituida principalmente por capas de dermatán sulfato, mucopolisacárido que favorece el crecimiento de los cristales de calcita (Fernández et al., 1997) y protege a la estructura de impactos externos (Nys et al., 2004).

### Capa vertical cristalina

Esta capa tiene un espesor de 3-8  $\mu\text{m}$  y se caracteriza por presentar microcristales de calcita con orientación vertical. La matriz orgánica en este caso, también está orientada perpendicularmente a la superficie de la cáscara y su grado de empaquetamiento aumenta conforme se acerca a la superficie (Dennis et al., 1996; Fraser et al., 1998).

### Cutícula

La superficie de la cáscara está recubierta por la cutícula, una capa orgánica depositada por las células epiteliales del útero de las gallinas sobre la capa vertical de cristales de la cáscara de huevo (Nys et al., 1999). Mide hasta 12  $\mu\text{m}$  de espesor y su función principal es taponar la abertura de los poros de la cáscara limitando el movimiento del agua y de las bacterias hacia el interior del huevo. La cutícula junto con la cáscara y las membranas constituye la primera barrera física contra la invasión de microorganismos. De hecho huevos sin cutícula o en los que ha sido parcialmente eliminada son más susceptibles a la contaminación bacteriana (Board & Halls, 1973). Está compuesta principalmente de proteínas (glicoproteínas) (90%), algunas de ellas con potente actividad antimicrobiana (lisozima C, ovotransferrina, ovocalixina y ovocleidina), y en menor proporción de polisacáridos (4%) lípidos (3%) y pigmentos de porfirina en huevos marrones (Baker & Balch, 1962, Hincke, 2012).

Existe escasa información sobre cómo características tan importantes como la composición química de la cutícula de la cáscara de huevo se ve afectadas por factores como la edad de la gallina y la frescura del huevo (Haisiak et al., 1970). Por ello, en este trabajo se ha estudiado como afectan estos factores a las propiedades y composición de la cutícula y a la penetración bacteriana.

### *1.1. Tejido óseo.*

El hueso es un tejido conectivo especializado que junto con el cartílago forma el sistema esquelético. Como en otros tejidos, está compuesto por una serie de células y matriz extracelular, aunque en este caso, la característica que lo distingue del resto de tejidos es que su matriz está mineralizada. El resultado de la mineralización es un tejido de gran dureza que es capaz de proporcionar sostén y protección. Las funciones principales del hueso son: mecánica, al actuar como soporte para la inserción muscular y facilitar el movimiento del sistema musculo-esquelético, protectora de los órganos y de la médula ósea y metabólica, como reserva de calcio y fósforo, necesario para mantener la homeostasis del organismo y las funciones celulares (Baron, 1993; Ross et al., 2007).

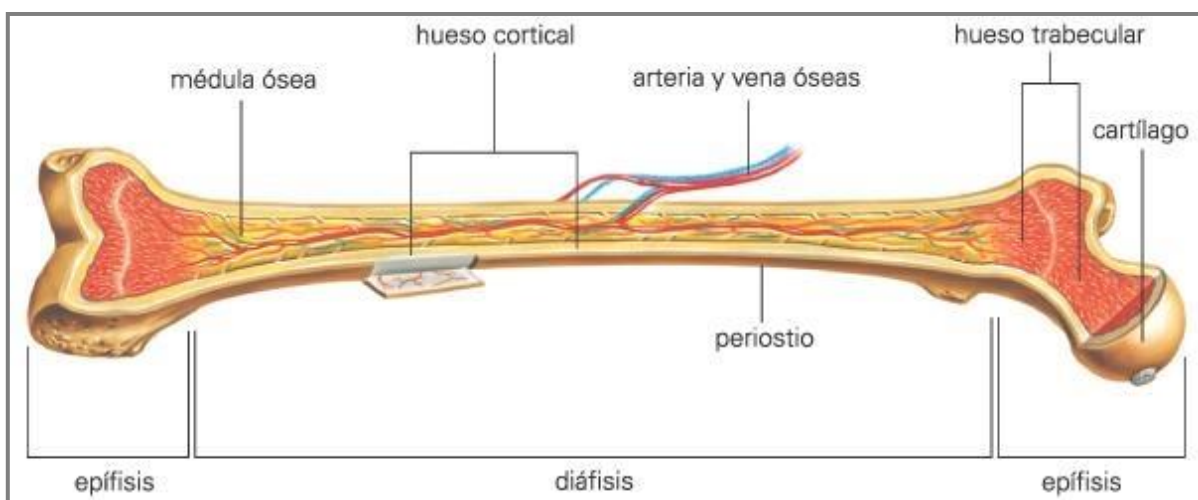
#### *1.1.1. Tipos de hueso.*

El hueso es un composite biocerámico que se caracteriza por presentar una estructura compleja y jerárquicamente organizada. A nivel macroscópico se pueden clasificar, según su forma, en cinco grupos:

- Huesos largos: se encuentran principalmente en las extremidades. Su forma es cilíndrica y predomina su longitud sobre el ancho y el grosor. Ejemplos de este tipo de huesos son el fémur, la tibia y el peroné.
- Huesos cortos: tienen forma cúbica, su longitud y diámetro son similares y su función principal es de amortiguamiento. El tarso del tobillo y el carpo de la muñeca son ejemplos de este tipo de huesos.
- Huesos planos: como su propio nombre indica son planos y delgados, por lo que son más anchos y largos que gruesos. Su función principal es la protección y se encuentra en los lugares donde se requiere fijación muscular. Ejemplo de ellos son el esternón y los huesos del cráneo.

- Huesos irregulares: no presentan una forma determinada para poder encuadrarlos dentro del resto de los grupos descritos. Su forma es compleja y su función principal es la de proteger al sistema nervioso central. Las vértebras o el etmoides entre otros forman parte de este grupo.
- Huesos sesamoideos: su forma es redondeada, son pequeños y están embebidos en los tendones. Se encuentran en las articulaciones y claro ejemplo de ellos es la rótula.

Los huesos largos, concretamente la tibia, es uno de los objetos principales de estudio de esta tesis. Como muestra la figura 4, el hueso está formado estructuralmente por tres partes: a) diáfisis, porción cilíndrica y alargada que ocupa la zona media del hueso, b) epífisis, cada uno de los extremos del hueso y c) metáfisis, zona de transición entre la diáfisis y la epífisis. El responsable del crecimiento longitudinal de los huesos largos, es el cartílago epifisario, una capa de cartílago que separa a la epífisis y a la diáfisis durante la etapa de crecimiento y desarrollo. Esta capa de cartílago se mineraliza, se remodela y finalmente se reemplaza por tejido óseo (Boskey, 2000).



**Figura 4.** Estructura típica de un hueso largo (fuente: <http://espasa.planetasaber.com>).

La diáfisis está recubierta por una capa densa y gruesa de tejido óseo calcificado que recibe el nombre de hueso cortical (denso o compacto). En su interior, esta parte del hueso, alberga una cavidad medular formada por células hematopoyéticas de la médula ósea. En la epífisis y la metáfisis, sin embargo, el grosor de la capa del hueso cortical disminuye y se forma en su interior una fina red de finas trabéculas calcificadas que recibe el nombre de hueso trabecular (esponjoso).

En el esqueleto humano de un adulto, el 80% del volumen total del hueso está formado por hueso cortical y el 20% restante del volumen es de hueso trabecular. El hueso cortical, con un 80% del tejido mineralizado, es el encargado de llevar a cabo funciones mecánicas y de protección. Sin embargo, el hueso trabecular con tan solo un 20% del tejido calcificado, es fundamental en las funciones metabólicas (metabólicamente más activo) (Buckwalter et al., 1996).

### **Hueso cortical**

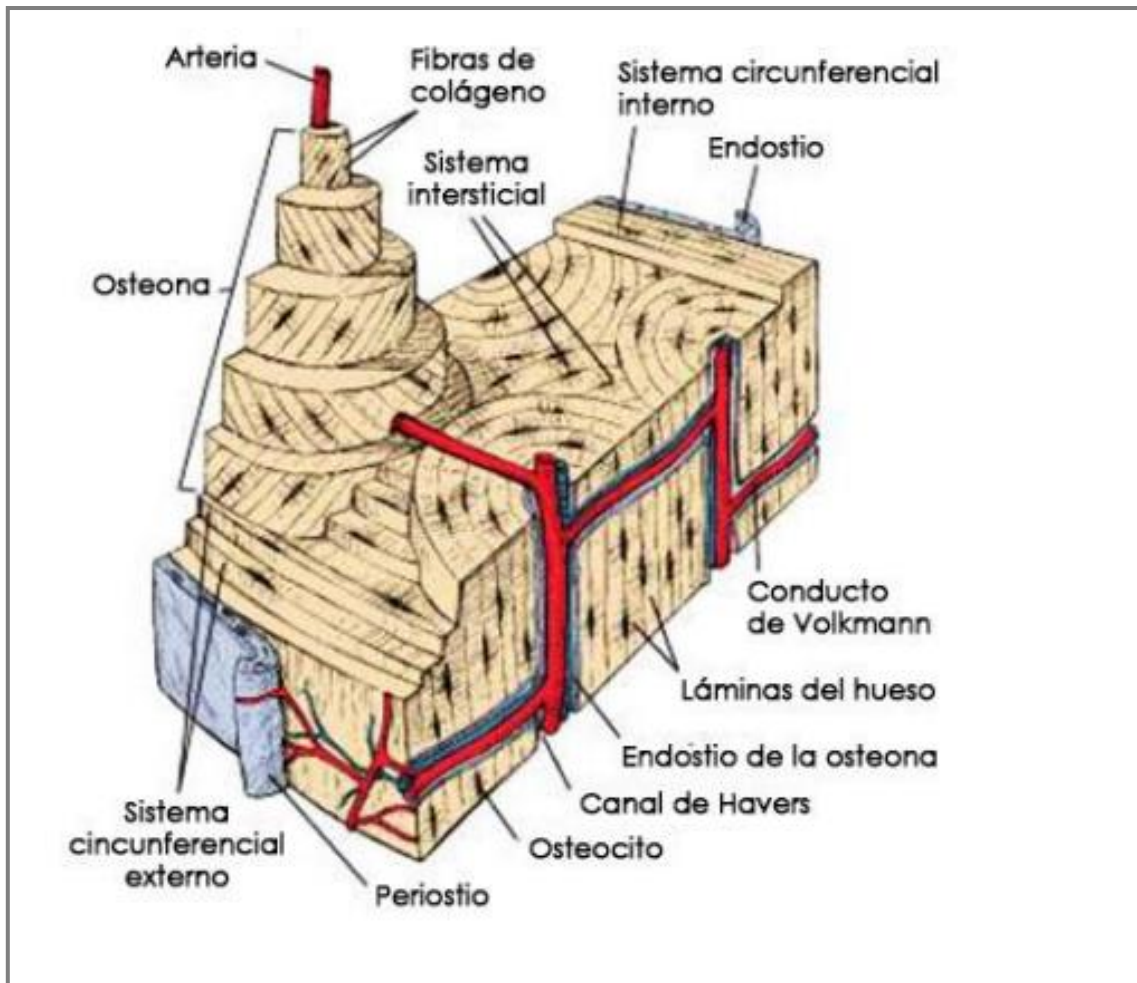
El hueso cortical es denso y compacto y rodea a la médula ósea y al hueso trabecular. Está compuesto principalmente por unidades cilíndricas de estructura ósea que reciben el nombre de osteonas o sistemas de Havers (Figura 5). Cada osteona está formada por una serie de laminillas concéntricas de matriz ósea que rodean a un canal central, el conducto de Havers, encargado de transportar a los vasos sanguíneos y a los nervios. Los conductos Harversianos se interconectan entre sí, gracias a unos canales perforantes llamados conductos de Volkmann. Además, este tipo de canales son los encargados de comunicar a los conductos Harversianos con la médula ósea y el periostio. Es interesante destacar, que los osteocitos se encuentran entre las laminillas concéntricas de la matriz. Este tipo de células, como he comentado anteriormente, tienen una serie de prolongaciones

citoplasmáticas que viajan a lo largo de canalículos que les permiten intercambiar nutrientes con el líquido intersticial.

Las laminillas concéntricas de matriz ósea están formadas por fibras de colágeno dispuestas de manera paralela, pero están orientadas en una dirección diferente a la que adoptan en las laminillas adyacentes, adoptando la superficie de corte del hueso un aspecto similar a la madera terciada. Además de las laminillas concéntricas, entre las osteonas se observan remanentes de laminillas óseas distribuidas de manera irregular que reciben el nombre de laminillas intersticiales, y laminillas circunferenciales que rodean el interior y el exterior de la diáfisis de los huesos (Ross et al., 2007; Weiner & Wagner, 1998).

### **Hueso trabecular**

El hueso trabecular es un tejido mineralizado que a diferencia del hueso cortical no está formado por osteonas sino que presenta una red de tabiques y barras conectadas llamadas trabéculas. Es mucho menos denso que el hueso cortical y tiene una mayor porosidad (50-90%). Estas trabéculas dan lugar a una estructura esponjosa caracterizada por la presencia de numerosos huecos rellenos de médula ósea. Los vasos sanguíneos en este caso, penetran directamente en el hueso, permitiendo el intercambio de nutrientes con los osteocitos que están localizados dentro de las trabéculas. El hueso trabecular es el principal constituyente de la epífisis de los huesos largos y se caracteriza por presentar una tasa metabólica y de remodelado más elevada que el hueso cortical además de responder más rápidamente a cualquier cambio mecánico (Buckwalter et al., 1995).



**Figura 5.** Esquema de una sección transversal de hueso largo en el que se muestra la organización y localización del hueso compacto y esponjoso (Texto y atlas color con Biología celular y molecular, Ross et al., 2007).

### Hueso medular

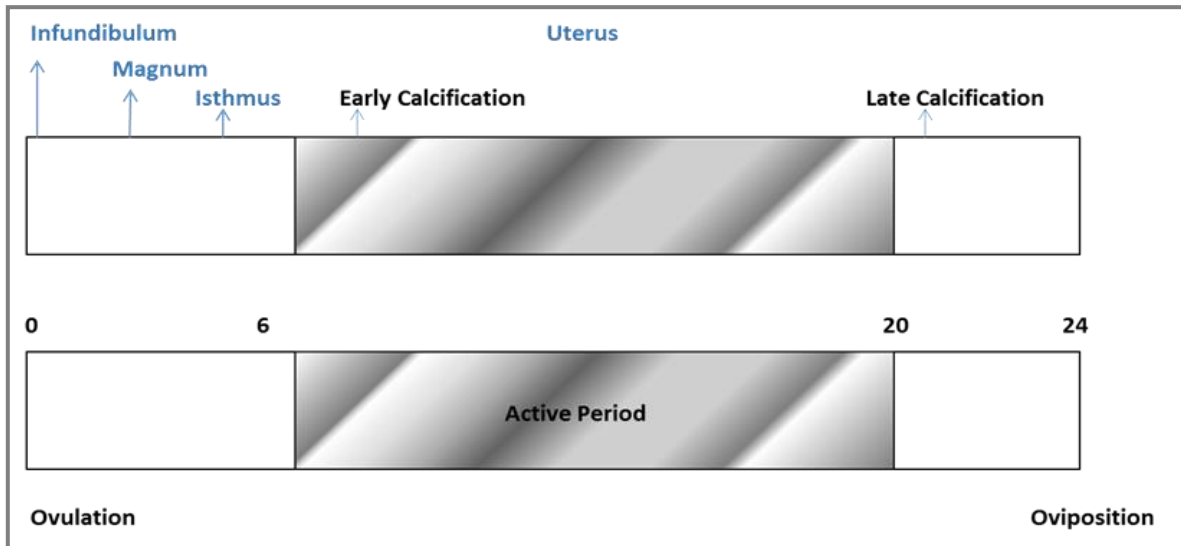
Durante el periodo de puesta, las gallinas ponedoras movilizan una gran cantidad de Ca (2 g), que equivale a cerca del 10% del calcio total de su cuerpo. El 60% del calcio de la cáscara deriva directamente de la ingestión de la dieta, mientras que el 40% restante lo hace del esqueleto (Comar & Driggers, 1949). Para ello, han desarrollado un metabolismo de este elemento muy eficaz y especializado durante la producción intensiva de huevos (Whitehead & Fleming, 2000). En este periodo de madurez sexual, los estrógenos inducen



la formación de un tipo especial de hueso, llamado hueso medular localizado en las cavidades de la médula de los huesos de las ponedoras (Whitehead, 2004). El hueso medular es un tipo de hueso esponjoso no estructural que se encuentra principalmente en los huesos largos de las gallinas ponedoras. Está formado principalmente por cristales de hidroxiapatita depositados de manera aleatoria sobre una matriz de fibras de colágeno (Ascenzi et al.; 1963) y su función principal es actuar como reservorio de calcio. Además cabe destacar que al estar altamente calcificado y con menor número de fibras de colágeno que el hueso cortical, la accesibilidad al calcio es mayor (Taylor et al., 1971). Es un tipo de hueso muy reactivo y metabólicamente activo, ya que mientras que el hueso estructural (cortical) tiene un periodo de remodelación de varios meses al año, el medular se renueva en tan sólo 3 días. Durante la formación de la cáscara del huevo se produce una intensa reabsorción osteoclástica seguida de una intensa actividad osteoblástica que da lugar a la formación de hueso medular nuevo, antes del siguiente ciclo de formación de la cáscara de huevo (Van de Velde et al., 1985; 1986).

Como se ha comentado previamente en el apartado de la cáscara de huevo, el ciclo de puesta comienza con la ovulación y dura aproximadamente 24 horas (figura 6). Durante las primeras seis horas de este ciclo, el óvulo se mueve a través del oviducto de la gallina recorriendo el infundíbulo, el magnum y el isthmus. Una vez transcurrido este tiempo, el óvulo está listo para ingresar en el útero, donde va a tener lugar la calcificación de la cáscara de huevo. Al periodo que comprende la reabsorción del hueso medular y formación de la cáscara se le denomina fase activa (15-18h), mientras que el intervalo en el que no tiene lugar el proceso de calcificación de la cáscara, se considera fase inactiva (Miller, 1977). Una vez completada la formación de la cáscara tiene lugar la ovoposición. Un aspecto que no se conoce bien es la evolución de la composición mineral de hueso medular o la alteración de sus propiedades minerales durante el ciclo de formación de la

cáscara (Kerschnitzki et al., 2014). En particular, se ha estudiado si se forman fases minerales de carbonato cálcico, además del apatito, que pudiesen explicar la alta reactividad del hueso medular.



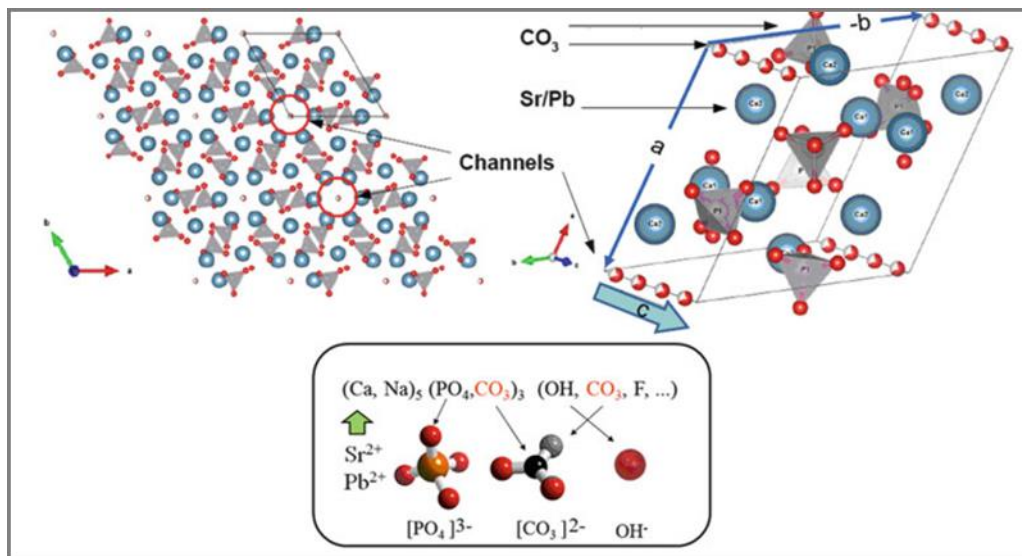
**Figura 6.** Ciclo de oviposición de la gallina y formación de hueso medular (Modificado de Scott C. Miller, 1977).

### 1.1.2. Composición.

El hueso es un material heterogéneo que está compuesto por una fase inorgánica, una fase orgánica y agua. La fase inorgánica constituida mayoritariamente por hidroxiapatita, contribuye aproximadamente al 65% del peso seco del hueso. El agua por su parte representa el 10% y la fase orgánica, formada principalmente por colágeno y proteínas no colágenas, constituyen un 20% del peso seco del hueso (Buckwalter et al., 1995).

### A) Fase Mineral.

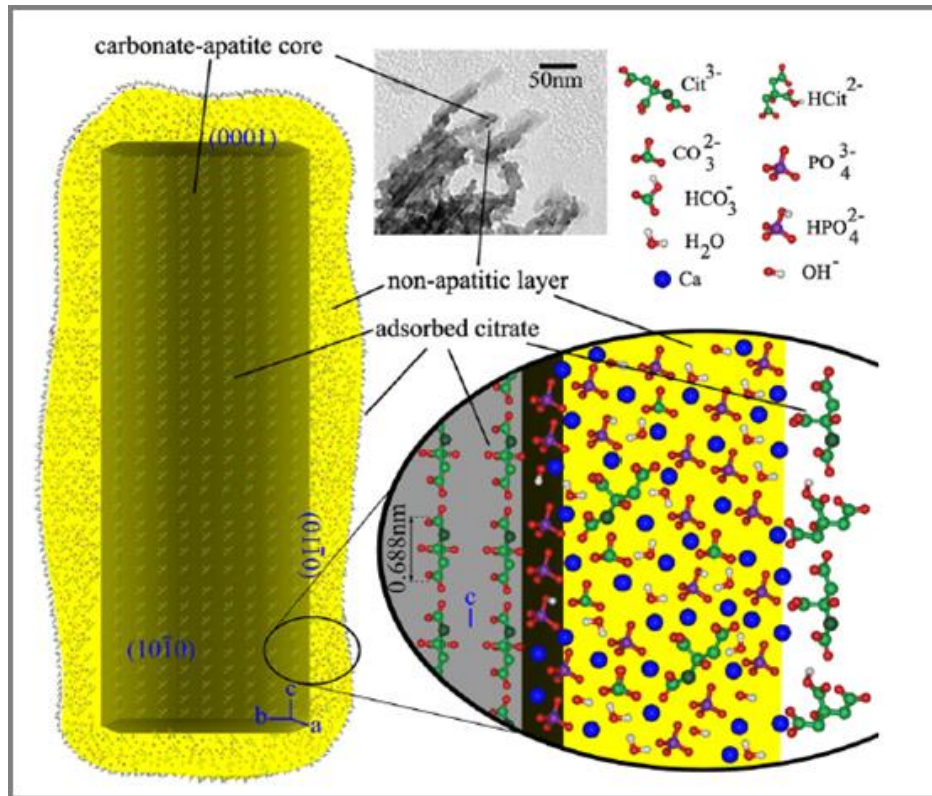
El mineral que se encuentra formando parte del hueso es un análogo de la hidroxiapatita geológica ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) y es el encargado de proporcionarle al hueso resistencia y rigidez (figura 7).



**Figura 7.** Estructura del apatito del hueso. Presenta una composición variable debido a las sustituciones iónicas:  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  o  $\text{Sr}^{2+}$ ; sustituciones tipo B,  $\text{PO}_4$  por  $\text{CO}_3^{2-}$ , y tipo A,  $\text{OH}^-$  por  $\text{CO}_3^{2-}$  (Schmahl et al., 2016).

Los cristales de apatito óseo, al contrario que los cristales de origen geológico, se caracterizan por ser muy pequeños (9 nm x 6 nm x 2 nm) (Boskey, 2006). Por otro lado, el mineral óseo presenta numerosas impurezas, la más abundante de ellas, el carbonato, y deficiencias en calcio e hidróxido, deficiencias que genera que la relación estequiométrica de Ca/P sea menor a la del hidroxiapatito geológico (1.67). Por otro lado, es importante destacar el papel que desempeñan los iones citrato, agentes complejantes del calcio, que al interactuar con la superficie inhiben el crecimiento de cristales de apatita (López-Macipe et al., 1998; Hu et al., 2010) (Figura 8). Estas propiedades unidas al

pequeño tamaño de los cristales hacen que la solubilidad de los cristales sea mayor que la de su análogo geológico permitiendo su reabsorción por parte de las células especializadas (Boskey, 2007; Olszta et al., 2007).



**Figura 8.** Estructura del cristal de apatito carbonatado, formado por un núcleo central carbonatado cubierto por una capa hidratada estabilizada por iones citrato (Delgado-López et al., 2012).

El agua, por su parte, representa el 5-10% del peso del tejido óseo. Está localizada dentro de las fibras de colágeno, en particular, en las zonas de unión (Zonas gap) y entre las moléculas de triple hélice (Weiner & Wagner, 1998). Los enlaces de hidrógeno entre ambas moléculas contribuyen a la estabilización de la fibrilla de colágeno. Además de favorecer la interacción entre las fibrillas de colágeno, se ha comprobado que el agua facilita la unión de los cristales minerales al colágeno (Boskey, 2006; Yoder et al., 2012).

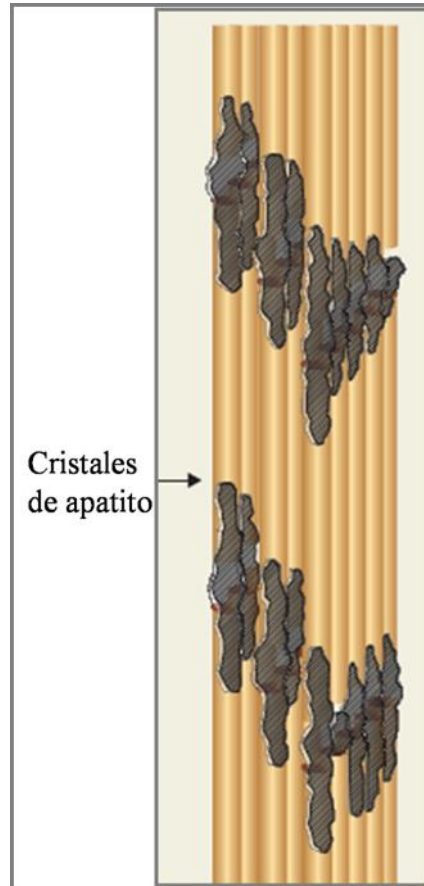
## **B) Fase Orgánica.**

La matriz orgánica está formada mayoritariamente por fibras de colágeno tipo I (90%), tipo V, proteínas no colágenas (5%) y lípidos (2%) (Boskey, 2013). Juega un papel importante en el sistema óseo y constituye una reserva de proteínas que regulan la diferenciación celular y participan en la función del tejido óseo (Young, 2003).

### **El colágeno**

El colágeno tipo I es la proteína más abundante que existe en el tejido óseo (90%). Se trata de una proteína fibrosa insoluble que además de dirigir la organización de la matriz, le proporciona al hueso elasticidad y flexibilidad (Boskey, 2006). La macromolécula de colágeno tiene una estructura única. Está formada por tres cadenas polipeptídicas, dos de ellas idénticas ( $\alpha_1$ ) y una distinta ( $\alpha_2$ ). La naturaleza repetitiva de sus secuencias de aminoácidos, que consiste en (Gly-X-Y), donde X e Y son frecuentemente residuos de prolina e hidroxiprolina, permite que las cadenas polipeptídicas se ensamblen en una fibrilla con estructura triple hélice denominadas moléculas de tropocolágeno (Ramachandran & Venkatachalam, 1966). La disposición de las fibras de colágeno varía en función del tipo de hueso. Por ejemplo, mientras que en el periostio están dispuestas en hojas, en las osteonas están orientadas todas con la misma dirección, en espiral dentro de una misma placa. Las fibrillas que se orientan y forman un conjunto repetitivo le dan flexibilidad a los tejidos no mineralizados. Cuando el tejido está mineralizado, las unidades de tropocolágeno se ensamblan las unas con las otras a lo largo de un eje dando lugar a una estructura con forma escalonada, de aproximadamente 64-67 nm, dependiendo del estado de hidratación y mineralización (Weiner & Wagner, 1998). Los cristales de hidroxapatita están alineados de forma paralela al eje de las fibras de colágeno (Figura 9) y ocupan los espacios (zonas gap) que se generan entre las moléculas

y fibrillas de colágeno. Esta orientación permite que los cristales contribuyan a la resistencia mecánica del hueso y que esta sea altamente anisotrópica (Hodge, 1989; Landis et al., 1996; Weiner & Wagner, 1998).



**Figura 9.** Distribución de los cristales de apatito en las fibras de colágeno (Ritchie et al., 2009).

### **Proteínas no colágenas**

Este tipo de proteínas se encuentra íntimamente relacionadas con el colágeno, ya que, si se eliminan de la matriz junto con el mineral, la matriz no puede volver a ser remineralizada (Termine et al., 1981).

#### a) Proteoglicanos

Constituyen el 10% de las proteínas no colágenas. Son moléculas de gran tamaño que inhiben el proceso de calcificación al enmascarar las fibrillas de colágeno e impedir el

secuestro de iones calcio o complejos de fosfato cálcico. Ejemplos de proteoglicanos son la decorina y el biglicano, ambos ricos en condroitín-sulfato y dematán sulfato, con capacidad de unión a las fibras de colágeno tipo V, a algunas proteínas de la matriz y a diversos factores de crecimiento (Fradinger & Zanchetta, 2001; Al-Qtaitat & Aldalaen, 2014).

b) Proteínas  $\gamma$  carboxiladas

Son proteínas que se caracterizan por la presencia de residuos gamma carboxilados en el ácido glutámico. La osteocalcina representa el 20% de las proteínas no colágenas de la matriz (Al-Qtaitat & Aldalaen, 2014). Es sintetizada por osteoblastos y plaquetas, dependientes de las vitaminas D y K. Tiene una elevada afinidad por los cristales de hidroxiapatita e inhibe su crecimiento en solución, llegándose a proponer que es la encargada de regular la longitud de los cristales en el tejido óseo (Ducy et al., 1996). Clínicamente, es utilizada como marcador de la actividad osteoblástica y para medir el grado de remodelación ósea.

c) Proteínas glucosiladas

Las más importantes en el hueso son la fosfatasa alcalina, la osteonectina y las proteínas RGD.

La fosfatasa alcalina es una enzima, que al igual que la osteocalcina es sintetizada por los osteoblastos. Está involucrada en la mineralización, ya que libera fosfato inorgánico a partir de la degradación de esteres fosfóricos (George & Veis, 2008).

La osteonectina es una glicoproteína ácida implicada en la mineralización y en la remodelación ósea. Es sintetizada por varios tipos de células como los osteoblastos, fibroblastos, odontoblastos y células de los tendones (Mundy, 1995). Tiene afinidad por el colágeno tipo I, III, V y por la hidroxiapatita, lo cual sugiere que interviene en la organización de la matriz y promueve el crecimiento cristalino (Fradinger, 2001).

Las proteínas RGD presentan en su estructura una secuencia de tres aminoácidos (arg-gly-asp) que es utilizada por las integrinas para llevar a cabo las interacciones célula-matriz (Ruoslanhti y Pierschbacher, 1989). También se conocen con el nombre de SIBLINGS (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein). Las proteínas RGD más importantes son la vitronectina, fibronectina, trombospondina, osteopontina y sialoproteína ósea. Todas son glicoproteínas fundamentales en los procesos de remodelado y regeneración ósea, aunque su función principal es la de facilitar la unión de las células óseas a la superficie del hueso (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil et al., 2006).

d) Proteínas procedentes del plasma

Son conocidas también como proteínas exógenas y las más importantes son la albúmina y la glucoproteína  $\alpha_2$ -HS. Se ha probado que ambas tienen afinidad por la hidroxiapatita e inhiben el crecimiento (Mura-Galelli et al., 1991).

e) Factores reguladores del crecimiento.

Son una amplia gama de proteínas biológicamente activas que tienen la capacidad de regular la actividad celular. Intervienen en la diferenciación, crecimiento y proliferación de las células (Canalis et al., 2003). Ejemplo de ellas son los factores de crecimiento  $TGF\beta I$  y  $TGF\beta II$  y los factores de crecimiento insulínico IGFI e IGFII (Favus, 1999).

## Lípidos

Los lípidos representan el 2-5% de la matriz orgánica del hueso. Son componente de las membranas celulares y por tanto juegan un papel muy importante en la función celular, regulando el flujo de iones y las moléculas de señalización dentro y fuera de la célula (Reid et al., 2012). También parecen desempeñar un papel fundamental en el inicio de la mineralización (Gokhale et al., 2001).



### **C) Células óseas.**

Además de la fase mineral y la fase orgánica, en la matriz ósea se distinguen tres tipos de células, los osteoblastos, los osteocitos y los osteoclastos, responsables de la formación y reabsorción ósea. A excepción de los osteoclastos, que derivan de células hematopoyéticas, los osteoblastos y los osteocitos, son una forma diferenciada del mismo tipo celular, las células madres mesenquimatosas.

#### **Osteoblastos**

Los osteoblastos son células grandes (20-30  $\mu\text{m}$ ) que se caracterizan por presentar una forma cuboide o poliédrica y abundante retículo endoplasmático rugoso. Son las encargadas de secretar el colágeno y la sustancia fundamental que va a constituir el osteoide o hueso inicial no mineralizado. El proceso de calcificación, es iniciado por estas células mediante la secreción de vesículas matriciales. Estas vesículas de unos 50-250 nm de diámetro contienen una enzima, la fosfatasa alcalina, que permite que se lleve a cabo el proceso de mineralización (Ross et al., 2007). Además de sintetizar proteínas colágenas, no colágenas y contribuir a la mineralización del tejido, los osteoblastos, dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular, sintetizan factores de crecimiento y median en la reabsorción a través de la síntesis de citocinas (Simonet et al., 1997).

#### **Osteocitos**

Los osteocitos son osteoblastos diferenciados que quedan atrapados dentro de la matriz mineralizada. Tienen forma de estrella y son las células más abundantes del hueso. Cada osteocito ocupa un lugar o laguna que adopta la forma lenticular de la célula y se comunican con las células vecinas mediante sus prolongaciones citoplasmáticas. Esta

comunicación ocurre a través de una serie de túneles o canalículos (Ross et al., 2007). Además de participar en la síntesis y mineralización de la matriz, se cree que la función principal de los osteocitos es la de controlar el proceso de remodelación ósea, detectando la fuerza mecánica que se le aplica al hueso e informando a las células efectoras (osteoclastos u osteoblastos) (Burguer & Klein-Nulend, 1999).

### **Osteoclastos**

El osteoclasto es una célula multinucleada y de gran tamaño (100  $\mu\text{m}$ ) que tiene como función principal la reabsorción ósea (Fernández-Tresguerres et al., 2005). Como consecuencia de este proceso, las células generan una excavación que recibe el nombre de laguna de resorción o laguna de Howship. Se pueden diferenciar dos partes en las células: una región central con estructuras similares a las microvellosidades y que reciben el nombre de borde fenestrado, y un perímetro anular de citoplasma denominado zona clara. Mientras que la zona clara sirve de anclaje a la matriz, en el borde fenestrado es donde tiene lugar el proceso de reabsorción. En este proceso, las membranas del borde fenestrado secretan ácidos orgánicos para la disolución de las sales de calcio y posteriormente enzimas hidrolíticas liberadas de los lisosomas digieren los componentes orgánicos de la matriz ósea (Ross et al., 2007).

#### **1.1.3. *Formación del hueso.***

La formación ósea es un proceso complejo que se puede llevar a cabo mediante dos mecanismos, osificación intramembranosa y osificación endocondral. La diferencia entre ambos mecanismos es que exista el cartílago como precursor óseo (osificación endocondral) o que el hueso se forme por un mecanismo más sencillo sin la existencia de un cartílago precursor (osificación intramembranosa).

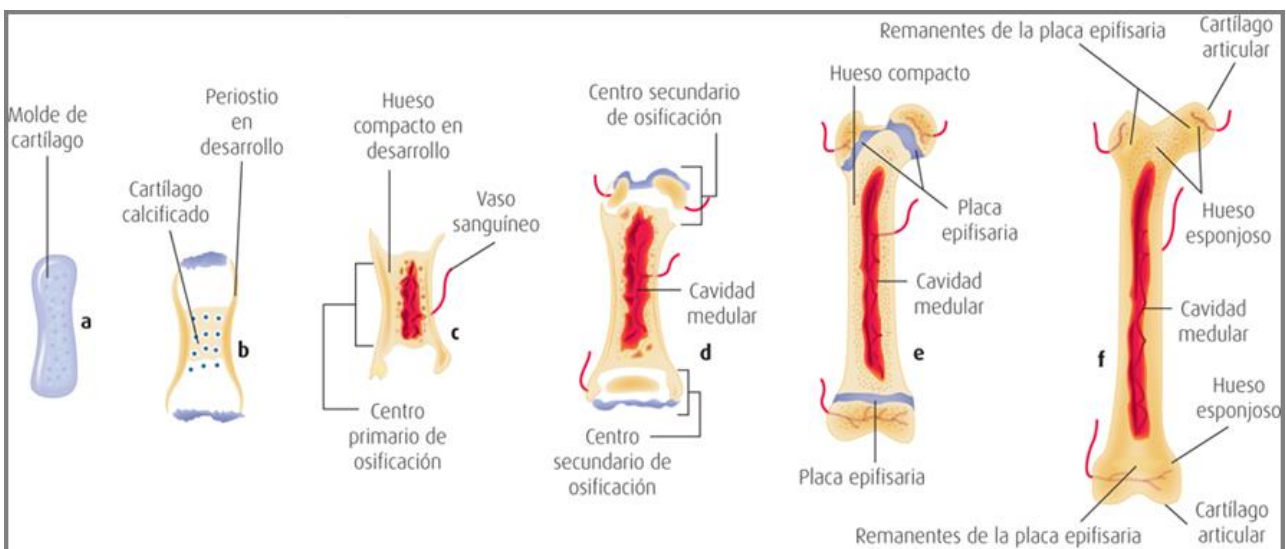
### **Osificación intramembranosa**

Este tipo de formación ósea suele ocurrir en huesos planos del esqueleto como, por ejemplo, los huesos de la cara, la mayoría de los huesos craneales y los de la clavícula. El proceso de desarrollo comienza cuando las células mesenquimáticas migran del mesénquima y se agrupan en las áreas donde se formará el hueso. En estas zonas, algunas de las células se van a diferenciar en capilares mientras que otras se convertirán en células osteogénicas y posteriormente en osteoblastos. Estos osteoblastos van a secretar colágeno y proteoglucanos dando lugar a una matriz ósea no calcificada (osteóide) que posteriormente va a ser mineralizada (Ross et al., 2007). En este punto del desarrollo, los osteoblastos quedan atrapados por la matriz mineralizada transformándose en osteocitos interconectados con las células vecinas a través de sus prolongaciones citoplasmáticas. Al mismo tiempo que ocurre esto, otro grupo de células osteogénicas del tejido circundante se diferencian de nuevo en osteoblastos y agregan más matriz. El osteóide secretado alrededor de los capilares da como resultado una matriz trabecular mientras que en la superficie se crea una capa protectora de hueso cortical compacto. Este tipo de formación se llama crecimiento por aposición (Buckwalter et al., 1996).

### **Osificación endocondral**

Este proceso de formación, esquematizado en la figura 10, tiene lugar en los huesos de la base del cráneo y en los huesos largos. Al igual que en la osificación intramembranosa, comienza con la agrupación y proliferación de células mesenquimáticas en el sitio donde se va a desarrollar el hueso, pero en este caso se diferencian en condroblastos. Estos condroblastos van a ser los encargados de producir en esta etapa inicial el cartílago hialino que actuará como modelo cartilaginoso. Los condrocitos nuevos originados a partir del pericondrio, membrana que recubre al cartílago, son los encargados del incremento del

espesor. A medida que avanza el proceso de formación, se observa en la región media del modelo cartilaginoso que las células del pericondrio no dan origen a condrocitos sino a osteoblastos. En este momento se habla por tanto de periostio y no de pericondrio. Como consecuencia de estas modificaciones, alrededor del modelo cartilaginoso se forma una capa delgada de tejido óseo que recibe el nombre de manguito o collar óseo. A partir de este momento, la matriz cartilaginosa se calcifica e impide la difusión de los nutrientes necesarios para los condrocitos. La muerte de los condrocitos provoca la desintegración del cartílago circundante dando lugar a una serie de cavidades que son invadidas por los vasos sanguíneos y las células osteogénicas.

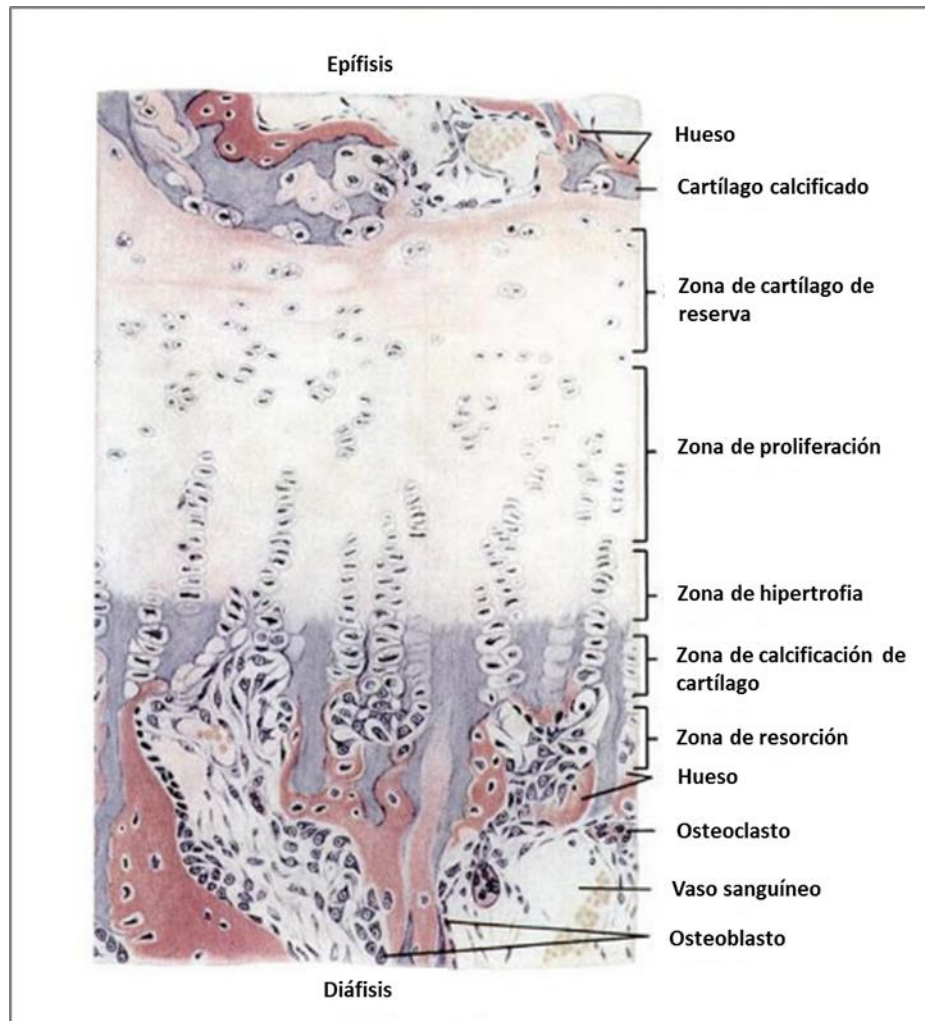


**Figura 10.** Representación esquemática del proceso de osificación endocondral (fuente: [www.accessmedicina.com](http://www.accessmedicina.com)).

Estas células osteoprogenitoras se depositan sobre los residuos de cartílago y se diferencian en osteoblastos, células que comienzan a sintetizar y a depositar hueso (osteóide). Todo este conjunto de estructuras que se desarrollan en la región central se denominan centro de osificación primario o diafisario. Posteriormente, en los extremos

distales y proximales surgen centros de osificación secundaria, denominados secundarios o epifisarios. Entre estos centros de osificación, persiste un disco delgado de cartílago conocido como placa epifisaria que es la que va a permitir el crecimiento longitudinal del hueso. Esta placa presenta una serie de zonas bien diferenciadas, ilustradas en la figura 11:

- Zona de cartílago de reserva o en reposo: es la región más cercana a la epífisis y sirve como punto de anclaje entre esta zona y la diáfisis. Está formada por condrocitos que ni proliferan ni producen matriz.
- Zona de proliferación: los condrocitos, algo mayores que los anteriores, se organizan en nítidas columnas y experimentan mitosis activa. La capa se espesa y toda la placa crece longitudinalmente.
- Zona de hipertrofia: está compuesta por condrocitos de gran tamaño que acumulan glucógeno. La matriz está comprimida formando bandas entre las columnas de células cartilagosas hipertrofiadas.
- Zona de cartílago calcificado: en esta región, las células degeneran como consecuencia de la calcificación de la matriz.
- Zona de resorción: es la más cercana a la diáfisis y en ella el cartílago está en contacto directo con el tejido conjuntivo de la cavidad medular.



**Figura 11.** Corte longitudinal de un hueso metatarsiano (*Histología Texto y atlas color con Biología Celular y Molecular. Ross et al., 2007*).

A medida que la calcificación progresa, los osteoblastos y los vasos sanguíneos invaden la zona, dando lugar a una capa calcificada sólida que se deposita sobre las trabéculas de la matriz cartilaginosa. Este cartílago se reabsorbe y queda el hueso esponjoso primario. La única porción de tejido cartilaginosa que permanece en esta estructura, es el cartílago articular de los extremos del hueso y una placa transversal que recibe el nombre de disco epifisario y que es el responsable de mantener el proceso de crecimiento.

Por tanto, es importante tener en cuenta que la elongación del hueso se produce por la síntesis de nueva matriz orgánica cartilaginosa en el disco epifisario. Los siguientes

procesos de hipertrofia, calcificación, reabsorción y osificación permiten que el cartílago sea sustituido por tejido óseo. Además, el aumento del diámetro del hueso se produce por crecimiento aposicional del tejido óseo entre las laminillas corticales y el periostio. A la vez que está teniendo lugar la adición de nuevo tejido óseo, se produce un fenómeno conocido con el nombre de remodelación. La remodelación consiste en la reabsorción de algunos sitios del hueso y la síntesis y el depósito óseo en otras localizaciones (Ross et al., 2007; Bernabé et al., 2012).

#### *1.1.4. Mineralización del tejido óseo.*

La mineralización del hueso es un proceso altamente regulado que se lleva a cabo mediante control biológico y en el que los cristales de hidroxiapatita se depositan de una manera ordenada sobre la matriz de las fibras de colágeno. Los cristales están siempre depositados de manera que su dimensión más larga se encuentra paralela al eje de la fibrilla de colágeno (Boskey, 2006). El mineral aparece por primera vez en las zonas de separación de las fibrillas de colágeno, aunque en varios estudios se ha observado que los cristales con forma de filamento son más largos que las fibras de colágeno y se extienden hacia las zonas de superposición (Arsenault, 1989). Existen dos teorías no exclusivas que explican como empieza a depositarse el mineral en el hueso. En primer lugar, se ha propuesto la existencia de fases minerales de fosfato de calcio distintas a la hidroxiapatita como precursores. Ejemplos de ellos son el fosfato de calcio amorfo (ACP) o el fosfato octacálcico (OCP). El fosfato octacálcico fue propuesto por primera vez como precursor transitorio de la apatita por Brown et al. (1962). Su estructura cristalina es muy similar a la de la hidroxiapatita, sus cristales son muy pequeños y es termodinámicamente hablando una fase metaestable que tiende a hidrolizar a la hidroxiapatita. El fosfato de calcio amorfo por su parte, es una fase muy inestable que presenta una estructura muy similar a

la de la apatita pero que el tamaño tan pequeño del cristal hace que parezca amorfo al analizarlo por difracción de rayos X (Wang & Nancollas, 2008).

La deposición mineral de fosfato de calcio es en parte un proceso físico químico, ya que la concentración local de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^-$  en la matriz debe superar el nivel umbral normal. Cuando la concentración de estos iones incrementa, tiene lugar la nucleación de los cristales. Durante la nucleación, los iones se asocian formando una configuración estable que va a contener al “núcleo crítico”, estructura sobre la que se sigue añadiendo iones durante el proceso de crecimiento (Gokhale et al., 2001). Una vez formado el cristal inicial, por nucleación secundaria tiene lugar la formación de un nuevo cristal sobre la estructura primaria. La formación en este caso ocurre de manera análoga a la ramificación del glucógeno, por lo que las ramas cristalinas que se forman proporcionan núcleos adicionales para la formación de nuevos cristales (Boskey et al., 2006). Además de este tipo de formación, en los sistemas biológicos, existen numerosos nucleadores heterogéneos que facilitan la mineralización. Por ejemplo, en el caso específico del hueso se ha demostrado que los primeros cristales se formaron en las “bandas e” a lo largo de la matriz del colágeno. Este tipo de nucleación es conocida como nucleación epitaxial (Traub et al., 1992).

El segundo de los mecanismos propuestos para el inicio de la mineralización del hueso es gracias a la deposición de unas vesículas pequeñas sobre la matriz. Estas vesículas reciben el nombre de vesículas matriciales (Ross et al., 2007), miden entre 50 y 200 nm de diámetro y son estructuras ligadas a la membrana extracelular formadas a partir de la membrana plasmática de los osteoblastos (Glimcher, 1992). Las vesículas, que se encuentran siempre adyacentes a las fibras de colágeno, contienen un núcleo formado por fosfolípidos, especialmente fosfatidilserina, un lípido con alta afinidad por el calcio, fosfato inorgánico, calcio, proteínas transportadoras del calcio, anexinas y enzimas como



la fosfatasa alcalina y las pirofosfatasas (Anderson et al., 2004). Además, se ha observado la presencia de colágeno tipo X, importante para la organización de la matriz y de las células producidas por condrocitos hipertróficos (Luckman et al., 2003). La acumulación de iones de calcio y fosfato genera que se produzca el proceso de cristalización dentro las vesículas. Una vez producidos los cristales, las vesículas se rompen y produce un aumento de la concentración local de mineral, suficiente para iniciar la mineralización (Ross et al., 2007).

A parte de estas vesículas, se han identificados una serie de proteínas no colágenas que sirven como nucleadores de cristales y como reguladoras del tamaño y forma de los cristales. Un ejemplo de ellas, son las conocidas como proteínas SIBLING, reguladoras potenciales de la mineralización (Boskey et al., 2006). Además de este tipo de proteínas, se ha observado que componentes de la matriz como los lípidos y varias fosfoproteínas también actúan como nucleadores e interactúan en el cristal del apatito con determinadas caras, estabilizando el núcleo y bloqueando el crecimiento de los cristales en determinadas direcciones (Gokhale et al., 2001).

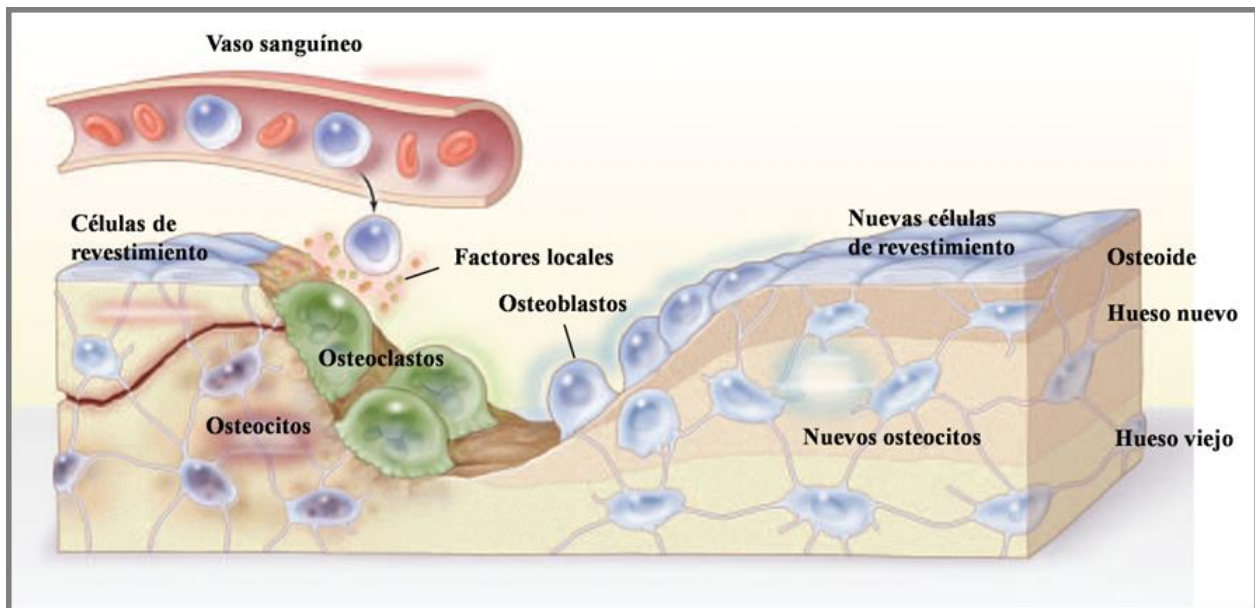
#### ***1.1.5. Remodelación del tejido óseo.***

La remodelación ósea es un proceso altamente coordinado, responsable de la reabsorción y formación de hueso, y necesario para reparar el hueso dañado y mantener la homeostasis del mineral. Se trata de un proceso complejo que necesita la actividad controlada y sincronizada de células óseas que aseguren que las fases no se produzcan al azar y ocurran en la misma ubicación anatómica (Raggat & Partridge, 2010). De este modo, mientras que las células encargadas de reabsorber el hueso viejo o dañado son los osteoclastos, la formación de hueso nuevo corre a cargo de los osteoblastos. Los osteocitos, al formar parte de la maquinaria que protege la integridad y resistencia estructural del hueso,

también juegan un papel importante en este proceso y su muerte por apoptosis ante algún tipo de deformación ósea, anuncia la presencia de daño en el tejido óseo y la necesidad de que se inicie la remodelación (Seeman & Delmas, 2006).

La remodelación ósea es un proceso controlado por hormonas y factores locales y se organiza en diferentes fases (Baron, 1993) (Figura 12). La primera fase, conocida como fase de activación, supone la conversión de la superficie ósea en reposo, a una zona de remodelación activa. Este proceso de activación, iniciado por estímulos mecánicos, microfracturas, cambios hormonales o factores locales, provoca que las células de revestimiento óseo produzcan diversas enzimas proteolíticas y eliminen el osteoide no mineralizado, favoreciendo de este modo el acceso de los osteoclastos a la matriz mineralizada (Meikle et al., 1992). Seguidamente, los osteoclastos maduros al reconocer las proteínas de la matriz, se adhieren y reabsorben la matriz ósea mineralizada formando unas lagunas, conocidas con el nombre de lagunas de reabsorción o de Howship (Teitelbaum, 2000). El medio ácido generado, junto con la ayuda de enzimas proteolíticas provoca la disolución de la matriz orgánica y el cese de la fase de reabsorción. Posteriormente, y durante la fase de inversión, las superficies de las lagunas de Howship quedan recubiertas de matriz de colágeno no digerida. Estos restos de colágeno son eliminados por células mononucleadas que además envían señales de activación osteoblástica y preparan la superficie ósea para la llegada de los precursores de los osteoblastos (Everts et al., 2002). Por último, y durante la fase de formación, las células pre-osteoblásticas comienzan a proliferar y diferenciarse hacia osteoblastos maduros. En ese momento, las células comienzan a rellenar las cavidades con componentes orgánicos de la matriz (osteoide), que se depositan en forma de láminas paralelas (hueso trabecular) o concéntricas (Sistema de Havers de hueso cortical), y posteriormente es mineralizado. Al final del proceso, varios de los osteoblastos quedan atrapados en la matriz ósea y se

transforman en osteocitos o se transforman en células de revestimiento óseo (De la Mata, 2010).



**Figura 12.** Proceso de remodelación ósea. Acoplamiento de la actividad de los osteoclastos y osteoblastos. Reabsorción y formación ósea. (Seeman. & Delmas, 2006)

Poco se conoce sobre la actividad de las células formadoras de hueso durante el proceso de formación de la cáscara de huevo (Miller, 1977) y sobre cómo evoluciona o cambia estructuralmente el hueso a lo largo del proceso de formación. Por ello, en este trabajo se han estudiado los cambios que experimentan el hueso cortical y medular a lo largo del proceso de calcificación de la cáscara de huevo.



## *Objetivos*

---

## 2. *Objetivos.*

El objetivo principal de esta tesis es el estudio de los procesos de formación de la cáscara de huevo y el hueso medular, y cómo están relacionados entre sí. Así mismo se ha estudiado como la estructura y composición de estos tejidos determina su funcionalidad. Para ello se han definido los siguientes objetivos específicos:

- 1) Estudiar la evolución de la mineralogía y cristalinidad y organización estructural del carbonato cálcico a lo largo del proceso de formación de la cáscara de huevo de gallinas ponedoras y gallinas pintadas.
- 2) Estudiar la evolución de la composición y organización del hueso medular a lo largo del ciclo diario de formación del huevo y su relación con el proceso de calcificación de la cáscara de huevo.
- 3) Determinar la importancia de la cáscara de huevo como primera barrera de defensa del huevo contra la contaminación bacteriana. En particular, determinar como la estructura, morfología y composición química de la cutícula afecta a su funcionalidad.
- 4) Determinar como la composición y organización del hueso medular contribuye a la resistencia a la fractura del hueso en gallinas ponedoras.
- 5) Determinar que técnicas analíticas son las más adecuadas para estudiar la evolución de la composición mineral, cristalinidad y organización estructural de los tejidos mineralizados y que permitan definir parámetros cuantitativos útiles para la mejorar la calidad de estos tejidos.

# *Material y Métodos*

---

### ***3. Material y Métodos.***

#### ***3.1. Material.***

##### ***3.1.1. Material empleado para el apartado: formación y estructura de la cáscara de huevo.***

Para el estudio de la estructura de la cáscara de se utilizaron gallinas ponedoras marrones (ISA Hendrix, Francia) y pintadas (Guinea Fowl) (Galor, Amboise, Francia). Las gallinas estaban en jaulas individualmente con un ciclo de 14 horas de luz: 10 horas de oscuridad. Cada jaula estaba equipada con un dispositivo electrónico que registraba de manera automática la puesta (que coincide con la ovulación). Se recogieron cáscaras de huevo a diferentes estadios de formación. En la fase inicial de la mineralización (5, 6 y 7 horas después de la ovulación) y durante la fase de crecimiento lineal (14 y 16 horas después de la ovulación). De la misma manera, cáscaras de huevo de pintada, se recogieron a diferentes etapas a lo largo del proceso de calcificación (4, 5, 7, 10, 12 y 18 horas después de la ovulación) y cuando la cáscara estaba totalmente formada. Para que los huevos fueran expulsados de la glándula de la cáscara prematuramente, se les suministró a las gallinas una inyección intravenosa de 1 mg de prostaglandina (PGF<sub>2a</sub>). Para preservar las fases amorfas de carbonato cálcico que pudieran estar presentes, las cáscaras de los huevos se enjuagaron rápidamente con agua destilada para eliminar cualquier resto de albumina, se dejaron secar durante 48 horas y se congelaron. Adicionalmente el mismo tipo de muestras se almacenaron en alcohol absoluto para preservar cualquier tipo de carbonato cálcico amorfo presente en las muestras.



### 3.1.2. Material empleado para el apartado: la cutícula de la cáscara de huevo.

Para este estudio se utilizaron muestras de huevos blancos de gallinas ponedoras Hy Line CV-22. Se recogieron huevos frescos directamente de la granja (Avícola Garrido, García, Granada) con un tiempo máximo de puesta de dos horas y se conservaron a temperatura ambiente. Para el estudio de la influencia del almacenamiento de los huevos, se recolectaron 160 huevos de gallinas de dos grupos de edad (16 y 70 semanas) que posteriormente fueron analizados a diferentes tiempos después de la puesta (2, 3, 4, 5, 6, 24, 26 y 72 horas) en grupos de 10 huevos. Por otro lado, se evaluó el efecto que tiene la edad de la gallina en la calidad de la cáscara del huevo. Para ello se recogieron huevos de gallinas de diferente edad (16, 30, 36 y 70 semanas; 20 huevos por grupo). Se analizaron 24 horas después de la puesta para garantizar la completa formación y estabilización de la cutícula.

Para evaluar la cantidad y el grado de cobertura de la cutícula de la cáscara de huevo, las muestras se tiñeron con una solución específica llamada *Cuticle Blue* (MS Technologies Ltd., Northamptonshire, UK). Este colorante tiene afinidad por las proteínas de la cutícula y tiñe de verde la superficie de la cáscara de huevo. El grado de tinción indica la cantidad de cutícula presente. Los huevos permanecieron inmersos en la solución (1%) durante 5 minutos colocados de manera que solo se tiñera la mitad de la cáscara. La cantidad de cutícula se calculó, midiendo el cambio de color que experimentaron las muestras tras la tinción ( $\Delta E_{ab}$ ), con un espectrofotómetro de color (modelo CM-700d; Konica-Minolta, Japón). Las medidas se tomaron en tres puntos localizados en la zona del ecuador de los huevos.

Adicionalmente, para evaluar la pérdida de peso a lo largo de una semana, se recolectaron huevos blancos de gallinas Hy Line (de 25 y 60 semanas de edad) y huevos marrones de

gallinas Brown Hy Line (de 25 y 60 semanas). De cada tipo y grupo de edad se usaron 20 huevos. En estos experimentos, las muestras permanecieron en el laboratorio a una temperatura de 20°C y con una humedad relativa del 41%.

Posteriormente, todas las muestras empleadas en este estudio se rompieron y se analizaron mediante espectroscopia de infrarrojos (modo ATR).

### ***3.1.3. Material empleado para el apartado: importancia de la cutícula para evitar la contaminación bacteriana por Salmonella.***

Para estudiar la efectividad de la cutícula contra la *Salmonella*, se recogieron huevos morenos recién puestos (Hy Line Plus Brown) (Avícola Garrido-García S.L, Albolote, España). Para evaluar cómo puede influir la variabilidad de las propiedades de la cutícula en el riesgo de contaminación del huevo por la bacteria, se utilizaron huevos de gallinas de diferente edad. Se seleccionaron un total de 180 huevos recién puestos de gallinas de 25, 35 y 52 semanas. Por otro lado, para estudiar el efecto del grado de madurez de la cutícula en su resistencia a la contaminación, se expusieron huevos a una suspensión de *Salmonella* a las 3, 6 y 72 horas después de la puesta, con una cutícula inmadura, madura y seca, respectivamente. Los huevos se mantuvieron durante todo el experimento a una temperatura de 20°C.

- *Preparación de muestras para el análisis microbiológico.*

#### ***Condiciones de cultivo y cepa bacteriana***

Estos estudios se llevaron a cabo con *Salmonella arizonae* en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias. La cepa de *Salmonella* se mantuvo a 4°C en medio TSA (Tryptona Soya Agar) utilizado para favorecer el crecimiento de microorganismos. Posteriormente, se realizaron cultivos de *Salmonella* en medio de

enriquecimiento TSB (Trytone Soya Broth) a 30°C durante toda la noche, que se utilizaron para inocular la solución de Ringer (solución salina) empleada para contaminar los huevos.

### ***Inoculación de los huevos***

Los huevos se sumergieron en una solución Ringer que contenía una suspensión de *Salmonella* de 6 ufc/mL. Cada subconjunto de 60 huevos utilizados para evaluar el efecto de la madurez de la cutícula, se sumergieron en la solución Ringer a las 3, 6 y 72 horas después de la puesta. El proceso de inoculación se realizó introduciendo cada uno de los huevos en bolsas estériles que contenían 20 mL de la suspensión bacteriana. Los huevos se masajearon cuidadosamente durante 3 minutos permitiendo la transferencia bacteriana a la cáscara de huevo, evitando mojar el extremo superior. A continuación, los huevos se mantuvieron a una temperatura de 20°C y se colocaron en una caja de plástico para garantizar una humedad constante durante los 21 días que duraba el experimento. Una vez transcurridas 36 ó 48 horas de la contaminación bacteriana, 30 huevos de cada conjunto se analizaron para determinar la contaminación microbiana total de la superficie de la cáscara, la penetración de *Salmonella*, así como la composición de la cutícula y las propiedades de la cáscara. Estos mismos parámetros se determinaron a los 21 días en los 30 huevos restantes de cada grupo.

Cabe destacar que, de manera paralela a los experimentos, se utilizaron muestras controles no expuestas a la suspensión de *Salmonella*, para evaluar la contaminación superficial de la cáscara y verificar la ausencia de *Salmonella* en el interior del huevo.

### ***Análisis microbiano de la superficie***

Para determinar la carga total bacteriana en superficie de cada una de las muestras, cada huevo se colocó de manera individual en bolsas estériles que contenían 10 mL de solución Ringer. Los huevos se masajearon durante 1 minuto, con cuidado de no manchar el

extremo superior no contaminado, para favorecer la transferencia de los microorganismos desde la superficie de la cáscara hacia la solución salina. Posteriormente, 100 mL de cada dilución se sembraron por triplicado en medio TSA y se incubaron a 30°C durante 48 horas. El recuento total de microorganismos se denominó en log ufc/cáscara después de aplicar el factor de corrección (x10), correspondiente al volumen total (10mL) de la que se obtuvo la suspensión bacteriana de cada huevo.

### ***Penetración de Salmonella***

Una vez realizados los recuentos microbianos en superficie, cada huevo se pulverizó con etanol al 70% y se flameó dos veces antes de romperse asépticamente (modificado de De Reu et al., 2006). Se prepararon diluciones 1:10 del contenido del huevo homogeneizado en agua de peptona tamponada (BPW) y se incubaron a 30°C durante 24 horas. Después del proceso de pre enriquecimiento, se sembró una alícuota de cada muestra en un medio selectivo para *Salmonella*, agar XLD (Xilosa, Lisina, Desoxicolato). Estas placas fueron incubadas a 30°C y tras 24-48 horas, se observó el crecimiento de colonias rosas con centros negros, que indicaban la presencia de *Salmonella* en el interior del huevo y por tanto la penetración de ésta a través de la cáscara.

Inmediatamente después de romper cada huevo, se recogió un fragmento de muestra de la cáscara, del extremo no contaminado, para su posterior análisis mediante otras técnicas (p.ej. espectroscopia infrarroja).

### ***3.1.4. Material empleado para el apartado: evolución del hueso medular de gallinas ponedoras durante el proceso de formación de la cáscara de huevo.***

Se recogieron muestras de tibia de gallinas ponedoras White Leghorn (de 66 semanas) para estudiar la formación de hueso medular. Se dividieron las muestras en cinco grupos,

como se muestra en la tabla siguiente, en función de la localización del huevo en el oviducto y que corresponden a diferentes estadios del ciclo de formación del huevo.

Grupo	Nº Gallinas	Localización en oviducto	Tiempo desde ovulación
I	4	Huevo en el magnum	4 horas
II	6	Huevo en el isthmus	5 horas
III	12	Huevo en el útero (calcificación temprana)	7-10 horas
IV	8	Huevo en el útero (calcificación media)	10-14 horas
V	1	Huevo en el útero (calcificación tardía)	14-18 horas

El hueso medular se extrajo de la cavidad medular de la tibia y se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

- *Preparación de muestras para microscopía óptica*

Las muestras seleccionadas para su observación al microscopio óptico, se fijaron durante 48 horas en tampón formalina al 10% y se descalcificaron en EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) al 10% para su posterior inclusión en parafina (Paraplast Merck). A continuación, se realizaron cortes histológicos seriados de 5  $\mu\text{m}$  de grosor y, finalmente, las secciones se tiñeron con azul de toluidina y una mezcla de rojo picosirius y fast green. Con el azul de toluidina se diferencian los mucopolisacáridos del tejido y el hueso medular, y con la tinción mezcla se observan las fibras de colágeno tipo I específicas del hueso medular.

### ***3.1.5. Material empleado para el apartado: estudio de la calidad del tejido óseo en gallinas ponedoras.***

Para este estudio, se recogieron muestras de tibia de dos líneas de gallinas ponedoras White Leghorn (de 56 semanas de edad) con alta y baja resistencia ósea. Las gallinas se criaron juntas hasta las 15 semanas de edad en un gallinero de 60 metros cuadrados, y posteriormente se transfirieron a jaulas o a sistemas aviarios. El patrón de iluminación en ambos sistemas de alojamiento fue el mismo, 14 horas luz y 10 horas oscuridad, y la temperatura fue de  $21^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Las gallinas utilizadas para el estudio fueron 24 de las alojadas en jaulas individuales, 14 pertenecientes a la línea de baja resistencia ósea y 10 a la de alta resistencia ósea, y 69 de las alojadas en sistemas aviarios, 40 de baja resistencia ósea y 29 de alta resistencia ósea. Los huesos se almacenaron en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta que se analizaron. Las propiedades biomecánicas (por ejemplo, la resistencia a la rotura) se han determinado mediante pruebas de flexión en tres puntos utilizando una máquina de ensayo (JJ Lloyd LRX 50, Reino Unido).

## ***3.2. Métodos.***

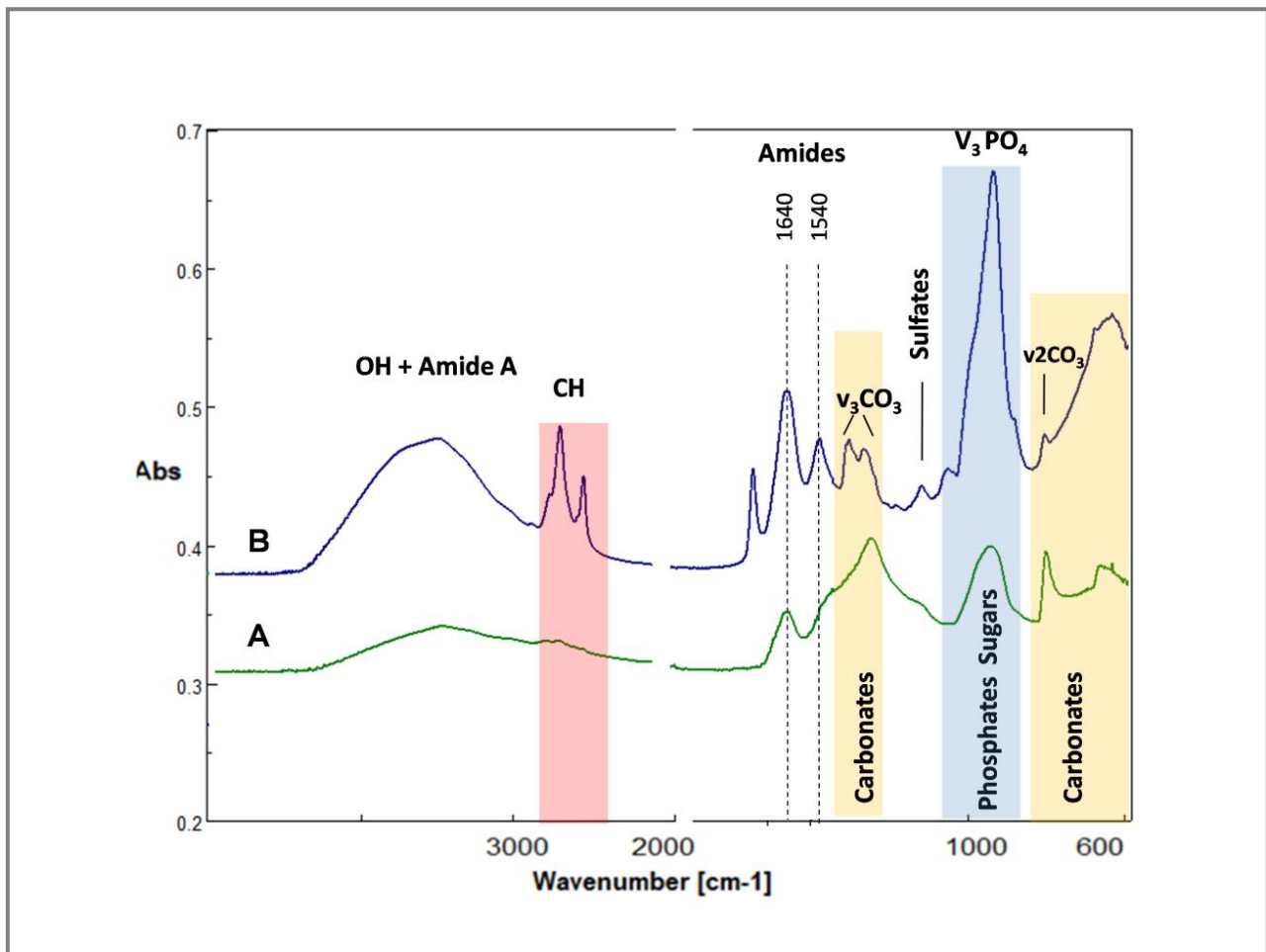
A continuación, se describirán brevemente las técnicas analíticas empleadas durante este estudio para el análisis las muestras de cáscara de huevo y tejido óseo.

### ***3.2.1. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier en modo Reflectancia Total Atenuada (ATR-FTIR).***

La espectroscopia infrarroja es una técnica basada en el estudio de la interacción entre la materia y la radiación infrarroja (Rull Perez, 1993). Dentro de la radiación infrarroja se pueden observar tres zonas distintas: IR cercano (NIR):  $12800\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ ; IR medio:  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ ; IR lejano:  $400\text{-}10\text{ cm}^{-1}$ , siendo la zona del IR medio la que más

información nos proporciona. Un espectro infrarrojo se obtiene comúnmente pasando la radiación infrarroja a través de una muestra y determinando qué fracción de la radiación incidente es absorbida en una energía determinada. La energía a la que aparece cualquier pico en un espectro de absorción corresponde a la frecuencia de una vibración de una parte de una molécula de la muestra (Stuart, 2004).

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier mejora la calidad de los espectros y minimiza el tiempo requerido para la obtención de datos. Las muestras se miden por transmisión, con una pequeña cantidad de muestra diluida en una pastilla de bromuro de potasio. También se puede medir por reflexión (modo reflexión total atenuada ATR). El método ATR está especialmente indicado para el estudio de las superficies ya que la señal tiene una penetración de unas pocas micras. Se analizaron por muestras de cáscaras de huevo por su superficie externa con un espectrómetro FTIR (Jasco Modelo 6200) equipado con un accesorio ATR de cristal de diamante (MIRacle TM). Las muestras se presionan sobre el cristal y para cada medida se registran 100 barridos, con una resolución de  $2\text{ cm}^{-1}$  en la región de  $4000$  a  $600\text{ cm}^{-1}$ . Las muestras de hueso medular, separadas manualmente con un bisturí, se homogeneizaron en un mortero de ágata y se analizaron de la misma manera. Las muestras de hueso cortical por su parte, se homogeneizaron moliéndolas con una criomoladora. La cantidad relativa de agua, lípidos, proteínas, fosfatos y carbonatos en las muestras, se determinaron del área de los picos de las bandas de absorción asociados a los grupos moleculares de cada uno de los componentes (ejm., O-H: agua; C-H: lípidos; amidas I: proteínas;  $\nu_2$ ,  $\nu_3$  CO<sub>3</sub>: carbonatos;  $\nu_1$ ,  $\nu_3$  PO<sub>4</sub>: fosfatos; Rodríguez-Navarro et al., 2006., 2013) (Figura 13). El tratamiento de los espectros se llevó a cabo con el software Jasco versión 2. Los picos superpuestos se resolvieron y sus áreas integradas se midieron utilizando un software específico de ajuste de curvas.



**Figura 13.** Espectros FTIR de cáscara de huevo (A) y hueso medular (B).

En el tejido óseo, se determinaron los siguientes parámetros composicionales para caracterizar el tejido.

- Grado de mineralización.

$$\frac{PO_4}{Amidas I} = \frac{v1, v3; 900 - 1200 \text{ cm}^{-1}}{1590 - 1710 \text{ cm}^{-1}}$$



- Cantidad de carbonatos sustituyendo a iones fosfatos (tipo B) en la estructura cristalina del apatito. Principalmente incrementa a medida que el mineral del hueso madura.

$$\frac{CO_3}{PO_4} = \frac{v2,; 850 - 890 \text{ cm}^{-1}}{v1, v3; 900 - 1200 \text{ cm}^{-1}}$$

- Cantidad total de carbonatos con respecto al contenido mineral. Decece a medida que el tejido óseo madura.

$$\frac{CO_3}{PO_4} = \frac{v3,; 1390 - 1440 \text{ cm}^{-1}}{v1, v3; 900 - 1200 \text{ cm}^{-1}}$$

- Cantidad de carbonatos relativo al hueso mineral (relacionado con la tasa de remodelación ósea).

$$\frac{CO_3}{Amidas I} = \frac{v3,; 1390 - 1440 \text{ cm}^{-1}}{1590 - 1710 \text{ cm}^{-1}}$$

- Índice de cristalinidad. Incrementa a medida que incrementa el tamaño cristalino (apatito).

$$\frac{PO_4 \text{ (alta cristalinidad)}}{PO_4 \text{ (baja cristalinidad)}} = \frac{1030 \text{ cm}^{-1}}{1020 \text{ cm}^{-1}}$$

### 3.2.2. Espectroscopia Raman.

La espectroscopia Raman es una técnica espectroscópica vibracional que permite evaluar la luz dispersada de moléculas e iones (Morris & Mandair, 2011). Durante el análisis, se hace incidir una luz monocromática que se dispersa mayoritariamente de manera elástica (dispersión *Rayleigh*) y de manera inelástica en menor proporción (dispersión *Raman*). Esto genera que se produzcan una serie de cambios en la frecuencia, característicos de la naturaleza química y del estado físico de las muestras, que va a permitir identificar los distintos compuestos presentes en la muestra (Pelletier, 1999).

La información molecular que proporciona la espectroscopia Raman es básicamente del mismo tipo que la obtenida con la espectroscopia infrarroja (Herzberg, 1991). Ambas se complementan y proporcionan información sobre las vibraciones moleculares utilizadas para análisis cualitativo y cuantitativo de muestras orgánicas y/o minerales (Olsen, 1990). En el tejido óseo, esta técnica permite la identificación precisa de una gran variedad de fases minerales. En este estudio se usó, para determinar la composición mineral del hueso medular y conocer si el carbonato encontrado en las muestras corresponde a su sustitución en el apatito ( $1070\text{ cm}^{-1}$ ), a la calcita ( $1080\text{ cm}^{-1}$ ) o a una fase amorfa ( $1085\text{ cm}^{-1}$ ). Para ello, se analizaron muestras correspondientes a cada una de las etapas de calcificación de la cáscara de huevo. Para ello utilizamos un espectrómetro Raman confocal (Jasco NRS-5100) equipado con un microscopio Olympus y un detector CCD (Andor DU 420 OE) refrigerado mediante sistema Peltier. Las muestras se analizaron con láser rojo a 780 nm. (Elforlight G4-30; Nd:YAG) con tiempos de exposición de 30 segundos y con una resolución media de  $2\text{ cm}^{-1}$  dentro del intervalo de número de onda de  $400\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ .

### ***3.2.3. Espectroscopia de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES).***

La técnica de ICP-OES surgida como un avance en la espectroscopia tradicional de emisión, es una de las herramientas analíticas más poderosas y populares utilizadas para la determinación de elementos trazas de una muestra. Esta técnica se basa en la medida de la radiación emitida por los átomos de la muestra previamente excitados o ionizados (Sánchez de Rojas et al., 1986; Hou & Jones., 2000).

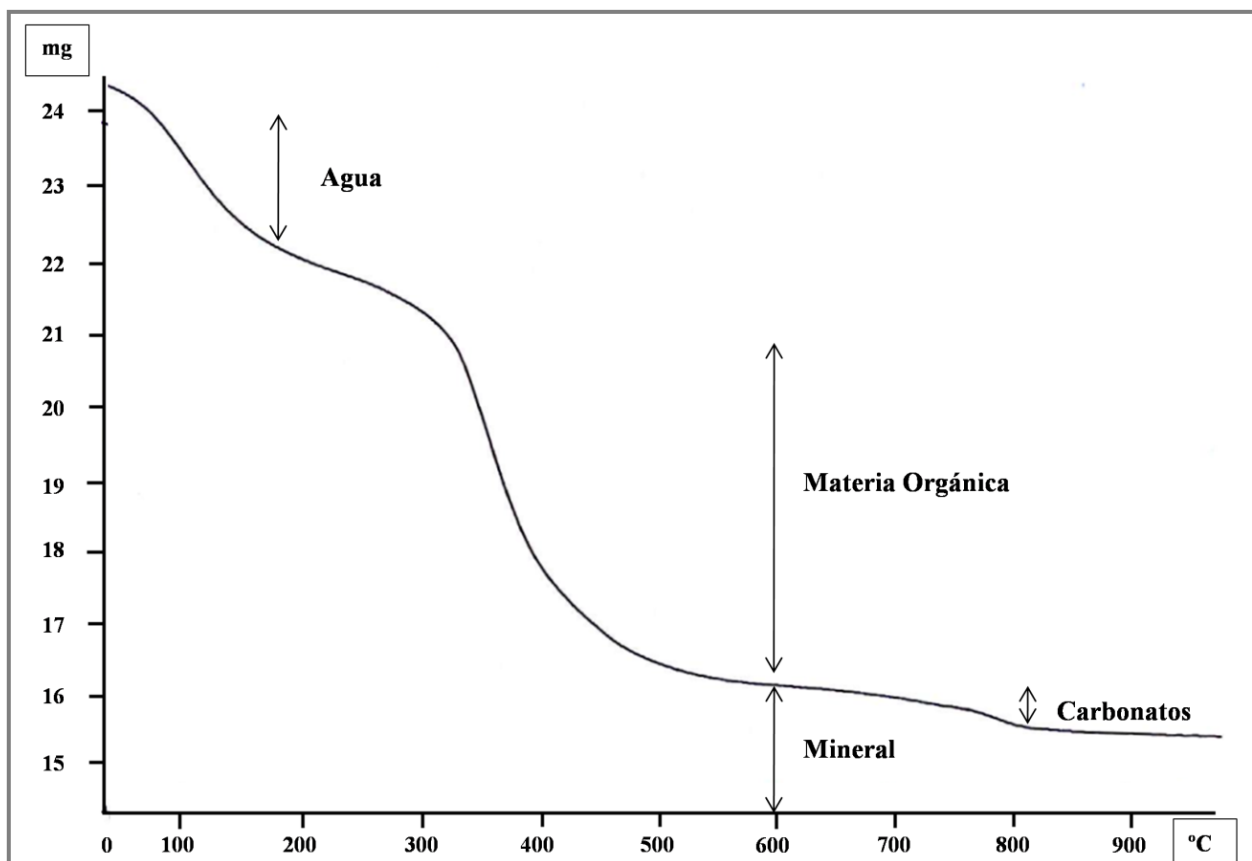
Las disoluciones de las muestras de tejido óseo se han preparado en un volumen total de 5 ml. El hueso medular de cada una de las gallinas extraído de la cavidad medular de la tibia (aproximadamente 10-50 mg) se le añadió 0.5 mL de ácido nítrico (60%), 0.5 mL de peróxido de hidrógeno (30%) y 4 mL de agua destilada. Las muestras se dejaron reposar durante 12 horas y se filtraron antes del análisis.

Las muestras de tejido óseo se analizaron en un espectrómetro ICP-OES Perkin Elmer Óptima modelo 8300 y los elementos analizados fueron calcio, magnesio, sodio y fósforo con objeto de determinar la relación Ca/P y el grado de sustitución iónica en el mineral del hueso.

### ***3.2.4. Análisis Termogravimétrico (TGA).***

El análisis termogravimétrico mide la variación en el peso de un material (pérdidas o ganancias) al ser sometido a un calentamiento en una atmósfera controlada, variación que es debida a la descomposición del material como consecuencia del desprendimiento de compuestos gaseosos. El gráfico de la pérdida de masa en función de la temperatura se conoce con el nombre de termograma o curva de descomposición térmica. En ella, el eje de ordenadas representa la variación de la masa del material y el de abscisa refleja el incremento de la temperatura (Matteini & Moles, 2001).

En este estudio, las muestras de tejido óseo molidas se analizaron en un equipo termogravimétrico Mettler-Toledo, modelo TGA/DSC1. Es un equipo dotado de un horno de diseño horizontal, que mide las variaciones de flujo de calor, y una balanza termostática con una precisión de 0.1  $\mu\text{g}$ . El software que controla el equipo y evalúa los resultados es el programa STARe versión 15.01 de METTLER TOLEDO STAR<sup>e</sup>system. Al someter las muestras de hueso al análisis termogravimétrico, las curvas de descomposición térmica muestran un número característico de escalones, que corresponden a la pérdida de peso de diferentes componentes del hueso en función del rango de temperatura. De 0 a 200°C, la pérdida de peso corresponde al agua, de 200 a 600°C a materia orgánica, principalmente al colágeno, y de 600 a 900°C al CO<sub>2</sub> de la composición del carbonato (ver figura 14).



**Figura 14.** Análisis composicional del hueso obtenido por termogravimetría

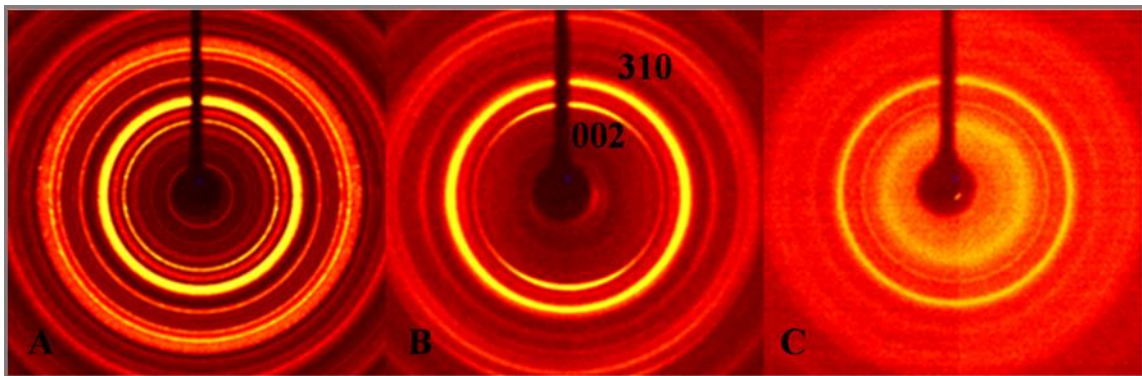
Los resultados obtenidos correspondientes al contenido en carbonatos del hueso y al contenido mineral, se compararon con las variables homólogas obtenidas por FTIR (contenidos en carbonatos y grado de mineralización).

### ***3.2.5. Difracción de Rayos X (DRX).***

El método de difracción de rayos X se utilizó para detectar fases minerales cristalinas, para su identificación y caracterización.

Para determinar la composición mineralógica de las muestras y sus propiedades microestructurales, tamaño de los cristales, y textura cristalográfica, las muestras se analizaron utilizando un difractómetro de cristal único, Bruker D8 Smart Apex o Venture Photon, equipado con un detector de área CCD usando radiación de molibdeno y un colimador de 0.5 mm de diámetro. Muestras de hueso cortical y de cáscara de huevo, de aproximadamente 1x1cm, se montaron en un soporte de manera que sus superficies externas quedaran enfrentadas al detector y las internas enfrentadas al haz de rayos X incidente. El haz de rayos pasa a través de la muestra y se genera un patrón de difracción constituido por una serie de anillos concéntricos que reciben el nombre de anillos de Debye-Scherrer (Figura 15). Cada punto dentro del anillo corresponde a un reflejo hkl de un cristal cuyos planos hkl están orientados en condiciones de difracción. El número de cristales que integran el patrón de difracción va a depender del diámetro del haz de rayos X, el tamaño de los cristales y el espesor de la muestra (Cullity, 1977). De este modo, un gran número de reflexiones de baja intensidad indica que el tamaño del cristal es muy pequeño, mientras que un pequeño número de reflexiones de alta intensidad indica que el tamaño del cristal es grande, estimándose de este modo el tamaño de los cristales a partir de la intensidad de los puntos de reflexión en los anillos de Debye Scherrer (Rodríguez-Navarro, 2006). Para analizar los patrones de difracción 2D obtenidos, se utilizó el

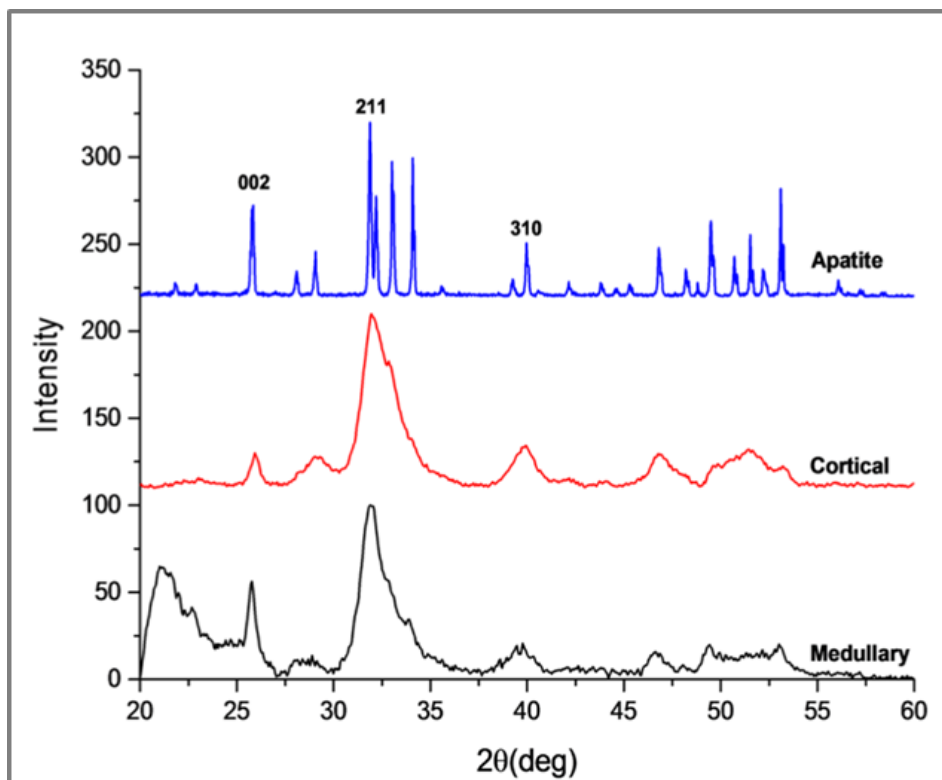
software XRD2DScan que mide automáticamente la intensidad de los puntos de reflexión, así como el número de puntos de reflexión en los anillos y su amplitud. Para las muestras de tejido óseo (hueso cortical y medular) estos parámetros se determinaron utilizando tres anillos diferentes, asociados con las reflexiones principales del apatito (002), (211) y (310). El grado de alineación del eje c de los cristales, se determinó a partir del ancho angular de las bandas que aparecen en el perfil de intensidad a lo largo del anillo de Debye-Scherrer asociado con la reflexión 002 del apatito. Cuanto más ancha es la banda, mayor es la dispersión en la distribución del eje c de los cristales de apatito y menor es el grado de alineación. La cristalinidad del hueso mineral, se determinó midiendo el ancho a la mitad del máximo (FWHM) de los picos principales del apatito (002, 211 y 310) en un barrido 1D según el ángulo  $2\theta$ .



**Figura 15.** Patrones de difracción 2D con anillos de Debye-Scherrer. A: Apatito geológico; B: Hueso cortical; C: Hueso medular.

En el caso de las muestras de cáscara de huevo, los parámetros anteriormente nombrados, se calcularon utilizando seis anillos diferentes, asociados con las reflexiones de la calcita: 104, 006, 110, 113, 108 y 116.

Adicionalmente, tanto las muestras de tejido óseo (molidas) como las de cáscara de huevo se analizaron con el difractómetro de polvo, Panalytical Expert Pro en modo de reflexión usando radiación de cobre (40 KV y 35 mA), un tamaño de paso de 0.03 grados y un rango de ángulo  $2\theta$  de los 20 a los 60 (Figura 16). Con el fin de determinar la presencia de carbonato de calcio amorfo, muestras seleccionadas se calentaron en un horno durante 30 minutos a 350°C y/o 550°C para inducir su cristalización.



**Figura 16.** Patrones de difracción 1D de una muestra de hueso medular, hueso cortical y apatito geológico.

### 3.2.6. Microscopía óptica.

Para el análisis de la microestructura de la cáscara de huevo, se prepararon secciones finas pulidas, de cortes transversales, de aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  de espesor. La orientación

de los cristales de las muestras se determinó ópticamente a partir de microfotografías tomadas mediante microscopía óptica de luz polarizada (Nikon SZ1000).

Por otro lado, para estudiar la evolución del tejido óseo a lo largo del periodo de formación de la cáscara de huevo, se seleccionaron una serie de secciones histológicas teñidas con rojo picrosirius y fast Green y se observaron al microscopio óptico de fluorescencia Leica DMRB. Las imágenes se analizaron con el programa de análisis de imágenes ImageJ.

### ***3.2.7. Microscopía electrónica.***

El análisis mediante microscopía electrónica nos permite estudiar la ultraestructura y la morfología de las muestras estudiadas desde la escala milimétrica a la nanométrica.

En la ***microscopía electrónica de barrido (SEM)***, un haz de electrones, generado por un filamento incandescente, pasa a través de una serie de lentes electromagnéticas, y antes de alcanzar las últimas, un sistema deflector del haz permite que estas barran la superficie de la muestra. Cuando el haz de electrones alcanza la superficie de la muestra, algunos electrones se reflejan como electrones retrodispersados (BSE), otros liberan electrones secundarios (SE) de baja energía y otros producen rayos X característicos de los elementos presentes en la muestra. Una vez barrida la muestra, diversos detectores amplifican la señal emitida por la superficie y se genera una imagen que es visualizada en un monitor. La imagen final presenta diversidad de contrastes que van a variar en función de la composición de la muestra, y su topografía.

Para estudiar la evolución de la microestructura de la cáscara de huevo a lo largo del proceso de formación, cáscaras de huevo en diferentes etapas de formación, intactas o pulidas, se cubrieron con carbón (Hitachi UHS, Hitachi, Tokio, Japón) y se analizaron con un microscopio electrónico de barrido de alta resolución (SEM, Auriga, Zeiss,



Alemania) en modo SE (secundario) y BSE (detector de los electrones retrodispersados). El mismo sistema se utilizó para determinar la composición elemental de las muestras a través del análisis de dispersión de energía de rayos X (EDX) y microestructura mediante mapas de difracción de electrones retrodispersados (EBSD). Este último análisis nos arroja un mapa en el que además de observarse la microestructura de la cáscara de huevo, se aprecia un gradiente de colores que representa la orientación de los cristales.

Adicionalmente muestras seleccionadas de cáscara de huevo y tejido óseo se analizaron en un microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM), FEI, modelo 400 y en el microscopio electrónico de barrido de presión variable (VPSEM), LEO, modelo 1430-VP. Las imágenes obtenidas en ambos casos, dan información complementaria sobre la estructura morfológica y distribución de fases minerales de las muestras estudiadas.

Para el examen mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), muestras seleccionadas de tejido óseo y cáscara de huevo ( $1\text{mm}^2$ ) se fijaron en glutaraldehído al 2.5% y tampón cacodilato (0.1M, pH7.4). Las muestras de cáscara se descalcificaron utilizando una solución EDTA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, 40 g / L, pH 8) durante un periodo de 15 días. Una vez descalcificadas, se postfijaron en tetróxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) al 1,5%, y se deshidrataron utilizando un gradiente de etanol (50, 70, 90 y 100%). Las muestras se incluyeron en resina Epón-812 y se obtuvieron secciones ultrafinas (70 nm) que se contrastaron con acetato de uranilo al 2% y con citrato de plomo. Las secciones obtenidas se visualizaron en un microscopio electrónico LIBRA 120 Plus de Carl ZeissSMT dotado de una serie de detectores que permiten realizar microanálisis por espectroscopia de pérdida de energía de electrones (EELS) y por espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDX). Estos análisis de microscopía nos han permitido conocer, además de la estructura interna de las cáscaras de huevo y del tejido óseo, la localización y distribución de calcio a lo largo de las secciones de tejido óseo.

### *3.3. Análisis estadísticos y programas utilizados para el tratamiento de los datos.*

Para analizar las propiedades determinadas de las muestras de cáscara de huevo y tejido óseo, se han utilizado estadísticas descriptivas básicas. La comparación de dichas propiedades entre los diferentes grupos de muestras se ha llevado a cabo utilizando una ANOVA unidireccional. El análisis de la correlación de Pearson y los modelos de regresión lineal, por su parte, se utilizaron para estudiar las relaciones entre las diferentes propiedades medidas. Para todos los análisis estadísticos se ha empleado el paquete informático SPSS 24.0 (IBM, Nueva York, USA) y el programa Origin Pro (OriginLab Corporation).

El tratamiento de datos y espectros obtenidos en esta tesis se realizó empleando los siguientes programas: Spectra Manager\_Spectra Analysis 2.0 (Jasco Corporation), XPowder 12, XRD2DScan 4.1.1, ImageJ 1.51 (RBS) y Origin Pro (OriginLab Corporation).

## *Resultados y Discusión*

---

## ***4. Resultados y discusión.***

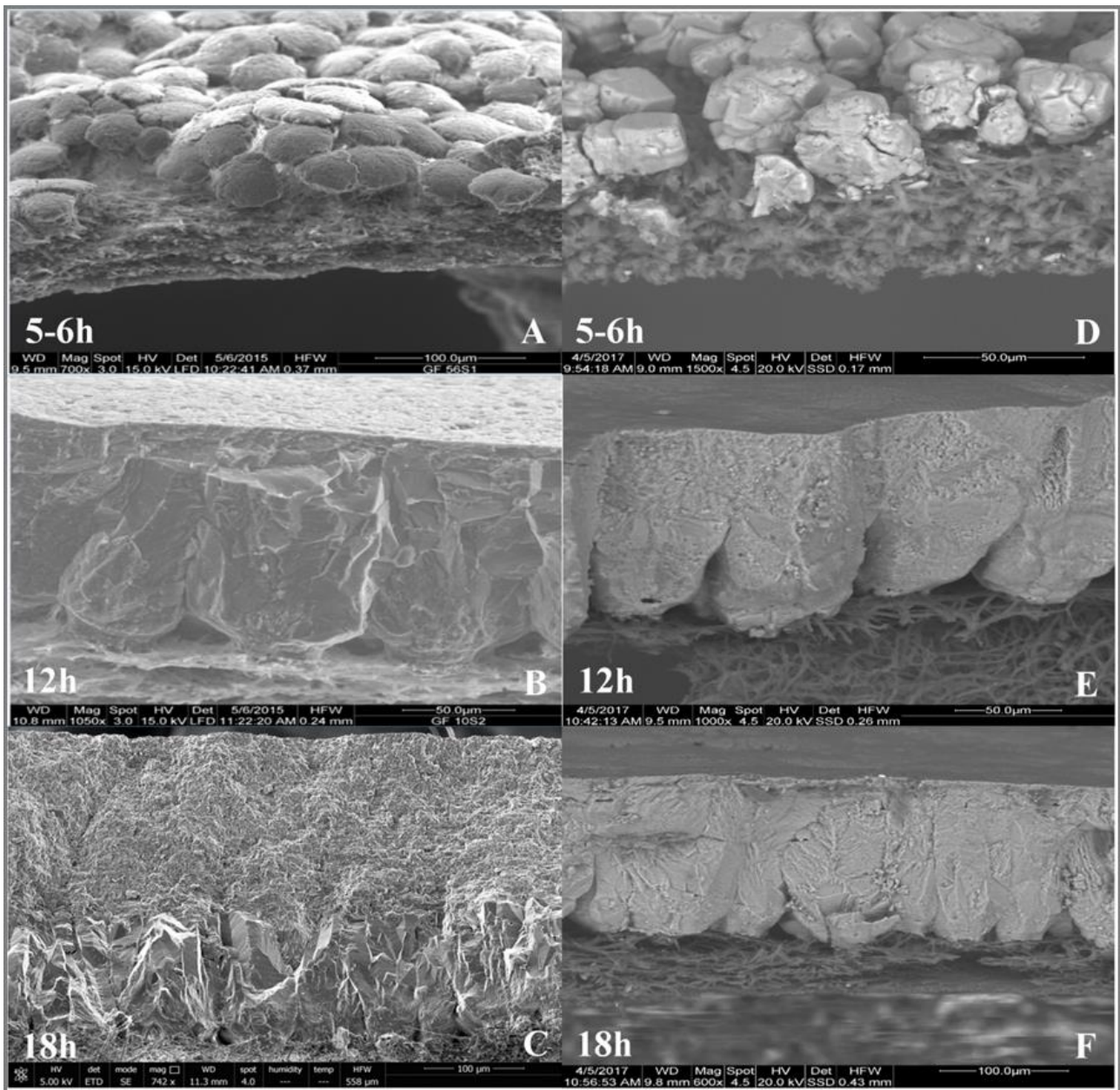
### ***4.1. Formación y estructura de la cáscara de huevo.***

En este trabajo se ha estudiado la evolución de la mineralogía y la cristalinidad del carbonato cálcico a lo largo del proceso de formación de la cáscara de huevo de gallinas ponedoras, y de gallinas pintadas, utilizando técnicas analíticas, como la espectroscopia infrarroja y la difracción de rayos X, capaces de detectar y caracterizar las fases amorfa y cristalinas del carbonato de calcio. Adicionalmente, estudios mediante microscopía electrónica de barrido (SEM y EBSD), nos han permitido observar la evolución de la microestructura a lo largo del proceso de formación.

#### ***Microscopía electrónica de barrido***

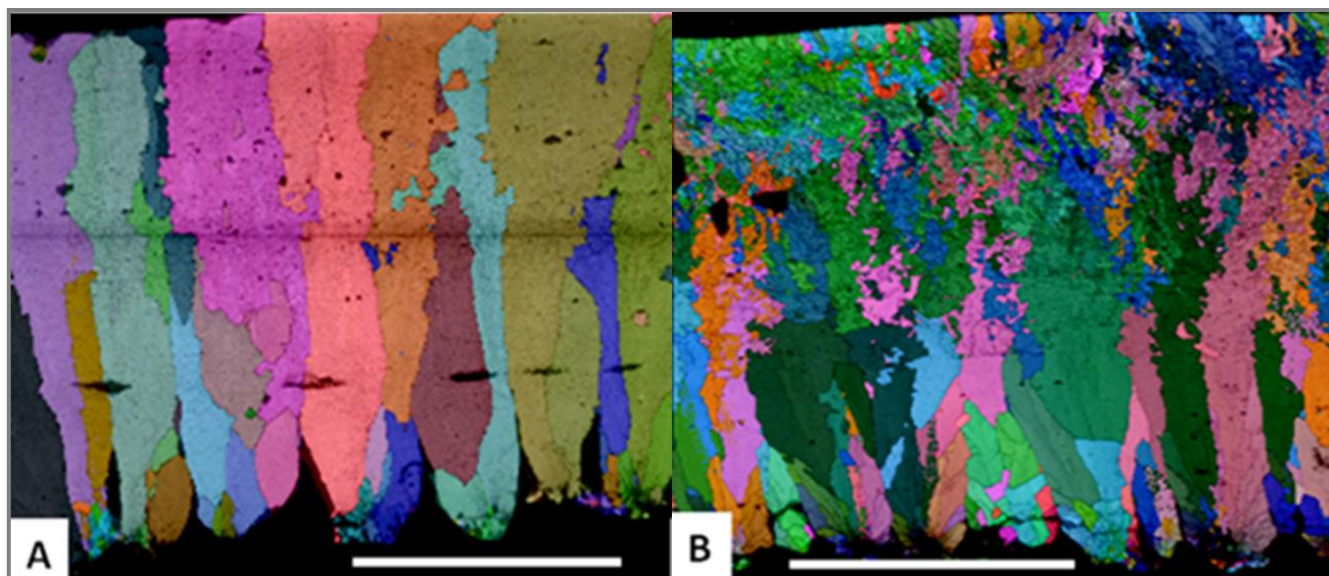
Para estudiar el proceso de mineralización de la cáscara de huevo, se analizaron muestras de gallinas pintadas (Guinea Fowl) y gallinas ponedoras (ISA-Brown) en diferentes estadios de formación y se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) (Figura 17). En las primeras etapas de formación (5-6 horas post ovulación), tanto las muestras de Guinea Fowl (17A) como las de gallinas ponedoras (17D), están totalmente cubiertas por estructuras esféricas formadas por la agregación masiva de nanopartículas de carbonato cálcico que posteriormente (5-6 horas post-ovulación) desarrollan caras cristalinas romboédricas bien definidas. Estos esferulitos se distribuyen de manera pseudoperiódica por toda la superficie de la membrana externa y se generan alrededor de los núcleos mamilares que son unas estructuras ricas en materia orgánica. Estos agregados de calcita, constituyen el primer escalón en el proceso de formación de los cristales que constituyen la cáscara de huevo. A medida que la mineralización de la cáscara avanza (a

las 12 horas post ovulación), los cristales de calcita irradian de los núcleos mamilares y continúan creciendo verticalmente de manera organizada hasta dar lugar a los cristales columnares que constituyen la capa empalizada de la cáscara de huevo (figura 17B y E). En esta fase de desarrollo, los cristales columnares formados en las cáscaras de las gallinas ponedoras (figura 17E) son individuales y presentan unos bordes bien definidos que separan a las unidades columnares adyacentes. En Guinea Fowl (figura 17B), los bordes de los cristales columnares, en principio, son iguales que los de las gallinas ponedoras, pero a medida que crece la cáscara (> 10 horas post-ovulación), los bordes entre cristales no parecen tan nítidos y las unidades cristalinas disminuyen en tamaño haciéndose los bordes más difusos y mezclándose. A las 18 horas post ovulación, una vez formada la cáscara de huevo casi en su totalidad, la capa empalizada de las gallinas ponedoras queda formada por cristales columnares de calcita de gran tamaño, distribuidos de manera organizada a lo largo de la superficie (figura 17F). La capa empalizada de las Guinea Fowl por su parte (figura 17C), queda formada por una zona inferior, compuesta por cristales columnares de gran tamaño que tienen bordes rectos y definidos, similares a los de las gallinas ponedoras, y por una zona superior, compuesta de cristales de calcita de tamaño muy pequeño (unas pocas micras).



**Figura 17.** Imágenes SEM de muestras de cáscaras de huevo recogidas durante las distintas etapas de mineralización. Muestras de gallinas pintadas Guinea Fowl (A-C) y de gallinas ponedoras ISA Brown (D-F).

Estudios adicionales realizados mediante la técnica de difracción de electrones retrodispersados (EBSD), apoyan los resultados obtenidos mediante microscopía electrónica de barrido. En la figura 18, se muestran mapas de EBSD en falso color de secciones de cáscara de huevo de gallinas ponedoras (figura 18A) y de Guinea Fowl (figura 18B). La escala de color que se observa en las imágenes está relacionada con la orientación del cristal, por lo que el mismo color significa la misma orientación del cristal y una variación en el gradiente de color significa un cambio gradual en su orientación. La cáscara de las gallinas ponedoras (figura 18A), se caracteriza por una capa empalizada compuesta por cristales columnares individuales con cristales de calcita con orientación homogénea (figura 18A). Las cáscaras de Guinea Fowl (figura 18B), sin embargo, presentan en la base de los núcleos mamilares una gran variación de color, por lo que los cristales de esa zona están orientados al azar. Posteriormente se observa una zona de cristales columnares con una orientación homogénea (con el eje *c* perpendicular a la superficie), que en algún momento cambia para dar paso a zona constituida por microcristales con una orientación al azar. Estos cristales, en principio, crecen epitaxialmente sobre los cristales columnares (se conserva la orientación de los cristales de capas inferiores), pero posteriormente los cristales se van desorganizando (se va perdiendo la orientación; se interrumpe la epitaxia) y finalmente los cristales se distribuyen con una orientación aleatoria.

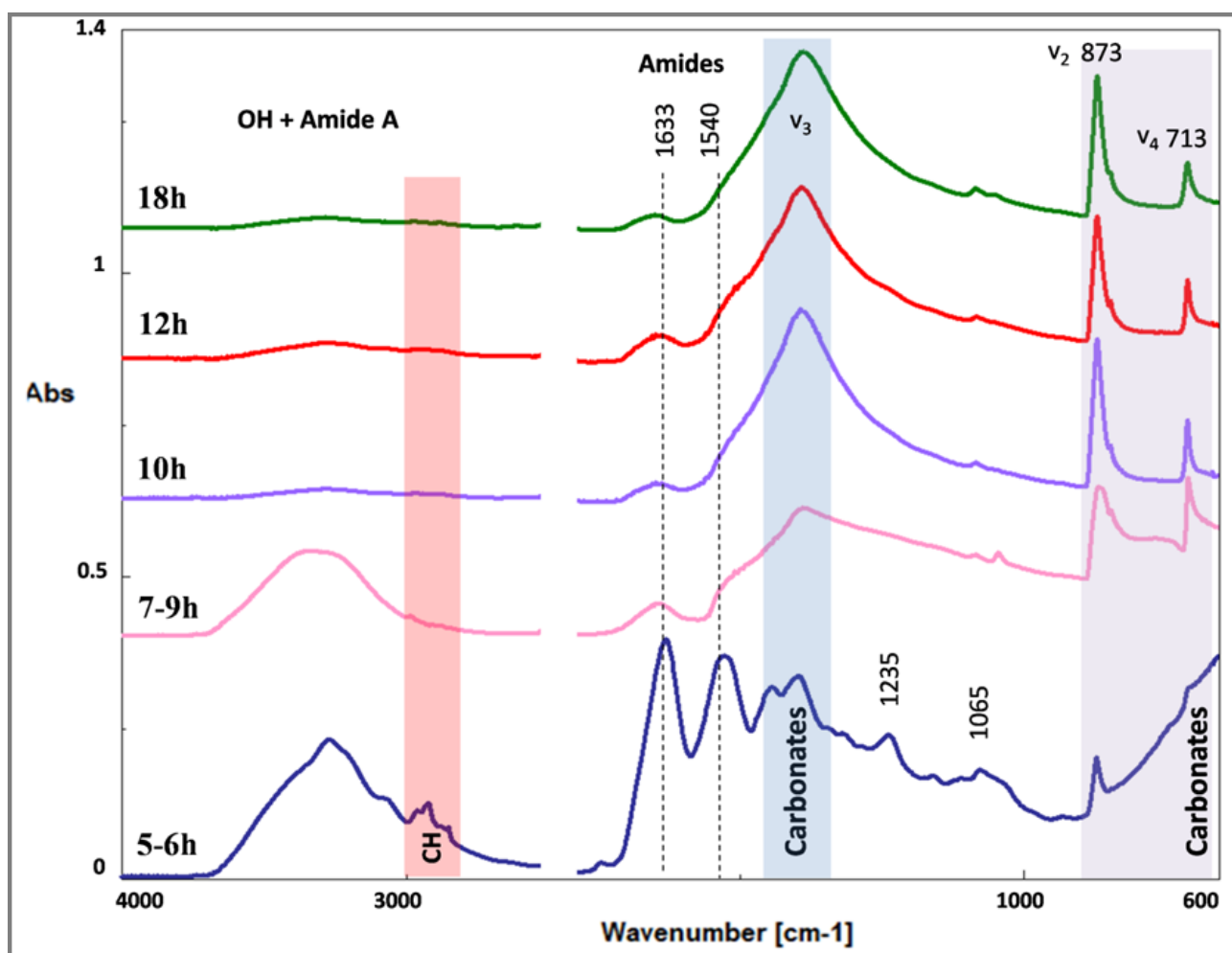


**Figura 18.** Mapas EBSD de cáscaras de huevo completamente formadas. A) Cáscara de huevo de gallina ponedora, caracterizada por el crecimiento de columnas de calcita bien definidas. B) Cáscara de Guinea Fowl, en la que se observa la doble estructura de la capa empalizada.

### *Espectroscopia infrarroja*

El análisis de la superficie externa de la cáscara de huevo por ATR-FTIR permite seguir el proceso de calcificación de la cáscara. En la figura 19 se muestra una serie de espectros FTIR representativos de cáscaras de huevo recolectados en diferentes etapas de su formación. Durante las primeras etapas de mineralización (5-6h p.o.), los espectros se caracterizan por presentar picos asociados con los grupos OH y las amidas A (3700 a 2500  $\text{cm}^{-1}$ ) de agua y proteínas, además de dos picos asociados con las amidas I (1633  $\text{cm}^{-1}$ ) y las amidas II (1540  $\text{cm}^{-1}$ ) de las proteínas. Localizadas alrededor de 2918  $\text{cm}^{-1}$ , 1235  $\text{cm}^{-1}$  y 1065  $\text{cm}^{-1}$ , se observan tres bandas de menor intensidad que están asociadas a los grupos C-H de los lípidos, a los sulfatos y a los polisacáridos, respectivamente.

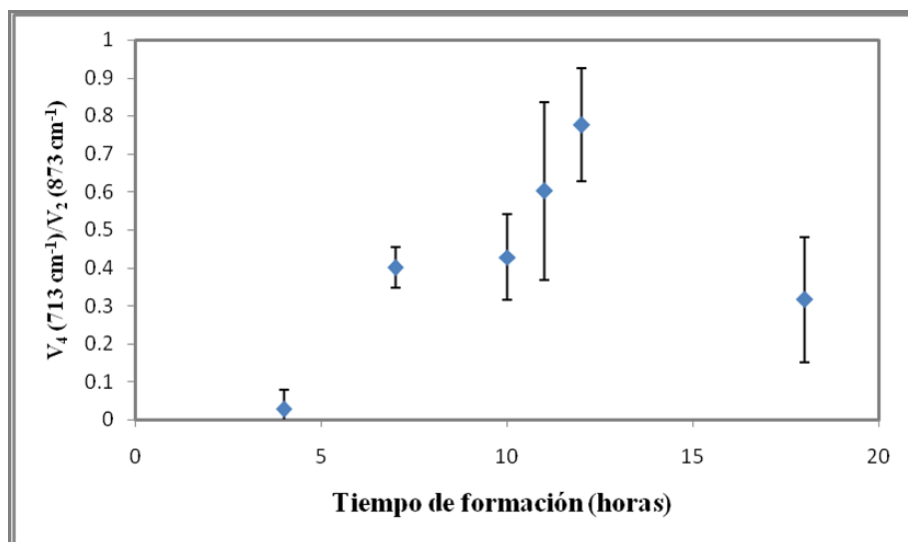




**Figura 19.** Espectros ATR-FTIR de la superficie externa de cáscaras de huevo recolectadas en etapas distintas del proceso de mineralización.

El grado de calcificación de la cáscara durante esta etapa es muy bajo, por lo que principalmente lo que detectamos son los componentes de la membrana externa. Estos picos, en su mayoría son de proteínas que componen las fibras de la membrana y de sulfatos y polisacáridos de los núcleos mamilares (Kodali et al., 2011). Picos que disminuyen o desaparecen a medida que se produce la calcificación de la membrana con carbonato cálcico. Con respecto a los carbonatos, además del pico principal localizado a  $1397\text{ cm}^{-1}$ , que va aumentando durante el proceso de mineralización, se observan dos picos

más débiles, pero bien definidos, a  $873\text{ cm}^{-1}$  (modo vibracional  $\nu_2$ ) y  $713\text{ cm}^{-1}$  (modo vibracional  $\nu_4$ ). En las etapas tempranas de calcificación, el pico de  $713\text{ cm}^{-1}$  (característico de  $\text{CaCO}_3$  cristalino) está ausente o presenta poca intensidad en comparación con el de  $873\text{ cm}^{-1}$ . A medida que el proceso de formación va avanzando y tiene lugar el comienzo de la cristalización de la calcita, el pico aparece y aumenta en intensidad. El pico localizado a  $873\text{ cm}^{-1}$  por su parte, está presente tanto en las fases tempranas de formación, como en las fases más avanzadas, aparece tanto en carbonato cristalino como en carbonato amorfo. Para ver como evoluciona la cristalinidad del carbonato de calcio a lo largo del periodo de formación de la cáscara de huevo, se ha calculado la relación entre los picos de carbonato (Figura 20). Durante las primeras etapas de formación, el grado de cristalinidad de las muestras es muy bajo ( $>0.03$ ), sin embargo, a medida que va pasando el tiempo aumenta hasta alcanzar valores típicos de la calcita cristalina. Esto quiere decir, por lo tanto, que en las etapas iniciales de la formación de la cáscara de huevo, la mayor parte del carbonato cálcico está en forma amorfa, fase que se va reemplazando por carbonato cálcico cristalino en forma de calcita a medida que avanza el proceso de mineralización. Estos resultados concuerdan con los análisis realizados por difracción de rayos X. Es de interés resaltar que la proporción de carbonato cálcico amorfo (ACC) ( $\nu_4/\nu_2 + \nu_4$ ) vuelve a aumentar a las 18 horas post-ovulación cuando la microestructura de la cáscara se hace más desordenada.

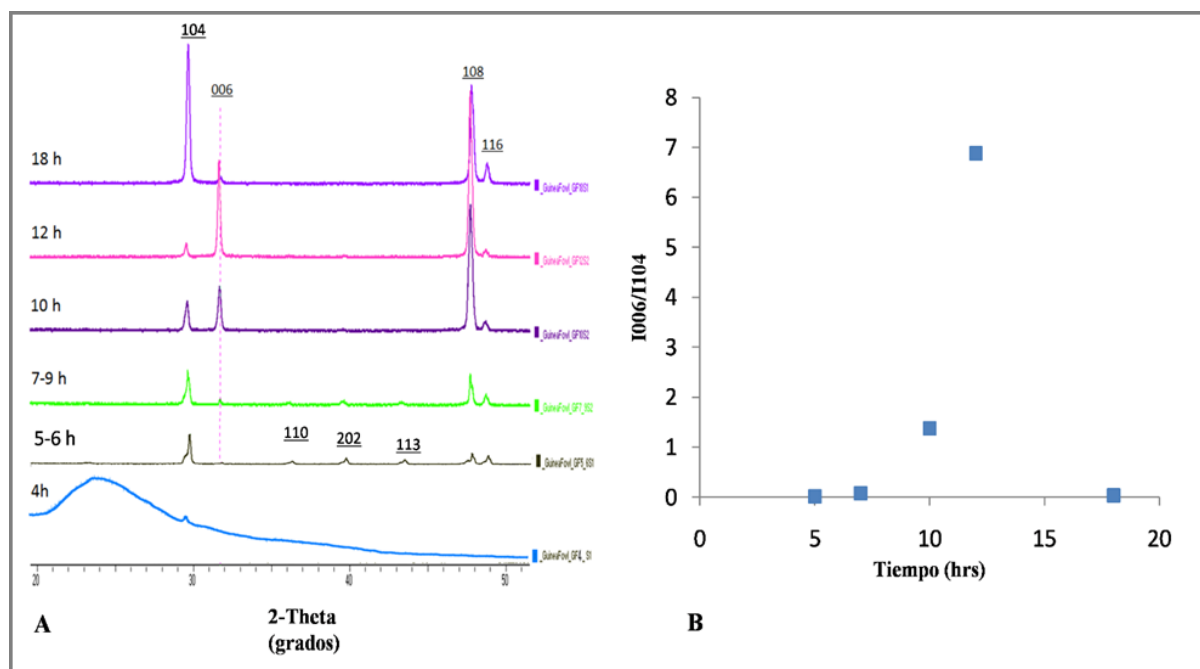


**Figura 20.** Evolución de la proporción entre carbonato cristalino y total ( $V_4 (713 \text{ cm}^{-1})/V_2 (873 \text{ cm}^{-1})$ ) a lo largo del proceso de formación de la cáscara, calculado a partir de los valores obtenidos por ATR-FTIR, y en el que el pico  $V_4 (713 \text{ cm}^{-1})$  está presente solo en  $\text{CaCO}_3$  (cristalino), y el pico  $V_2 (873 \text{ cm}^{-1})$  está presente tanto en la  $\text{CaCO}_3$  cristalino (calcita) como en el carbonato cálcico amorfo (ACC).

### **Difracción de rayos X**

El estudio mediante difracción de rayos X, nos ha permitido seguir la evolución de la mineralogía y cristalinidad de la parte mineral de la cáscara de huevo (1D-DRX) así como su organización microestructural (2D-DRX). A las 4 horas post-ovulación, cuando existe un leve grado de mineralización, los patrones 1D (Figura 21A) de las muestras de cáscaras, revelan la presencia de dos bandas anchas que pueden ser atribuidas a la presencia de fases no cristalinas (carbonato cálcico amorfo y/o materia orgánica). Entre las 5 y 9 horas, y a medida que el mineral va cubriendo la superficie de la membrana de la cáscara, aparecen los picos típicos de la calcita (104, 006, 110, 202, 113, 108 y 116). A medida que los cristales adoptan una orientación preferencial con sus ejes c

perpendiculares a la superficie y con los planos basales (001) paralelos a la superficie se refuerza la reflexión 006, asociada estos planos. Al comienzo del proceso de mineralización, la reflexión más intensa de la calcita es la 104 y el patrón es similar a la de una muestra en polvo de calcita. Los cristales en esta etapa adoptan una orientación aleatoria y crecen en tamaño (aumenta su cristalinidad) a medida que evoluciona el proceso. A las 10 horas, la reflexión 006 es la predominante, por lo que, en esta etapa de formación, los cristales desarrollan rápidamente una fuerte orientación preferencial con los ejes c perpendiculares a la superficie (Figura 21B). En la etapa final de formación, la distribución de los cristales vuelve a cambiar y los cristales vuelven a orientarse de manera desordenada (pico más intenso 104). A largo de todo el proceso de mineralización de la cáscara del huevo, la calcita fue la única forma cristalina de carbonato de calcio detectada con DRX. Esto indica que el carbonato amorfo se transforma directamente en calcita sin la existencia de ninguna fase intermedia.

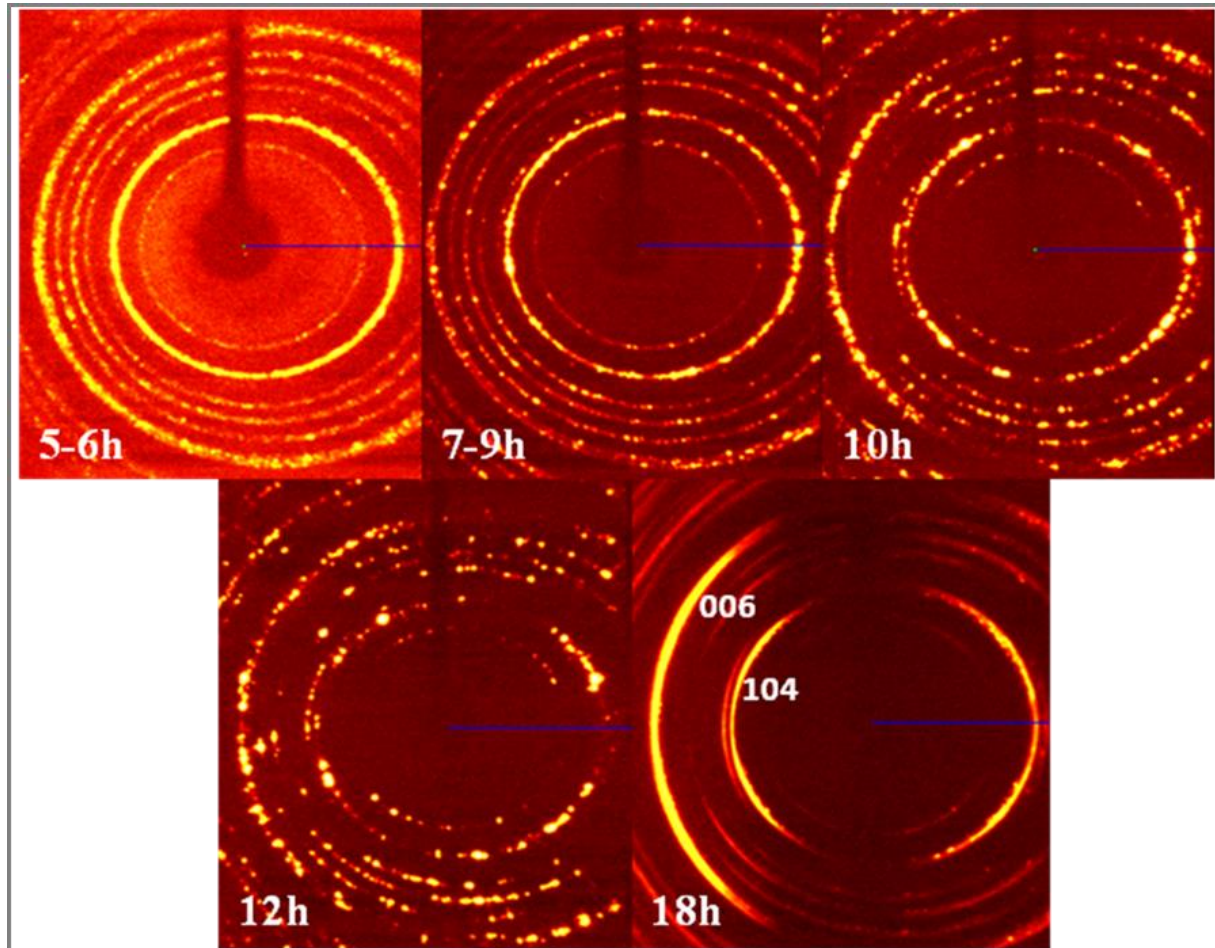


**Figura 21.** A) Evolución de patrones de difracción 1D en Guinea Fowl, en el que se observa como varía la intensidad de los picos de calcita al variar la organización del mineral durante

*su proceso de formación. B) Gráfica de la relación I006/I104 en la que se observa la evolución de los cristales y su organización a lo largo del ciclo de formación de la cáscara de huevo.*

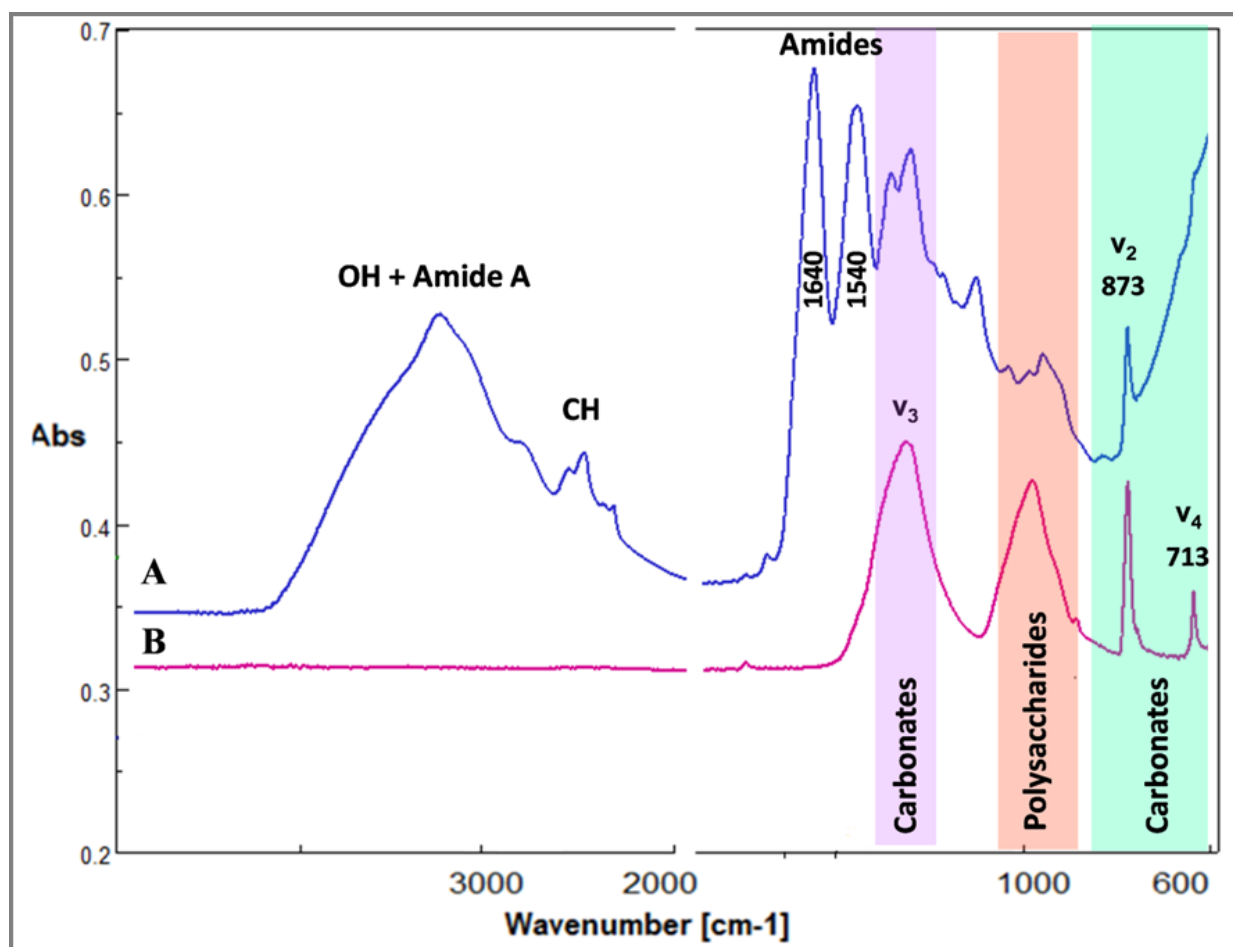
En resumen y de acuerdo con lo descrito anteriormente en el apartado de microscopía electrónica, los patrones de difracción muestran que los cristales de calcita orientados inicialmente de manera aleatoria desarrollan rápidamente una orientación preferencial con el eje c perpendicular a la superficie (cristales columnares de la capa empalizada). Posteriormente, y tras un cambio microestructural, a las 12 horas post-ovulación la fuerte orientación preferencial se pierde y los cristales se vuelven a orientar de manera aleatoria (18 horas post-ovulación). Adicionalmente, los patrones de difracción 2D (Figura 22), nos han permitido seguir la evolución del tamaño de los cristales de calcita a lo largo del proceso de mineralización además de conocer su orientación en las diferentes etapas. En muestras recogidas a las 5-6 horas, los patrones muestran anillos continuos en ángulos correspondientes a las reflexiones principales de calcita. Estos anillos son producidos por cristales de calcita nanométricos/micrométricos resultantes de la transformación de partículas amorfas de carbonato cálcico en calcita microcristalina. A medida que avanza el tiempo (a las 7-9 horas), el anillo continuo va desapareciendo y en su lugar se observan puntos pequeños de reflexión aislados. Esta transformación es debida a la disolución de cristales de calcita más pequeños y a la aparición o el crecimiento de microcristales. En etapas posteriores y hasta las 12 horas post-ovulación, los puntos de reflexión aumenta en tamaño e intensidad, reflejando el crecimiento progresivo de los cristales columnares de calcita. Seguidamente (a las 18 horas post-ovulación), el patrón de difracción cambia apareciendo de nuevo los anillos continuos que indica que los cristales disminuyen abruptamente su tamaño y adoptan una orientación aleatoria. En la mayoría de las etapas, las reflexiones obtenidas en cada patrón, se distribuyen de manera homogénea a lo largo

de los anillos de difracción, aunque se observa una concentración de las reflexiones (006 y 104) de acuerdo con una orientación preferencial definida.



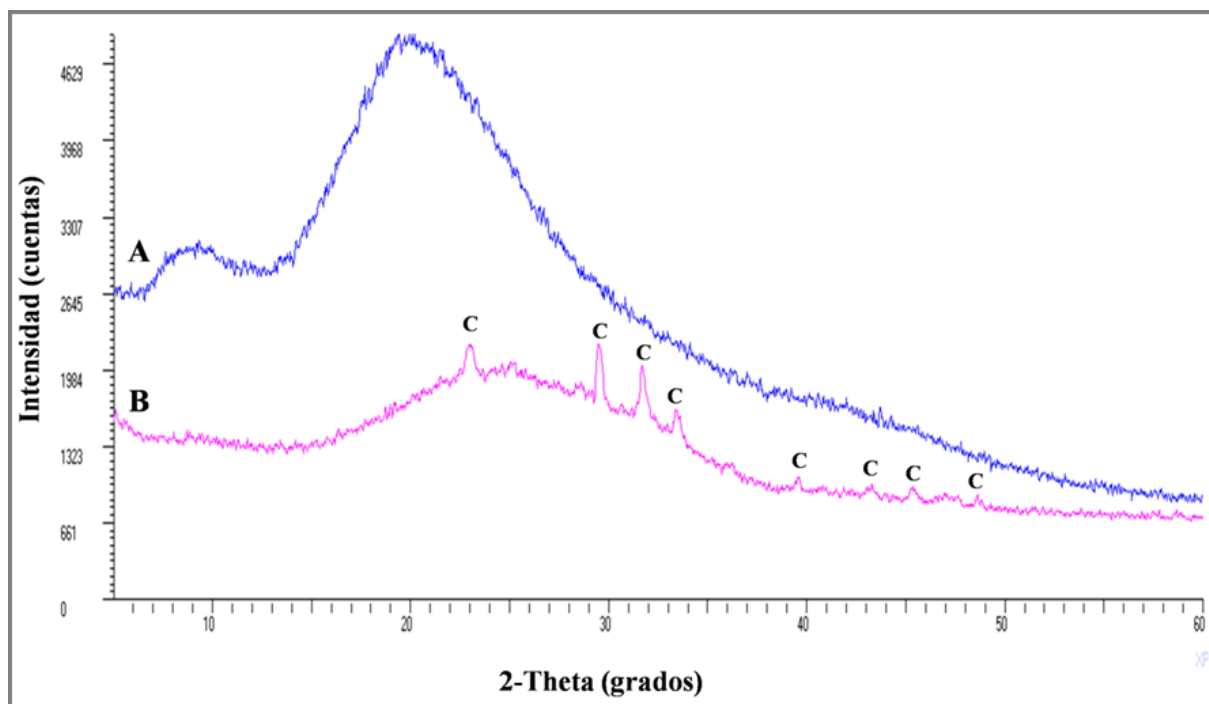
**Figura 22.** Patrones de difracción 2D que muestran la evolución de la microestructura de la cáscara de Guinea Fowl a las 5, 7 10, 12 y 18 horas post ovulación.

Adicionalmente, muestras de la primera etapa del proceso de formación de la cáscara de huevo (4-5 horas post-ovulación) que presentan una mineralización incipiente de carbonato cálcico amorfo (no difractan los rayos X), se calentaron a 550°C durante 30 minutos (Figura 23).



**Figura 23.** Espectros ATR-FTIR de cáscaras de huevo recolectadas a las 4 horas después de la ovulación, analizadas antes (A) y después (B) de ser calentadas a 550°C durante 30 minutos.

Tras el calentamiento, el espectro de infrarrojos muestra la presencia de los picos característicos del carbonato cálcico cristalino en forma de calcita (873 y 713  $\text{cm}^{-1}$ ). Así mismo el análisis mediante difracción de rayos X (Figura 24), confirma, que la fase inicial de carbonato de calcio, es una fase amorfa con una proto-estructura calcítica que cristaliza dando lugar a la calcita.



**Figura 24.** Patrones de difracción 1D de muestras de cáscara de huevo de Guinea Fowl, antes (A) y después (B) de ser calentadas a 550°C durante 30 minutos. C: picos de la calcita.

En conclusión, los estudios llevados a cabo en este apartado demuestran que la mineralización de la cáscara de huevo ocurre a través de una fase mineral amorfa transitoria que es metaestable y que da paso de manera progresiva a la calcita cristalina. En el caso específico de Guinea Fowl, el proceso de mineralización de la cáscara de huevo es igual que el de las gallinas ponedoras. Lo único es que sus características microestructurales son muy diferentes y, lo que le confiere unas propiedades mecánicas muy superiores a los de la cáscara de huevo de gallinas ponedoras (Petersen & Tyler, 1967; Panheleux et al., 1999).

En Guinea Fowl al igual que en gallinas ponedoras, la calcificación se inicia con la formación de partículas que nuclean en los núcleos mamilares, ubicados sobre la membrana externa de la cáscara de huevo. A medida que el proceso va evolucionando,

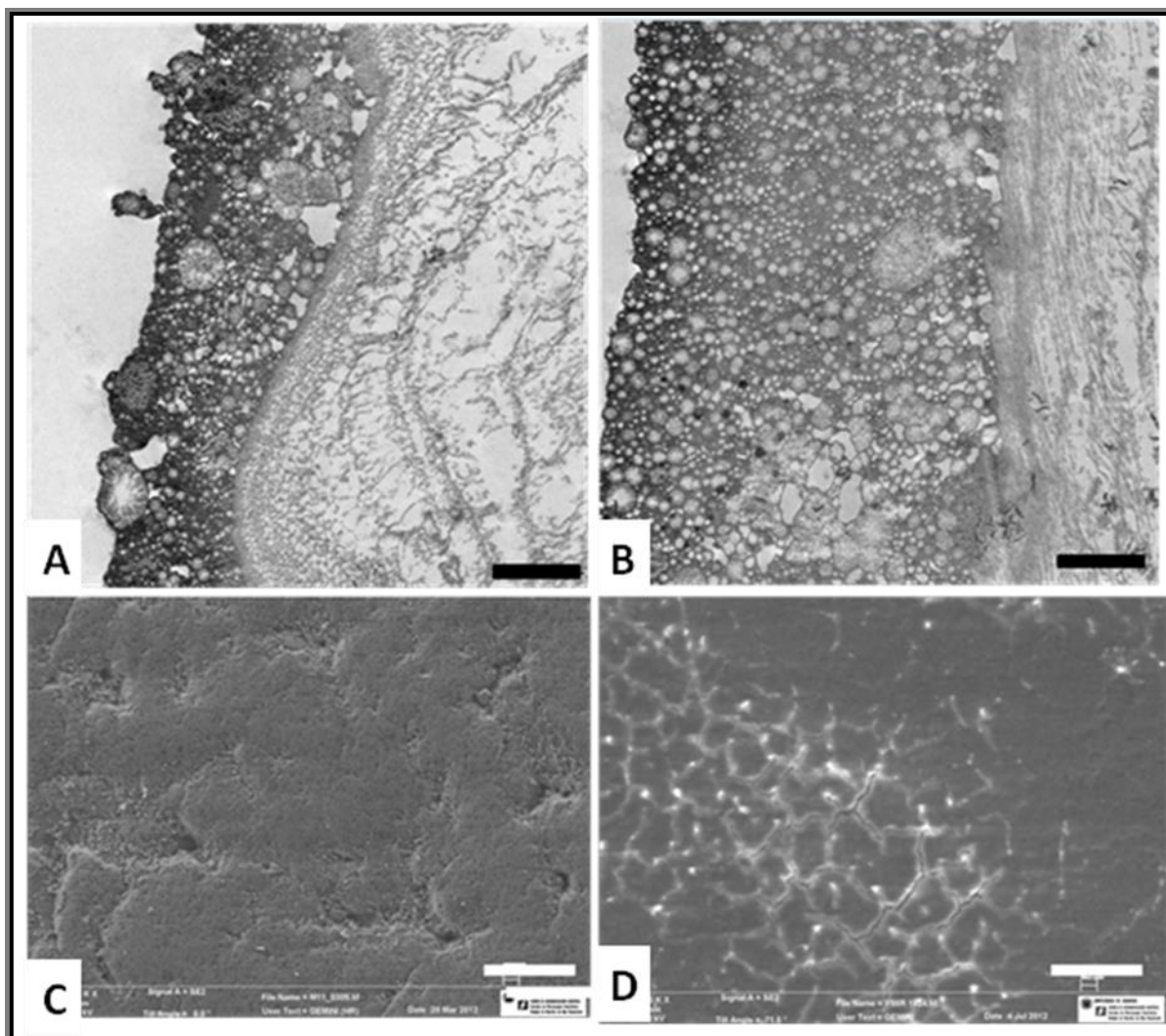


las partículas de mineral amorfo se acumulan y se producen depósitos masivos esferulíticos que posteriormente se transforman en cristales de calcita de gran tamaño. La precipitación inicial de carbonato cálcico amorfo y su conversión directa en calcita indican que el proceso de precipitación en las cáscaras de huevo, no siguen exactamente la regla de las etapas de Ostwald que se dan en otros sistemas, en los que existe un proceso bien definido de precipitación, otro de disolución y otro de recristalización de las fases de carbonato cálcico y que están determinados por factores cinéticos (Jiménez-Lopez et al., 2001). Análisis complementarios de difracción de rayos X, en los que tras el calentamiento de las muestras, el carbonato cálcico amorfo se transforma fácilmente en calcita, apoyan que esta conversión directa en calcita está predeterminada y facilitada por la estructura proto-calcítica del carbonato de calcio amorfo (Rodríguez-Navarro et al., 2015). Se ha demostrado mediante ensayos de cristalización in vivo (Hernández et al., 2008), que las macromoléculas específicas del fluido uterino de las gallinas y de la cáscara de huevo, seleccionan calcita sobre otros polimorfos de carbonato cálcico. Además de ello, existen proteínas específicas que juegan un papel importante en la modulación de la cinética de nucleación, estabilización del carbonato amorfo y en el control de la morfología de los cristales. (Gautron et al., 1997; Marie et al., 2015). Como se ha comentado anteriormente, el carbonato cálcico amorfo y la calcita se forman y estabilizan en los núcleos mamilares. Estas estructuras ricas en proteoglicanos sulfatados y proteínas ácidas específicas (negativas), promueven la acumulación del calcio y favorecen la nucleación del carbonato cálcico mediante un efecto ionotrópico (Addadi et al., 1987; Smeets et al., 2015). Por el contrario, las partículas de carbonato cálcico amorfo formadas en otras partes de la membrana de la cáscara se disuelven.

#### 4.2. *La cutícula de la cáscara de huevo.*

En este trabajo se ha estudiado cómo influye la edad de la gallina y la frescura del huevo en la estructura, morfología y composición de la cutícula. En concreto, para el estudio del efecto de la edad se consideraron cuatro grupos de edad (16, 30, 36 y 70 semanas) y para el de la frescura se analizaron huevos a diferentes tiempos después de la puesta (2, 3, 4, 5, 6, 24, 26 y 72 horas). Para analizar la estructura, morfología y composición química de la cutícula se han empleado técnicas analíticas como la microscopía electrónica de barrido y transmisión, la difracción de rayos X y la espectroscopia de infrarrojo (ATR-FTIR). Adicionalmente, muestras seleccionadas fueron teñidas con la tinción de Cuticle Blue, para evaluar el grado de recubrimiento de la cutícula en la superficie del huevo.

Los análisis de las muestras mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) muestran que la cutícula es una capa muy fina ( $< 10 \mu\text{m}$ ) que cubre de forma homogénea la superficie de la cáscara. Esta capa está constituida por vesículas esféricas densamente empaquetadas que se depositan sobre la capa vertical de cristales de la cáscara de huevo (Figura 25). El tamaño de las vesículas varía aproximadamente entre los 50 y 500 nm de diámetro y muestran un aumento gradual de contraste hacia la superficie externa. El grosor de la cutícula (entre 2 y 5 micras de espesor) es muy diferente en los diferentes grupos de edad de las gallinas estudiados. En general, los huevos de gallinas viejas (Figura 25A) tienen una cutícula más delgada distribuida de forma más irregular sobre la superficie de la cáscara dejando a la vista numerosos poros de la cáscara de huevo (Figura 25C). Por otra parte, los huevos de gallinas jóvenes (Figura 25B) tienen una cutícula más gruesa que recubre de forma más homogénea la superficie de la cáscara y que deja un menor número de poros visibles (Figura 25D).

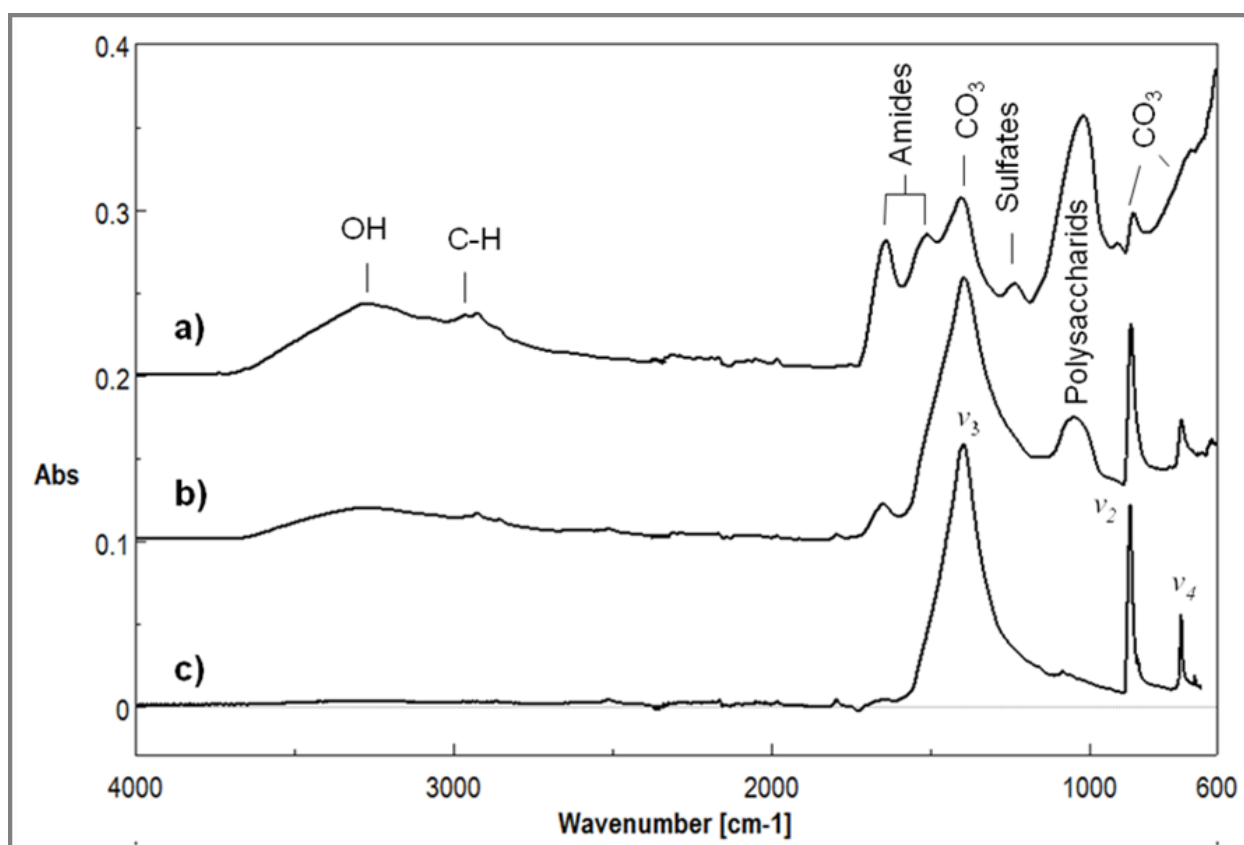


**Figura 25.** Imágenes de microscopio electrónico de transmisión de la superficie externa, de una sección transversal de cáscara de huevo descalcificada de gallinas viejas (A) y gallinas jóvenes (B). Escala 1  $\mu\text{m}$ . Imágenes al microscopio electrónico de barrido de la superficie de una cáscara de huevo sin cutícula (C) y con buen grado de cobertura (D). Escala 50  $\mu\text{m}$ .

### **Composición química**

El análisis mediante ATR-FTIR de la superficie de la cáscara de huevo proporciona información detallada sobre su composición química y su calidad (espesor y/o grado de cobertura). Los espectros ATR-FTIR que se muestran en la figura 26 corresponden a

huevos que presentan una cutícula con distinto grado de recubrimiento. Entre los picos más característicos de la superficie de la cáscara se encuentran los asociados con los grupos OH y las amidas A ( $3700$  a  $2500\text{ cm}^{-1}$ ) de agua y proteínas, dos picos asociados con las amidas I ( $1633\text{ cm}^{-1}$ ) y las amidas II ( $1540\text{ cm}^{-1}$ ), tres picos asociados con los grupos carbonatos de los cristales de carbonato cálcico de la cáscara, el principal localizado a  $1390\text{ cm}^{-1}$  y los otros dos a  $873\text{ cm}^{-1}$  y  $713\text{ cm}^{-1}$ , y una banda que se corresponde con fosfatos y polisacáridos ( $1100$  a  $990\text{ cm}^{-1}$ ). Por otro lado, hay bandas de menor intensidad como es el caso de la asociada con enlaces sulfatos, localizada aproximadamente sobre los  $1240\text{ cm}^{-1}$  o las asociadas con los grupos C-H ( $2918\text{ cm}^{-1}$ ) de los lípidos y los grupos carboxilo ( $1447$  y  $1410\text{ cm}^{-1}$ ) de los residuos de aminoácidos.



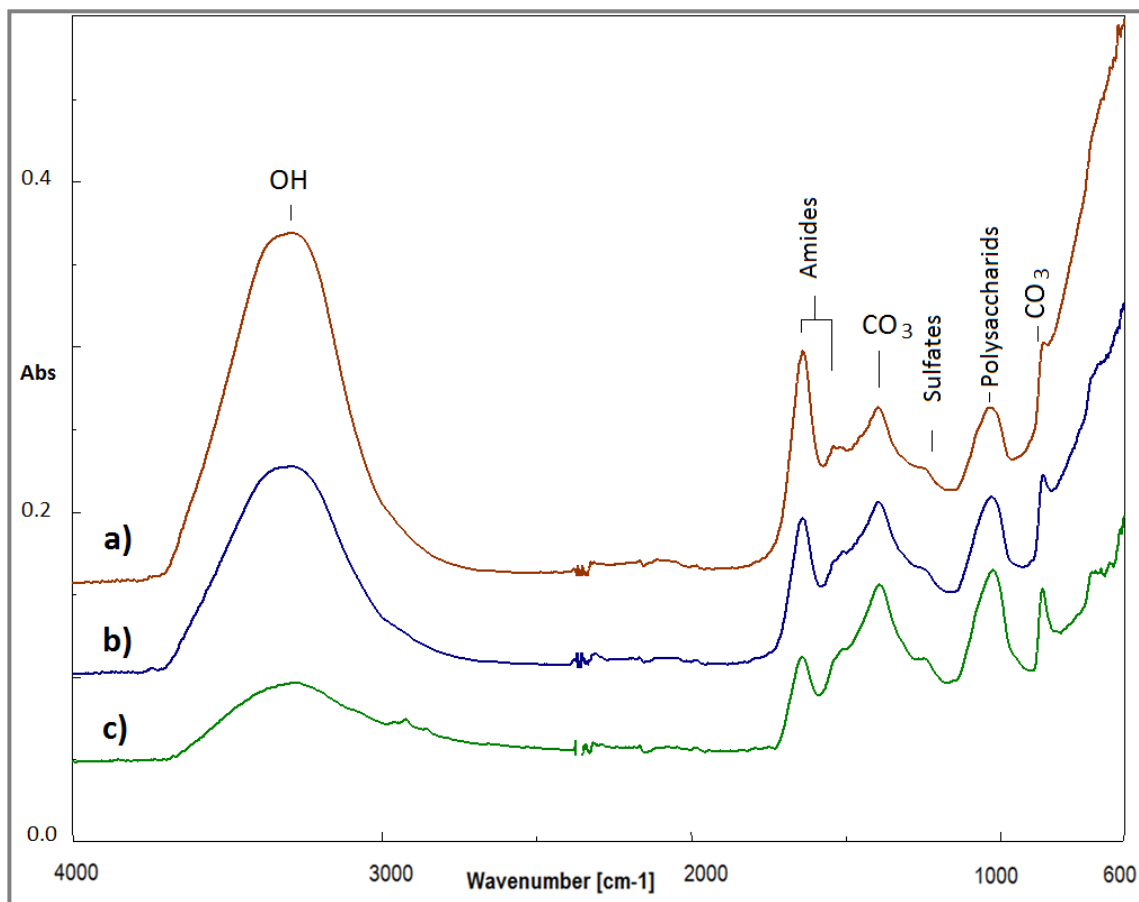
**Figura 26.** Análisis ATR-FTIR de la superficie de la cáscara: a) con buen grado de recubrimiento de la cutícula, b) con pobre recubrimiento de la cutícula y c) calcita en polvo.

Cuando analizamos las correlaciones de Pearson entre las áreas de los picos asociados con las proteínas (amidas), fosfatos, polisacáridos y sulfatos, se observa una correlación significativa entre ellos, indicando que estos componentes moleculares están estructuralmente asociados como glicoproteínas, el principal constituyente orgánico de la cutícula. Por otro lado, el área de los picos de las amidas está fuerte y negativamente correlacionado con la intensidad de los picos principales del carbonato. Esto se debe a que a medida que la cobertura de la cutícula disminuye o se hace más delgada, la cantidad de proteínas que recubren a la superficie de la cáscara disminuye y el carbonato mineral se expone más a la superficie de la cáscara del huevo contribuyendo más al espectro de ATR-FTIR. Otro hallazgo interesante, es que la cantidad de agua (OH) en la superficie de la cáscara del huevo está fuerte y negativamente correlacionada con componentes específicos de la cutícula, como los fosfatos, polisacáridos y lípidos. Así mismo, esta señal del grupo OH y de las proteínas (amida I) están correlacionadas positivamente, indicando esto que probablemente las proteínas de la clara de huevo y el agua permean a través de los poros de la cáscara del huevo.

### ***Influencia de la frescura de huevos***

El análisis ATR-FTIR de la superficie de la cáscara de huevo muestra también cambios bien definidos en la composición y estructura de la cutícula en el tiempo (Figura 27). Poco después de su puesta (Figura 27a), la superficie de la cáscara de huevo está húmeda y los espectros muestran una banda de OH muy grande que se va reduciendo gradualmente conforme va pasando el tiempo y se va secando la cutícula. A medida que la cutícula se seca (Figura 27b) el espesor disminuye y el mineral de carbonato de la cáscara del huevo queda más expuesto contribuyendo más al espectro de IR. Simultáneamente, se observa

una disminución gradual de la intensidad del pico de amida I y un aumento en el área de picos asociados a fosfatos, polisacáridos y sulfatos, que puede deberse o bien a la difusión de componentes de polisacáridos sulfatados desde la capa interna de la cutícula o por un gradiente en la composición química de la cutícula, en la que la parte externa es más rica en proteínas y la parte interna es más rica en polisacáridos y fosfatos. Así cuando la cutícula se seca (Figura 27c) y se hace más delgada, la capa interna de polisacáridos y/o fosfatos que están asociados con los sulfatos contribuye más a los espectros. Por otro lado, el aumento de la cantidad de polisacáridos en la superficie sugiere que el grado de glicosilación de las proteínas aumenta a medida que madura la cutícula. Estos cambios composicionales de la cutícula durante las primeras horas después de la puesta pueden mejorar sus propiedades mecánicas. A tiempos más largos (72 h), se observa que los picos de amida I (proteínas) y de OH (agua) aumentaban bruscamente, mientras que los picos de carbonato disminuyen. Esto se debe a que una vez que la cutícula se seca, se forman fisuras que dejan expuestas las aberturas de los poros de la cáscara facilitando la difusión de agua de la clara de huevo. Por tanto, el aumento de la permeabilidad de la cáscara del huevo provoca que el agua movilice y transporte las proteínas hacia la superficie a través de los poros.

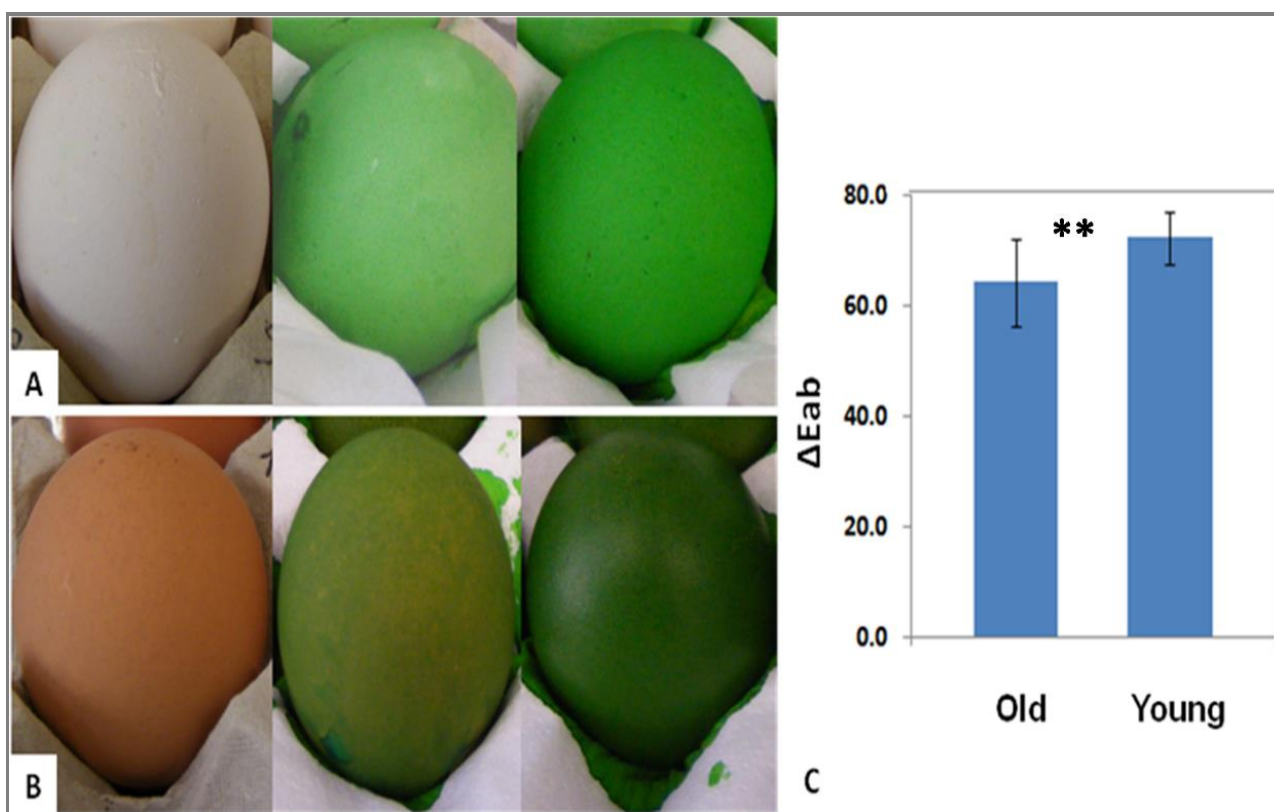


**Figura 27.** Espectro ATR-FTIR de la superficie de la cáscara de huevos de gallinas viejas (70 semanas) medidas a diferentes tiempos después de la puesta: a) a las 2 horas, b) a las 4 horas, y c) a las 6 horas.

Paralelamente a los cambios de composición que ocurren en la cutícula de la cáscara del huevo durante su maduración y secado, hay cambios estructurales de sus proteínas. En particular, se observa un desplazamiento notable del pico de amida I (de 1.636 a 1.645  $\text{cm}^{-1}$ ) que sugiere un cambio en la conformación de proteínas, pasando de tener una estructura desordenada (típica de las proteínas en solución) a una estructura más ordenada.

### *Influencia de la edad de las gallinas*

La tinción de la cutícula con la técnica tradicional, Cuticle Blue (Edicol Pea Green), demuestra que los huevos puestos por gallinas viejas presentan una calidad de la cutícula peor, con un menor grado de tinción, que la cutícula de huevos de gallinas jóvenes (Figura 28C). Adicionalmente, la figura 28A y 28B demuestran que tanto los huevos blancos como los huevos marrones se tiñen de color verde y presentan diferentes grados de tinción en función de la cantidad de cutícula depositada.

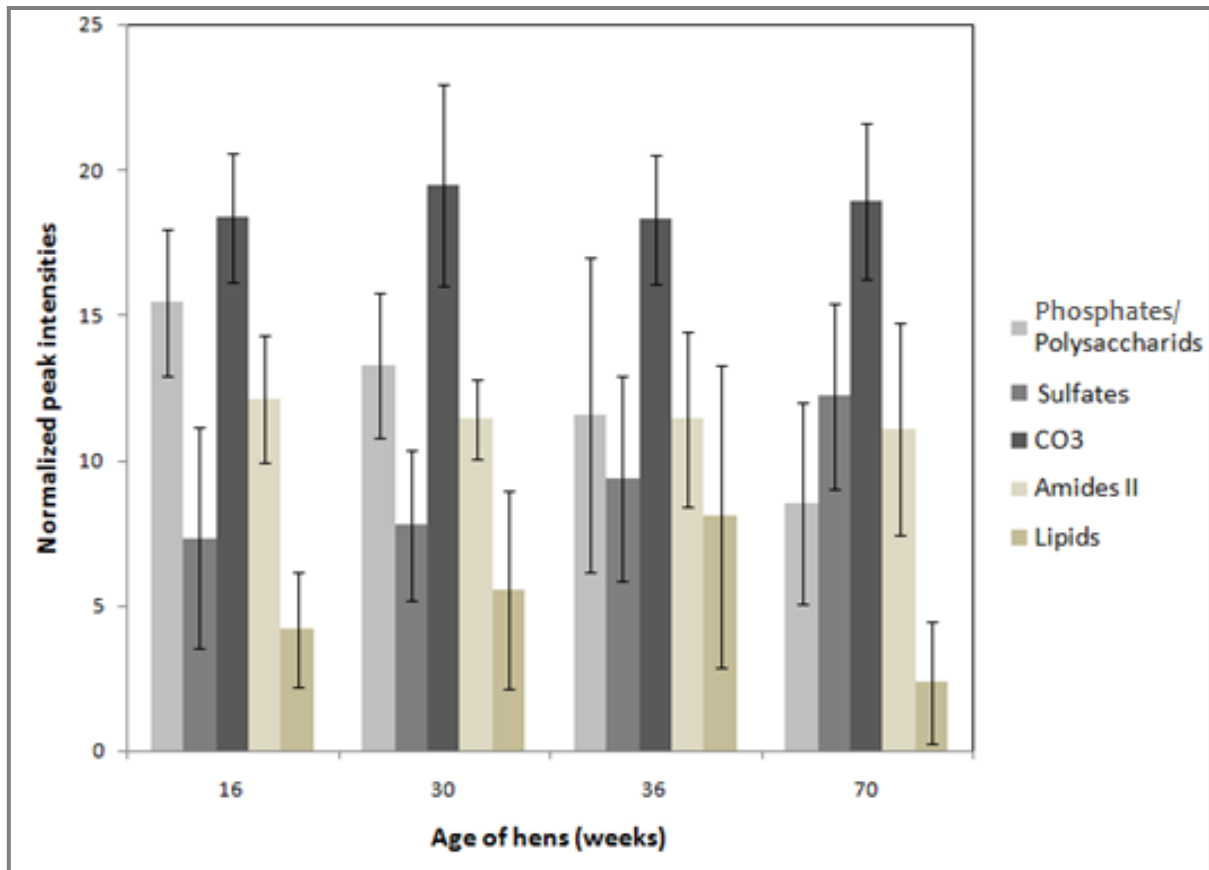


**Figura 28.** Evaluación de la calidad de la cutícula de la cáscara de huevo mediante el método de tinción de Cuticle Blue. A) Huevos blancos antes de teñir (izquierda), con grado de tinción medio (mitad) y alto (derecha). B) Huevos marrones antes de teñir (izquierda), con grado de tinción medio



(mitad) y alto (derecha). C) Cambio de color ( $\Delta E_{ab}$ ) en huevos blancos puestos por gallinas jóvenes (25 semanas) y gallinas viejas (60 semanas) tras la técnica de tinción.

Estas diferencias de tinción de la superficie de la cáscara con la edad de las gallinas se correlacionan con los datos de ATR-FTIR, que indican que la cantidad y composición de la cutícula depositada sobre la superficie de la cáscara del huevo es altamente dependiente de la edad de la gallina (Figura 29). En particular, durante el primer año de puesta, se observa una reducción gradual de la cantidad de fosfatos/polisacáridos conforme la gallina va envejeciendo al contrario de lo que ocurre con la cantidad de sulfatos. Mientras tanto, la cantidad de lípidos aumenta gradualmente hacia la mitad de la temporada de puesta y alcanza su valor más bajo al final del año de puesta. Sin embargo, la intensidad de los picos de amidas y carbonatos se mantiene constantes. Por otra parte, la disminución de la intensidad del pico de fosfatos/polisacáridos implica que el grado de glicosilación de las proteínas de la cutícula disminuye a medida que las gallinas envejecen. Estos cambios pueden llevar asociados un deterioro de las propiedades mecánicas de la cutícula y por tanto de su resistencia a la penetración bacteriana. Por último, se han encontrado diferencias notables en el contenido de agua. Los huevos frescos de gallinas más viejas tienen una cantidad más grande de agua en la superficie de la cáscara del huevo (son más permeables) que los huevos puestos por las gallinas más jóvenes.



**Figura 29.** Evolución de la intensidad de los picos ATR-FTIR asociados con los principales componentes orgánicos (polisacáridos, fosfatos, sulfatos, carbonatos, proteínas-amidas, y lípidos) de la cutícula con la edad de la gallina.

En conclusión, si una cáscara de huevo con una cutícula intacta es una barrera física y eficaz contra la penetración bacteriana de la cáscara (Board & Tranter, 1995; Messens et al., 2005; De Reu et al., 2006), una cutícula de buena calidad es esencial para preservar la seguridad alimentaria de los huevos. En estudios anteriores, además de evaluar cualitativamente la calidad de la cutícula por el grado de tinción de la cáscara de huevo (Board & Halls, 1973; De Reu et al., 2006), se ha desarrollado una metodología cuantitativa basada en el análisis espectrométrico del color de los huevos teñidos (De Reu et al., 2006; Leleu et al., 2011; Bain et al., 2013).

En nuestro caso, para evaluar la calidad de la cutícula y determinar su composición química, hemos empleado la técnica ATR-FTIR. Es una técnica simple, rápida y altamente sensitiva, que no requiere procesos tediosos para la preparación previa de las muestras y que nos proporciona datos útiles para calcular parámetros composicionales que permitan determinar la calidad de la cutícula.

Las características y calidad de la cáscara de gallina dependen de muchos factores entre los que se pueden destacar la edad, factores genéticos, la dieta o su hábitat (Solomon, 1997; Jones et al., 2002; Rodríguez-Navarro et al., 2002; Travel et al., 2011). De la misma manera, las propiedades de la cutícula de la cáscara (grado de recubrimiento, espesor, composición química) dependen de los mismos factores (Board & Halls, 1973; Board & Tranter, 1986; Bain et al., 2013). En general, se observa que la calidad de la cáscara disminuye conforme avanza la edad de la gallina (Board & Halls, 1973; Board & Tranter, 1995; Leleu et al., 2011). Los resultados obtenidos muestran que la composición de la cutícula es altamente dependiente de la edad de la gallina y de la frescura del huevo.

Particularmente, se ha observado que, durante el primer año de puesta, los huevos puestos por gallinas viejas, presentan cutículas con una baja cantidad de fosfatos, polisacáridos y componentes lipídicos, en comparación con huevos puestos por gallinas jóvenes. Una reducción en el contenido de polisacáridos, indica un menor grado de glicosilación de las proteínas (Khajehpour et al., 2006) que a su vez podría provocar una disminución de las propiedades mecánicas de la cutícula, y el cambio en los componentes lipídicos por su parte, podría tener un impacto negativo en las propiedades antimicrobianas de la cutícula (Wellman-Labadie et al., 2010).

Estos cambios añadidos a una cutícula con un grado de cobertura reducido podrían explicar, en parte, la mayor incidencia de contaminación bacteriana que presentan los

huevos puestos por gallinas viejas (Wells, 1968; Nascimento et al., 1992; Jones et al., 2002). Para compensar la pérdida de cobertura de la cutícula, se han desarrollado estrategias específicas, en las que se revisten los huevos con aceite mineral o con otro tipo de recubrimiento doméstico (Stadelman and Cotterill, 1995; Bhale et al., 2003; Caner & Cansiz, 2008) y que reducen la humedad y la pérdida de CO<sub>2</sub>, además de una protección adicional frente a la contaminación bacteriana. Por otro lado, cambios rápidos en las propiedades de la cutícula, como pueden ser el grado de humedad, su composición y su permeabilidad, también influyen en la contaminación bacteriana.

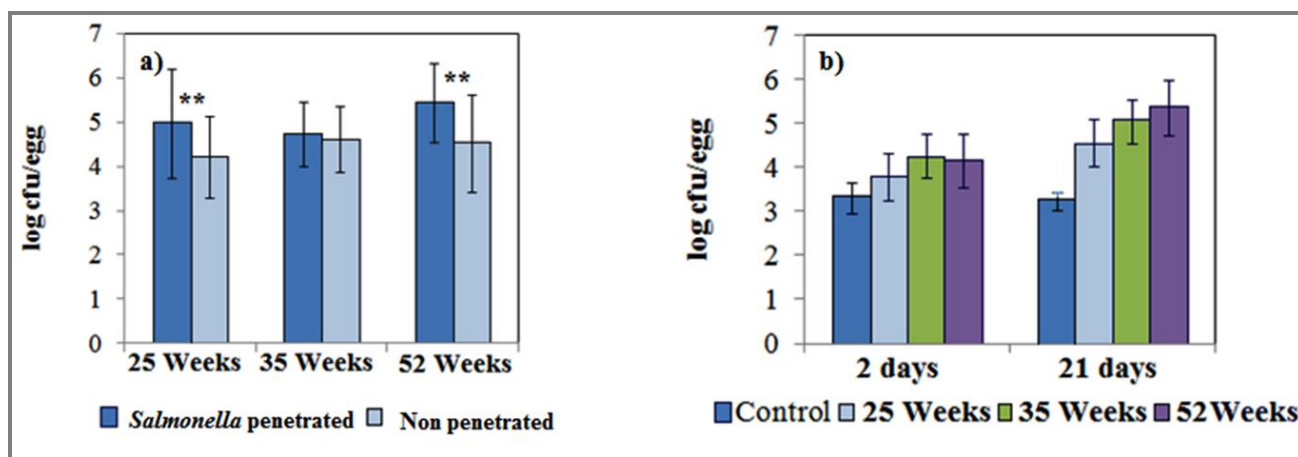
#### ***4.3. Importancia de la cutícula para evitar la contaminación bacteriana por Salmonella.***

Para evaluar cómo la variabilidad de las propiedades de la cutícula puede modificar el riesgo de contaminación por bacterias, hemos realizado un estudio detallado en el que se ha determinado la incidencia de huevos penetrados por *Salmonella* en huevos de gallinas de diferentes edades (25, 35 y 52 semanas) y en las que se esperan que las propiedades de la cutícula varíen sustancialmente. Además, se ha analizado la influencia de la madurez de la cutícula en la penetración bacteriana. Para ello se expusieron a una suspensión con *Salmonella*, huevos frescos a diferentes tiempos después de la ovoposición (3, 6 y 72 horas después de la puesta) y que tienen una cutícula inmadura, madura y/o seca.

#### ***Recuentos microbianos en la superficie de la cáscara de huevo***

Como muestra la figura 30, los huevos expuestos a una suspensión microbiana de *Salmonella arizonae* (6 log cfu/ml) muestran una contaminación superficial ligeramente

mayor (4 log cfu/ml) en comparación con los huevos controles (3.2 log cfu/ml). Además, cabe destacar, que los huevos penetrados por *Salmonella* presentan una mayor contaminación superficial que los no penetrados. Con respecto a la influencia de la edad de las gallinas (Figura 30a) en el riesgo de contaminación bacteriana, se observó que los huevos de gallinas jóvenes tienen una menor contaminación superficial que los de gallinas más viejas. Asimismo, después de 21 días de experimento (Figura 30b), los huevos de gallinas jóvenes presentan un incremento menos acentuado de la contaminación en comparación con los de gallinas viejas. Estos resultados indican que la cutícula es capaz de limitar el crecimiento bacteriano. Por otro lado, al comparar huevos expuestos a *Salmonella* a diferentes tiempos (3, 6 y 72 horas después de la ovoposición), no se aprecian diferencias significativas en la contaminación. Sin embargo, los huevos con una cutícula inmadura (3 horas) muestran mayor variabilidad en los recuentos superficiales que los huevos expuestos a otros tiempos (6 y 72 horas), lo cual sugiere que el crecimiento de los microorganismos en superficie depende de la madurez de la cutícula.



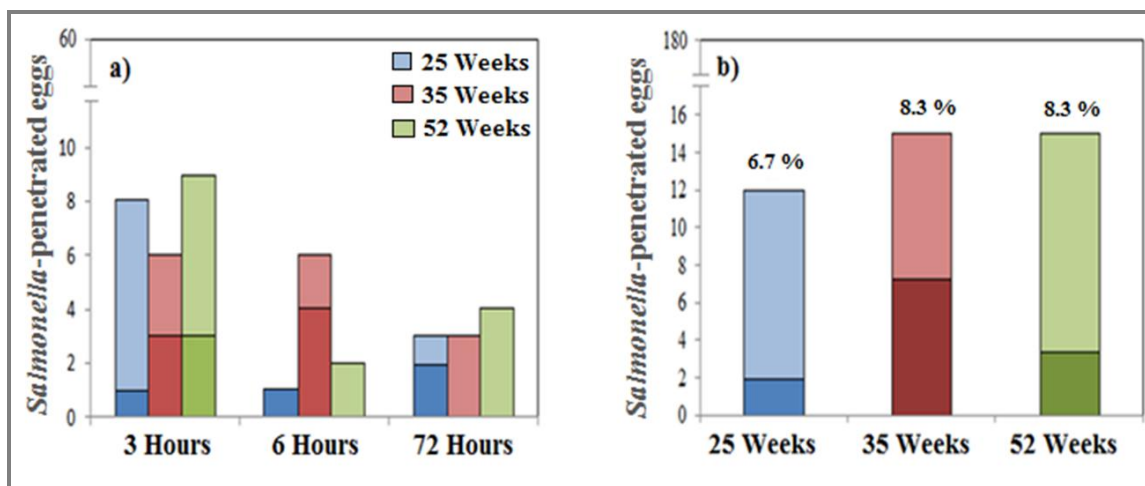
**Figura 30.** Recuentos microbianos totales de la superficie de la cáscara de huevo en grupos de diferente edad (25, 35 y 52 semanas): a) Recuento microbiano en superficie de huevos penetrados y

no penetrados por *Salmonella arizonae*; b) Evolución de los recuentos microbianos en superficie después de 2 y 21 días. \*\* Diferencias significativas ( $P < 0.01$ ).

### ***Penetración de Salmonella***

Por otra parte, se observó que el grado de madurez de la cutícula tiene una gran influencia en la resistencia de la cáscara a la penetración de *Salmonella* hacia el interior del huevo. En particular, se observó que los huevos expuestos a *Salmonella* cuando la cutícula es inmadura (3h) tienen una tasa de penetración mucho más alta (más del doble) que aquellos que fueron expuestos a la bacteria a otros tiempos (6 y 72 horas) (Figura 31a). En cambio, en huevos con una cutícula madura (6 horas después de la ovoposición), el número de huevos penetrados es siempre menor, en particular en el caso de huevos puestos por gallinas jóvenes. Sin embargo, a medida que la cutícula se va secando (72 h), el número de huevos penetrados aumenta, especialmente en huevos de gallinas jóvenes y de mediana edad.

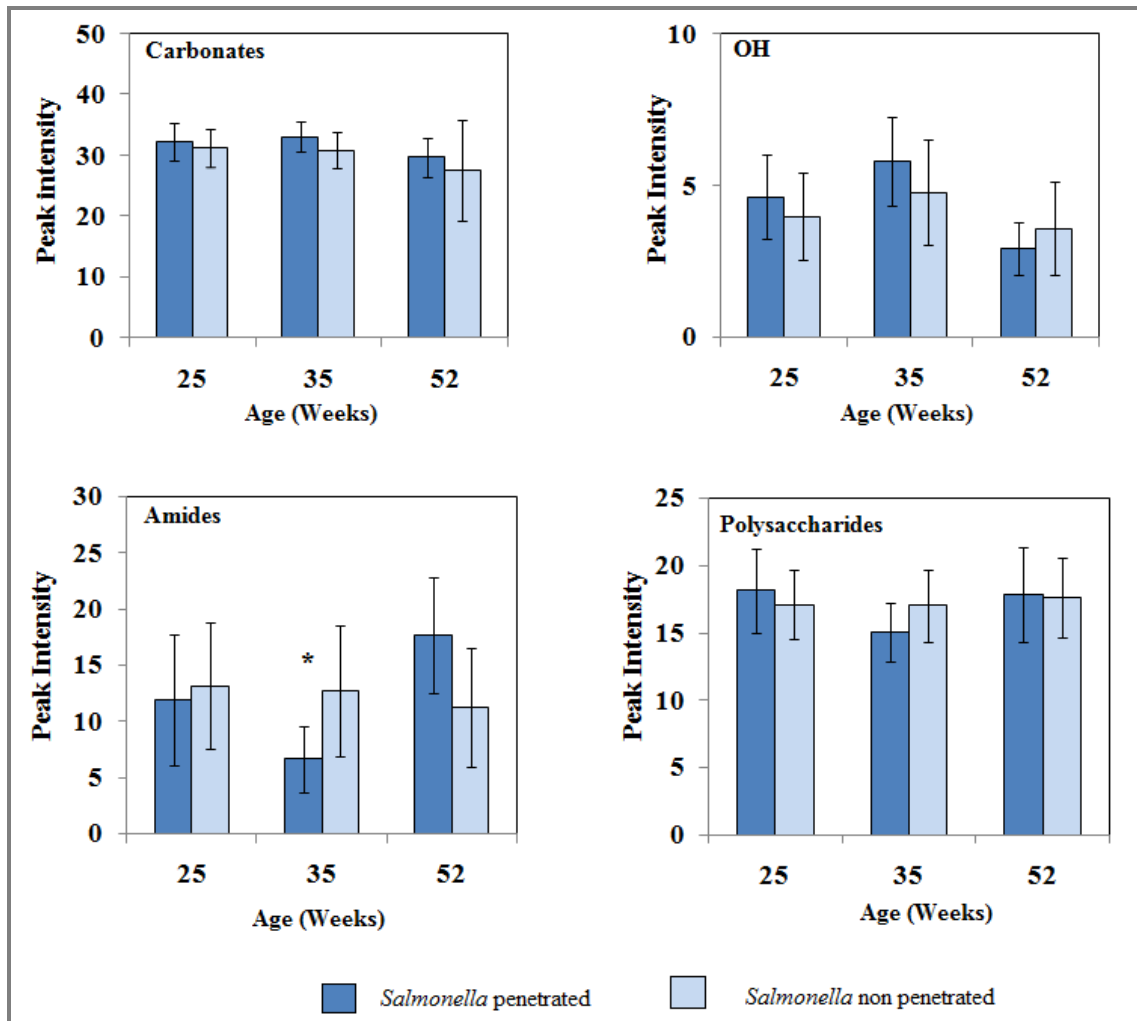
Cuando comparamos el número total de huevos penetrados en función de la edad de las gallinas (Figura 31b), la tasa de penetración es más baja en los huevos de gallinas jóvenes (6.7%) que en los huevos de los otros grupos de edad (8.3%).



**Figura 31.** Incidencia de huevos penetrados por *Salmonella arizonae*: a) En función de la madurez de la cutícula (3, 6 y 72 horas); b) En función de la edad de la gallina (25, 35 o 52 semanas). Color oscuro: el experimento terminó después de 12 días. Color nítido: los experimentos terminaron después de 21 días.

### Composición de la cutícula

Como se observa en la figura 32, al comparar los espectros de ATR-FTIR de la superficie de huevos de gallinas de diferentes edades, penetrados y no penetrados por *Salmonella*, se aprecian diferencias significativas en la composición de la cutícula. Las diferencias en la intensidad de los picos principales del espectro de IR (proteínas, carbonatos, fosfatos, polisacáridos, agua) muestran que los huevos penetrados por la bacteria tienen una cutícula más delgada (picos de carbonatos más intensos) y más permeable (banda de OH más intensa). Esto sugiere que una cutícula más delgada facilita el movimiento de agua y de bacterias a través de los poros de la cáscara. Por otro lado, los resultados tan similares obtenidos en ambos grupos en la cantidad de polisacáridos, sugieren este componente no determinan la penetración de *Salmonella*.

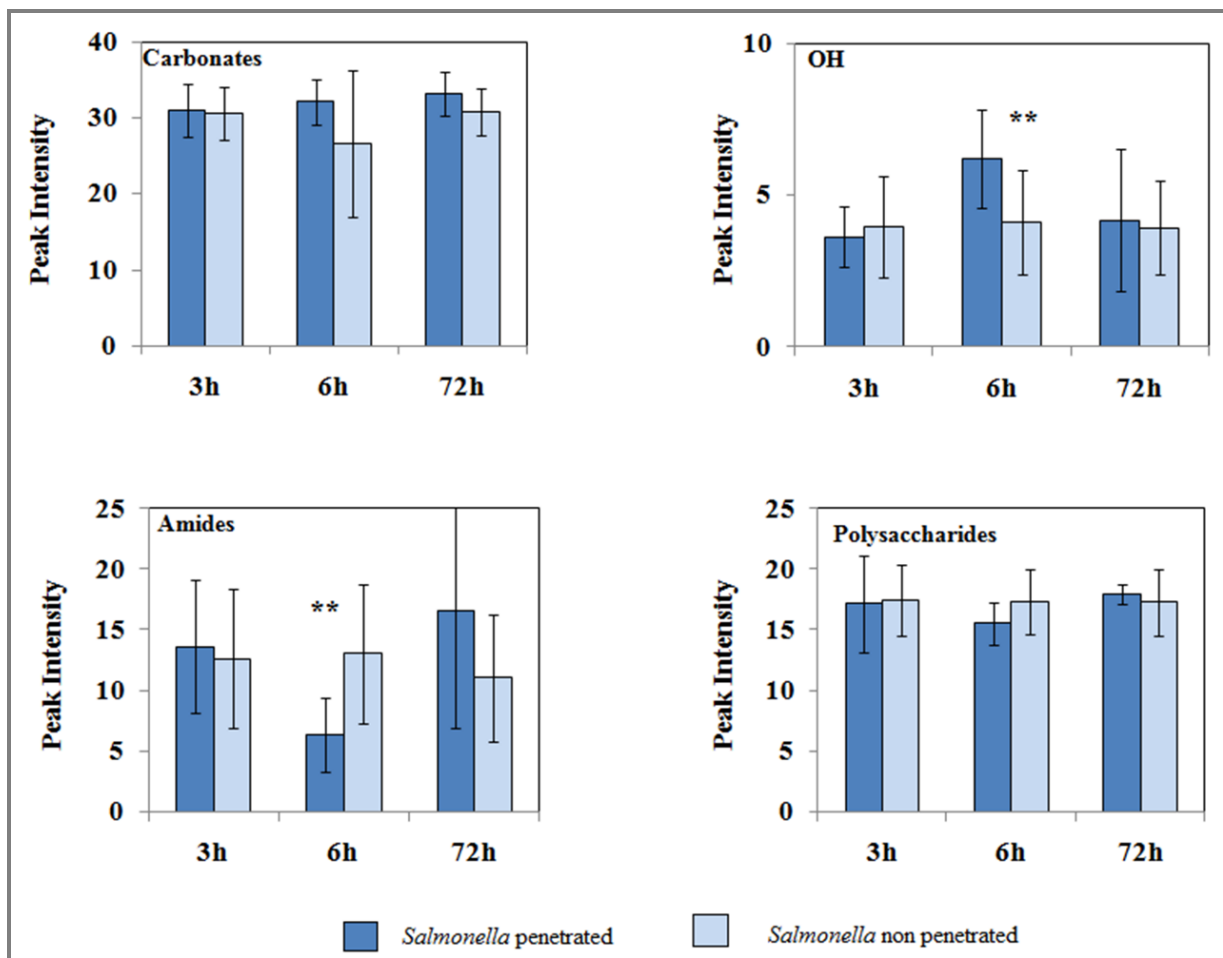


**Figura 32.** Intensidad de los picos ATR-FTIR asociados a los principales componentes químicos de la cutícula de la cáscara para huevos de gallinas de diferentes grupos de edad que fueron penetrados o no por *Salmonella*. \* Diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Por otro lado, si comparamos la composición de la cutícula de huevos penetrados o no que fueron expuestos a la suspensión de *Salmonella*, a diferentes tiempos desde la ovoposición (Figura 33), se observa que solo existen diferencias significativas en huevos expuestos a las 6 horas. Esto indica que la cutícula es especialmente eficaz en resistir la penetración bacteriana cuando es madura, en particular cuando es rica en proteínas (mayor señal de amidas) y menos permeable (menor señal de OH). En cambio, cuando es



inmadura, la cutícula no es capaz de resistir la penetración bacteriana, independientemente de su composición. Por otra parte, en huevos con una cutícula madura pero seca (72 horas), una mayor cantidad de proteínas parece provocar que el revestimiento sea más frágil y se generen grietas que hacen que la permeabilidad de la cáscara aumente facilitando la contaminación interna del huevo.



**Figura 33.** Intensidad de los picos ATR-FTIR asociados a los principales componentes químicos de la cutícula para huevos que fueron penetrados o no por *Salmonella*. La exposición a la bacteria se hizo a diferentes tiempos tras la puesta. \*\* Diferencias significativas ( $P < 0.01$ ).

### *Espesor de la cáscara*

Nuestro estudio muestra que la penetración de *Salmonella* no está determinada por el espesor de la cáscara de huevo (Tabla 1), ya que no existen diferencias significativas en cuanto a espesor de la cáscara entre huevos penetrados y no penetrados.

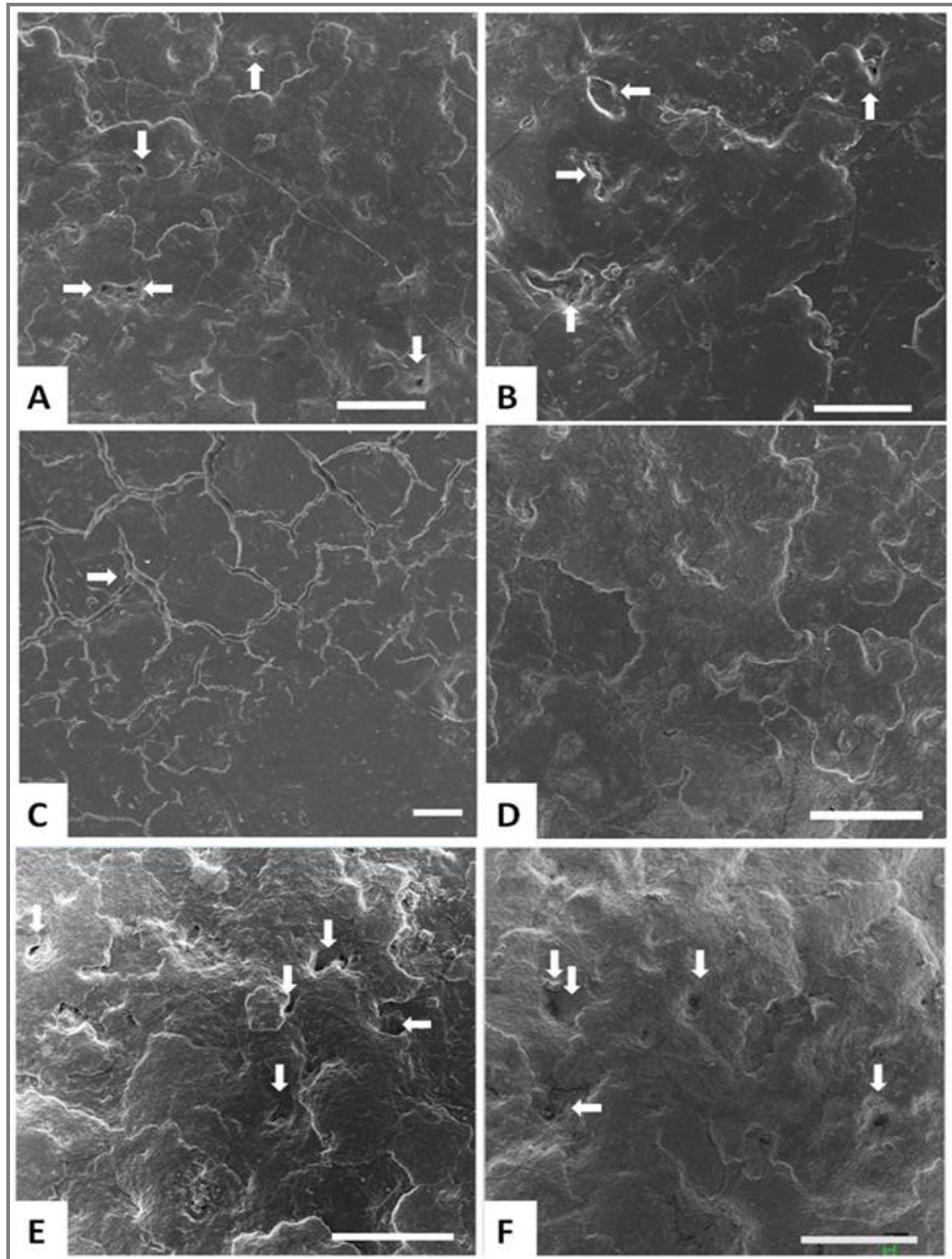
<i>Hen age</i> (weeks)	<u><i>Salmonella positive</i></u>		<u><i>Salmonella negative</i></u>		<i>F</i>	<i>P</i>
	Thickness ( $\mu\text{m}$ )	<i>N</i>	Thickness ( $\mu\text{m}$ )	<i>N</i>		
<b>25</b>	371 $\pm$ 6	12	382 $\pm$ 4	168	0.120	0.729
<b>35</b>	385 $\pm$ 4	15	367 $\pm$ 5	165	1.957	0.164
<b>52</b>	398 $\pm$ 7	15	415 $\pm$ 5	165	1.617	0.204

**Tabla 1.** Espesor de la cáscara de huevo para muestras de diferentes grupos de edad. *N*, es el número de muestras medidas, *F*, la varianza y, *P*, la probabilidad.

### *Microscopía electrónica de barrido*

Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica (Figura 34) revelan la existencia de diferencias significativas en cuanto al grosor y el grado de cobertura de la cutícula entre huevos penetrados y no penetrados por *Salmonella*. En general, los huevos penetrados por *Salmonella* o no tienen cutícula o presentan una cutícula con menor recubrimiento, con poros claramente expuestos, que facilita la penetración de las bacterias a través de los poros de la cáscara (Figura 34 A, E). En algunos casos, hemos observado que los huevos tienen una cutícula gruesa pero también fisuras o grietas que actúan como vía de penetración (Figura 34 C). Con respecto a los huevos no penetrados, cabe señalar que el grado de recubrimiento de su cutícula es casi total y son pocos los poros que quedan expuestos al exterior (Figura 34 B, D, F). Estas características son más evidentes en los huevos puestos por gallinas jóvenes (Figura 34A-D), ya que en los otros dos grupos de

edad (35 y 52 semanas) las diferencias morfológicas entre huevos penetrados y no penetrados no son tan evidentes. En algunos casos las aberturas de los poros son visibles independientemente de su estado de contaminación (Figura 34 E y F).



**Figura 34.** Imágenes SEM de la superficie de la cáscara de huevos de diferentes grupos de edad, que fueron penetrados o no por *Salmonella arizonae*. A) y B) cáscaras de gallinas de 25 semanas

de edad; C) y D) cáscaras de gallinas de 35 semanas de edad; E) y F) cáscaras de gallinas de 52 semanas. Las imágenes A, C y E corresponden a huevos penetrados por *Salmonella*, mientras que las imágenes B, D y F corresponden a huevos no penetrados. Las grietas y poros de la cáscara se indican con flechas blancas. Escala de imágenes 100  $\mu\text{m}$ , a excepción de la imagen C, 10  $\mu\text{m}$ .

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la importancia de la cutícula como primera barrera de defensa del huevo contra la contaminación bacteriana, y como está especialmente adaptada para resistir la penetración bacteriana (Bain et al., 2013; De Reu et al., 2006). Entre los factores que modifican la capacidad de resistencia de la cutícula a la penetración bacteriana se observa que la edad de la gallina afecta negativamente al crecimiento microbiano, posiblemente debido a la reducción de la cantidad de componentes antimicrobianos de la cutícula. De este modo, el incremento de contaminación bacteriana que se dan en las gallinas viejas, en parte podría estar causada por la reducción de estos componentes (Berrang et al., 1998; Jones et al., 2002; Nascimento et al., 1992). Adicionalmente se ha demostrado que la presencia de una cutícula con buena cobertura, es la característica más importante de la cáscara de huevo que determina la penetración bacteriana (Bain et al., 2013; Board & Tranter, 1995; De Reu et al., 2006). Además del factor edad, la funcionalidad de la cutícula depende en gran medida de su composición química y del grado de madurez. De hecho, nuestros resultados muestran que la composición de la cutícula (cantidad de proteínas) es diferente en huevos que fueron o no penetrados por *Salmonella*. En cuanto al grado de madurez, los huevos recién puestos (frescos) pueden ser fácilmente contaminados al ser su cutícula inmadura menos efectiva frente a la penetración bacteriana (Miyamoto et al., 1998; Padron et al., 1990; Sparks & Board, 1985). Por otra parte, la falta de resistencia de la cutícula parece ser independiente de la cantidad de cutícula depositada y de su composición. No es hasta

las 6 horas después de la ovoposición cuando la cutícula se consolida y madura, adquiriendo en este momento mayor resistencia mecánica y mayor resistencia contra la contaminación bacteriana. Esta consolidación de la cutícula durante la maduración, pudiera estar asociada a una mayor glicosilación de las proteínas, que aumenta la estabilidad estructural de las glicoproteínas, conforme la cutícula empieza a secarse (Rodríguez-Navarro et al., 2013). Más tarde, a medida que la cutícula se seca, su función protectora se ve comprometida, ya que el agua y las bacterias pasan a través de las fisuras generadas y acceden al interior del huevo. Por lo tanto, según este estudio y el llevado a cabo por Tung et al. (1979), la protección del huevo por parte de la cutícula es solo temporal, siendo óptima hasta las 72 horas aproximadamente. En cuanto al factor edad, en este estudio, influye menos en el riesgo de contaminación bacteriana que el grado de madurez y la composición química de la cutícula. Finalmente, los análisis composicionales de la cutícula realizada mediante ATR-FTIR, pueden ser de gran utilidad para los programas de selección dirigidos a mejorar la seguridad y calidad de los huevos. Además, la gran variabilidad natural de las propiedades de la cutícula, al tener un importante componente genético (Bain et al., 2013), permite seleccionar gallinas con cutículas resistentes a la contaminación bacteriana.

#### *4.4. Evolución del hueso medular de gallinas ponedoras durante el proceso de formación de la cáscara de huevo.*

Con este estudio pretendemos hacer un recorrido a lo largo del ciclo de puesta de la gallina analizando los cambios que se producen en el hueso medular durante la mineralización de la cáscara de huevo y averiguando si la rápida movilización del calcio se debe a la existencia de fases minerales independientes (carbonato cálcico amorfo o calcita). En particular, para determinar las propiedades y composición del hueso medular (grado de mineralización, cristalinidad, tamaño de cristal y organización mineral), hemos utilizado huesos de tibia de gallinas ponedoras White Leghorn recogidos en diferentes etapas de formación de la cáscara de huevo, que se identificaron en función del sitio del oviducto en el que se encontrara el huevo. Para su análisis se han empleado técnicas analíticas complementarias como la microscopía óptica y electrónica de barrido, la espectroscopia transformada de Fourier (FTIR), ICP-OES, la espectroscopia Raman o la difracción de rayos X, que además de proporcionarnos información sobre la composición química y estructural del hueso nos ayudan a entender mejor la relación existente entre la mineralización del hueso medular y la calcificación de la cáscara de huevo.

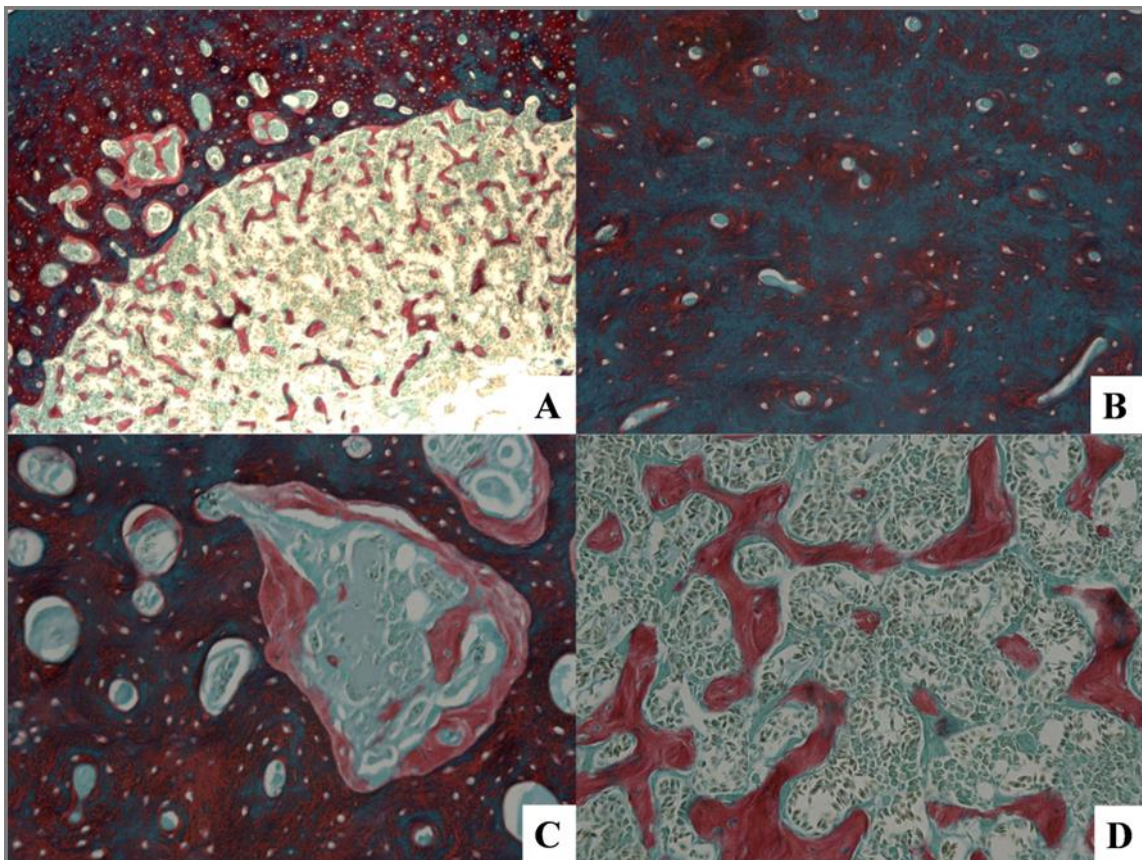
##### *Evolución del grado de mineralización*

Las imágenes obtenidas mediante microscopía óptica de las secciones teñidas con la técnica rojo picrosirius-fast green, nos permiten visualizar la estructura del tejido óseo de las gallinas ponedoras (Figura 35A). En este caso se observa una clara diferencia entre el hueso cortical, situado en la parte más externa y teñido de un verde intenso (Figura 35B), y el hueso medular, caracterizado por la presencia de trabéculas óseas en la cavidad medular, la parte interna de la sección (Figura 35D). Existen muestras que presentan



centros de reabsorción en el hueso cortical (Figura 35C), debido a la intensa actividad osteoclástica que se produce en el hueso durante el proceso de formación de la cáscara de huevo. Estos centros de absorción generan un progresivo debilitamiento del esqueleto óseo de las ponedoras.

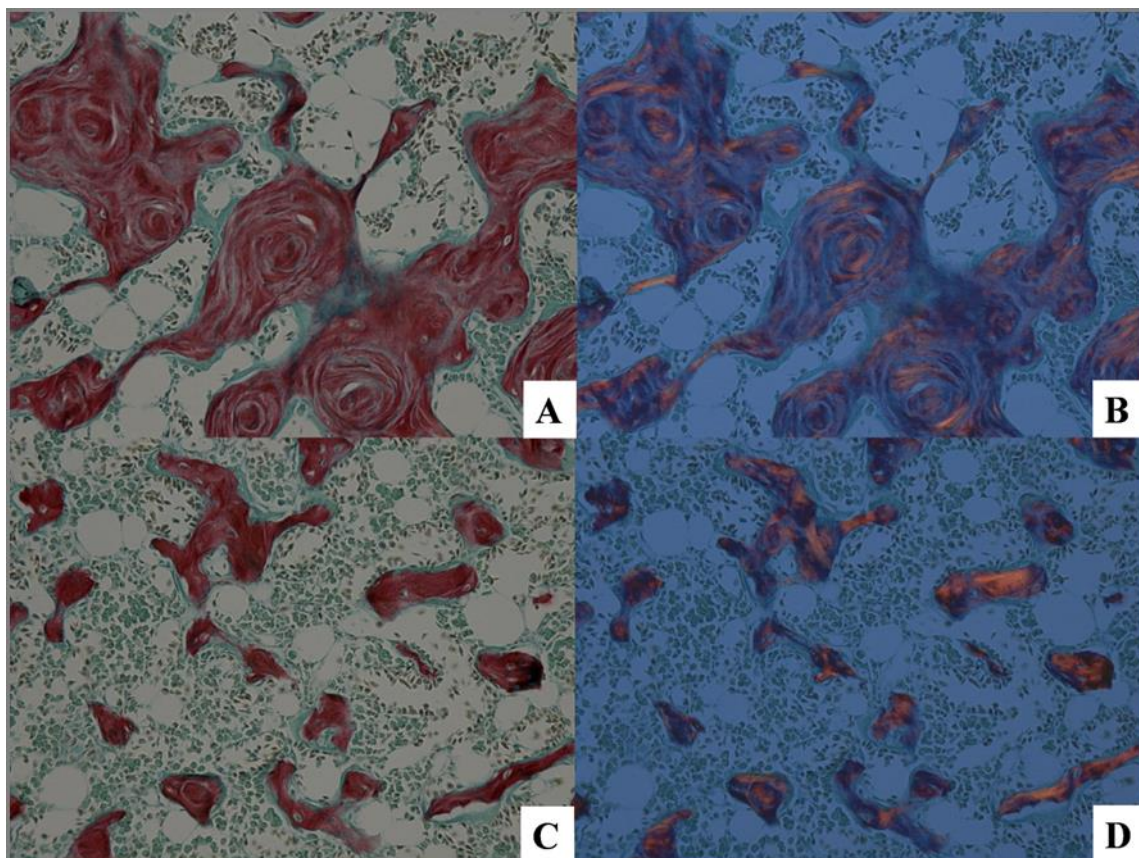
Además, de proporcionar información estructural, esta técnica nos permite teñir de rojo intenso las fibras de colágeno tipo I, características del tejido óseo. Cabe recordar que, en el caso del hueso cortical, la disposición de las fibras de colágeno, al igual que los cristales de apatito, es organizada, mientras que en el hueso medular las fibras de colágeno están dispuestas al azar.



**Figura 35.** Imágenes de microscopía óptica de secciones transversales de tejido óseo (tibia) de gallinas ponedoras, teñidas con rojo picosirius y fastgreen, en la etapa temprana de calcificación: A) Corte histológico general de hueso medular y cortical (5X). B) Detalle de

*hueso cortical (10X). C) Detalle de centro de reabsorción (10X). D) Detalle de las trabéculas de hueso medular (10X).*

En la figura 36, se observan cortes histológicos de hueso medular en distintas etapas del ciclo de ovoposición y la orientación de las fibras de colágeno observadas con el microscopio de fluorescencia (Figura 36B y 36D). En la fase temprana del ciclo de formación del huevo, las gallinas presentan elevados niveles de calcio gracias a la ingesta de alimentos.

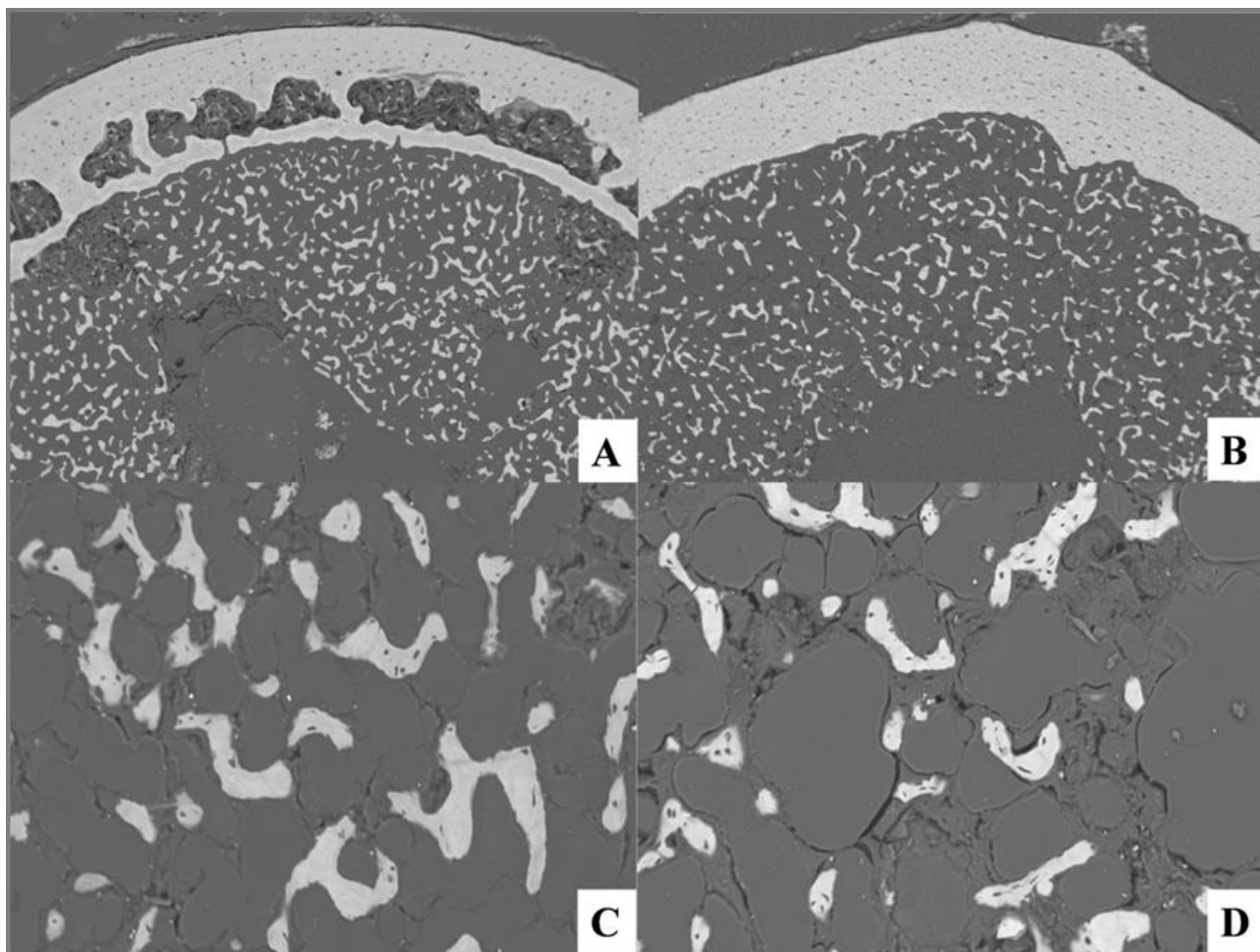


**Figura 36.** Comparación de secciones histológicas de hueso medular de gallinas ponedoras teñidas con rojo picosirius y fastgreen para observar las fibras de colágeno tipo I al microscopio de fluorescencia (B y D). A) Antes del comienzo de la calcificación (10X). C) Al final del periodo de calcificación (10X).



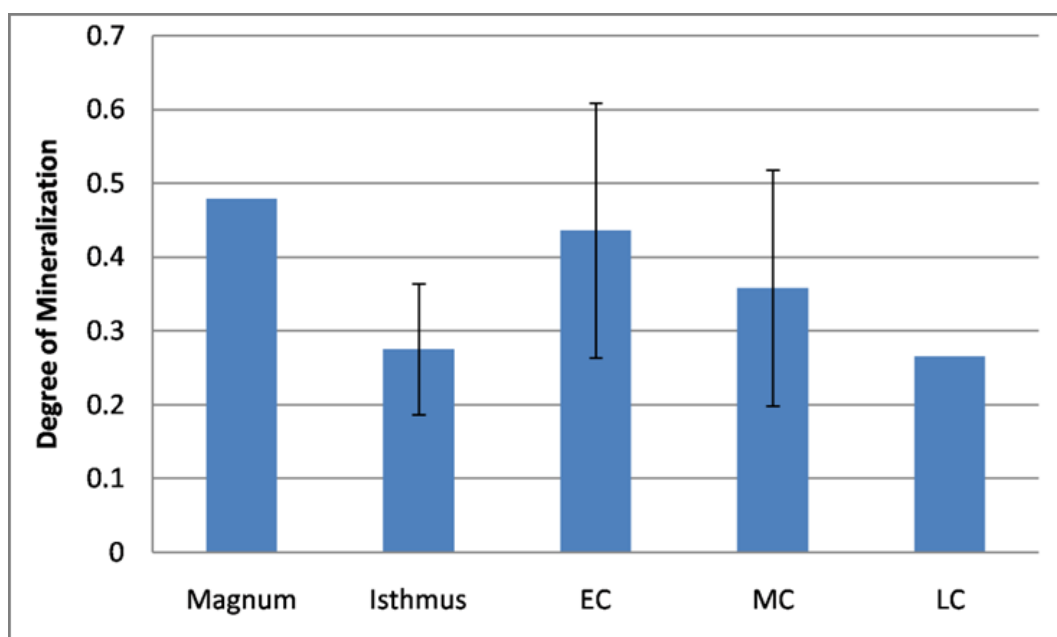
En este momento (fase inactiva de calcificación de la cáscara) no se necesita un aporte de calcio para la formación de la cáscara de huevo. El número y tamaño de las trabéculas del hueso medular son mayores (Figura 36A). Sin embargo, entramos en la fase activa de formación de la cáscara al llegar el huevo al útero, donde tiene lugar la calcificación de la cáscara, la demanda incrementa y tiene lugar la reabsorción ósea del hueso medular por parte de los osteoclastos. De este modo, al final de la etapa de calcificación, el hueso medular presenta un menor número de trabéculas y de menor tamaño (Figura 36C).

Las imágenes obtenidas en el microscopio electrónico de barrido de las secciones de huesos (Figura 37), apoyan los resultados descritos en el apartado anterior, en el que se observan diferencias estructurales tanto en el hueso cortical como en el hueso medular a lo largo del proceso de formación de la cáscara de huevo. En la etapa anterior a la calcificación (Figura 37A), el hueso cortical presenta abundantes centros de reabsorción ósea en los que el hueso está parcialmente reemplazado por hueso medular. Mientras que en la etapa posterior a la calcificación de la cáscara (Figura 37B), cuando no se necesita el aporte extra de calcio para la formación de la cáscara de huevo, no se observan dichos centros de reabsorción. Con respecto a la cavidad medular, las trabéculas de hueso que constituyen el hueso medular, están parcialmente mineralizadas y su tamaño y abundancia varía en función de la etapa del proceso en el que se encuentren. Durante la etapa anterior a la calcificación de la cáscara (Figura 37C), las trabéculas son más abundantes y presentan un tamaño mayor, mientras que en la etapa post-calcificación, disminuyen en cantidad y tamaño (Figura 37D). En ambos casos, el grado de luminosidad del hueso cortical y medular es similar, por lo que es indicativo de que tienen un grado de mineralización similar.



**Figura 37.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido (VPSEM) de gallinas ponedoras en distintas etapas de calcificación. A) Etapa pre-calcificación. B) Etapa post-calcificación. Las imágenes C y D, corresponden al detalle de las trabéculas del hueso medular durante las etapas pre y post calcificación, respectivamente. Escalas: A-B) 200  $\mu\text{m}$ . C-D) 100  $\mu\text{m}$ .

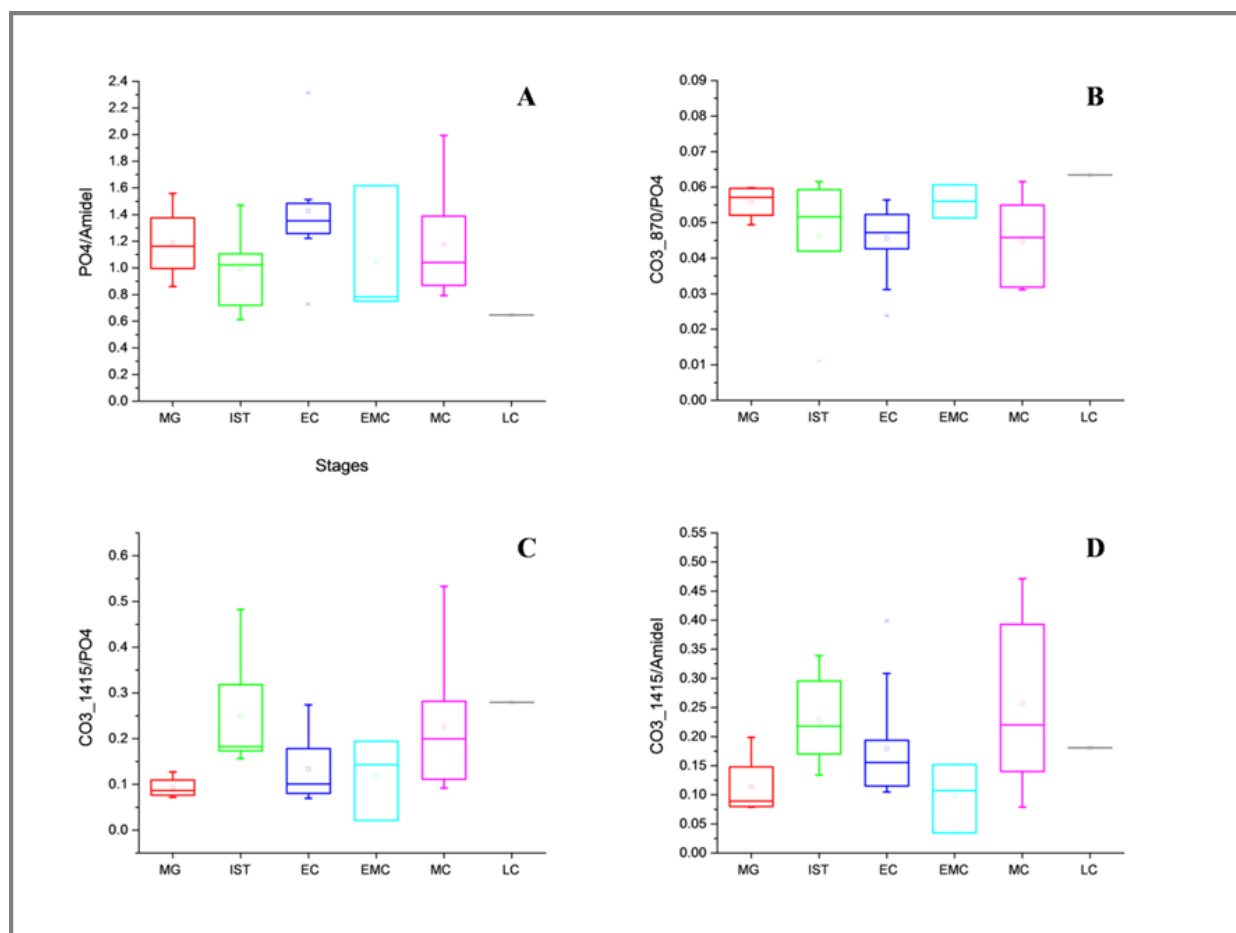
Al analizarla evolución del grado de mineralización del hueso medular a lo largo del proceso de calcificación (Figura 38), se aprecia que el grado de mineralización del hueso medular es mayor al comienzo del ciclo de ovoposición (cuando no necesita calcio para la formación de la cáscara de huevo), y va disminuyendo conforme avanza la calcificación de la cáscara de huevo.



**Figura 38.** Grado de mineralización del hueso medular a lo largo del ciclo de ovoposición analizado con el programa ImageJ a partir de imágenes de microscopía electrónica de barrido. EC: Calcificación temprana; MC: Calcificación media; LC: Calcificación tardía.

La determinación mediante FTIR de los parámetros composicionales del hueso medular apoyan los resultados descritos anteriormente en este estudio. Aunque no existen diferencias significativas entre las distintas etapas de formación en cuanto a las propiedades del hueso (Tabla 2), se observa una tendencia bien definida a lo largo del ciclo de puesta (Figura 39). En el caso del grado de mineralización, este va disminuyendo conforme va avanzando el ciclo de formación de la cáscara, mientras que el grado de sustitución de carbonatos en los cristales se mantiene constante. Los resultados sugieren, que el hueso medular al ser un tipo de hueso metabólicamente muy activo está en un proceso constante de remodelación, por tanto, en cada uno de los ciclos de puesta el mineral no alcanza un alto grado de madurez manteniéndose el grado de sustitución de carbonatos en los cristales de hidroxiapatita. Por el contrario, tanto el carbonato total en

el mineral como la cantidad total de carbonatos en el hueso aumentan justo antes del proceso de calcificación para después disminuir. Esta acumulación de carbonatos por parte de las gallinas durante esta etapa es debida a la alta demanda que presentan las ponedoras para la mineralización de la cáscara.



**Figura 39.** Parámetros composicionales del hueso medular determinados mediante FTIR en las distintas etapas del ciclo de ovoposición. A) Grado de mineralización. B) Grado de sustitución de carbonatos en el apatito. C) Cantidad total de carbonatos en el hueso mineral. D) Cantidad de carbonatos en el hueso. MG: Magnum; IST: Isthmus; EC: Calcificación temprana; EMC; Calcificación temprana-media; MC; Calcificación media; LC: Calcificación tardía.

<i>Anova</i>			
	<i>N</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>PO<sub>4</sub>/Amidas I</i>	31	1.453	0.237
<i>Min CO<sub>3</sub>_ 870</i>	31	1.201	0.334
<i>Min CO<sub>3</sub>_ 1415</i>	31	2.262	0.076
<i>CO<sub>3</sub>_1415/AmideI</i>	31	1.771	0.151

**Tabla 2.** Resumen de las propiedades composicionales del hueso medular durante el ciclo de ovoposición. Los valores entre los grupos son significativamente diferentes si  $P < 0.05$ .

Los análisis de correlación de Pearson entre los parámetros composicionales del hueso medular (Tabla 3) revelan que existen una correlación negativa entre el grado de mineralización ( $PO_4 / Amida I$ ) y la cantidad relativa de carbonato en el mineral ( $MinCO_3_{1415}$ ) ( $R = -0.392$ ;  $P=0.016$ ), al igual que ocurre entre éste ( $MinCO_3_{1415}$ ) y la cantidad de sustitución de carbonatos ( $MinCO_3_{870}$ ) ( $R = -0.578$ ;  $p < 0.001$ ).

Por otro lado, la cantidad total de carbonatos en el hueso mineral ( $CO_3_{1415}/AmideI$ ) está correlacionado negativamente con la cantidad de sustitución de carbonatos ( $MinCO_3_{870}$ ) ( $R = -0.805$ ;  $P < 0.001$ ) y positivamente con la cantidad relativa de carbonatos en el mineral ( $MinCO_3_{1415}$ ) ( $R = 0.822$ ;  $P < 0.001$ ).

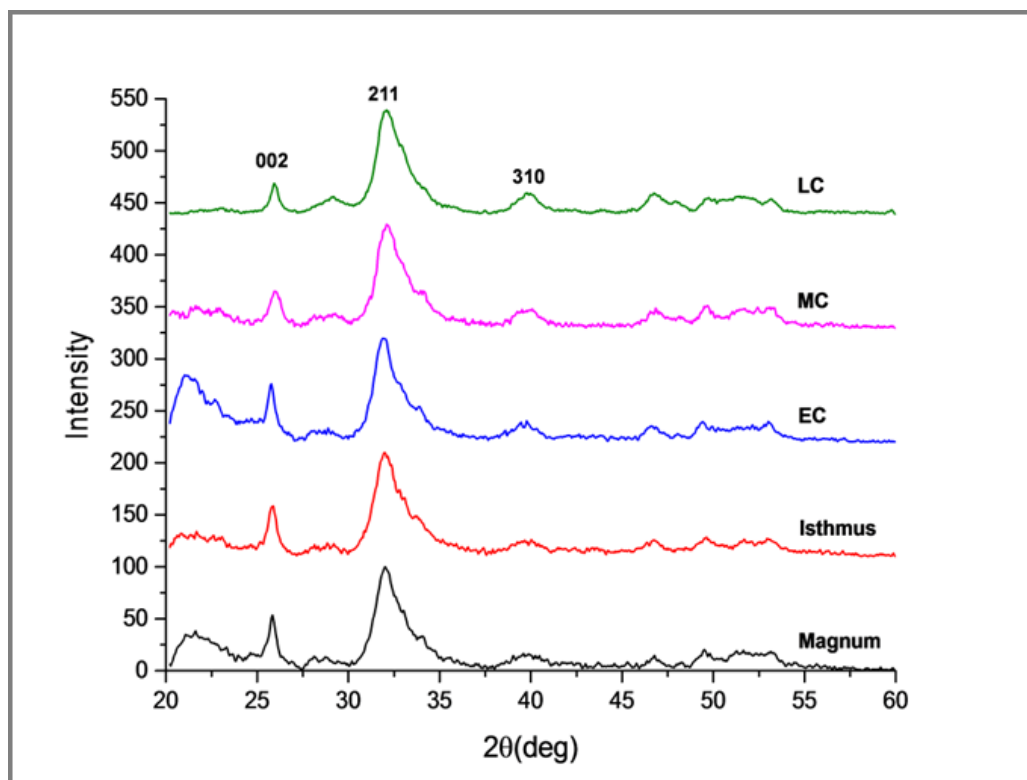
Estos resultados sugieren que el hueso medular durante el proceso de ovoposición al presentar un metabolismo muy activo y estar en continua renovación para la formación

de una nueva cáscara en cada uno de los ciclos, no le da tiempo a (madurar) mineralizarse completamente, perdiendo además con mayor facilidad el carbonato lábil para ser fácilmente reabsorbido.

	<i>PO<sub>4</sub>/Amidas I</i>	<i>Min CO<sub>3</sub>_ 870</i>	<i>Min CO<sub>3</sub>_ 1415</i>	<i>CO<sub>3</sub>_ 1415/AmideI</i>	
<i>PO<sub>4</sub>/Amidas I</i>	R	1			
	P				
	N	31			
<i>Min CO<sub>3</sub>_ 870</i>	R	-0.224	1		
	P	0.183			
	N	31	31		
<i>Min CO<sub>3</sub>_ 1415</i>	R	<b>-0.393</b>	<b>-0.578</b>	1	
	P	<b>0.016</b>	<b>&lt;0.001</b>		
	N	31	31	31	
<i>CO<sub>3</sub>_ 1415/AmideI</i>	R	0.089	<b>-0.805</b>	<b>0.822</b>	1
	P	0.599	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	
	N	31	31	31	31

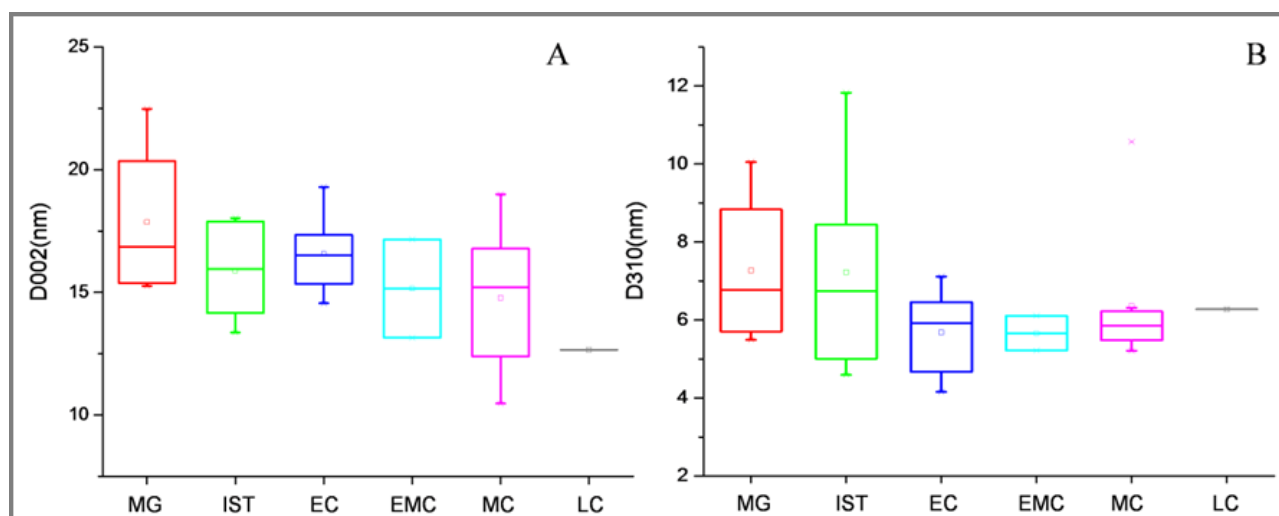
**Tabla 3.** Análisis de correlación de Pearson para las diferentes propiedades del hueso determinadas por FTIR. R es el coeficiente de correlación, P es la probabilidad y N es el número de muestras. Los valores con  $P < 0.05$  se destacan en negrita.

Los patrones de difracción de rayos X obtenidos, muestran que la única fase mineral detectada en las diferentes etapas de calcificación es el apatito (Figura 40). Al observar el tamaño del cristal determinado a partir del ancho de los picos de las reflexiones 002 o 310.



**Figura 40:** Patrones de difracción de rayos X (1D) de hueso medular durante las diversas etapas del ciclo de formación del huevo. Reflexiones principales del apatito (002), (211) y (310).

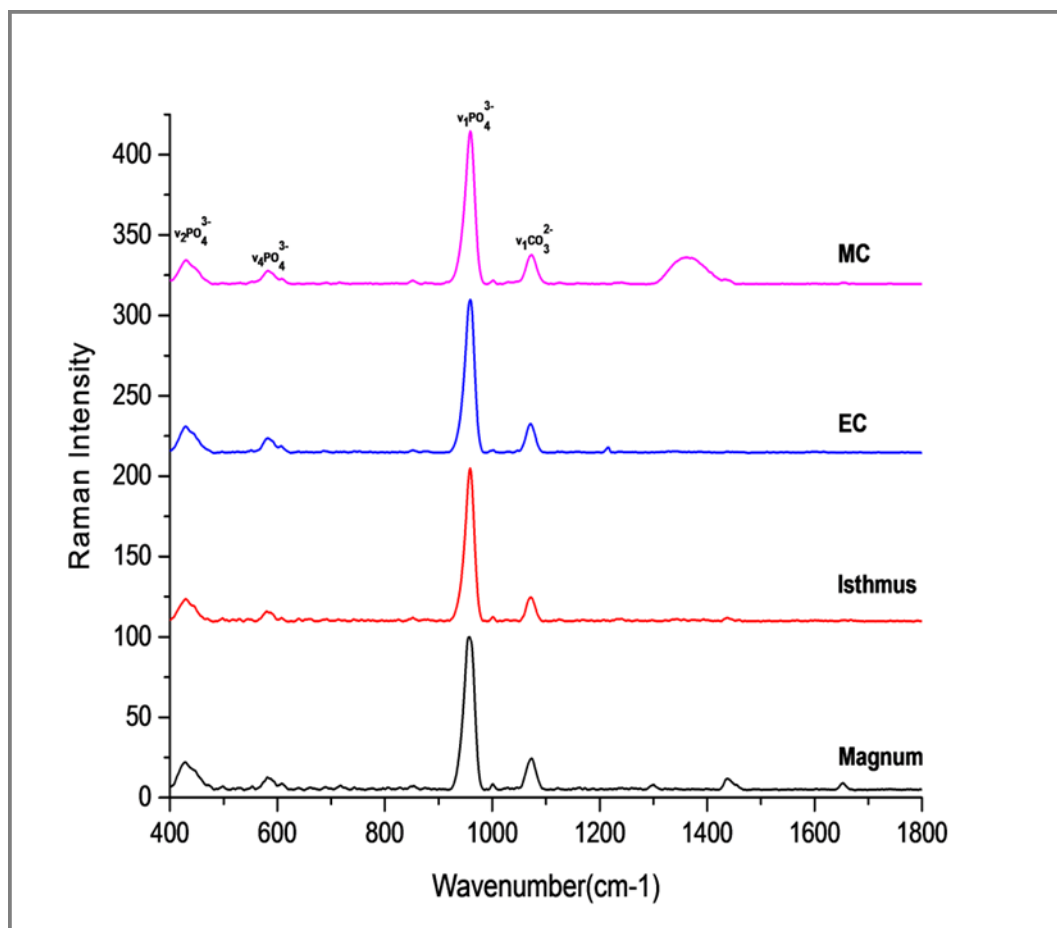
A partir de la anchura FWHM de la reflexión 002, al estar asociada al eje c de los cristales se determina el tamaño del cristal según la dirección del hueso y con la 310 su anchura. Al observar la figura 41, se determina que la longitud de los cristales (Figura 41A) va descendiendo a medida que avanza el ciclo de ovoposición oscilando desde los 20 nm hasta los 12 nm, y la anchura (Figura 41B), sin embargo, se mantiene constante (8-6nm). Esto está de acuerdo con el proceso de disolución de las partículas del mineral. Por otro lado, al analizar los patrones de difracción 2D, se determina que los anillos de Debye-Scherrer (reflexión 002) de las muestras analizadas presentan una intensidad homogénea, indicando de este modo que los cristales de apatito que se encuentran en el hueso medular, presentan una disposición al azar.



**Figura 41.** Parámetros determinados por DRX del hueso medular durante el ciclo de puesta de las gallinas ponedoras. A) Tamaño del cristal en función del plano de reflexión 002. B) Tamaño del cristal en función del plano de reflexión 310. MG: Magnum; IST: Isthmus; EC: Calcificación temprana; EMC; Calcificación temprana-media; MC; Calcificación media; LC: Calcificación tardía.

La espectroscopia Raman al igual que la infrarroja transformada de Fourier (FTIR) proporciona información química y mineral del tejido óseo. En este estudio, la diferencia entre ambas técnicas es que con la espectroscopia Raman se observa (Figura 42) que el carbonato localizado en el hueso medular a lo largo de todas las etapas de calcificación forma parte del apatito ( $1070\text{ cm}^{-1}$ ) del hueso y no lo encontramos como una fase independiente, ya sea de manera amorfa o de manera cristalina como calcita ( $1080\text{ cm}^{-1}$ ). Además de la banda de carbonatos, la banda mineral más destacada es la del fosfato, localizada a  $959\text{ cm}^{-1}$  y característica del apatito carbonatado.



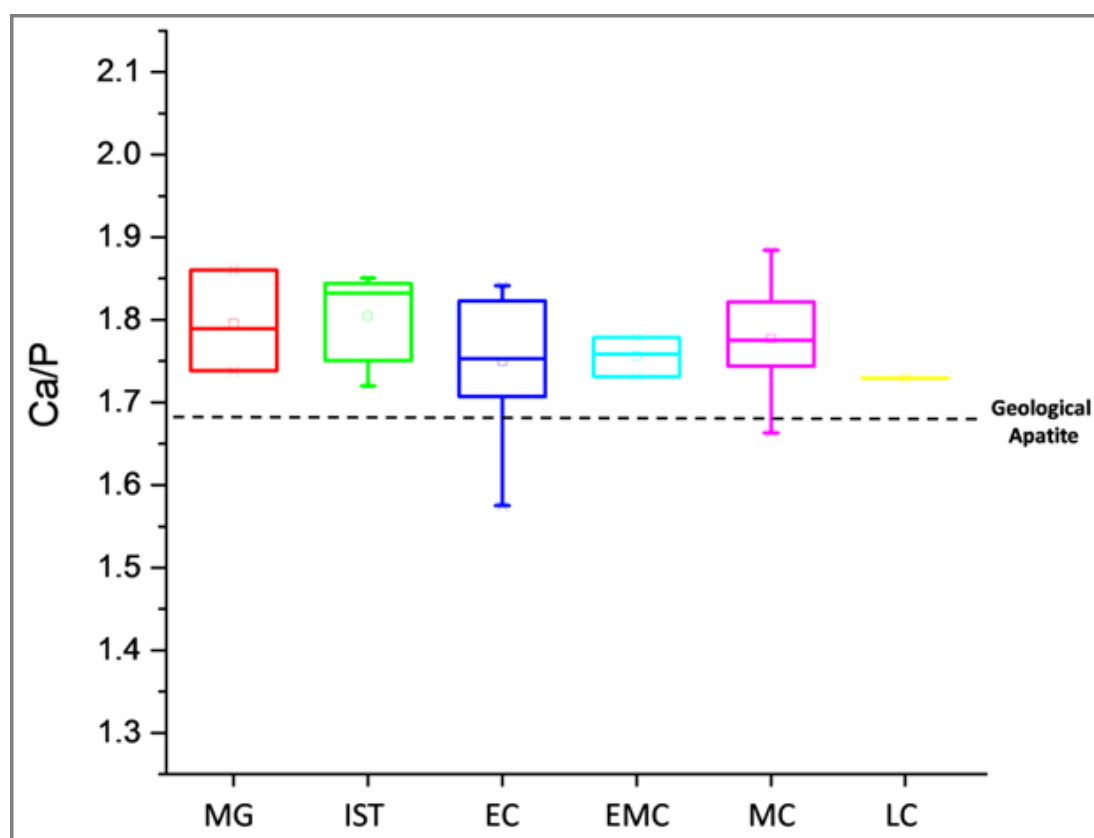


**Figura 42.** Espectros Raman de hueso medular a lo largo del ciclo de ovoposición de las gallinas ponedoras. EC, calcificación temprana; MC, calcificación media.

Por lo tanto, los resultados sugieren que el carbonato localizado en el hueso medular a lo largo de todas las etapas de calcificación está formando parte del apatito del hueso y no se encuentra como una fase independiente. En cualquier caso, el apatito es muy poco cristalino con una alta solubilidad que permite que el hueso medular sea útil para la formación de la cáscara de huevo.

Al analizar por espectroscopia de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) las muestras de hueso medular, se observa que la relación Ca/P (calcio/fosforo) es constante durante todo el proceso de formación de la cáscara de huevo

(Figura 43). Aunque no se ha determinado ninguna fase independiente rica en calcio, los valores son significativamente mayores que el del apatito geológico. Esto indica que existe un exceso de calcio que sin embargo no se ha podido atribuir a ninguna fase mineral independiente. Otros investigadores como Kerschnitzki et al. (2014) lo identifican como zonas de concentración de calcio.



**Figura 43.** Diagrama de la relación Ca/P (calcio/fósforo) de muestras de hueso medular durante el ciclo de puesta de las gallinas ponedoras, calculado a partir de los resultados obtenidos por ICP-OES. MG: Magnum; IST: Isthmus; EC: Calcificación temprana; EMC; Calcificación temprana-media; MC; Calcificación media; LC: Calcificación tardía.

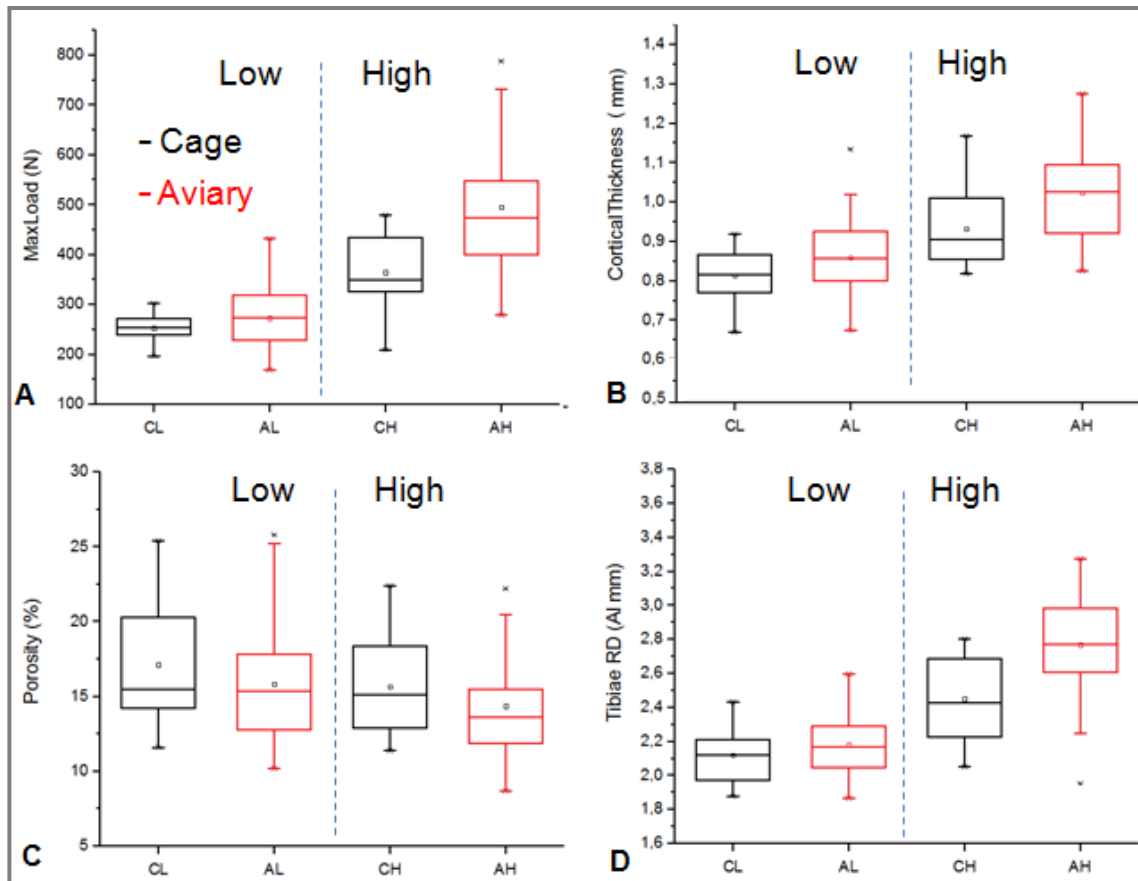
Los resultados de este estudio revelan que, durante el proceso de formación de la cáscara de huevo, el grado de mineralización del hueso medular varía en función de la etapa del ciclo de ovoposición en la que se encuentre. Durante las primeras etapas (durante el día), las gallinas consumen alimentos ricos en calcio, por lo que el grado de mineralización es elevado. A medida que avanza el ciclo de puesta (por la noche) y el huevo va llegando al útero, donde comienza la calcificación de la cáscara, las gallinas necesitan un aporte extra de calcio que proviene del hueso medular. Así el grado de mineralización del hueso medular disminuye. Estos resultados se correlacionan con los resultados obtenidos por Kerschnitzki et al. (2014), en los que durante las etapas iniciales la concentración de calcio en el suero incrementa, y durante las etapas posteriores, disminuye a medida que el calcio es reabsorbido del hueso medular para ser transportado al útero donde tiene lugar la formación de la cáscara (Luck & Scanes., 1979) Además de esto, observaron que los niveles de PTH (hormona paratiroidea), hormona que estimula la movilización del calcio del hueso medular y estimula la reabsorción ósea (Taylor & Belanger, 1969), son bajos durante la fase inactiva, cuando no existe reabsorción ósea ni formación de cáscara de carbonato cálcico y aumentan durante la fase activa. Los niveles de fósforo por su parte, al no ser necesario para la formación de la cáscara, permanecen elevados en todo momento. Finalmente, los resultados descritos anteriormente son apoyados por el análisis estructural de las secciones de hueso medular, en las que se observan que el número y tamaño de las trabéculas que constituyen el hueso medular disminuyen con la calcificación, debido principalmente al aumento de osteoclastos activos durante este periodo (Miller, 1978).

#### *4.5. Estudio de la calidad del tejido óseo en gallinas ponedoras.*

Para entender mejor cómo contribuye a las propiedades mecánicas el hueso medular, se han determinado diversas propiedades (como el grado de mineralización, la cristalinidad mineral y la organización mineral) en el hueso cortical y medular por separado, usando técnicas analíticas como la microscopía electrónica y la espectroscopia de infrarrojos, que son de gran utilidad para entender cómo contribuyen las propiedades del hueso en las propiedades mecánicas. Adicionalmente, se ha estudiado como la actividad física modifica las propiedades del hueso, analizando dos grupos de gallinas, un grupo en el que las gallinas están enjauladas (movilidad reducida, cage), y otro en el que las gallinas se alojan en sistemas aviarios (movilidad no restringida, aviary). Asimismo, se han estudiado muestras de grupos de gallinas que presentan una alta o baja resistencia a la fractura (High y Low line).

##### ***Propiedades del hueso***

Los resultados mostrados en la figura 44 y en la tabla 4, muestran que propiedades mecánicas del hueso, tales como la resistencia ósea, calculada en base a la carga máxima que soporta el hueso antes de su rotura, la densidad radiográfica de la tibia y el espesor del hueso cortical, son significativamente mayores en gallinas de la línea de alta resistencia ósea ( $P < 0.001$ ). Dentro del sistema de alojamiento, aquellas que viven en sistemas aviarios muestran un aumento notable de estas propiedades en comparación con las gallinas que viven en jaulas. En el caso de gallinas alojadas en jaulas, y en las líneas de baja resistencia, la porosidad del hueso cortical es siempre mayor.



**Figura 44.** Propiedades del hueso de gallinas de alta (*High*) y baja (*Low*) resistencia ósea alojadas en sistemas aviarios (rojo) y en jaulas (negro). A) Carga máxima (*Max Load*) aplicada para la fractura. B) Espesor del hueso cortical (*Cortical Thickness*). C) Porosidad del hueso cortical (*Porosity*). D) Densidad radiográfica de la tibia (*Tibiae RD*).

	Low Cage	N	Low Aviary	N	High Cage	N	High Aviary	N	Line P	Housing P	Interaction P
<i>Cortical thickness (mm)</i>	0.81 ± 0.07	12	0.86 ± 0.09	39	0.93 ± 0.11	10	1.02 ± 0.12	29	<0.001	<0.001	0.007
<i>Porosity (%)</i>	17.1 ± 4.5	13	15.8 ± 3.8	40	15.7 ± 3.4	10	14.4 ± 3.6	29	0.120	0.168	0.997
<i>Tibiae RD (Al mm)</i>	2.12 ± 0.16	13	2.18 ± 0.17	40	2.45 ± 0.27	10	2.77 ± 0.30	29	<0.001	0.001	0.023
<i>Max load (N)</i>	253 ± 29	13	273 ± 57	40	364 ± 82	10	496 ± 130	29	<0.001	0.001	0.010

**Tabla 4.** Resumen de las propiedades óseas de gallinas de alta (*High*) y baja (*Low*) resistencia ósea,

*alojadas en sistemas aviarios (Aviary) o en jaulas individuales (Cage). Los valores entre los grupos son significativamente diferentes si  $p < 0.05$ .*

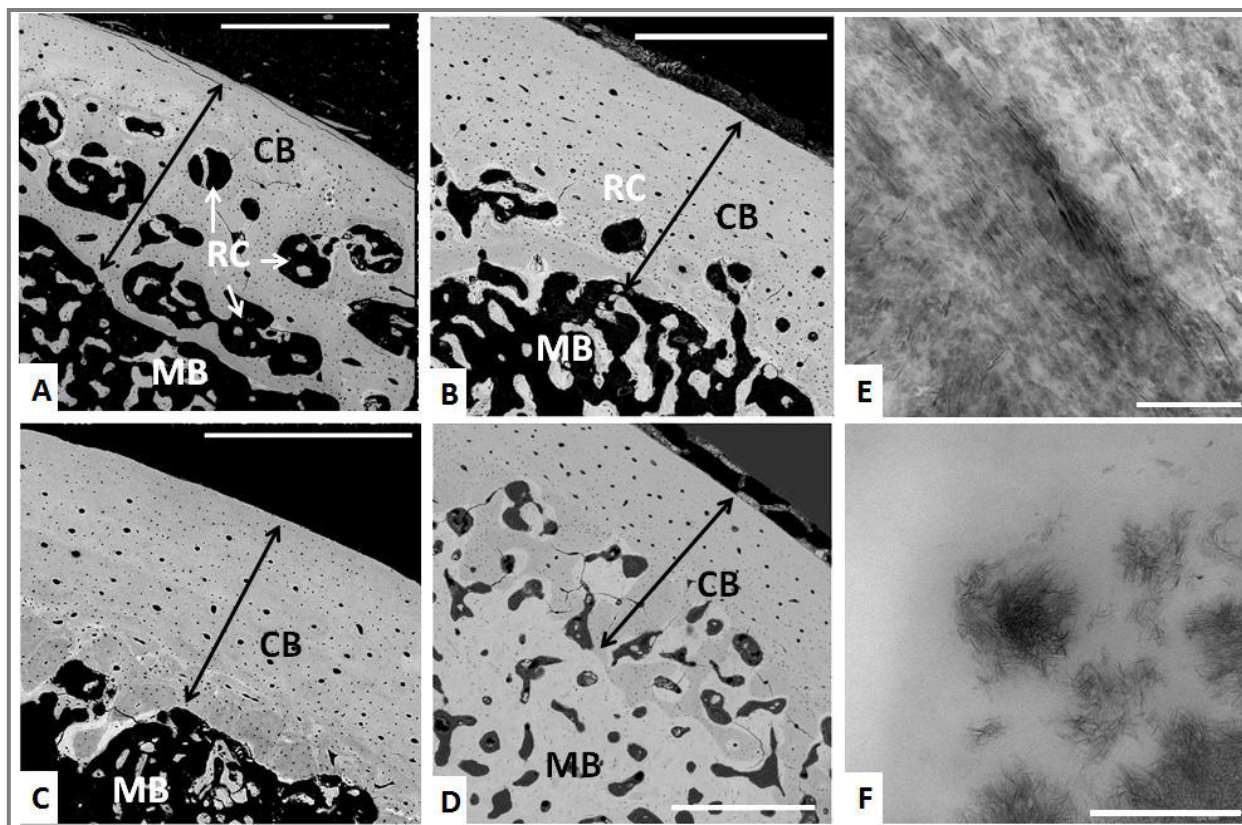
Los análisis de correlación de Pearson revelan que las propiedades mecánicas están positiva y significativamente correlacionadas con el espesor del hueso cortical ( $R=0.64$ ;  $P < 0.001$ ) y más aun con la densidad radiográfica total de la tibia ( $R=0.94$ ;  $P < 0.001$ ), indicando que las propiedades mecánicas están determinadas por la masa ósea (hueso cortical y medular). Además, existe una correlación negativa, en este caso, entre las propiedades mecánicas y la porosidad del hueso cortical ( $R= -0.20$ ;  $P < 0.05$ ).

La figura 45 (A-D) muestra imágenes BSE-SEM de cortes transversales de tibia de gallinas que pertenecen a líneas y sistemas de alojamiento diferentes. En estas secciones, se puede observar una parte externa, constituida por hueso cortical denso, y una cavidad interna de hueso medular. El hueso cortical presenta una estructura caracterizada por la presencia de osteonas, estructuras de tejido óseo depositado alrededor de los vasos sanguíneos, y la cavidad medular, parcialmente mineralizada, formada por trabéculas aisladas de hueso medular. Ambas zonas, presentan un brillo similar, por lo que su grado de mineralización es muy parecido. Al comparar las secciones de ambas líneas y sistemas de alojamientos, se observan diferencias evidentes en cuanto al espesor del hueso cortical, a la porosidad y la cantidad de hueso medular. En general, el hueso cortical de las gallinas que pertenecen a la línea de baja resistencia ósea, es más delgado que el de las gallinas de la línea de alta resistencia. Por otro lado, el hueso de gallinas en jaulas presenta numerosas cavidades de reabsorción, en las que el hueso cortical es reemplazado por hueso medular (Figura 45 A y B). Por el contrario, el hueso cortical de las gallinas alojadas en sistemas aviarios es más grueso y no presentan, generalmente, centros de reabsorción.

Algunas gallinas con alta resistencia ósea y alojadas en sistemas aviarios, tienen trabéculas de hueso medular, altamente mineralizado, que se unen a la superficie interna del hueso cortical. Estas gallinas muestran una resistencia a la fractura muy alta (790 Newton) en comparación con el promedio de las gallinas de alta resistencia ósea (500 Newton).

Al microscopio electrónico de transmisión se observa que el hueso cortical (Figura 45E) está formado principalmente por fibrillas de colágeno alineadas paralelamente al eje longitudinal del hueso, y por una serie de bandas transversales altamente mineralizadas. Estas fibras de colágeno están mineralizadas con cristales de apatito, en forma de aguja, orientados con su eje c paralelo al de las fibrillas, y tienen un tamaño medio de 66 nanómetros (nm) de largo y 6.7 nm de ancho. En el hueso medular (Figura 45F), las fibrillas de colágeno están dispuestas de manera aleatoria, y los cristales de apatito tienen forma de cinta y se distribuyen en haces separados. En este caso, el tamaño de los cristales es menor y alcanzan una longitud de 15 nm y una anchura de 1.7 nm. Estas imágenes TEM no han revelado diferencias significativas entre gallinas de diferentes líneas y/o sistemas de alojamiento. Sin embargo, el análisis del hueso cortical ha demostrado que el grado de mineralización es mayor en gallinas enjauladas.

Con estos resultados se puede concluir que las gallinas que pertenecen a la línea con alta resistencia ósea tienen huesos más fuertes, al presentar una cantidad mayor de masa ósea, que las de la línea de baja resistencia ósea. Por otro lado, debido al incremento del espesor del hueso cortical, a una menor porosidad y a una mayor cantidad de hueso medular, las gallinas alojadas en sistemas aviarios tienen mejores propiedades mecánicas que las gallinas enjauladas.

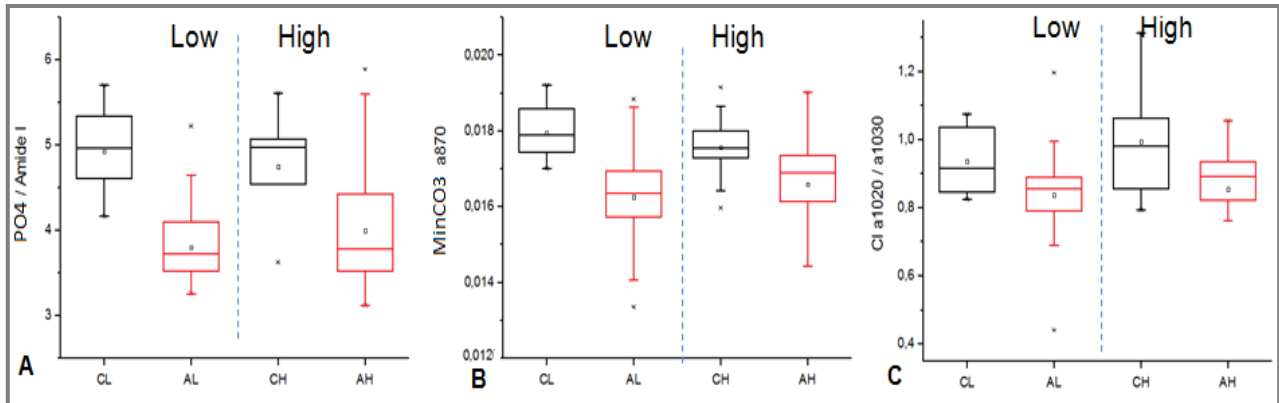


**Figura 45.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido de electrones retrodispersados (BSE-SEM) de secciones transversales de tibia de gallinas con alta o baja resistencia ósea y alojadas en sistemas aviarios o en jaulas. A) Alta resistencia ósea y enjaulada. B) Alta resistencia ósea y enjaulada. C) Baja resistencia ósea y en sistemas aviarios. D) Alta resistencia ósea y en sistemas aviarios. CB: hueso cortical; MB: Hueso medular; RC: Centro de reabsorción. Escala: 500 $\mu$ m. E-F) Imágenes de microscopía electrónica de barrido (TEM). E) Corte longitudinal de hueso cortical. F) Hueso medular.

Al analizar mediante espectroscopia de infrarrojos (ATR-FTIR) el hueso cortical de las gallinas, los parámetros composicionales determinados no revelan ninguna diferencia significativa entre gallinas de alta y baja resistencia ósea al contrario de lo que ocurre entre gallinas enjauladas y alojadas en sistemas aviarios. En la figura 46, se observa que el grado de mineralización ( $PO_4$ /Amidas I) (Figura 46A) en el hueso cortical de las



gallinas enjauladas es mayor (4.84), que el de las gallinas de sistemas aviarios (3.88), presentando de este modo mayor cantidad de mineral (25% más). Por otro lado, tanto el grado de sustitución de carbonatos en el mineral ( $\text{MinCO}_3_{870}$ ) (Figura 46B) como la cristalinidad (CI) (Figura 46C), son menores en el hueso cortical de las gallinas alojadas en sistemas aviarios.

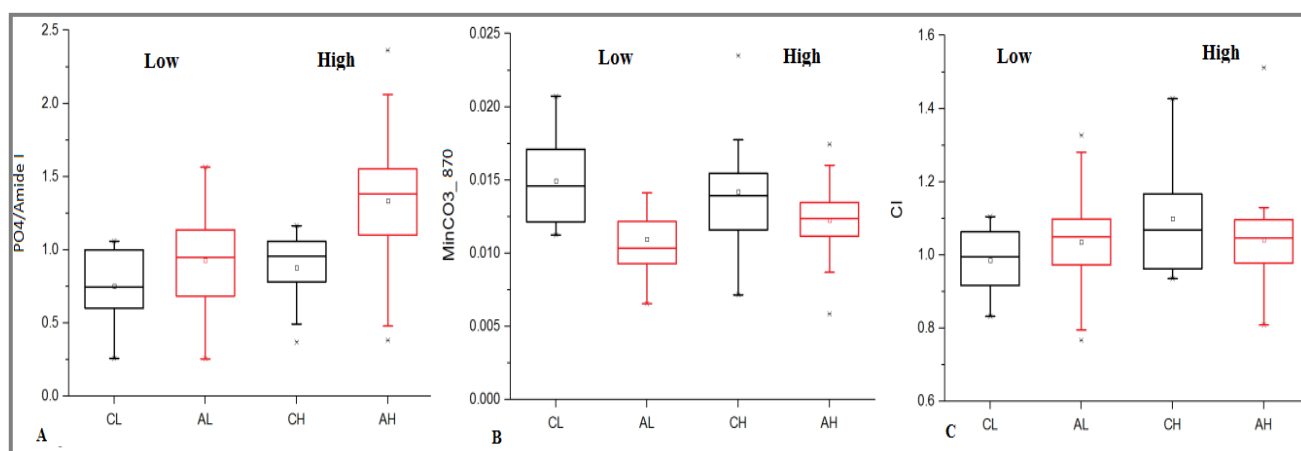


**Figura 46.** Parámetros composicionales determinados por espectroscopia infrarroja de hueso cortical de gallinas de alta (High) y baja (Low) resistencia ósea alojadas en sistemas aviarios (rojo) y en jaulas (negro). A) Grado de mineralización ( $\text{PO}_4/\text{Amide I}$ ). B) Grado de sustitución de carbonatos en el mineral del hueso ( $\text{MinCO}_3_{870}$ ). C) Índice de cristalinidad (CI).

De este modo, el hueso cortical de las gallinas alojadas en sistemas aviarios está menos mineralizado y es menos cristalino que el de las gallinas enjauladas. Estas características son típicas de una mineralización ósea más reciente y menos madura, que indica que el hueso cortical de estas gallinas es metabólicamente más activo y está en continua renovación, provocando que el tejido no se mineralice completamente o no alcance madurez.

En cuanto al hueso medular (Figura 47), los parámetros composicionales muestran que las gallinas con alta resistencia a la fractura ósea o aquellas que viven en sistemas aviarios,

tiene mayor cantidad de mineral óseo medular, que las gallinas con huesos de baja resistencia o que viven en jaulas individuales. Particularmente, el hueso medular de gallinas con alta resistencia ósea y alojadas en sistemas aviarios, tienen mayor grado de mineralización medular ( $PO_4/Amidas I = 1.41$ ) (Figura 47A). El grado de cristalinidad (Figura 47C) en este caso, no experimenta ningún tipo de diferencia significativa. Sin embargo, el tipo de alojamiento sí parece afectar a la composición del mineral óseo medular, siendo la cantidad de sustitución de carbonatos en el mineral ( $MinCO_3_{870}$ ) (Figura 47B) significativamente mayor para las gallinas alojadas en sistemas aviarios. Esto indica, que el hueso medular de estas gallinas tiene mayor cantidad de hueso medular, menos maduro y por lo tanto tiene una tasa metabólica y una tasa de remodelación muy alta.



**Figura 47.** Parámetros composicionales determinados por espectroscopia infrarroja de hueso medular de gallinas de alta (High) y baja (Low) resistencia ósea alojadas en sistemas aviarios (rojo) y en jaulas (negro). A) Grado de mineralización ( $PO_4/Amide I$ ). B) Grado de sustitución de carbonatos en el mineral del hueso ( $MinCO_3_{870}$ ). C) Índice de cristalinidad (CI).

### *Influencia de las propiedades del tejido óseo en las propiedades mecánicas*

Para comprender mejor la contribución del hueso cortical y del hueso medular en las propiedades mecánicas del hueso, se ha diseñado un modelo de regresión lineal multivariable. Para el hueso cortical, los parámetros que se han considerado son: el espesor cortical, el grado de mineralización y la porosidad. En el caso del hueso medular, el único parámetro utilizado ha sido el grado de mineralización. Los datos de las propiedades mecánicas del grupo de gallinas enjauladas y del grupo de gallinas alojadas en sistemas aviarios, se han tratado por separado debido a las diferencias tan evidentes entre propiedades.

En el caso de las gallinas enjauladas, la contribución del hueso cortical y del hueso medular es moderada. Cada tipo de hueso, puede explicar solo el 20% de la varianza de las propiedades mecánicas (hueso cortical:  $R^2 = 0.20$ ;  $P = 0.05$ ; hueso medular:  $R^2 = 0.21$ ;  $P = 0.03$ ). Poner las propiedades de ambos tejidos en el modelo, no mejoró el ajuste ( $R^2 = 0.21$ ;  $P = 0.03$ ). En cuanto al grupo de gallinas alojadas en sistemas aviarios, la contribución del hueso cortical y del hueso medular es alta. Las propiedades óseas del hueso cortical pueden explicar hasta un 59% de la varianza de las propiedades mecánicas del hueso (hueso cortical:  $R^2 = 0.59$ ). Al poner las propiedades del hueso medular en el modelo, el ajuste mejoró significativamente ( $R^2 = 0.68$ ). De este modo, en este grupo de gallinas, ambos tejidos contribuyen significativamente a las propiedades mecánicas del hueso, aunque la contribución del hueso cortical es notablemente más importante.

Las propiedades mecánicas del hueso no están sólo determinadas por la masa ósea total, sino también por su porosidad, su organización estructural y la calidad de los componentes que lo forman (Zimmermann et al., 2011). Los parámetros de la calidad

ósea que se utilizan para evaluar los riesgos de fractura son la cristalinidad mineral, la madurez del colágeno, así como su distribución y organización en cada uno de las estructuras óseas (Fratzl et al., 2004; Gourion-Arsiquaud., 2009).

Los resultados de este estudio demuestran que las propiedades mecánicas del hueso están determinadas principalmente por la masa ósea siendo estas mejores en la línea High (de alta resistencia ósea). Sin embargo, el resto de las propiedades analizadas (grado de mineralización, sustitución de carbonatos e índice de cristalinidad), tanto en el hueso cortical como en el medular, no difieren en cuanto a resultados en ambas líneas. El aumento de masa ósea en gallinas High (de alta resistencia ósea) se atribuye a una mejora en el proceso de formación ósea durante la cría de las aves y a una menor reabsorción del hueso, debido a una densidad reducida de osteoclastos, durante el periodo de puesta (Fleming et al., 2006; Whitehead, 2004).

El tipo de alojamiento ha tenido una gran influencia en las propiedades óseas, presentando un marcado aumento en la resistencia ósea aquellas gallinas alojadas en sistemas aviarios. Este aumento en la resistencia se debe al incremento del grosor del hueso cortical, a la existencia de menor porosidad cortical y al aumento de hueso medular, por lo que la actividad física estimula la formación de hueso medular y reduce la reabsorción de hueso cortical (Jendral et al., 2008; Aguado et al., 2015). Por el contrario, en las gallinas alojadas en jaulas, la falta de ejercicio físico estimula la reabsorción ósea del hueso cortical, y como consecuencia la formación de grandes cavidades de reabsorción. En cualquier caso, las gallinas que presentan alta resistencia parecen tener mayor capacidad para formar hueso y responder a estímulos mecánicos que las gallinas con baja resistencia ósea. Pudiendo ser debido o bien a un aumento del metabolismo o a una mayor capacidad de absorción de calcio. De hecho, el ejercicio físico provoca un aumento de la síntesis de vitamina D, que estimula la absorción intestinal de calcio (Yeh et al., 1989).

Por otro lado, durante la mineralización del hueso y durante el remodelado, existen cambios composicionales y estructurales bien definidos del tejido (Bonucci & Gherardi, 1975; Glimcher, 1998). Particularmente, el hueso cortical de las gallinas alojadas en sistemas aviarios, está menos mineralizado, menos maduro y menos organizado que el de las gallinas alojadas en jaulas, lo que indica que el hueso es metabólicamente más activo y que tiene mayor tasa de renovación. Además, estas gallinas son muy eficaces formando gran cantidad de hueso medular, caracterizado por ser aún menos cristalino que el hueso cortical y por presentar una tasa de renovación mucho más rápida (Van de Velde et al., 1984; Kerschnitzki et al., 2014).

En conclusión, las propiedades mecánicas óseas están determinadas por muchas de las propiedades óseas que se han calculado en este estudio (grado de mineralización, porosidad, tipo de tejido óseo y organización estructural). El hueso cortical es el que contribuye más en las propiedades mecánicas del hueso, mientras que el hueso medular lo hace en la resistencia ósea, cuando está presente en mayores cantidades y altamente mineralizado. Por otro lado, el tipo de alojamiento e indirectamente la actividad física de las gallinas, produce cambios en las propiedades del material óseo, que están relacionados con el metabolismo óseo. De manera que, las gallinas alojadas en sistemas aviarios, con mayor actividad física, estimulan la formación de tejido óseo y la renovación de este.



## *Conclusiones*

---

## 5. Conclusiones.

1. El proceso de calcificación de la cáscara de huevo se inicia con la agregación masiva de nanopartículas de carbonato cálcico alrededor de los núcleos mamilares de la membrana externa de la cáscara. La mayoría de los cristales se disuelven y algunos que permanecen crecen de manera progresiva dando lugar a los cristales columnares que forman la capa empalizada de la cáscara de huevo. En Guinea Fowl, hay un cambio microestructural a mitad de espesor en el que los cristales disminuyen de manera abrupta su tamaño y adoptan una orientación aleatoria. Estas características microestructurales le confiere a la cáscara de Guinea Fowl unas propiedades mecánicas muy superiores a la de la cáscara de huevo de gallinas.

2. La mineralización de la cáscara de huevo ocurre a través de una fase amorfa de carbonato cálcico, con una proto-estructura calcítica, transitoria que es metaestable y que da paso progresivamente a la calcita cristalina. El carbonato amorfo se transforma directamente en calcita sin la existencia de ninguna fase intermedia.

3. La espectroscopia infrarroja (ATR-FTIR) ha sido la técnica analítica de mayor utilidad para caracterizar la superficie de la cáscara de huevo y evaluar los cambios que sufre la cutícula a lo largo del tiempo. Cambios que llevan asociados un deterioro de las propiedades de la cutícula y de su capacidad de resistencia a la penetración bacteriana. Los análisis composicionales de la cutícula obtenidos mediante esta técnica, pueden ser de gran utilidad para los programas de selección dirigidos a mejorar la seguridad y calidad de los huevos.

4. La cutícula juega un papel muy importante en la seguridad alimentaria del huevo y es altamente dependiente de la edad de la gallina y de la frescura del huevo. Los huevos puestos por gallinas viejas presentan cutículas con menor grado de recubrimiento, menor



grado de glicosilación y menor contenido de componentes lipídicos, lo que indica que la calidad de la cutícula es peor en comparación con la de los huevos puestos por gallinas jóvenes.

5. El grado de madurez de la cutícula influye en la penetración bacteriana de *Salmonella*, y no es hasta las seis horas después de la ovoposición cuando la cutícula se consolida y adquiere mayor resistencia contra la contaminación bacteriana. Huevos con una cutícula inmadura, presentan una tasa de penetración más alta que huevos con una cutícula madura. Otro de los factores que afectan a la tasa de penetración de *Salmonella*, es la edad de la gallina, siendo esta más baja en huevos puestos por gallinas jóvenes.

6. El tejido óseo de la tibia de las gallinas ponedoras está constituido estructuralmente por dos tipos de hueso. El hueso cortical, con función estructural y localizado en la parte externa de la tibia, y el hueso medular, formado por numerosas trabéculas óseas en la cavidad medular, que funciona como reservorio de calcio.

7. El hueso medular, formado por apatito poco cristalino con un alto grado de carbonatos, es un tipo de hueso metabólicamente muy activo que está en constante proceso de remodelación. Durante el ciclo de ovoposición de la cáscara de huevo, el grado de mineralización del hueso medular varía. Antes de la calcificación de la cáscara en el útero, los niveles de calcio son elevados, por lo que el grado de mineralización del hueso es elevado. Una vez que el huevo llega al útero, la demanda de calcio aumenta y se activa la reabsorción del hueso medular provocando una disminución del grado de mineralización de este.

8. Las propiedades mecánicas del hueso están determinadas por el tipo de tejido óseo, por su grado de mineralización, por su porosidad y por su organización estructural. Además, los resultados mostraron, que aquellas gallinas que pertenecen a la línea genética con

mayor resistencia ósea presentan mejores propiedades óseas que las que pertenecen a la línea de baja resistencia ósea, y se debe principalmente al aumento de la masa ósea (hueso cortical más grueso y mayor cantidad de hueso medular

9. El tipo de alojamiento, y por lo tanto la actividad física de las gallinas ponedoras, influyen en las propiedades del material óseo. De manera que las gallinas alojadas en jaulas con movilidad restringida tienen peor calidad ósea, huesos menos fuertes, con menor cantidad de hueso medular y menor tasa de remodelación, que aquellas alojadas en aviarios que no tienen restricción en el movimiento.

## *Conclusions.*

1. The eggshell calcification process begins with the massive aggregation of calcium carbonate nanoparticles around the mammillary nuclei of the outer eggshell membrane. Most of crystals are dissolved and some remaining grow progressively giving rise to columnar crystal that form the palisade layer of the eggshell. In Guinea Fowl, there is a microstructural change at half-thickness in which the crystals size decreases abruptly and take a random orientation. These microstructural characteristics give to Guinea Fowl eggshell better mechanical properties than hen's eggshell.

2. Eggshell mineralization in hens Guinea Fowl occurs through an amorphous phase of calcium carbonate with a transient calcitic proto-structure that is metastable and progressively gives rise to crystalline calcite. Amorphous carbonate is transformed directly into calcite without the existence of any intermediate phase.

3. Infrared spectroscopy (ATR-FTIR) has been the most useful analytical technique to characterize the eggshell surface and evaluate changes suffered by the cuticle over time. Changes that have associated a deterioration of cuticle properties and its resistance of bacterial penetration. The cuticle compositional analysis obtained by this technique could be useful for selection programs aimed to improve the quality and safety of eggs.

4. The cuticle plays an important role in food safety of eggs and is highly dependent on hen age and egg freshness. Eggs laid by older hens have cuticles with a poor degree of coverage, lower degree of glycosylation and lower content of lipid components indicating that the cuticle quality is worse than eggs laid by young hens.

5. The degree of cuticle maturity influences on *Salmonella* penetration and it is not until six hours after oviposition when the cuticle is consolidated and acquires optimum

mechanical properties and becomes most resistant against bacterial contamination. Eggs with an immature cuticle have a higher *Salmonella* penetration rate than eggs with a mature cuticle. Another important factor contributing to the risk of bacterial penetration is the age of hens, which is lower in eggs laid by young hens.

6. Tibiae bone tissue of laying hens is constituted structurally by two types of bone. The cortical bone, with an structural function and located in the outer part of tibiae, and the medullary bone, a special type of bone in the medullary cavity, which is composed of numerous trabeculae and whose main function is to act as a calcium reservoir for eggshell formation.

7. The medullary bone is formed by poor crystalline apatite with a high degree of carbonates. It is a metabolically active tissue in constant remodelling process. During the eggshell oviposition cycle, the degree of mineralization of the medullary bone changes. Before eggshell calcification in the uterus carbonate levels are elevated in medullary bone and decreases during the active eggshell formation. When the egg reaches the uterus, the calcium demand increases and begins the medullary bone resorption, causing a lower degree of mineralization of bone.

8. Bone mechanical properties are determined by the type of bone tissue, its degree of mineralization, porosity and its structural organization. In addition, the results showed that hens with high bone breaking strength have better bones properties than hens with low bone breaking strength, and is mainly due to an increased bone mass (thicker cortical bone and higher amount of medullary bone).

9. The type of housing and therefore the physical activity of laying hens have a greater influence on bone material properties. Thus, birds housed in cage system with restricted mobility have poorer bone quality, thinner, more porous and less strong bones, as well as

lower amount of medullary bone. They also have lower bone turnover rates compared to birds housed in aviary system without movement restriction.



## *Bibliografía*

---

## 6. Bibliografía.

- Addadi, L., Moradian, J., Shay, E., Maroudas, N.G. & Weiner, S. (1987). A chemical model for the cooperation of sulfates and carboxylates in calcite crystal nucleation -Relevance to biomineralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84, 2732-2736.
- Aguado, E., Pascaretti-Grizon, F., Goyenvalle, E., Audran, M. & Chappard, D. (2015). Bone mass and bone quality are altered by hypoactivity in the chicken. *PLoS ONE*, 10(1), e0116763.
- Al-Qtaitat, A.I. & Aldalaen, S.M. (2014). A review of non-collagenous proteins; their role in bone. *American Journal of Life Sciences*, 2(6), 351-355.
- Anderson, H.C., Sipe, J.B., Hesse, L., Dharmyramaju, R., Atti, E., Camacho, N.P. & Millán, J.L. (2004). Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice. *The American Journal of Pathology*, 164(3), 841-847.
- Arias, J.L., Fink, D.J., Xiao, S.Q., Heuer A.H. & Caplan, A.I. (1993). Biomineralization and eggshells: cell-mediated acellular compartments of mineralized extracellular matrix. *International Review of Cytology*, 145, 217-250.
- Arias, J.L., Nakamura, O., Fernández, M.S., Wu, J.J., Knigge, P., Eyre, D.R. & Caplan, A. I. (1997b). Role of type X collagen on experimental mineralization of eggshell membranes. *Connective Tissue Research*, 36, 21-33.



- Arsenault, A.L. (1989). A comparative electron microscopic study of apatite crystals in collagen fibrils of rat bone, dentin and calcified turkey leg tendons. *Bone and Mineral*, 6(2), 165-177.
- Ascenzi, A., Franoics, C. & Bocciarelli, S. (1963). On the bone induced by oestrogens in birds. *Journal of Ultrastructure Research*, 8, 491–505.
- Bain, M. M., McDade, K., Burchmore, R., Law, A., Wilson, P.W., Schmutz, M., Preisinger, R. & Dunn, I.C. (2013). Enhancing the eggs natural defence against bacterial penetration by increasing cuticle deposition. *Animal Genetic*, 44 (6), 661-668.
- Baker, J. R. & Balch, D.A. (1962). A study of the organic material of hen's-egg shell. *Biochemical Journal*, 82, 352–361.
- Baron R. (1993). Anatomy and ultrastructure of bone. En: *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. (2ª Edición). Nueva York: Raven Press.
- Bernabé, A., Navarro, J.A. & Pallarés, F.J. (2012). Tejido óseo: concepto y composición. *Citología e Histología Veterinaria*. Universidad de Murcia.
- Berrang, M. E., Frank, J. F., Buhr, R. J., Bailey, J. S., Cox, N. A., & Mauldin, J. (1998). Eggshell characteristics and penetration by Salmonella through the productive life of a broiler breeder flock. *Poultry Science*, 77, 1446-1450.
- Bhale, S., No, H.H., Prinyawiwatkul, W., Farr, A. J. & Nadarajah, K. (2003). Chitosan coating improves shelf life of eggs. *Journal of Food Science*, 68:2378–2383.

- Board, R. G. & Halls, N.A. (1973). The cuticle: A barrier to liquid and particle penetration of the shell of the hen's egg. *British Poultry Science*, 14, 69–97.
- Board, R. G. & Tranter, H. S. (1995). The microbiology of eggs. En W. J. Stadelman & O.J. Cotterill (eds), *Egg Science and Technology* (pp. 81-104). Londres, UK: The Haworth Press.
- Bonucci, E. & Gherardi, G. (1975). Histochemical and electron microscope investigations on medullary bone. *Cell Tissue Research*, 163, 81–97.
- Boskey, A. L., Karsenty, G., & McKee, M. D. (2000). Mineral characterization of bones and soft tissues in matrix gla protein deficient mice. En M. Goldberg, A. Boskey & C. Robinson (eds), *Chemistry and Biology of Mineralized Tissues* (pp. 63–67). Chicago, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons.
- Boskey, A.L. (2006). Mineralization, Structure and Function of Bone. En M.J. Seibel., S.P. Robins & J.P. Bilezikian (eds), *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism* (201-212). Academic Press.
- Boskey, A.L. (2007). Mineralization of bones and teeth. *Elements*, 3, 387-393.
- Boskey, A.L. (2013). Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *BoneKEy reports*, 2, 447.
- Brown, W. E., Smith, J. P., Lehr, J. R. & Frazier, A. W. (1962). Octacalcium phosphate and hydroxyapatite. *Nature*, 196, 1048–1055.

- Buckwalter, J.A., Glimcher, M.J., Cooper, R.R. & Recker, R. (1995). Bone biology. 2. Formation, form, modelling, remodeling and regulation of cell-function. *Journal of Bone and Joint Surgery – American Volume*, 77A, 1276–1289.
- Buckwalter, J.A., Glimcher, M.J., Cooper, R.R. & Recker, R. (1996). Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *Instructional Course Lectures*, 45, 387–99.
- Burguer, E.H. & Klein-Nulend, J. (1999). Mechanotransduction in bone-role of the canalicular network. *FASEB Journal*, 13, 101-112.
- Canalis, E., Economides, A.N. & Gazzerro, E. (2003). Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocrine Reviews*, 24, 218–235.
- Caner, C., & Cansiz, O. (2008). Chitosan coating minimises eggshell breakage and improves egg quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 56-61.
- Chien, Y. C., Hincke, M.T., Valia, H. & Mckee, M.D. (2008). Ultrastructural matrix–mineral relationships in avian eggshell, and effects of osteopontin on calcite growth in vitro. *Journal of Structural Biology*, 163, 84–99.
- Comar, C.L. & Driggers, J.C. (1949). Secretion of radioactive calcium in the hen's egg. *Science*, 109 (2829), 282.
- Cullity, B.D. (1977). *Elements of X-Ray Diffraction*, New York, Addison Wesley.
- De la Mata, J. (2010). Remodelación ósea. En Sociedad Española de Reumatología, *Manual de enfermedades ósea*. (2ª Edición). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.

- Delgado-López, J.M., Lafisco, M., Rodríguez, I., Tampieri, A., Prat, M. & Gómez-Morales, J. (2012). Crystallization of bioinspired citrate-functionalized nanoapatite with tailored carbonate content. *Acta Biomaterialia*, 8(9), 3491-3499.
- Dennis, J. E., Xiao, S.Q., Agarwal, M., Fink, D.J., Heuer, A. H. & Caplan, A.1. (1996). Microstructure of matrix and mineral components of eggshells from white leghorn chicken (*Gallus gallus*). *Journal of Morphology*, 228, 287-306.
- De Reu, K., Grijspeerdt, K., Messens, W., Heyndrickx, A. & Uyttendaele, M. (2006). Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*, 112, 253-260.
- Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B., Dunstan, C., Smith, E., Bonadio, J., Golsdtein, S., Gundberg, C., Bradley, A. & Karsenty, G. (1996). Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*, 382 (6590), 448-452.
- Everts, V., Delaisse, J. M., Korper, W., Jansen, D. C., Tigchelaar-Gutter, W., Saftig, P. & Beertsen, W. (2002). The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 17, 77-90
- Favus, M.J. (1999). *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. William & Wilkins.
- Fernandez, M.S., Araya, M. & Arias, J.L. (1997). Eggshells are shaped by a precise spatio-temporal arrangement of sequentially deposited macromolecules. *Matrix Biology*, 16, 13-20.

- Fernández, M.S. & Arias, J.L. (2000). La cáscara del huevo: Un modelo de biomineralización. *Monografías de Medicina Veterinaria*, Vol. 20(2).
- Fernandez, M.S., Moya, A., Lopez, L. & Arias, J.L. (2001). Secretion pattern, ultrastructure and function of extracellular matrix molecules involved in eggshell formation. *Matrix Biology*, 19, 793–803.
- Fernández-Tresguerre, I., Alobera, M.A., Del Canto, M. & Blanco, L. (2005). Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido óseo. *Medicina Oral Patológica Oral y Cirugía Bucal*, 11, 47-51.
- Fink, D.J., Caplan, A.I. & Heuer, A.H. (1992). Eggshell mineralization: a case study of a bioprocessing strategy. *MRS Bulletin*, 20 (10), 27–31.
- Fleming, R.H., McCormack, H.A., Mcteir, L. & Whitehead, C.C. (2006). Relationships between genetic, environmental and nutritional factors influencing osteoporosis in laying hens. *British Poultry Science*. 47, (6), 742-755.
- Fradinger, E.E. & Zanchetta, J.R. (2001). Vitamin D and bone mineral density in ambulatory women living in Buenos Aires, Argentina. *Osteoporosis International*, 12: 24-27.
- Fraser, A.C., Bain, M.M. & Solomon, S.E. (1998). Organic matrix morphology and distribution in the palisade layer of eggshells sampled at selected periods during lay. *British Poultry Science*, 39, 225-228.
- Fratzl, P., Gupta, H.S., Paschalis, E.P. & Roschger, P. (2004). Structure and mechanical quality of the collagen-mineral nano-composite in bone. *Journal of Materials Chemistry*, 14, 2115–23.

- Gautron, J., Hincke, M.T. & Nys, Y. (1997). Precursor matrix proteins in the uterine fluid change with stages of eggshell formation in hens. *Connective Tissue Research*, 36,195-210.
- Gautron, J., Murayama, E., Vignal, A., Morisson, M., McKee, M.D., Réhault, S., Labas, V., Belghazi, M., Vidal, ML.,Nys, Y. & Hincke, M.T. (2007). Cloning of ovocalyxin-36, a novel chicken eggshell protein related to lipopolysaccharide-binding proteins, bactericidal permeability-increasing proteins, and plunc family proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 5273–5286.
- George, A. & Veis, A. (2008). Phosphorylated proteins and control over apatite nucleation, crystal growth, and inhibition. *Chemical Review*, 108(11), 4670-4693.
- Glimcher, M.J. (1992). The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification. En: F.L. Coe & J. Favus, *Disorders of Bone and Mineral Metabolism* (pp 265–286). New York, Raven Pres.
- Glimcher, M. J. (1998). The nature of the mineral phase in bone: Biological and clinical implications. En L. V. Alvioli & S.M. Krane. *Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders* (pp 23-50). San Diego, CA. Academic Press.
- Gokhale, J., Robey, P.G. & Boskey, A.L. (2001). The Biochemistry of Bone. En: R. Marcus., D. Feldman., J. Kelsey (eds). *Osteoporosis*. 2nd Vol. 1. (pp. 107-189). San Diego, Academic Press.
- Gourion-Arsiquaud, S., Faibish, D., Myers, E., Spevak, L., Compston, J, Hodsman, A., Shane, E.,Recker, R.R., Boskey, E.R & Boskey, A.L. (2009). Use of FTIR spectroscopic imaging to identify parameters associated with fragility fracture. *Journal of Bone and Mineral Research*, 24, 1565–71.

- Hasiak, R.J., Vadehra, D.V. & Baker, R.C. (1970). Lipid composition of the egg exteriors of the chicken *Gallus Gallus*. *Comparative biochemistry and physiology*, 37(3), 429-435.
- Hernandez-Hernandez, A., Gomez-Morales, J., Rodriguez-Navarro, A.B., Gautron, J., Nys, Y. & Garcia-Ruiz, J.M. (2008). Identification of some active proteins in the process of hen eggshell formation. *Crystal Growth Design*, 8, 4330-4339.
- Herzberg, G.H. (1991). *Infrared and Raman Spectra of Polyatomic Molecules*. New York, Krieger.
- Hincke, M.T., Nys, Y., Gautron, J., Mann, K., Rodríguez-Navarro, A. & McKee, M. (2012). The eggshell: Structure, composition and mineralization. *Frontiers in Bioscience*. 17, 1266-1280.
- Hodge, A.J. (1989). Molecular models illustrating the possible distributions of 'holes' in simple systematically staggered arrays of type I collagen molecules in native-type fibrils. *Connective Tissue Research*, 21 (1-4), 137-147.
- Hou, X. & Jones, B.T. (2000). Inductively Coupled Plasma/Optical Emission Spectrometry En: *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (pp. 9468-9485). Chichester: John Wiley & Sons.
- Hu, Y.Y., Rawal, A. & Schmidt-Rohr, K. (2010). Strongly bound citrate stabilizes the apatite nanocrystals in bone. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 22425-22429.

- Jendral, M. J., Korver, D. R., Church, J. S. & Feddes, J. J. R. (2008). Bone mineral density and breaking strength of White Leghorns housed in conventional, modified, and commercially available colony battery cages. *Poultry Science*, 87, 838–837.
- Jimenez-Lopez, C., Caballero, E., Huertas, F.J. & Romanek, C.S. (2001). Chemical, mineralogical and isotope behavior, and phase transformation during the precipitation of calcium carbonate minerals from intermediate ionic solution at 25 °C. *Geochimica Cosmochimica Acta*, 65, 3219–3231.
- Jones, D. R., Anderson, K.E., Curtis, P.A. & Jones, F.T. (2002). Microbial contamination in inoculated shell eggs: I. Effects of layer strain and hen age. *Poultry Science*, 81:715–720.
- Kerschnitzki, M., Zander, T., Zaslansky, P., Fratzl, P., Shahar, R. & Wagermaier, W. (2014). Rapid alterations of avian medullary bone material during the daily egg-laying cycle. *Bone*, 69 109–117.
- Khajepour, M., Dashnau, J.L. & Vanderkooi, J.M. (2006). Infrared spectroscopy used to evaluate glycosylation of proteins. *Analytical Biochemistry*, 348, 40–48.
- Kodali, V.K., Gannon, S.A., Sivakumar, P., Sonali, R., Polenova, T. & Thorpe, C. (2011). A novel disulfide-rich protein motif from avian eggshell membranes. *PLoS ONE*, 6(3), e18187.
- Kohler, P.O., Grimley, P.M & O'Malley, B.W. (1968). Protein synthesis: differential stimulation of cell-specific proteins in cells of the chick oviduct. *Science*, 160, 86–87.



- Landis, W.J., Hodgens, K.J., Arena, J., Song, M.J. & McEwen, B.F. (1996). Structural relations between collagen and mineral in bone as determined by high voltage electron microscopic tomography. *Microscopy Research and Technique*, 33 (2), 192-202.
- Leleu, S., Messens, W., De Reu, K., De Preter, S. & Herman, L. (2011). Effect of egg washing on the cuticle quality of brown and white table eggs. *Journal of Food Protection*, 74, 1649-1654.
- López-Macipe, J., Gómez-Morales, J. & Rodríguez-Clemente, R. (1998). Nanosized hydroxyapatite precipitation from homogeneous calcium/citrate/phosphate solutions using microwave and conventional heating. *Advanced Materials*, 10, 49-53.
- Luck, M.R. & Scanes, C.G. (1979). The relationship between reproductive activity and blood calcium in the calcium deficient hen. *British Poultry Science*, 20(6), 559-564.
- Luckman, S.P., Rees, E. & Kwan, A.P. (2003). Partial characterization of cell-type X collagen interactions. *The Biochemical Journal*, 372, 485-493.
- Marie, P., Labas, V., Brionne, A., Harichaux, G., Hennequet-Antier, C., Nys, Y. & Gautron, J. (2015). Quantitative proteomics and bioinformatic analysis provide new insight into protein function during avian eggshell biomineralization. *Journal of Proteomics*, 113, 178-193.
- Matteini, M. & Moles, A. (2001). *La química en la restauración*, San Sebastián, España, Editorial Nerea.

- Meikle, M.C., Bord, S., Hembry, R.M., Compston, J., Croucher, P.I. & Reynolds, J.J. (1992). Human osteoblasts in culture synthesize collagenase and other matrix metalloproteinases in response to osteotropic hormones and cytokines. *Journal of Cell Science*, 103, 1093-1099.
- Messens, W., Grijspeerdt, K & Herman, L. (2005). Eggshell penetration by *Salmonella*: A review. *World's Poultry Science Journal*, 61:71-85.
- Miller, S.C. (1977). Osteoclast cell-surface changes during the egg-laying cycle in Japanese quail. *The Journal of Cell Biology*, 75(1), 104-118.
- Miller, S.C. (1978). Rapid activation of the medullary bone osteoclast cell surface by parathyroid hormone. *The Journal of Cell Biology*, 76(3), 615-618.
- Miyamoto, T., Horie, T., Baba, E., Sasai, K., Fukata, T., & Arakawa, A. (1998). *Salmonella* penetration through eggshell associated with freshness of laid eggs and refrigeration. *Journal of Food Protection*, 61, 350-353.
- Morris, M.D. & Mandair, G.S. (2011). Raman assessment of bone quality. *Clinical Orthopaedics and related research*, 469(8), 2160-2169.
- Mundy, G.R. (1995). Cellular mechanism of bone resorption. En: G.R. Mundy. *Bone Remodeling and its Disorders* (pp. 12-26). London, UK: Martin Dunitz.
- Mura-Galelli, M.J., Voegel, J.C., Behr, S., Bres, E.F. & Schaaf, P. (1991). Adsorption/Desorption of human serum albumino on hydroxyapatite: A critical analysis of the Langmuir model. *PNAS*, 88(13), 5557-5561.

- Nascimento, V. P., Cranstoun, S. & Solomon, S.E. (1992). Relationship between shell structure and movement of *Salmonella enteritidis* across the eggshell wall. *British Poultry Science*, 33, 37-48.
- Nys, Y., Zawadaski, J. & Mills, A.D. (1991). Whitening of brown-shelled eggs: mineral composition of uterine fluid and rate of protoporphyrin deposition. *Poultry Science*, 70, 1236-1245.
- Nys, Y., Hincke, M.T., Arias, J.L., García-Ruiz, J.M. & Solomon, S.E. (1999). Avian eggshell mineralization. *Poultry Avian Biology Reviews*, 10, 143–166.
- Nys, Y., Gautron, J., Garcia-Ruiz, J.M. & Hincke, M.T. (2004). Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins. *Comptes Rendus Palevol*, 3, 549–562.
- Oka, T. & Schimke, R.T. (1969). Progesteron antagonism of estrogen induced cytodifferentiation in chick oviduct. *Science*, 163, 83-85.
- Olsen, E.D. (1990). *Métodos ópticos de análisis*, Barcelona, España, Reverté.
- Olszta, M.J., Cheng, X., Jee, S.S., Kumar, R, Kim, Y.Y., Kaufman, M.J. Douglas, E.P. & Gower, L.B (2007). Bone Structure and formation: A new perspective. *Materials Science and Engineering Reports*, 58, 77-116.
- Padron, M. N. (1990). *Salmonella typhimurium* penetration through the eggshell of hatching eggs. *Avian Diseases*, 34, 463-465.

- Panheleux, M., Bain, M., Fernández, M.S., Morales, I., Gautron, J., Arias, J. L., Solomon, S., Hincke, M.T. & Nys, Y. (1999). Organic matrix composition and ultrastructure of eggshell. a comparative study. *British Poultry Science*, 40, 240-252.
- Pelletier, M.J. (1999). *Analytical Applications of Raman Spectroscopy*. John Wiley & Sons.
- Petersen, J. & Tyler, C. (1967). The strength of guinea fowl (*Numida meleagris*) egg shells. *British Poultry Science*, 7, 291-296.
- Raggatt, L.J. & Partridge, N.C. (2010). Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(33), 25103-25108.
- Ramachandran, G.N. & Venkatachalam, C.M. (1966). The stability of the two-bonded collagen triple hélix. *Biochemical et Biophysica Acta*, 120 (3), 457-458.
- Reid, D.G., Shanahan, C.M., Duer, M.J., Arroyo, L.G., Schoppet, M., Brooks, R.A. & Murray, R.C. (2012). Lipids in biocalcification: contrasts and similarities between intimal and medial vascular calcification and bone by NMR. *Journal of Lipid Research*, 53, 1569–1575.
- Ritchie, R.O., Buehler, M.J. & Hansma, P. (2009). Plasticity and toughness in bone. *Physics Today*, 62, 6, 41.
- Rodriguez-Navarro, A.B. (2006). XRD2DScan a new software for polycrystalline materials characterization using two-dimensional X-ray diffraction. *Journal of Applied Crystallography*, 39, 905- 909.

- Rodriguez-Navarro, A.B., Romanek, C.S., Alvarez-Lloret, P. & Gaines, K.F. (2006). Effect of in ovo exposure to PCBs and Hg on Clapper Rail bone mineral chemistry from a contaminated salt marsh in coastal Georgia. *Environmental Science & Technology*, 40(16), 4936-4942.
- Rodriguez-Navarro, A.B., Yebra, A., Jimenez-Lopez, C., Nys, Y. & Garcia-Ruiz, J.M. (2007). Analysis of eggshell microstructure using X-ray area detectors. *European Journal of Mineralogy*. 19, 391-398.
- Rodriguez-Navarro, A.B., Domínguez-Gasca, N., Muñoz, A. & Ortega-Huertas, M. (2013). Change in the chicken eggshell cuticle with hen age and egg freshness. *Poultry Science*, 92, 3026-3035.
- Rodríguez-Navarro, A.B., Marie, P., Nys, Y., Hincke, M.T. & Gautron, J. (2015). Amorphous calcium carbonate controls avian eggshell mineralization: a new paradigm for understanding rapid eggshell calcification. *Journal of Structural Biology*, 190 (3), 291-303.
- Ross, M.H., Kaye, G.I. & Pawlina W. (2007). *Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*. Madrid. Editorial Panamericana.
- Sánchez de Rojas, M.I., Luxán, M.P. & Frías, M. (1986). La espectroscopia de emisión como fuente de acoplamiento inductivo. *Materiales de Construcción*, 36(202), 31-46.
- Schmahl, W.W., Kocsis, B., Toncala, A. & Grupe, G. (2016). Mineralogic Characterisation of Archaeological Bone. En G. Grupe & G.C. McGlynn (eds.), *Isotopic Landscapes in Bioarchaeology* (pp 91-113). London, UK. Springer Verlag.

- Seeman, E. & Delmas, M.D. (2006). Bone Quality – The material and structural basis of bone strength and fragility. *The new England journal of medicine*, 356, 2250-2260.
- Simonet W.S., Lacey D.L., Dunstan C.R., Kelley M., Chang M.S., Luthy R., Nguyen, H. Q., Wooden, S., Bennett. L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H.L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T.M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R. & Boyle, W.J. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 89, 309–319.
- Simons, P.C.M. (1971). Ultrastructure of the hen eggshell and its physiology interpretation. Wageningen, Centre for Agricultura.
- Smeets, P.J.M., Cho, K.R., Kempen, R.G.E., Sommerdijk, N.A.J. & De Yoreo, J.J. (2015). Calcium carbonate nucleation driven by ion binding in a biomimetic matrix revealed by in situ electron microscopy. *Nature Materials*, 14, 394-399.
- Solomon, S.E. (1991). *Egg and Eggshell Quality*, p. 149. London, UK: Wolfe Publishing.
- Solomon, S. E. (1983). Oviduct. En D. J. Bell & B. M. Freeman (eds.), *Physiology and Biochemistry of Domestic Fowl* (pp 379-419). London, UK: Academic Press.
- Solomon, S. E. (1997) *Egg and eggshell quality*. London, UK, Manson Publishing Ltd.
- Sparks, N. H. C. & Board, R. G. (1985). Bacterial penetration of the recently developed oviposited shell of hens' eggs. *Australian Veterinary Journal*, 62, 169-170.
- Stadelman, W.J. & Cotterill, O.J. (1995). *Egg Science and Technology*, 4th edn. New York: Food Products Press.

- Stuart, B.H. (2004). *Infrared spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Inglaterra, John Wiley & Sons.
- Taylor, T.G. & Belanger, L.F. (1969). The mechanism of bone resorption in laying hens. *Calcified Tissue Research*, 4(2), 162-173.
- Taylor, T.G., Simkiss, K. & Stringer, D.A. (1971). The skeleton: its structure and metabolism. En: B.M. Freeman (ed), *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl* (2, pp. 621-640). Academic Press.
- Teitelbaum, S.L. (2000). Osteoclasts, integrins, and osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 18(6), 344-349.
- Termine, J.D., Kleinman, H.K., Whitson, S.W., Conn, K.M., McGarvey, M.L. & Martin, G.R. (1981). Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell*, 26, 99-105.
- Traub, W., Arad, T. & Weiner, S. (1992). Origin of mineral crystal growth in collagen fibrils. *Matrix*, 12(4), 251-255.
- Tung, M. A., Garland, M. R., & Gill, P. K. (1979). A scanning electron microscope study of bacterial invasion in Hen's egg shell. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 12(1), 16-22.
- Van de Velde, J.P., Vermeiden, J.P.W. & Touw J.J.A. (1984). Changes in activity of chicken medullarybone cell populations in relation to the egg laying cycle. *Metabolic Bone Disease and Related Research*. 5, 191-194.

- Van de Velde, J.P., Vermeiden, J.P.W. & Bloot A.M. (1985). Medullary bone matrix formation mineralization and remodeling related to dialy egg-laying cycle of Japanese quail. A histological and radiological study. *Bone*, 6, 321-328.
- Van De Velde, J.P., Van Ginkel, F.C. & Vermiden, J.P.W. (1986). Patterns and relationship of plasma calcium, protein and phosphorus during laying cycle of the fowl and the effect of dietary calcium. *British Poultry Science*, 27, 421-429.
- Wang, L. & Nancollas, G.H. (2008). Calcium orthophosphates: crystallization and dissolution. *Chemical Reviews*, 108(11), 4628-4669.
- Weiner, S. & Wagner, H.D. (1998). The material bone: Structure-mechanical function relations. *Annual Review of Materials Science*, 28, 271-298.
- Wellman-Labadie, O., Lemaire, S., Mann, K., Picman, J. & Hincke, M.T. (2010). Antimicrobial activity of lipophilic avian eggshell surface extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10156-10161.
- Wells, R. G. (1968). The measurement of certain egg quality characteristics: A review. En T. C. Carter (ed.), *Egg Quality: A Study of the Hen's Egg* (pp. 207-249). Edinburg, UK: Oliver & Boyd.
- Whitehead, C.C. & Fleming, R.H. (2000). Osteoporosis in cage layers. *Poultry Science*, 79(7), 1033-1041.
- Whitehead, C.C. (2004). Overview of bone biology in the egg-laying hen. *Poultry Science*, 83, 193-199.



Wilburn, K.M.& Simkiss, K. (1968). Extracellular and supporting structures. *Comprehensive Biochemistry*, 26, 229-295.

Yeh, J.K., Aloia, J.F. & Yasumura, S. (1989). Effect of physical activity on calcium and phosphorus metabolism in the rat. *The American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 256, E1–E6.

Yoder, C.H., Pasteris, J.D., Worcester, K.N., Schermerhorn, D.V. (2012). Structural water in carbonated hydroxylapatite and fluorapatite: Confirmation by solid state H2 NMR. *Calcified Tissue International*, 90, 60–66.

Young, M.F. (2003). Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporosis International*, 14 (3), 35-42.

Zimmermann, E.A., Schaible. E., Bale. H., Barth, H.D., Tang, S.Y., Reichert, P., Busse, B., Alliston, T., Ager, J.W. 3<sup>rd</sup>. & Ritchie, R.O. (2011). Age-related changes in the plasticity and toughness of human corticalbone at multiple length scales. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 108(35), 14416-21.

### **Sitios web**

1. [www.accessmedicina.com](http://www.accessmedicina.com)
2. <http://espasa.planetasaber.com>
3. [huevo.org.es](http://huevo.org.es)



*Anexo I*

---

## Change in the chicken eggshell cuticle with hen age and egg freshness

Alejandro B. Rodríguez-Navarro,<sup>1</sup> Nazaret Domínguez-Gasca, Arantxa Muñoz,  
and Miguel Ortega-Huertas

*Departamento de Mineralogía y Petrología, Universidad de Granada, 18002 Granada, Spain*

**ABSTRACT** For a fuller understanding of the functionality of the eggshell cuticle, we conducted a detailed study using a wide array of analytical techniques (scanning and transmission microscopy), energy dispersive x-rays, and attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy to analyze the structure, morphology, and chemical composition of this organic coating. This study shows that the cuticle has a compositional gradation with an outer part richer in proteins and an inner part richer in sulfated polysaccharides and phosphates. It also shown that the cuticle composition, thickness, and degree of coverage are highly dependent

on hen age and egg freshness. During the course of the first laying year, the thickness and degree of glycosylation of the cuticle decreases with hen age, and at the end of the laying cycle, the cuticle is significantly depleted in lipids. There are also well-defined compositional changes in the cuticle of freshly laid eggs as time passes and there is a notable increase in the permeability of the eggshell after 24 h due to cuticle drying. We discuss how these changes in the cuticle can affect the food safety of eggs in relation to the risk of trans-shell contamination by bacteria (i.e., Salmonellosis).

**Key words:** eggshell, cuticle, glycoprotein, attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy, Salmonellosis

2013 Poultry Science 92:3026–3035  
<http://dx.doi.org/10.3382/ps.2013-03230>

### INTRODUCTION

The eggshell, a thin mineral structure, protects the egg contents against mechanical impact, dehydration, and microorganism contamination. At the same time, the eggshell is permeable to gases and water necessary for the development of the chick embryo (Nys et al., 1999; Hincke et al., 2012). The permeability of the eggshell is in turn regulated by an organic-rich layer or cuticle that coats the outer eggshell surface and plugs the entry to the shell pores (Board and Halls, 1973). The cuticle is deposited by the epithelial cells lining the hen uterus during the last 1.5 h before oviposition (Nys et al., 1999). It has a variable thickness (up to 12  $\mu\text{m}$ ) and an uneven or patchy distribution on the eggshell surface (Board and Halls, 1973). The organic cuticle is composed of 85 to 90% proteins (mainly glycoproteins) and, as minority components, polysaccharides (4%), lipids (3%), and porphyrin pigments in brown eggs (Baker and Balch, 1962; Hasiak et al., 1970; Wedral et al., 1974; Nys et al., 1999; Rose-Martel et al., 2012).

Additionally, the cuticle is rich in phosphorus (Wedral et al., 1974; Dennis et al., 1996; Cusack et al., 2003).

The cuticle limits movement of particles, water, and bacteria through the shell pores (Board and Halls, 1973; Board and Tranter, 1986), and thus, together with the mineralized shell and shell membranes, constitutes a physical barrier against microorganism invasion and contamination of the egg content (Board and Tranter, 1986; De Reu et al., 2006). These natural physical defenses of the egg are especially important considering that trans-shell contamination, in which microorganisms, by penetrating the shell, contaminate the egg after being laid, this being regarded as the prevalent route for bacterial infection of eggs (Bruce and Drysdale, 1994). In fact, eggs with an absent or partially removed cuticle are more susceptible to bacterial contamination (Board and Halls, 1973; Sparks and Board, 1984; Messens et al., 2005; De Reu et al., 2006; Bain et al., 2013). Moreover, the cuticle coverage has been shown to be the most important eggshell characteristic to resist bacterial shell penetration (De Reu et al., 2006). Also, its chemical composition plays an important role in limiting bacterial contamination. For instance, proteins extracted from the cuticle of different bird species possess antimicrobial activity against several bacterial species (Wellman-Labadie et al., 2008). Additionally, lipid components extracted from the cuticle

©2013 Poultry Science Association Inc.  
Received April 8, 2013.  
Accepted August 5, 2013.  
<sup>1</sup>Corresponding author: [anava@ugr.es](mailto:anava@ugr.es)

have potent antimicrobial activity (Wellman-Labadie et al., 2010). Moreover, recent studies have identified several proteins in the cuticle (e.g., lysozyme C, ovotransferrin, ovocalyxin-32, and ovocleidin-17) known to have antimicrobial activity (Rose-Martel et al., 2012). Thus, these studies confirm that specific chemical components of the cuticle are important chemical defenses of the eggshell against bacterial penetration and colonization of the eggshell surface.

On the other hand, eggs with a cracked shell or poor eggshell quality, besides posing a health risk to consumers (because eggs are the main source of food-related *Salmonella enteritidis* poisoning), need to be downgraded, causing major economic losses to producers (Stadelman and Cotterill, 1995; Solomon, 1997). Thus, eggshell quality and integrity is of fundamental importance and great efforts have been devoted to study and improve it (Solomon, 1997; Dunn et al., 2009). An important aspect of eggshell quality, besides its thickness, is completeness of cuticle coverage, because this organic coating prevents water and bacteria moving across the shell (Musgrove et al., 2004; EFSA, 2005; Messens et al., 2005).

The eggshell characteristics and quality are greatly influenced by a wide array of factors including hen age, genetics, and diet as well as hen housing (Solomon, 1997; Jones et al., 2002; Rodriguez-Navarro et al., 2002; Travel et al., 2011). In the same way, cuticle properties are known to be affected by the same factors (Board and Halls, 1973; Board and Tranter, 1986; Bain et al., 2013). For instance, it is well known that there is a gradual decline in the quality of the cuticle with hen age (Board and Halls, 1973; Board and Tranter, 1986; Leleu et al., 2011). Eggs from end-of-lay hens generally have a very poor degree of cuticle coverage. However, there is scant information on how other important characteristics such as eggshell cuticle composition are affected by these factors (hen age, egg freshness; Haisiak et al., 1970; Rose-Martel et al., 2012). Thus, for a fuller understanding of the changes that occur in the cuticle as hens age and during egg storage, we have conducted a detailed study using up-to-date analytical techniques such as scanning and transmission electron microscopy (**scanning EM** and **TEM**, respectively), energy dispersive x-rays (**EDX**), and attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy (**ATR-FTIR**) to analyze the structure, morphology, and chemical composition of the eggshell cuticle. This is the first comprehensive study available describing the variation of the cuticle composition with hen age and with egg freshness. The application of this methodology on a large scale (i.e., using ATR-FTIR to determine the cuticle chemical composition), for instance, during selection programs could be useful for breeders to improve the safety and quality of eggs, especially considering that cuticle composition determines the antimicrobial properties of the egg.

## MATERIALS AND METHODS

### Samples

Hy-Line CV22 white hen eggs were collected within 2 h of being laid directly from a local farm (Avícola Garrido-García, Granada, Spain) and kept at room temperature. For the study of the influence of egg storage, 160 eggs from hens of 2 age groups (16 to 70 wk) were collected. Groups of 10 eggs were analyzed at different times (2, 3, 4, 5, 6, 24, 26, and 72 h after laying). To study the effect of hen age, 20 eggs from each age group (16, 30, 36, and 70 wk) were analyzed after 24 h to allow for cuticle stabilization. Eggs were broken and analyzed immediately by ATR-FTIR. Analyses were made consistently around the egg waist.

### Cuticle Staining

To assess the quality and degree of coverage of the eggshell cuticle, Cuticle Blue staining was used. A solution of 1% Cuticle Blue staining (MS Technologies Ltd., Northamptonshire, UK) was prepared and applied by immersing the samples in the solution for 5 min. This dye, having a strong affinity to proteins, stains the eggshell green if the cuticle coverage is good or does not stain at all where the cuticle is absent.

### Infrared Spectrometry

For the infrared (**IR**) analyses, the outer surface of intact eggshell samples was pressed against the ATR diamond crystal window and the IR spectra recorded at a  $2\text{ cm}^{-1}$  resolution over 100 scans using a FTIR spectrometer (model 6200, JASCO Analytical Instruments, Japan). The amount of water, proteins, sulfate, phosphate, carbonate, polysaccharides, and lipids were determined from the peak area of absorption peaks associated to a characteristic molecular group of each component (e.g., O-H: water; C-H: lipids or fatty acids; amide: proteins; C-O: carbonates; S-O: sulfates; P-O: phosphates; COC: sugars/polysaccharides; Rodriguez-Navarro et al., 2006). Overlapping peaks were resolved and their integrated areas measured using a specially designed curve-fitting software. Calculated peak areas of the main bands were normalized to the total area of the spectrum.

### Microscopy Analyses

For scanning EM and scanning EM-EDX analyses, intact pieces of eggshells were carbon coated (Hitachi UHS evaporator, Hitachi, Tokyo, Japan) and analyzed with a high-resolution scanning EM (Leo Gemini 1530, Zeiss, Oberkochen, Germany) operating at 15 kV. For TEM analyses, small pieces of eggshell ( $1\text{ mm}^2$ ) were fixed for 24 h at  $4^\circ\text{C}$  in a mixture of 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in cacodylate buffer

(0.01 M, pH 7.4). Each sample was then decalcified using a solution of EDTA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO; 40 g/L, pH 8) for 15 d. Afterward, they were postfixed in 1% osmium tetroxide for 1 h and then dehydrated using an ethanol gradient (50, 70, 90, and 100%), embedded in EMbed 812 resin and sectioned to 70 nm (Ultracut R Leica, Leica, Wetzlar, Germany). Finally, sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate. These sections were examined in a Libra 120 Plus transmission electron microscope (Zeiss).

### Statistical Analyses

Basic descriptive statistics were used to characterize cuticle properties. A 1-way ANOVA was used to compare cuticle properties between the different groups of samples analyzed. Pearson correlation analysis and linear regression models were used to study relationships among the different properties measured. The significance level chosen for all analyses was  $P < 0.05$ . All statistical analyses were performed using the software package SPSS 17.0 (IBM, New York, NY).

## RESULTS

### Scanning EM and TEM

Transmission electron microscopy examination of the cross-section of the outer surface of a decalcified eggshell revealed that the cuticle is a well-defined layer of a few microns in thickness constituted by densely packed spherical vesicles in close contact with the vertical crystal layer (Figure 1). The vesicular layer of the cuticle showed a gradual increase in contrast toward the outer surface. The higher contrast was due to the staining of vesicle membranes with osmium oxide, which gives them high electron density. Osmium oxide has a strong affinity to phospholipids of the vesicle membranes. On the other hand, the size of vesicles varied markedly, ranging from approximately 50 to 500 nm. The larger vesicles had an inner structure of radiating fibers, the remainder of spherical aggregates of needle-like apatite nanocrystals dissolved during the demineralization process (Dennis et al., 1996). Also, the cuticle thickness along the eggshell surface was quite variable, even being completely absent in some regions. The variability in the cuticle thickness was more evident in the case of eggs from old hens, which had a thinner and more irregular cuticle than eggs laid by young hens, which had a thicker and more regular cuticle. For example, Figure 1A and B shows TEM images of cuticles from eggs laid by old and young hens, the cuticle thickness measuring 2 and 5 microns, respectively.

Figure 1C, displaying an scanning EM image of an eggshell in which the organic cuticle was removed, shows an irregular eggshell surface with prominent pore openings. On the other hand, Figure 1D displays an scanning EM image of an eggshell with complete cuticle coverage. The organic cuticle coating the eggshell gives

the eggshell surface a very smooth appearance. In this case, the pore openings are no longer visible, as they are completely covered by the organic matter of the cuticle. In contrast, a network of fissures appears in the cuticle surface as a results of drying.

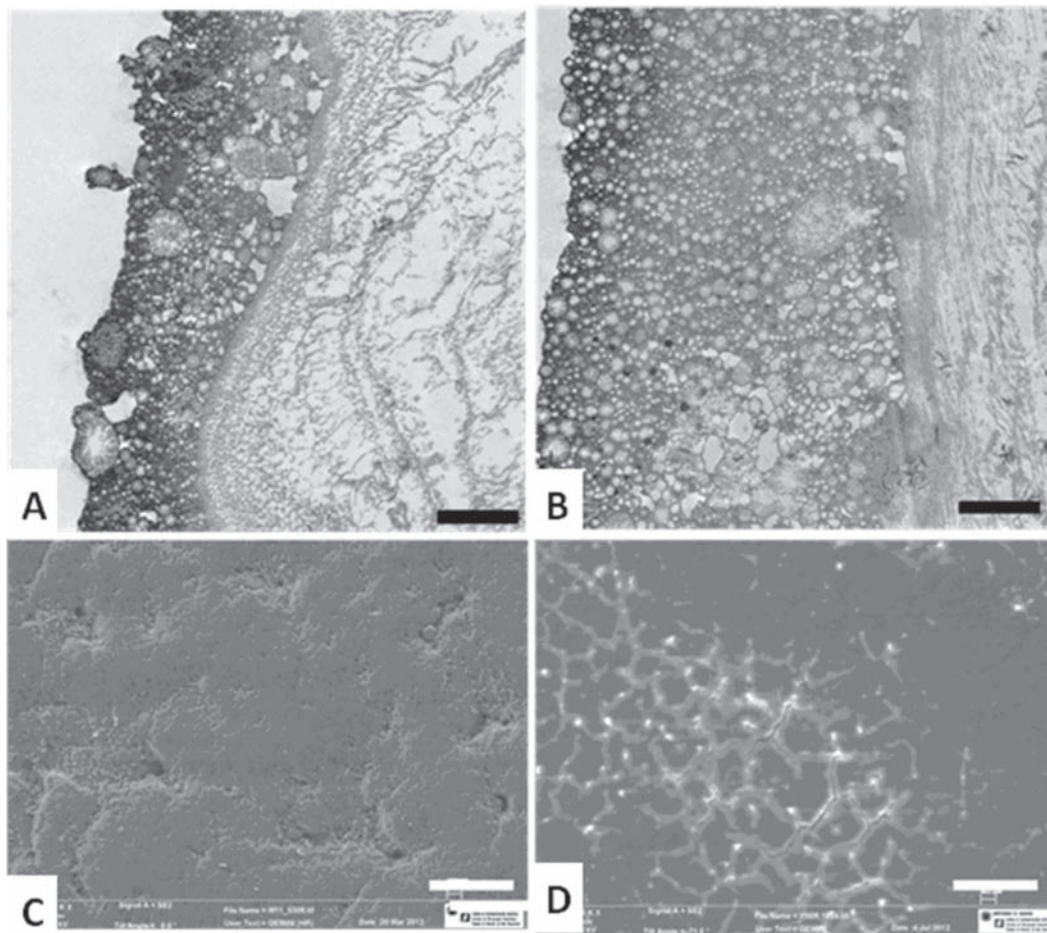
### Phosphorus in the Cuticle

The EDX analyses of eggshells showed that phosphorus and magnesium were concentrated mainly on the eggshell surface, in agreement with previous findings (Cusack et al., 2003), and that eggshells with a poor cuticle (i.e., from older hens) had significantly lower phosphorus and magnesium signals in the EDX spectra. However, the EDX analyses provided no information on the chemical form of cuticle phosphorus. The ATR-FTIR analyses of the eggshell surface were more informative, showing a well-defined phosphate band centered at about  $557\text{ cm}^{-1}$  and a peak at  $687\text{ cm}^{-1}$  associated with amide IV bands (Figure 2). The phosphate band was visible only in dry eggshells with a thin cuticle, suggesting that phosphates were concentrated mostly in the inner cuticle. Also, there is another phosphate band centered around  $1,000\text{ cm}^{-1}$ , but this band was not useful in this case because it was strongly overlapped by polysaccharide bands. It bears mentioning that, even though apatite crystals are found in the inner cuticle (Dennis et al., 1996), the cuticle phosphate band did not show an additional peak at about  $600\text{ cm}^{-1}$  characteristic of crystalline apatitic phosphate. Moreover, the phosphate band of the cuticle was much broader than that of bone mineral (constituted by nanocrystalline apatite). All these facts indicate that most of the phosphorus in the cuticle was in a noncrystalline phosphate form, presumably as part of phosphoproteins (Gautron et al., 1997).

### FTIR Spectra of Eggshells with Different Cuticle Quality

The analysis of the eggshell surface by ATR-FTIR provided detailed information about the cuticle chemical composition of the surface as well as its quality: defined as the thickness or degree of coverage over the eggshell mineral substrate. Figure 3 displays the ATR-FTIR spectra of the eggshell surface of eggs showing a good or a poor cuticle. The most prominent features of the FTIR spectra of the cuticle were: a broad band from  $3,700$  to  $2,500\text{ cm}^{-1}$ , associated with OH and amide A groups from water and proteins; 2 peaks centered at about  $1,633\text{ cm}^{-1}$  and  $1,540\text{ cm}^{-1}$ , associated with protein amide I and amide II groups; a peak centered at about  $1,390\text{ cm}^{-1}$  associated with carbonate groups from eggshell calcite crystals; and a broad band from  $1,100$  to  $990\text{ cm}^{-1}$ , associated with polysaccharides. On the other hand, the occurrence of a weaker band at about  $1,240\text{ cm}^{-1}$ , associated with sulfate bonds, implies that the polysaccharide moieties had some degree





**Figure 1.** Microscopy images of the cuticle. Transmission electron microscopy images of the cross-section of decalcified eggshells from an old (A) and from a young (B) hen. Scale bar = 1  $\mu\text{m}$ . Scanning electron microscopy images of the surface of an eggshell without a cuticle (C) and with good cuticle coverage (D). Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .

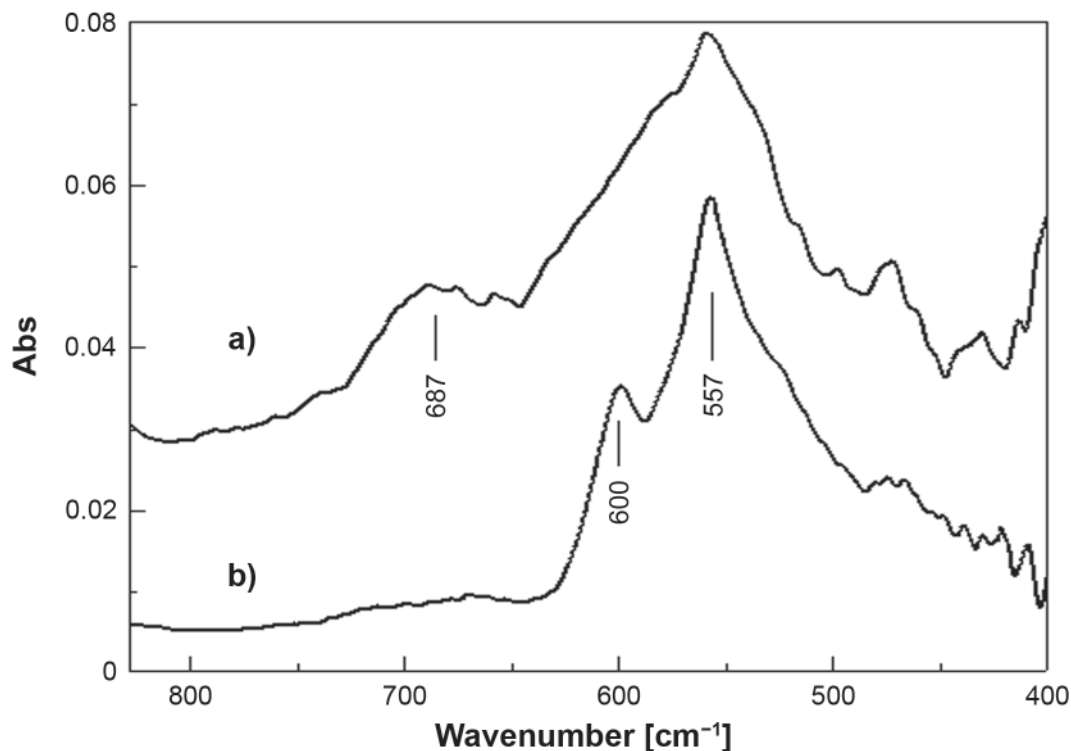
of sulfation. There were other minor bands in the spectra at about  $2,918\text{ cm}^{-1}$ , associated with C-H groups from lipids, and peaks at  $1,447$  and  $1,410\text{ cm}^{-1}$ , associated with carboxylate groups from amino acid residues. In the case of an eggshell with a very good cuticle (Figure 3a), the amide and polysaccharides bands had high intensity, comparable with or higher than that of the main carbonate band (centered at about  $1,397\text{ cm}^{-1}$ ). In this case, the intensity of polysaccharide band was very high, indicating that the cuticle was strongly glycosylated. In contrast, for an eggshell with a very thin cuticle, the IR spectra displayed weak amide or polysaccharide bands and very strong carbonate absorption peaks (Figure 3b). Thus, as the cuticle coverage or thickness decreased, the carbonate peaks intensified as the eggshell mineral was more exposed to the surface. Finally, for an eggshell without any cuticle, the spectrum will be that of pure calcite (which is the mineral constituent of the eggshell). The calcite spectrum showed 3 main absorption bands of carbonate groups at  $1,395$ ,  $817$ , and  $713\text{ cm}^{-1}$  (Figure 3c).

In addition, Pearson correlation analyses for all IR peak areas provide information on the relationship between the main molecular components of the cuticle.

Specifically, peaks associated with proteins (amides), polysaccharides, and sulfates proved to be highly and positively correlated. These results indicate that all these molecular components were structurally associated as glycoproteins, which are the main organic constituents of the cuticle. On the other hand, the intensity of amide peaks were strongly and negatively correlated with the intensity of main carbonate peaks. Thus, as the cuticle coverage decreases or becomes thinner, the amount of proteins coating the eggshell surface decreases and the carbonate mineral substrate becomes more exposed to the eggshell surface and contributes more to the IR spectra. Therefore, it is possible to define the intensity ratio of amide I to main carbonate peak as a measure or index of the cuticle quality. Also, another useful parameter could be the intensity ratio between the polysaccharide and the amide peaks, which is indicative of the degree of glycosylation of the cuticle proteins.

### ***Influence of Egg Freshness***

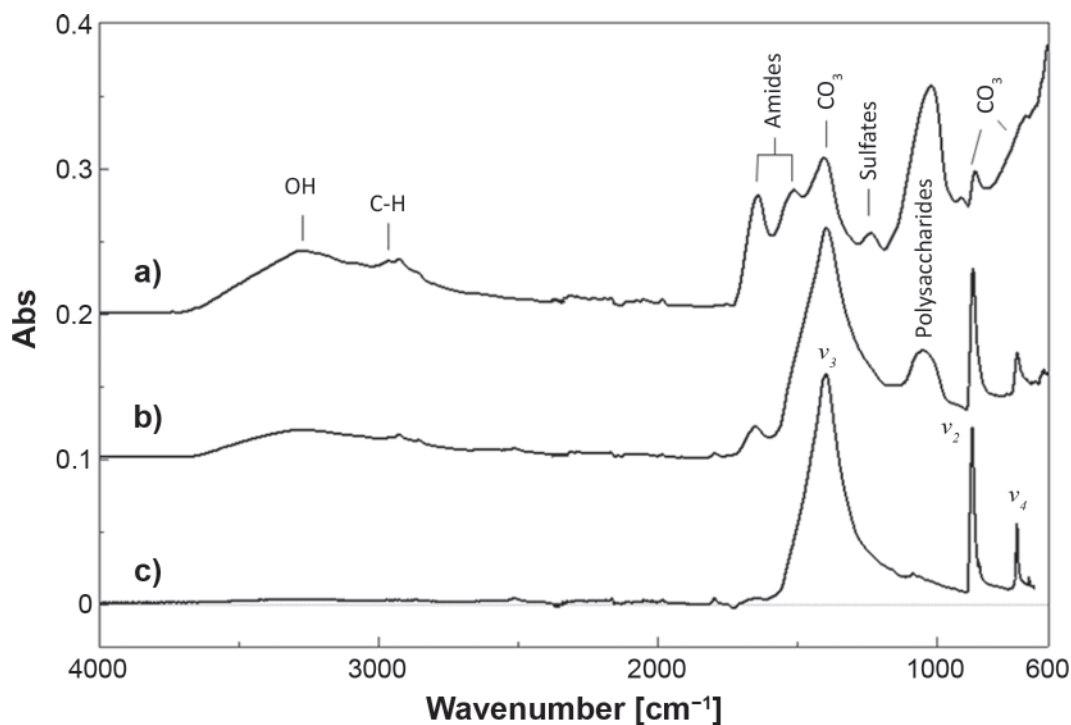
The ATR-FTIR analysis of the eggshell surface of freshly laid eggs showed well-defined changes in the



**Figure 2.** Attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectra in the 800 to 400  $\text{cm}^{-1}$  range of the eggshell surface (a) and that of a powdered cortical hen bone used as a reference material (b). Abs = absorbance.

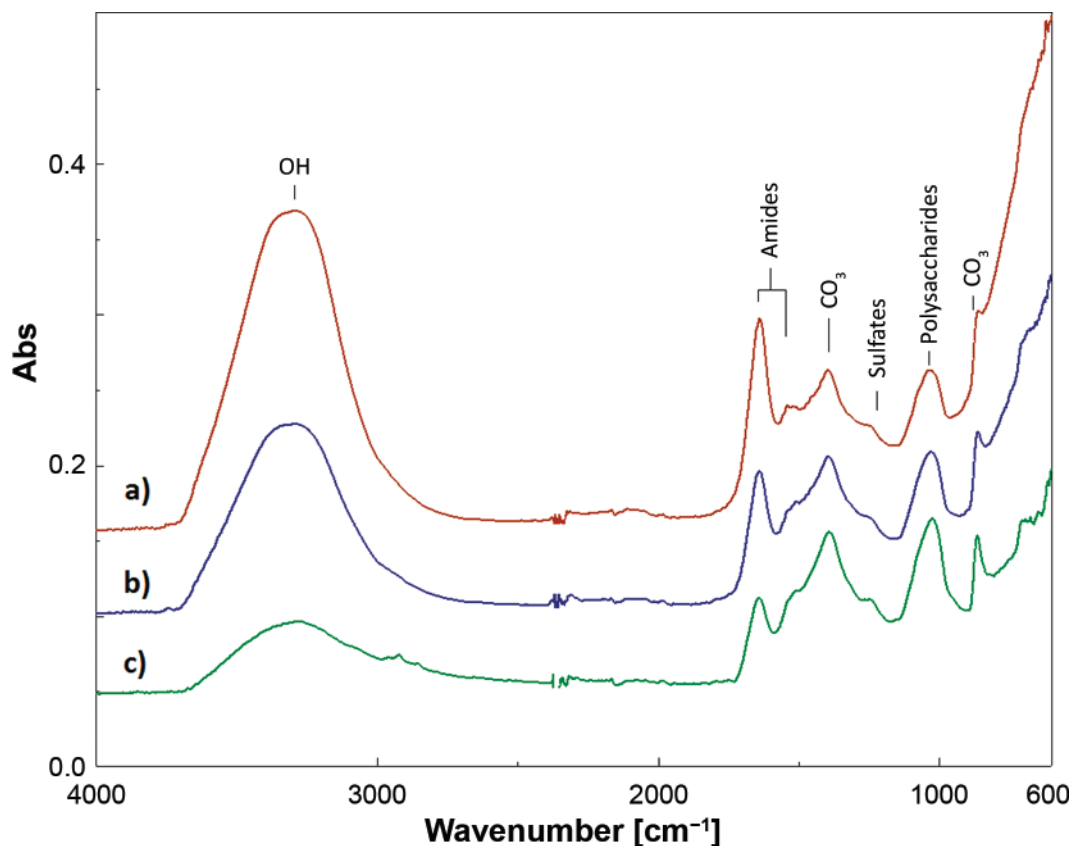
composition and structure of the cuticle over time. The eggshell surface is moist shortly after an egg is laid and the ATR-FTIR spectra of a freshly laid egg showed a very large OH band (Figure 4). With the passage of time, a gradual reduction appeared in the intensity of

the OH band, due to moisture loss as the cuticle dries (Figure 4 and 5). Also the carbonate peaks became better defined and their relative intensity increased with time. As the cuticle dried and became thinner, the eggshell carbonate mineral became more exposed to the



**Figure 3.** Attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy analyses of the surface of eggshells: a) with a good cuticle, b) with a poor cuticle, and c) calcite powder. Abs = absorbance.





**Figure 4.** Attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy spectra of the eggshell surface measured at different times after laying: a) at 2 h, b) at 4 h, and c) at 6 h. Eggs were from 70-wk-old hens. Color version available in the online PDF.

surface, contributing more to the IR spectra (note that the ATR signal had very low penetration of about 2 microns). Simultaneously, there was a gradual decrease in the intensity of amide I peak and an increase in the area of peaks associated to polysaccharides and sulfates. The decrease in amide peaks and the increase in polysaccharide and sulfate peaks could have resulted from the diffusion of sulfated polysaccharide components from the inner cuticle. Alternatively, this could be explained by a gradient in the chemical composition of the cuticle in which the outer part is richer in proteins and the inner part is richer in polysaccharides. As the cuticle dries and becomes thinner, the inner layer of polysaccharides that are associated with sulfates contributes more to the spectra. On the other hand, the increase in the amount of polysaccharides in the surface suggests that proteins become more glycosylated as the cuticle matures. A higher degree of glycosylation should improve the mechanical properties of the cuticle during the first hours after the eggs are laid. At longer times (72 h), amide I (proteins) and OH (water) peaks were found to sharply increase, whereas the carbonate peaks fell. As the cuticle dried, many fissures formed in this coating, leaving pore openings exposed. These changes in the cuticle facilitated the diffusion of the water from the egg white through the eggshell pores. Thus, the observed increase in the amount of protein at the eggshell surface was due to increased eggshell permeability

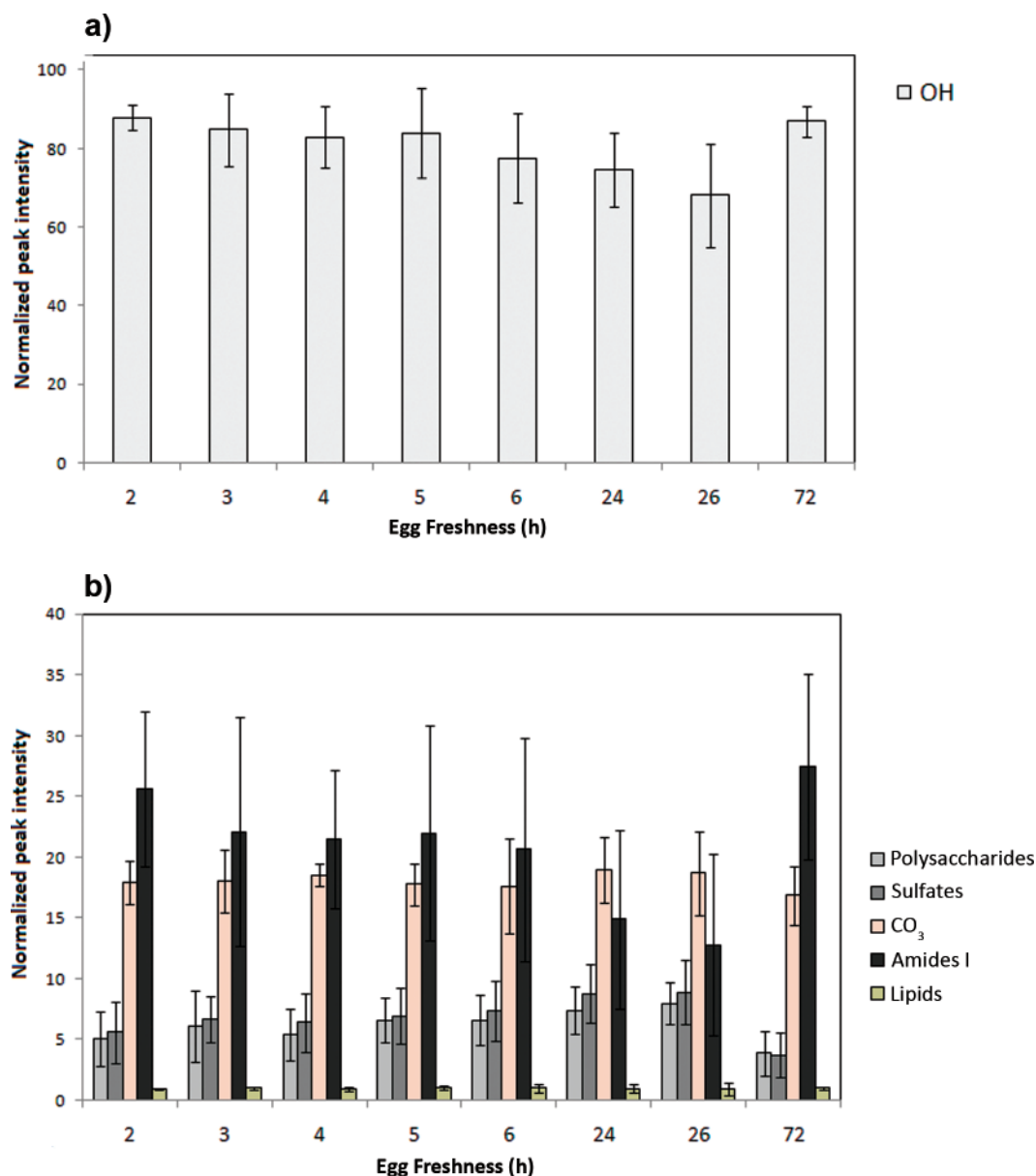
to water, which could mobilize and transport soluble proteins from the egg white or from the eggshell itself.

Parallel to the compositional changes occurring at the eggshell cuticle during its maturation and drying, there were concomitant structural changes in its constituting proteins. In particular, there was a notable shift of the amide I peak to higher wave numbers from 1,636 to 1,645  $\text{cm}^{-1}$ . This shift implies that a change in the conformation of cuticle proteins from having a disordered structure (typical of proteins in solution) to a more ordered structure. At longer times (after 72 h), the protein peak in the eggshell surface changed back to 1,636  $\text{cm}^{-1}$  due to hydration.

The changes described in the eggshell surface of freshly laid eggs were similar regardless of the hen age, though these changes occurred more rapidly and were more evident in the case of eggs laid by older hens. This could be due to the poorer cuticle quality of eggs from older hens but also to the fact that the albumen (egg white) in older hens is thinner and has a higher water content (Travel et al., 2011), making it easier for water to permeate to the eggshell surface.

### **Influence of Hen Age**

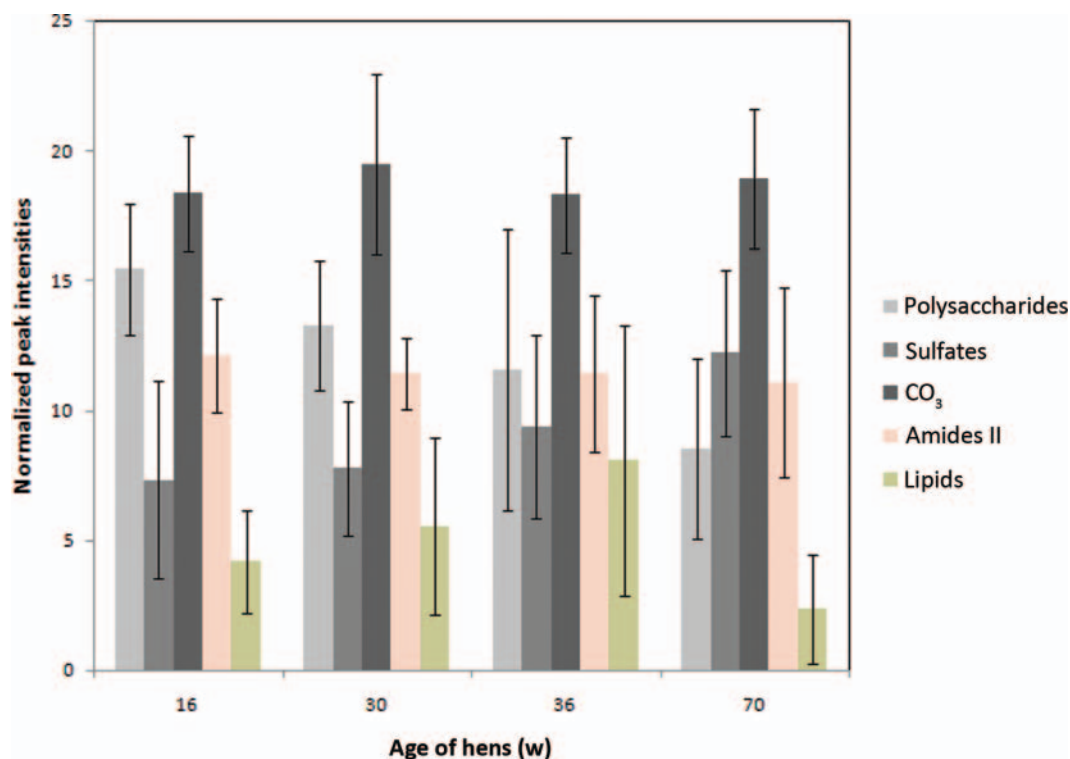
All eggs treated with Cuticle Blue dye showed some degree of staining and turned blue. However, eggs laid by older hens (70 wk old) showed a lesser degree



**Figure 5.** Time course of the intensity of attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy peaks associated with main chemical components of the eggshell cuticle over time since the eggs were laid. a) Intensity of OH band. b) Intensity of main infrared peaks associated to polysaccharides, sulfates, carbonates, protein-amide, and lipids. Data shown correspond to eggs from 70-wk-old hens. Color version available in the online PDF.

of staining and lighter green hues compared with eggs laid by younger hens. This result confirms previous observations that the quality of the cuticle decreases as hens age (Board and Halls, 1973). On the other hand, ATR-FTIR data indicated that the composition of the eggshell surface (the cuticle) was highly dependent on hen age (Figure 6). Furthermore, a detailed study of eggs laid by hens of different age groups showed that during the course of the first laying year, there were well-defined compositional changes in the cuticle—specifically, a gradual reduction in the amount of polysaccharide in the cuticle as the hen aged. By contrast, the amount of sulfate increased with hen age. Meanwhile, the amount of lipid gradually increased toward the middle of the laying season and decreased, reaching its

lowest value at the end of the laying year. However, the intensity of the amide peaks remained almost constant over the course of the first laying year, indicating that the amount of protein also was independent of hen age. It bears mentioning that the relative intensity of the main carbonate peak remained almost constant during the course of the first laying year. These findings indicate that the thickness of the cuticle remained almost constant. On the other hand, the decrease in the intensity of the polysaccharide peak implies that the degree of glycosylation of the cuticle proteins decreases as hens age. Lower glycosylation could reduce the mechanical properties of the cuticle and could diminish the resistance of the cuticle to bacterial penetration.



**Figure 6.** Time course of the intensity of attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy peaks associated with the main organic components (polysaccharides, sulfates, carbonates, protein-amide, and lipids) of the eggshell cuticle with hen age. Color version available in the online PDF.

Notable differences were also found in the water content in eggs laid by older and younger hens. Fresh eggs from older hens had a larger amount of water on the eggshell surface than eggs laid by younger hens. These differences can be attributed to such factors as a different cuticle coverage, leaving more eggshell pores exposed, and also to the fact that the albumen (egg white) in older hens is thinner and has a higher water content (Stadelman and Cotterill, 1995; Van Den Brand et al., 2004), making it easier for water to permeate to the eggshell surface.

## DISCUSSION

Because a solid eggshell with an intact cuticle is an effective physical barrier against bacterial shell penetration (Board and Tranter, 1986; Messens et al., 2005; De Reu et al., 2006), a good-quality cuticle is essential to ensure the safety of eggs. Previously, cuticle quality (i.e., its thickness and degree of coverage) have been assessed qualitatively by the degree of staining of the eggshell with specific dyes (i.e., Edicol Pea Green; Board and Halls, 1973; De Reu et al., 2006). More recently, a quantitative methodology has been developed based on spectrometric color analyses of dyed eggs (De Reu et al., 2006; Leleu et al., 2011; Bain et al., 2013). Complementary information concerning the degree of coverage of the cuticle is assessed by scanning electron microscopy (Solomon, 1997; Leleu et al., 2011). In the present study, we describe an alternative methodology based on

ATR-FTIR spectrometry to measure the quality of the cuticle, gaining not only measurements of cuticle thickness but also detailed information on its chemical composition. Additionally, due to the low penetration of the ATR signal (about 2 microns), this analytical technique provides information exclusively on the cuticle on the intact eggshell without the need to use tedious extraction processes that may also alter its composition (Pereira-Mouries et al., 2002). Moreover, from the IR analyses, it is possible to define compositional parameters to quantitatively measure the cuticle quality.

Previous studies have shown that in the cuticle, 2 structurally distinct layers can be differentiated: an organic rich outer layer and a mineralized inner layer (Dennis et al., 1996; Fraser et al., 1999; Chien et al., 2008). The present study reflects a compositional gradation of the cuticle in which the outer part is richer in proteins and the inner part is richer in sulfated polysaccharides and phosphates. Most of the phosphate in the cuticle is in a noncrystalline form, presumably as part of phosphoproteins (i.e., Ovocalyxin-32, osteopontin), as previously hypothesized (Gautron et al., 1997; Chien et al., 2008). The presence of crystalline phosphate (hydroxyapatite) described by other authors (Dennis et al., 1996) must be restricted to a minor fraction not detectable by our analyses.

In addition, this study shows that cuticle composition is variable, being highly dependent on hen age and egg freshness. Particularly, during the course of the first laying year, well-defined compositional chang-

es were found in the cuticle. Specifically, eggs laid by old hens were found to have a cuticle composition that was significantly depleted in polysaccharides and lipid components compared with eggs laid by younger hens. Haisiak et al. (1970) reported a gradual decrease in the lipid content in the eggshell cuticle with increasing hen age. However, we observed this decline only at the end of laying season. It is worth mentioning that in the study by Haisiak et al., the analyses were made in cuticle extracts, which could include lipid components from other eggshell structures. Regarding the content of polysaccharides, a decrease in their amount indicates a lower degree of glycosylation of the cuticle proteins (Khajepour et al., 2006). Glycosylation defines the structural stability of glycoproteins and their adhesive properties to substrates (Nicholson et al., 1998; Sola et al., 2007). A lower glycosylation could decrease the mechanical properties of the cuticle, reducing the resistance of the cuticle to bacterial penetration and thus magnifying the risk of bacterial contamination of the egg content. Also, a reduced lipid content could have a negative impact on the cuticle antimicrobial properties (Wellman-Labadie et al., 2010) as well as the ability of the cuticle to resist water. These changes added to a cuticle with a reduced degree of coverage could partly explain the higher incidence of bacterial contamination of eggs laid by older hens (Wells, 1968; Nascimento et al., 1992; Jones et al., 2002). On the other hand, rapid changes in the cuticle properties (degree of moisture, composition, and permeability) in fresh eggs could strongly influence the effect of bacterial contamination, depending on the timing of the penetration. For instance, an immature and moist cuticle, such that of freshly laid eggs (less than 6 h), could be more vulnerable to bacterial penetration. Also, increased eggshell permeability detected after 24 h would also increase the risk of bacterial penetration. Additionally, cuticle compositional changes could influence the ability of cuticle-digesting bacteria (i.e., *Pseudomonas*) to colonize and spoil eggs (Board and Halls, 1973) because cuticle polysaccharides and proteins are sources of the carbon and nitrogen necessary for microbial growth. In this respect, eggs from older hens might have a lower risk of colonization by these bacteria.

To compensate for a poor cuticle coverage or cuticle loss, for example in sanitized/washed eggs (Sparks and Burgess, 1993; Hutchison et al., 2003; Rose-Martel et al., 2012), specific strategies have been developed such as coating the eggs with mineral oil or with other edible coating materials (Stadelman and Cotterill, 1995; Bhale et al., 2003; Caner and Cansiz, 2008). These restorative treatments offer beneficial effects in eggs such as a reduced moisture and CO<sub>2</sub> loss, which slows down the natural decline of egg internal quality, thereby extending the shelf life of eggs. Additionally, these coatings can also provide additional protection against bacterial penetration. However, these coatings do not have the antimicrobial properties of the cuticle chemical compo-

nents and might allow the bacterial colonization of the eggshell surface.

Finally, the functionality and effectiveness of the cuticle as a barrier against bacterial penetration depends heavily on the degree of coverage and thickness of this layer, but also, as this study shows, protection could depend on cuticle composition, as specific components have antimicrobial properties. We have shown that cuticle composition is in turn highly dependent on hen age and egg freshness. This information could be useful to design strategies to evaluate and reduce the contamination risks during egg processing. Additionally, a rapid analytical tool such as ATR-FTIR spectrometry could be helpful in breeding hens genetically selected for eggs with the best cuticle characteristics (i.e., high degree of glycosylation, high lipid content) to improve egg quality and safety.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful for financial support through TEN Media LLC (USA), RNM-179 research group (Junta de Andalucía), and grant CGL2011-25906 (Ministerio de Economía y Competitividad). We also thank Avícola Garrido-García for providing fresh eggs and to the Universidad de Granada staff (Bendicion Funes, Juan de Dios Bueno, Alicia Gonzalez, and Maria Jose Martinez) for their assistance with sample preparation and analyses. We are also grateful to Maxwell Hincke (University of Ottawa, Canada) for valuable discussions.

## REFERENCES

- Bain, M. M., K. McDade, R. Burchmore, A. Law, P. W. Wilson, M. Schmutz, R. Preisinger, and I. C. Dunn. 2013. Enhancing the egg's natural defence against bacterial penetration by increasing cuticle deposition. *Anim. Genet.* <http://dx.doi.org/10.1111/age.12071>.
- Baker, J. R., and D. A. Balch. 1962. A study of the organic material of hen's-egg shell. *Biochem. J.* 82:352-361.
- Bhale, S., H. K. No, W. Prinyawiwatkul, A. J. Farr, and K. Nadarajah. 2003. Chitosan coating improves shelf life of eggs. *J. Food Sci.* 68:2378-2383.
- Board, R. G., and N. A. Halls. 1973. The cuticle: A barrier to liquid and particle penetration of the shell of the hen's egg. *Br. Poult. Sci.* 14:69-97.
- Board, R. G., and H. S. Tranter. 1986. The microbiology of eggs. Pages in *Egg Science and Technology*. W. J. Stadelman and O. J. Cotterill, ed. AVI Publishing Company Inc., Westport, CT.
- Bruce, J., and E. M. Drysdale. 1994. Trans-shell transmission. Pages 63-91 in *Microbiology of the Avian Egg*. R. G. Board and R. Fuller, ed. Chapman & Hall, London, UK.
- Caner, C., and O. Cansiz. 2008. Chitosan coating minimises eggshell breakage and improves egg quality. *J. Sci. Food Agric.* 88:56-61.
- Chien, Y. C., M. T. Hincke, H. Valia, and M. D. Mckee. 2008. Ultrastructural matrix-mineral relationships in avian eggshell, and effects of osteopontin on calcite growth in vitro. *J. Struct. Biol.* 163:84-99.
- Cusack, M., A. C. Fraser, and T. Stachel. 2003. Magnesium and phosphorus distribution in the avian eggshell. *Comp. Biochem. Phys. B Biochem. Mol. Biol.* 134:63-69.
- De Reu, K., K. Grijspeerd, W. Messens, A. Heyndrickx, and M. Uyttendaele. 2006. Eggshell factors influencing eggshell penetra-

- tion and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella enteritidis*. Int. J. Food Microbiol. 112:253–260.
- Dennis, J. M., S. Q. Xiao, M. Agarwal, D. J. Fink, and A. H. Heuer. 1996. Microstructure of matrix and mineral components of eggshells from White Leghorn Chickens (*Gallus gallus*). J. Morphol. 228:287–306.
- Dunn, I. C., N. T. Joseph, M. Bain, A. Edmond, and P. W. Wilson. 2009. Polymorphisms in eggshell organic matrix genes are associated with eggshell quality measurements in pedigree Rhode Island Red hens. Anim. Genet. 40:110–114.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2005. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to the microbiological risks on washing of table eggs. EFSA J. 269:1–39.
- Fraser, A. C., M. M. Bain, and S. E. Solomon. 1999. Transmission electron microscopy of the vertical crystal layer and cuticle of the eggshell of the domestic fowl. Br. Poult. Sci. 40:626–631.
- Gautron, J., M. T. Hincke, and Y. Nys. 1997. Precursor matrix proteins in the uterine fluid change with stages of eggshell formation in hens. Connect. Tissue Res. 36:195–210.
- Hasiak, R. J., D. V. Vadehra, and R. C. Baker. 1970. Lipid composition of the egg exteriors of the chicken *Gallus gallus*. Comp. Biochem. Physiol. 37:429–435.
- Hincke, M. T., Y. Nys, J. Gautron, K. Mann, and A. B. Rodriguez-Navarro. 2012. The eggshell: Structure, composition and mineralization. Front. Biosci. Special Edition on Biomineralization 17:1266–1280.
- Hutchison, M. L., J. Gittins, A. Walker, A. Moore, and C. Burton. 2003. Washing table eggs: A review of the scientific and engineering issues. World's Poult. Sci. J. 59:233–248.
- Jones, D. R., K. E. Anderson, P. A. Curtis, and F. T. Jones. 2002. Microbial contamination in inoculated shell eggs: I. Effects of layer strain and hen age. Poult. Sci. 81:715–720.
- Khajehpour, M., J. L. Dashnau, and J. M. Vanderkooi. 2006. Infrared spectroscopy used to evaluate glycosylation of proteins. Anal. Biochem. 348:40–48.
- Leleu, S., W. Messens, K. De Reu, S. De Preter, and L. Herman. 2011. Effect of egg washing on the cuticle quality of brown and white table eggs. J. Food Prot. 74:1649–1654.
- Messens, W., K. Grijspeerdt, and L. Herman. 2005. Eggshell penetration by *Salmonella*: A review. World's Poult. Sci. J. 61:71–85.
- Musgrove, M. T., D. R. Jones, J. K. Northcutt, P. A. Curtis, and K. E. Anderson. 2004. Survey of shell egg processing plant sanitation programs: Effects on non egg contact surfaces. J. Food Prot. 67:2801–2804.
- Nascimento, V. P., S. Cranstoun, and S. E. Solomon. 1992. Relationship between shell structure and movement of *Salmonella enteritidis* across the eggshell wall. Br. Poult. Sci. 33:37–48.
- Nicholson, M. W., A. N. Barclay, M. S. Singer, S. D. Rosen, and P. A. van der Merwe. 1998. Affinity and kinetic analysis of L-selectin (CD62L) binding to glycosylation-dependent cell-adhesion molecule-1. J. Biol. Chem. 273:763–770.
- Nys, Y., M. T. Hincke, J. L. Arias, J. M. Garcia-Ruiz, and S. E. Solomon. 1999. Avian eggshell mineralization. Poult. Avian Biol. Rev. 10:143–166.
- Pereira-Mouries, L., M. J. Almeida, C. Ribeiro, J. Peduzzi, and M. Barthelemy. 2002. Soluble silk-like organic matrix in the nacreous layer of the bivalve *Pinctada maxima*. A new insight in the biomineralization field. Eur. J. Biochem. 269:4994–5003.
- Rodriguez-Navarro, A. B., C. S. Romanek, P. Alvarez-Lloret, and K. Gaines. 2006. Effect of in ovo exposure to PCBs and Hg on bone chemistry of Clapper Rail from a contaminated salt marsh in coastal Georgia. Environ. Sci. Technol. 40:4936–4942.
- Rodriguez-Navarro, A. B., O. Kalin, Y. Nys, and J. M. Garcia-Ruiz. 2002. Influence of the microstructure on the shell strength of eggs laid by hens of different ages. Br. Poult. Sci. 43:395–403.
- Rose-Martel, M., J. Du, and M. T. Hincke. 2012. Proteomic analysis provides new insight into the chicken eggshell cuticle. J. Proteomics 75:2697–2706.
- Sola, R. J., J. A. Rodriguez-Martinez, and K. Griebenow. 2007. Modulation of protein biophysical properties by chemical glycosylation: Biochemical insights and biomedical implications. Cell. Mol. Life Sci. 64:2133–2152.
- Sparks, N. H. C., and R. G. Board. 1984. Cuticle, shell porosity and water-uptake through hens' eggshells. Br. Poult. Sci. 25:267–276.
- Solomon, S. E. 1997. Egg and eggshell quality. Manson Publishing Ltd., London, UK.
- Sparks, N. H. C., and A. D. Burgess. 1993. Effect of spray sanitizing on hatching egg cuticle efficacy and hatchability. Br. Poult. Sci. 34:655–662.
- Stadelman, W. J., and O. J. Cotterill. 1995. Egg Science and Technology. Food Products Press, New York, NY.
- Travel, A., Y. Nys, and M. Bain. 2011. Effect of hen age, moult, laying environment and egg storage on egg quality. In Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products. Y. Nys, M. M. Bain, and F. Van Immerseel, ed. Woodhead Publishing, Oxford, UK.
- Van Den Brand, H., H. K. Parmentier, and B. Kemp. 2004. Effects of housing system (outdoor vs cages) and age of laying hens on egg characteristics. Br. Poult. Sci. 45:745–752.
- Wedral, E. M., D. V. Vadehra, and R. C. Baker. 1974. Chemical composition of the cuticle, and the inner and outer shell membranes from eggs of *Gallus gallus*. Comp. Biochem. Physiol. B 47:631–640.
- Wellman-Labadie, O., S. Lemaire, K. Mann, J. Picman, and M. T. Hincke. 2010. Antimicrobial activity of lipophilic avian eggshell surface extracts. J. Agric. Food Chem. 58:10156–10161.
- Wellman-Labadie, O., J. Picman, and M. T. Hincke. 2008. Antimicrobial activity of the Anseriform outer eggshell and cuticle. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 149:640–649.
- Wells, R. G. 1968. The measurement of certain egg quality characteristics: A review. Pages 207–249 in Egg Quality: A Study of the Hen's Egg. T. C. Carter, ed. Oliver & Boyd, Edinburgh, UK.





Contents lists available at ScienceDirect

## Food Control

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodcont](http://www.elsevier.com/locate/foodcont)

## Importance of eggshell cuticle composition and maturity for avoiding trans-shell *Salmonella* contamination in chicken eggs



Arantxa Muñoz<sup>a</sup>, Nazaret Dominguez-Gasca<sup>a</sup>, Concepción Jimenez-Lopez<sup>b</sup>,  
Alejandro B. Rodriguez-Navarro<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Mineralogía y Petrología, Universidad de Granada, Campus Fuente Nueva s/n, 18071 Granada, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Microbiología, Universidad de Granada, Campus Fuente Nueva s/n, 18071 Granada, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 30 June 2014

Received in revised form

24 January 2015

Accepted 3 February 2015

Available online 28 February 2015

## Keywords:

Cuticle

Eggshell

Food safety

*Salmonella*

ATR-FTIR

SEM

## ABSTRACT

The cuticle coating the eggshell surface is the first line of defense of the egg against bacterial ingress. However, the cuticle properties (i.e., thickness, degree of coverage, chemical composition) have a very large natural variability and this work analyzed how this variability influence the risk of eggs being contaminated by *Salmonella*. Microbial growth on the eggshell surface as well as the incidence of *Salmonella* penetration in eggs increases significantly with hen age for the groups (25, 35, and 52 weeks) considered in this study. It shows also that the cuticle is most effective against bacterial penetration between 6 and 72 h after eggs have being laid when this coating is fully mature and has not dried excessively. In contrast, freshly laid eggs can be easily contaminated as they have an immature cuticle which is not able to resist bacterial penetration. This study show also that the chemical composition of the mature cuticle determines the risk of trans-shell contamination by *Salmonella*. In particular, it shows that eggs with a cuticle rich in proteins have a decreased shell permeability and greater resistance against *Salmonella* penetration. The novel analytical technique used here to quantify the cuticle quality (based on infrared spectroscopy; ATR-FTIR) could be used in assisted selection programs aimed to improve the quality and safety of eggs.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Hen eggs are a popular and inexpensive source of proteins which are extensively consumed around the world (Nys, Bain, & Van Immerseel, 2011). However, they are also commonly associated to food-poisoning outbreaks due to their contamination with pathogenic bacteria (i.e., *Salmonella* enteritidis). Only in the EU, there is an estimated incidence of over 100.000 cases of salmonellosis per year, that being a serious health problem with an important economic impact (EFSA, 2009; Gastois et al., 2009; Messens, Grijspeerdt, & Herman, 2005; Solomon et al., 1997). Thus, it is important to take active actions to reduce the risk of such contamination. Contamination of the egg can occur either prior to the oviposition, due to infection of the reproductive organs, in

contaminated flocks, and/or during or after the oviposition, by trans-shell penetration, which is considered the prevalent route for bacterial contamination (Board & Tranter, 1995; Gantois et al., 2009; Messens et al., 2005). Cracked eggs or eggs with a poor eggshell quality (which can account for over 6% of total production) can be more easily contaminated with bacteria and pose an important risk to consumers as they need to be downgraded causing important economic losses to producers (Dunn et al., 2010; Hamilton, Hollands, Voisey, & Grunder, 1979; Washburn, 1982).

The egg is protected against bacterial contamination by the eggshell and the shell membranes, which if intact, act together as an effective physical barrier against bacterial penetration (Board & Tranter, 1995; De Reu et al., 2006; Jonchere et al., 2010). Even if the eggshell integrity is good, the mineral shell is still perforated by many pores that allow gas and water exchange necessary for the developing chick embryo but also possibilities microbial ingress and contamination of the egg content (Hincke, Nys, Gautron, Mann, & Rodríguez-Navarro, 2012). The cuticle, a very thin (up to 12 μm) organic layer, coats the eggshell surface and plugs the eggshell pore opening, thus limiting the movement of particles, water and

\* Corresponding author. Departamento de Mineralogía y Petrología, Universidad de Granada, 18002 Granada, Spain. Tel.: +34 958240059; fax: +34 958243368.

E-mail addresses: [arantxa@ugr.es](mailto:arantxa@ugr.es) (A. Muñoz), [nadoga@ugr.es](mailto:nadoga@ugr.es) (N. Dominguez-Gasca), [cjl@ugr.es](mailto:cjl@ugr.es) (C. Jimenez-Lopez), [anava@ugr.es](mailto:anava@ugr.es) (A.B. Rodriguez-Navarro).

bacteria through the shell (Board & Halls, 1973; Board & Tranter, 1995; De Reu et al., 2006). It is composed mainly of proteins (glycoproteins) (90%) and, in a lesser proportion, polysaccharides and lipids (Baker & Balch, 1962; Hasiak, Vadehra, & Baker, 1970; Rodríguez-Navarro, Domínguez-Gasca, Muñoz, Ortega-Huertas, 2013; Rose-Martel, Du, & Hincke, 2012; Wedral, Vadehra, & Baker, 1974). Some of the cuticle proteins (lysozyme C, ovotransferrin, ovocalyxin and ovocleidin) and lipid components have been shown to have a potent antimicrobial activity and could significantly contribute to egg safety especially considering that it is the first barrier that microorganisms encounters (Jonchere et al., 2010; Rose-Martel et al., 2012; Wellman-Labadie, Picman, & Hincke, 2008, 2010). In fact, eggs with an absent or partially removed cuticle are more susceptible to bacterial contamination (Bain et al., 2013; Board & Halls, 1973; De Reu et al., 2006; Messens et al., 2005; Sparks & Board, 1984). Therefore, there is a great interest in studying the different factors that contribute to cuticle and eggshell quality to improve the safety and quality of eggs (Bain et al., 2013; Dunn et al., 2009; Jonchere et al., 2010; Nys et al., 2011; Solomon, 1997).

Eggshell quality and, particularly, cuticle properties are highly variable as they are influenced by a wide array of factors including hen age, genetics, and diet as well as hen housing (Bain et al., 2013; Board & Halls, 1973; Board & Tranter, 1995; Dunn et al., 2009; Leleu, Messens, De Reu, De Preter, & Herman, 2011; Nys et al., 2011; Solomon, 1997; Rodríguez-Navarro et al., 2013). Additionally, it has been shown that the cuticle composition is not constant and it changes with hen age and as it matures (Hasiak et al., 1970; Rodríguez-Navarro et al., 2013).

To evaluate how the natural variability of cuticle properties (i.e., thickness, degree of coverage, composition) can modify the risk of trans-shell contamination by bacteria, we have conducted a detailed study in which we determined the incidence of *Salmonella* penetrated eggs in eggs for hens of different ages and in which the cuticle properties are expected to vary substantially. The influence of cuticle maturity was also tested by evaluating bacterial penetration in freshly laid eggs exposed to *Salmonella* at different times after oviposition. Relevant cuticle properties (e.g., thickness, degree of coverage, morphology and chemical composition) were analyzed using complementary analytical techniques such as scanning electron microscopy (SEM) and attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) and their influence on *Salmonella* penetration was evaluated. ATR-FTIR spectroscopy is especially suited for the analysis of the eggshell cuticle quality as it provides detailed information about the chemical composition and thickness of this coating (Rodríguez-Navarro et al., 2013). Furthermore, it probes the cuticle chemical composition in its natural state without the need of extraction. Also, ATR signal penetration is limited to about 2 microns which is typically the thickness of the cuticle. However, being a local measurement, it does not provide information of the extent of the cuticle to evaluate the risk of eggs being contaminated coverage on the egg. Thus, for a more complete characterization of the cuticle quality, SEM observation was used to determine the cuticle coverage and the degree of exposure of shell pores. To the authors' knowledge, this is the first study evaluating how the natural variability in cuticle properties influences bacterial penetration. The study provides a new and comprehensive approach by *Salmonella* or other pathogens.

## 2. Material and methods

### 2.1. Samples

Hyline plus brown hen eggs were collected, immediately after being laid, directly from a local farm with no history of *Salmonella*

contamination (Avícola Garrido-García S.L, Albolote, Spain). To study the effect of hen age, eggs laid by hens of different age groups (25, 35 or 52 weeks old) were selected. For each hen age group studied, a total of 180 freshly laid eggs were collected. To evaluate the effect of cuticle maturity, subsets of 60 eggs, from each hen age group, were exposed to *Salmonella* suspension after 3, 6 or 72 h from oviposition, representing eggs with an immature, mature or dry cuticle, respectively. Eggs were kept at 20 °C throughout the experiments.

### 2.2. Bacterial strain and culture conditions

Experiments were conducted using *Salmonella arizonae* from the collection of the Department of Microbiology of the University of Granada. The strain was maintained at 4 °C on Tryptone Soya Agar, TSA (Oxoid, Hampshire, UK). Overnight cultures of *Salmonella* spp. at 30 °C in TSB (Oxoid) were used for inoculation of the ringer solutions (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) used for all microbial experiments. After inoculation of the ringer solution, bacteria were allowed a 20 min adaptation period before egg contamination.

### 2.3. Egg inoculation

Eggs were immersed in a with a 6 log cfu/mL *Salmonella* suspension in ringer solution. To evaluate the effect of cuticle maturity, subsets of 60 eggs, from each hen age group, were inoculated after 3, 6 or 72 h from oviposition, representing eggs with an immature, mature or dry cuticle, respectively. Eggs were placed in pairs in sterile bags containing 20 mL of the microbial suspension. The eggs were gently massaged for 3 min, avoiding to wet the sharp end (used for later analyses), allowing for bacterial transfer from the suspension to the eggshell. This method guaranteed a microbial contamination of *S. arizonae* of 3–5 log cfu per egg. Next, eggs were placed into a plastic box to ensure a constant humidity and kept at 20° C during the entire duration of the experiment (21 days). Between 36 and 48 h following contamination, 30 eggs from each set were examined to determine surface total microbial load, *S. arizonae* penetration and cuticle composition and eggshell properties. At day 21 after contamination, the remaining 30 eggs were examined to determine the same parameters. Control experiments using the same number of eggs but without exposing them to *Salmonella* suspension were run in parallel to determine the total microbial surface load of non-contaminated eggs and to verify the absence of *Salmonella* in the egg content in the control.

### 2.4. Surface microbial analyses

To measure the microbial surface load on the eggshell surface, eggs were placed individually in sterile bags containing 10 mL of ringer solution and gently massaged for 1 min (without wetting the non-contaminated sharp end) to transfer the microorganisms present in the eggshell to the saline solution. After that, 100 µL of the appropriate dilutions were plated by triplicate onto TSA and incubated at 30 °C for 48 h prior to enumeration. Total microbial counts were referred as log cfu/shell after applying the correcting factor ( $\times 10$ ) corresponding to the total volume (10 mL) where the bacterial suspension for each egg was obtained.

### 2.5. Penetration of *Salmonella*

After determining the surface microbial counts, each egg was pulverized with 70% ethanol and flamed (approx. 5 s) twice before breaking it aseptically (modified from De Reu et al., 2006). Dilutions 1:10 of homogenised egg contents were prepared in sterile buffered peptone water (BPW) (Oxoid) and incubated at 30 °C for 24 h. After

the pre-enrichment process, an aliquot for each sample was plated in XLD agar (Xylose, Lysine, Desoxicolate agar) (Oxoid), selective medium for *Salmonella*. Growth of translucent to pink colonies with black centers after 24–48 h at 30 °C, indicated the presence of *S. arizonae* in the egg interior, evidencing, therefore that the eggshell was penetrated by the bacteria. Immediately after breaking each egg, a piece of the eggshell from the egg sharp end (not exposed to the *Salmonella* suspension) was collected and analyzed by infrared spectroscopy.

## 2.6. Infrared spectroscopy

To determine the cuticle chemical composition of each egg, the freshly cut piece of eggshell from the non-contaminated sharp end of the egg was analyzed by infrared spectroscopy. The outer surface was pressed against the ATR diamond crystal window and the Infrared (IR) spectra recorded at a 2 cm<sup>-1</sup> resolution over 100 scans using an FTIR spectrometer (model 6200, JASCO Analytical Instruments, Japan). The amount of water, proteins, sulfate, phosphate, carbonate, polysaccharides and lipids were determined from the peak area of absorption peaks associated to characteristic molecular groups of each component (e.g. O–H: water; C–H: lipids or fatty acids; amide: proteins; C–O: carbonates; S–O: sulfates; P–O: phosphates; COC: sugars/polysaccharides; Rodríguez-Navarro et al., 2013). Overlapping peaks were resolved and their integrated areas measured using specially designed curve-fitting software. Calculated peak areas of the main bands were normalized to the total area of their spectral region (e.g., carbonate in 900–1800 cm<sup>-1</sup>; OH in 900–4000 cm<sup>-1</sup>).

## 2.7. Eggshell thickness

After finalizing each experiment, shell thickness was measured for each egg. Three measurements per egg were made around the egg waist with a digital calliper and their mean value recorded for statistic analyses.

## 2.8. Scanning electron microscopy

At the end of each experiment, pieces of eggshell from the non-contaminated sharp end of the egg were collected for scanning EM and EDX analyses. Samples were carbon coated (Hitachi UHS evaporator, Hitachi, Tokyo, Japan) and analyzed with a high-resolution scanning electron microscope (SEM; Auriga, Zeiss, Germany) operated at 15 kV. For each hen age group, a total of 10 eggs were analysed, 5 eggs that were penetrated by *Salmonella* and 5 eggs that were not penetrated.

## 2.9. Statistical analyses

Basic descriptive statistics were used to analyze the determined eggshell and cuticle properties. Analysis of variance (one-way ANOVA) was used to compare properties and surface microbial counts between the different groups of samples analyzed. Pearson's correlation analysis and linear regression models were used to study relationships among the different properties measured. All statistical analyses were performed using the software package SPSS 20.0 (IBM, New York, USA).

# 3. Results

## 3.1. Eggshell surface microbial counts

As shown in Fig. 1, eggs exposed to a 6 log cfu/ml *S. arizonae* suspension showed surface microbial counts of ~4 log cfu/egg

which was slightly greater than that of not exposed control eggs (~3.2 log cfu/egg). Surface microbial counts for *Salmonella* penetrated eggs were significantly higher ( $P < 0.01$ ) than non-penetrated eggs (Fig. 1 a). The average increment for surface counts, from non-penetrated to penetrated eggs was about 0.9 log unit. On the other hand, eggs from different hen age groups showed different surface counts with increases with hen age. Eggs from the young hens group (25 weeks) had about 1 log unit lower microbial surface counts than eggs from other hen age (35 and 52 weeks) groups. Also, the total surface counts after 21 days showed a smaller increment in eggs from the youngest hen age group (25 weeks) than in other groups, suggesting that the cuticle in eggs of young hens is able to limit the growth of bacteria on the eggshell surface (Fig. 1 b). On the other hand, when comparing eggs that were exposed to *Salmonella* at different times (at 3, 6 or 72 h after oviposition), no significant differences in total surface counts were observed. However, eggs exposed to *Salmonella* with an immature cuticle showed a higher variability of surface counts (up to 2.0 log units) than eggs exposed at other times (about 0.5 log units), indicating that the maturity of the cuticle has some influence on the growth of microorganisms on the eggshell surface.

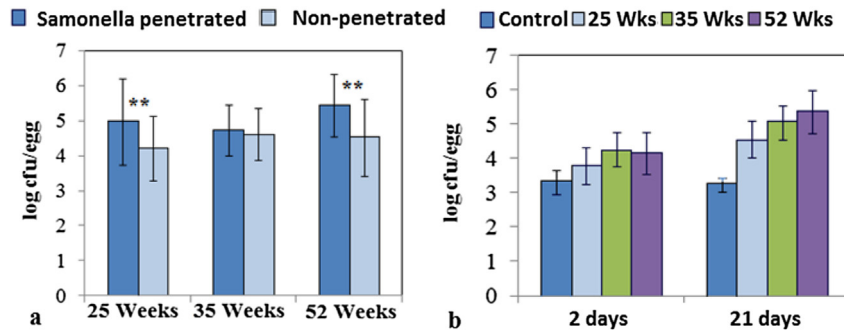
## 3.2. Penetration of *Salmonella*

Experiments showed different incidence of *Salmonella* penetrated eggs for the different hen age groups studied (25, 35 and 52 weeks) and/or depending on the maturity of the cuticle (immature: 3 h, mature: 6 h and dry: 72 h) at the time at which they were exposed to the *Salmonella* suspension. The main results of the effect of these two variables in the percentage of penetrated eggs are summarized in Fig. 2. The most evident differences were due to cuticle maturity (Fig. 2 a). Specifically, eggs that were exposed to *Salmonella* when the cuticle was immature (3h) had the highest incidence of penetrated eggs (over two-fold increase compared with other times). In contrast, the incidence of penetrated eggs was lowest in eggs exposed to *Salmonella* with a mature cuticle (6h), particularly for eggs laid by young hens (25 weeks), for which there was only one contaminated egg out of 60 (1.7%). In the case of eggs exposed to *Salmonella* with a dry cuticle (72h), the number of penetrated eggs increased in two age groups (25 and 52 weeks) but overall remained almost the same. When comparing the total number of penetrated eggs in different hen age groups, the incidence of penetrated eggs was the lowest (12.7%) for the youngest hen group (25 weeks). In the other hen age groups (35 and 52 weeks), the incidence of penetrated eggs was slightly higher (15%) with not evident differences between the later groups (Fig. 2 b). Thus, the risk of *Salmonella* penetration in eggs is dependent on cuticle maturity and hen age, being the highest for freshly laid eggs with an immature cuticle from older hens.

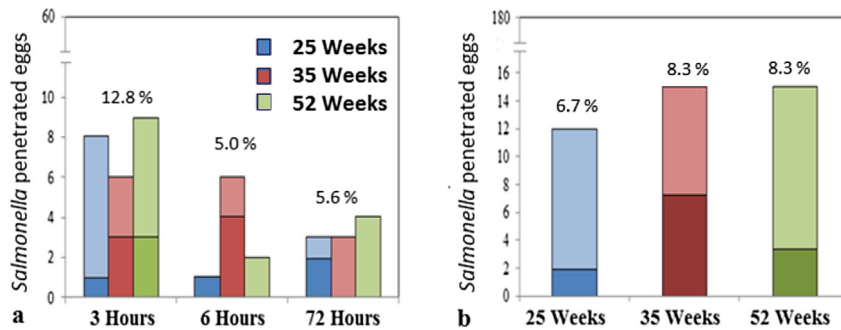
## 3.3. Eggshell cuticle composition

The amount of cuticle and its chemical composition was determined by analyzing the surface of eggs by ATR-FTIR spectrometry in experiments ended after 2 days from the time of inoculation with *Salmonella*. The different chemical components of the cuticle (mainly proteins, polysaccharides and lipids) and of the shell mineral (carbonate) contribute to the IR spectra with peaks of varying intensity depending on their relative concentration of each component in the cuticle and the cuticle thickness (see Fig. 3). Pearson correlation analyses (Table 2) show that the intensity of carbonate peaks is strongly and negatively correlated to that of proteins (amides), polysaccharides (sugars) and lipids (CH) peaks, which confirm that the shell mineral is coated by these components of the cuticle. Thus, as the cuticle became thicker, the signal





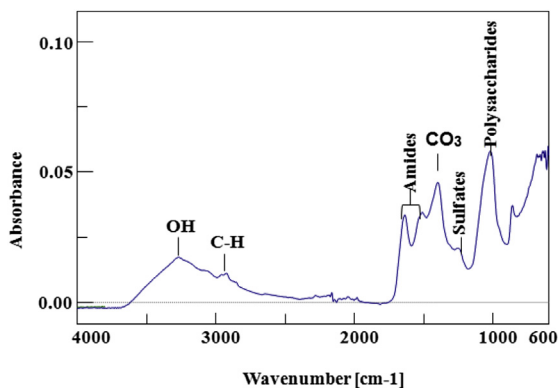
**Fig. 1.** Total microbial counts in eggshell surface in eggs from different hen age groups (25, 35 or 52 weeks): **a)** Surface microbial count in *Salmonella arizonae* penetrated and non-penetrated eggs; **b)** Evolution of surface microbial counts after 2 and 21 days. Significant differences are indicated as \*\* ( $P < 0.01$ ).



**Fig. 2.** Incidence of *Salmonella arizonae* penetrated eggs: **a)** As a function of cuticle maturity (3, 6 and 72 h); **b)** As a function of hen age (25, 35 or 52 weeks). Dark color: experiment ended after 2 days. Light color: experiments ended after 21 days.

from the cuticle components (i.e., proteins) increased whereas the signal from the underlying shell carbonate decreased accordingly. At the same time, the amount of water on the eggshell surface (measured as the OH band) is negatively correlated with cuticle components (particularly proteins and lipids), indicating that these components regulate shell permeability (for instance by sealing the shell pores). On the other hand, the composition of the cuticle showed a large variability. The coefficient of variation (CV) for different compositional parameters determined such as carbonate, amides, water, polysaccharides typically ranges from 10 up to 30%, though for some of the determined parameters (i.e., lipids), the variability is even larger ( $CV > 50\%$ ).

When comparing the IR spectra of *Salmonella* penetrated and non-penetrated eggs the different hen age groups (Fig. 4), it is evidenced that their cuticle thickness and/or its chemical



**Fig. 3.** Representative ATR-FTIR spectra of an eggshell showing the absorption bands of main cuticle chemical components.

composition is significantly different. In general, the IR spectra of eggshells from *Salmonella* penetrated eggs showed a higher carbonate signal compared to that of non-penetrated eggs, indicating that the shell mineral is more exposed and contribute more to the IR spectra. That means penetrated eggs have a lesser amount of cuticle. They also have, generally, lower amides signal (less protein), confirming that they have a lesser amount of cuticle deposited or that this organic coating is depleted in proteins (with the exception of the oldest hen group, 52 weeks). Additionally, in *Salmonella* penetrated eggs, the OH (water) signal was generally greater compared to those of non-penetrated eggs, indicating that contaminated eggs have a greater shell permeability due to open pores which would facilitate the movement of water across the shell. On the other hand, *Salmonella* penetrated and non-penetrated eggs showed very similar amount of polysaccharides in the cuticle, suggesting that amount of polysaccharides do not determine *Salmonella* penetration.

On the other hand, it is observed that depending on the time at which eggs were exposed to *Salmonella*, the chemical composition of the cuticle determined or not if eggs were subsequently penetrated by *Salmonella* (Fig. 5). In eggs exposed to *Salmonella* at 3 h

**Table 1**

Eggshell thickness for eggs from different hen age groups. No statistically significant differences in eggshell thickness were observed between *Salmonella* contaminated and not contaminated eggs. P is the probability and N is the number of samples.

Hen age (weeks)	<i>Salmonella</i> positive		<i>Salmonella</i> negative		F	P
	Thickness (μm)	N	Thickness (μm)	N		
25	371 ± 6	12	382 ± 4	168	0.120	0.729
35	385 ± 4	15	367 ± 5	165	1.957	0.164
52	398 ± 7	15	415 ± 5	165	1.617	0.204

N: Number of samples F: Variance of the group means P: Significance for  $\alpha = 95\%$ .

**Table 2**

Pearson correlation analysis for different cuticle compositional parameters determined from the ATR-FTIR spectra. R is the correlation coefficients, P is the probability and N is the number of samples. Properties and values with  $P < 0.05$  are highlighted in bold.

		S. Thickness	CO <sub>3</sub>	Sugars	Amides	Lipids	OH
S. thickness	R	1					
	P	0					
	N	270					
CO <sub>3</sub>	R	-0.007	1				
	P	0.912					
	N	270	270				
Sugars	R	0.092	-0.007	1			
	P	0.137	0.909				
	N	270	270	270			
Amides	R	0.087	<b>-0.726</b>	<b>0.224</b>	1		
	P	0.177	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>			
	N	270	270	270	270		
Lipids	R	0.005	<b>-0.716</b>	-0.006	<b>0.577</b>	1	
	P	0.937	<b>&lt;0.001</b>	0.925	<b>&lt;0.001</b>		
	N	270	270	270	270	270	
OH	R	-0.004	<b>0.511</b>	<b>-0.140</b>	<b>-0.680</b>	<b>-0.435</b>	1
	P	0.945	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.022</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0
	N	270	270	270	270	270	270

after oviposition, when the cuticle is immature, there were no differences in the cuticle composition between penetrated and non-penetrated eggs, indicating that the immature cuticle was not able to resist bacterial penetration whatever its amount or composition. In contrast, in eggs exposed to *Salmonella* at 6 h after oviposition, when the cuticle is mature, penetrated eggs have higher carbonate and water signals as well as lower protein signal. This is indicative that penetrated eggs have a more permeable shell due to a lesser amount of cuticle (thinner), making this coating less resistant to *Salmonella* penetration and facilitating contamination of the egg content. In eggs exposed to *Salmonella* at 72 h after oviposition, when the cuticle is dry, there are no such clear

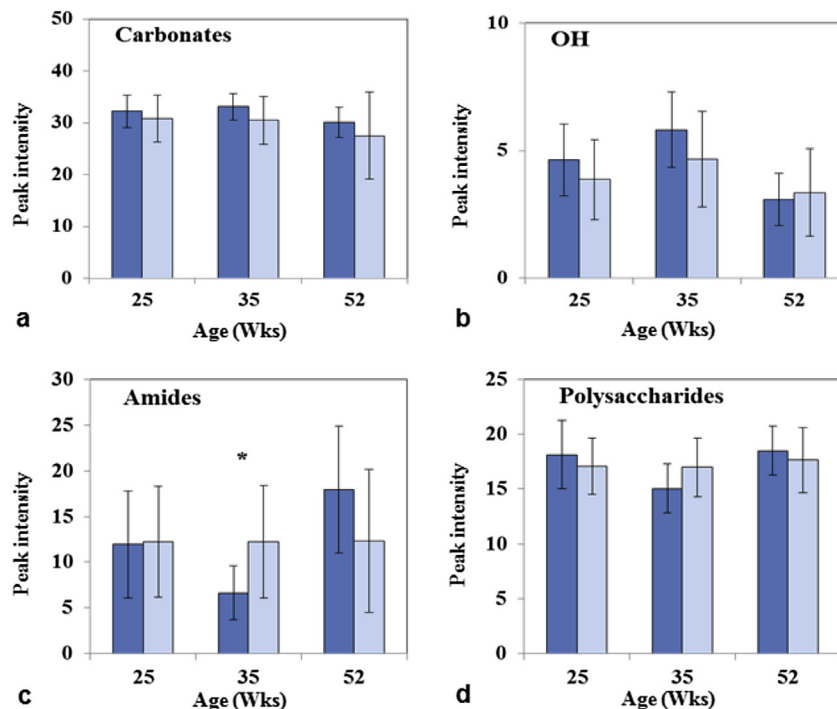
differences in the cuticle composition between penetrated and non-penetrated eggs, as in the case at 6 h. Still, eggs that were penetrated have a slightly higher carbonate signal, indicative of a thinner cuticle, and a higher amides (protein) signal. When the cuticle is dry, a greater amount of proteins could make the coating more brittle and facilitate crack formation and contamination of the egg.

### 3.4. Eggshell thickness

The eggshell thickness of *Salmonella* penetrated and non-penetrated eggs was not significantly different, for any of the hen ages groups considered (see Table 1), indicating that, in this study, the penetration of *Salmonella* was not mainly determined by the thickness of the mineral shell, and other eggshell properties should be invoked to explain bacterial shell penetration.

### 3.5. Scanning electron microscopy

When comparing the shell surface, SEM observation also revealed significant differences in the cuticle thickness and/or coverage between eggs that were penetrated by *Salmonella* and those that were not (Fig. 6). In general, eggs that were penetrated do not have cuticle or this has a poor degree of coverage, which leaves the shell surface and pore openings exposed, facilitating bacterial penetration across the shell and contamination of the egg (Fig. 6 a, e). In other cases, eggs have a thick cuticle with prominent fissures or cracks (Fig. 6 c) that can also facilitate the entry of bacteria. In either case, a poor cuticle quality facilitates *Salmonella* ingress and the contamination of the egg content. On the contrary, eggs that were not penetrated by *Salmonella*, generally, have a good cuticle coverage with few pore openings freely exposed on the shell surface (Fig. 6 b, d, f). These differences were more evident in eggs from younger hens (25 weeks group; Fig. 6 a–d), than eggs from



**Fig. 4.** Intensity of ATR-FTIR peaks associated to main chemical components of the eggshell cuticle for eggs that were penetrated or not by *Salmonella* for the different hens age groups considered. Significant differences of parameters within groups are indicated as \* ( $P < 0.05$ ) or \*\* ( $P < 0.01$ ). Data are from experiments ended after 2 days from the inoculation.

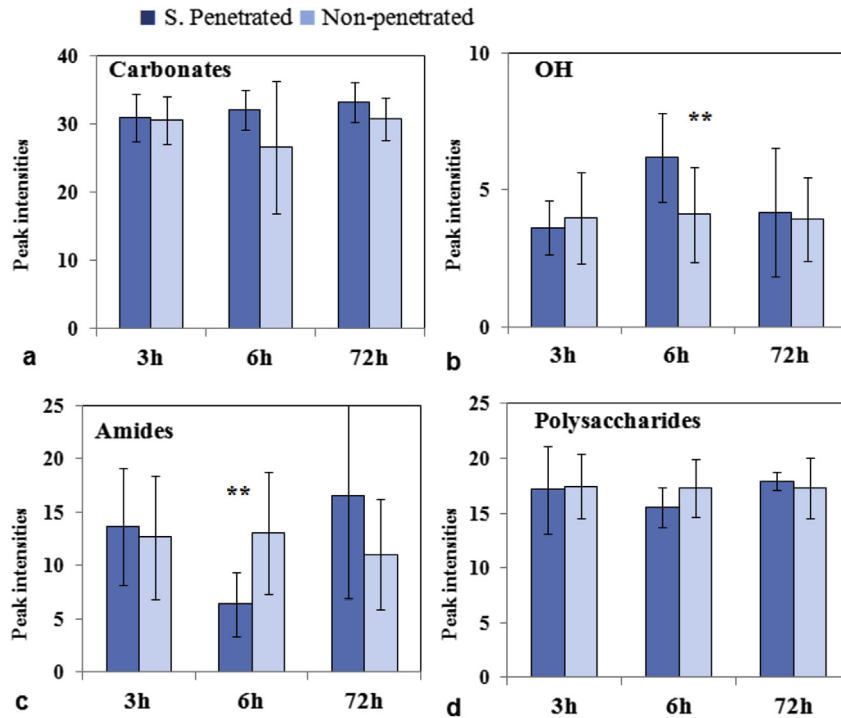


Fig. 5. Intensity of ATR-FTIR peaks associated to main chemical components of the eggshell cuticle for eggs that were penetrated or not by *Salmonella* after being exposed at different times from oviposition. Significant differences of parameters within groups are indicated as \* ( $P < 0.05$ ) or \*\* ( $P < 0.01$ ). Data combines all age groups and are from experiments ended after 2 days from the inoculation.

other hen age (35 and 52 weeks) groups which have a more variable cuticle quality (Fig. 6 e, f). In the later groups, the differences in the eggshell surface morphology between penetrated and non-penetrated eggs were not so obvious, as in some cases pore openings were visible irrespectively of their contamination status (Fig. 6 e, f). Nevertheless, the possibility exists that in non-penetrated eggs, the shell pores are internally plugged, though this fact could not be assessed by SEM.

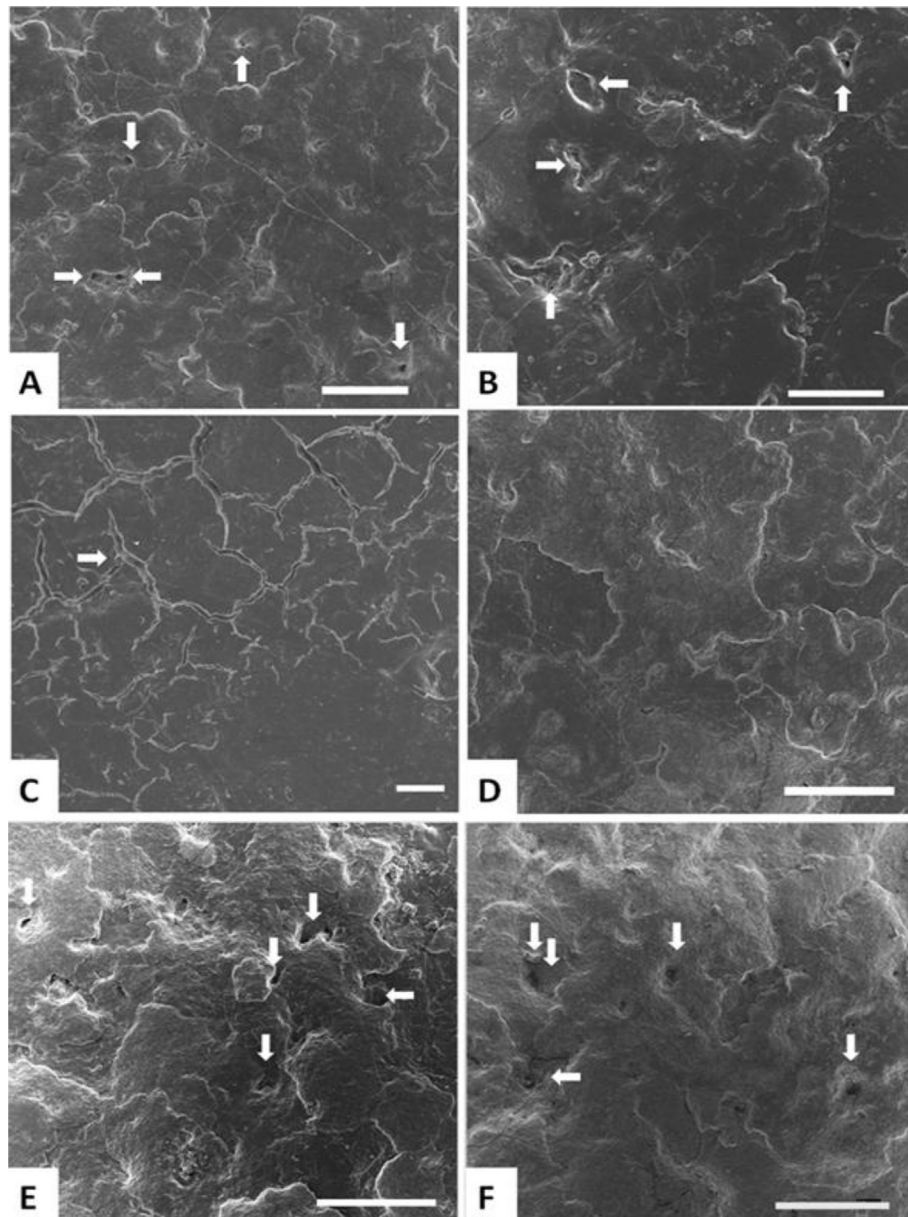
#### 4. Discussion

The cuticle, together with the eggshell and the eggshell membranes, acts as an effective physical and chemical barrier against bacterial contamination of the egg (Hincke et al., 2012). The cuticle coating the shell surface is in direct contact with the environment and is specially adapted to resist microbial colonization and penetration (Bain et al., 2013; Board & Tranter, 1995; De Reu et al., 2006). Its composition rich in proteins with antimicrobial activity (i.e., lysozyme C, ovotransferrin) limits microbial growth on the egg surface (Rose-Matel et al., 2012; Wellman-Labadie et al., 2008). Bird species adapted to challenging environments with high microbial loads (i.e., duck, flamingo, Australian brush-turkey) have developed a cuticle that is thicker or rich in antimicrobial proteins (Wellman-Labadie et al., 2008; Kusuda, Iwasawa, Doi, Ohya, & Yoshizaki, 2011; D'Alba, Jones, Badawy, Eliason, & Shawkey, 2014). However, we have observed that the capacity to limit microbial growth diminishes with hen age, possibly due to a decrease in the amount of antimicrobial components in the cuticle of eggs laid by older hens. A reduced amount of antimicrobial cuticle components could be in part responsible for the increase in the incidence of bacterial contamination of eggs from older hens (Berrang et al., 1998; Jones, Anderson, Curtis, & Jones, 2002; Nascimento, Cranstoun, & Solomon, 1992). On the other hand, the higher surface microbial counts found on eggs that were penetrated by *Salmonella* could be due also to a reduced amount of

cuticle antimicrobial components. Alternatively, a higher microbial load on the egg surface could be responsible for the contamination of their egg content (Messens et al., 2005; Musgrove, Jones, Northcutt, Cox, & Harrison, 2004).

The presence of the cuticle with a good coverage has been shown to be the most important eggshell characteristic determining bacterial shell penetration (Bain et al., 2013; Board & Tranter, 1995; De Reu et al., 2006). Generally, eggs with a good cuticle quality were not contaminated by *Salmonella* whereas eggs with a poor cuticle in which pore opening were exposed showed a higher incidence of contamination. However, the functionality of the cuticle against bacterial penetration is also highly dependent on its chemical composition and maturity, as this study shows. In fact, our results show that the cuticle composition (i.e., amount of proteins) is different in eggs that were penetrated or not by *Salmonella*. Thus, cuticle compositional parameters, determined from ATR-FTIR analyses, which also inform about the cuticle thickness and shell permeability, could be used predictively to assess the risk of *Salmonella* contamination in eggs.

Freshly laid eggs can be contaminated more easily as the immature cuticle is less effective in resisting bacterial penetration (Miyamoto et al., 1998; Padron et al., 1990; Sparks & Board, 1985). Moreover, the lack of resistance of the cuticle seems to be independent of the amount of cuticle deposited and of its composition, as shown in this study. At oviposition, the cuticle is a thick viscous liquid that dries in a few minutes (Sparks & Board, 1985). However, the cuticle does not become consolidated and mature until a few hours later (around 6 h), when it acquires optimum mechanical properties (unpublished observations) and becomes most resistant against bacterial penetration, reducing the risk of eggs being contaminated. The consolidation and stabilization of the cuticle during maturation is probably due to an increased glycosylation of proteins (Rodriguez-Navarro et al., 2013) as the cuticle starts to dry. Glycosylation increases both the structural stability of glycoproteins and their adhesion to substrates (Nicholson, Barclay, Singer,



**Fig. 6.** SEM images of the shell surface of eggs from different hen age groups and that were penetrated or not by *Salmonella arizonae*. a) and b) 25 week old hens; c) and d) 35 week old hens; e) and f) 52 week old hens. SEM images a), c) and e) correspond to eggs that were penetrated by *Salmonella*, whereas images b), d) and f) correspond to eggs that were not penetrated by *Salmonella*. Cuticle cracks and eggshell pore openings are indicated by arrows. Scale bars: a–b), d–f) 100 μm; c) 10 μm.

Rosen, & van der Merwe, 1998; Solá, Rodríguez-Martínez, & Griebenow, 2007). Later on, as the cuticle dries and cracks, the protective function of this layer is compromised, as water and bacteria can move more easily through the cuticle fissures and gain access the egg interior. Thus, according to our results and previous research (Tung, Garland, & Gill, 1979), the protection of the egg by the cuticle is only temporary, being optimum up to about 72 h. Thus, it is of most importance to optimize sanitation in the production and processing plants to minimize the contact of the eggs with dirty surfaces especially for freshly laid eggs to reduce the risk of bacterial contamination (Musgrove et al., 2004). These considerations are specially pertinent as furnished cages (introduced to comply with EU regulations) have a higher percentage of dirty eggs, which are exposed to higher microbial loads and can have a higher risk of contamination of the egg content if *Salmonella* is present (Gantois et al., 2009; Messens et al. 2005).

Also the age of hens is another important factor contributing to the risk of bacterial contamination. There is a gradual decline in quality of the cuticle with hen age (Board & Halls, 1973; De Reu et al., 2006; Rodríguez-Navarro et al., 2013) which explains the increase in the incidence of egg contamination by *Salmonella* or other pathogens with hen age (Berrang et al., 1998; De Reu et al., 2006; Jones et al., 2002; Nascimento et al., 1992). However, in this study, the influence of hen age, in the range explored, was less important than other factors such as cuticle maturity and cuticle chemical composition. Also, it is worth mentioning that there were not well defined compositional changes in the cuticle in brown eggs with hen age, at least in the age range studied. On contrary, in white eggs there was a gradual decrease in proteins, polysaccharides and lipids with hen age (Rodríguez-Navarro et al., 2013).

On the other hand, in this study, eggs were selected with good shell integrity, so that cuticle properties determined bacterial



penetration and not shell thickness. However, in a real production setting, eggshell thickness is an important factor for the risk of bacterial contamination of eggs, as it determines eggshell mechanical properties and the incidence of cracked eggs which can be readily contaminated by bacteria (Hamilton et al., 1979; Nascimento et al., 1992). Also, eggshell thickness could be the determinant factor, for bacterial penetration, in eggs lacking a cuticle or when the cuticle is less effective (i.e., in freshly laid eggs or in older eggs with a dry cuticle).

In conclusion, this study further evidence the importance of the cuticle as part of the natural defenses that the egg has against bacterial contamination, being the first barrier that microorganisms encounters, and that is specially adapted to resist bacterial penetration. Nevertheless, the functionality of the cuticle against bacterial penetration is highly dependent not only on the thickness and degree of coverage of this coating but also on its maturity and chemical composition, as this study reveals. All these cuticle characteristics need to be considered for a complete assessment of the risk of trans-shell contamination in eggs. On the other hand, the large natural variation of eggshell cuticle properties, which have an important genetic component (Bain et al., 2013), make it possible to select birds with cuticle traits that enable them to better resist bacterial contamination. Cuticle compositional parameters determined by ATR-FTIR can be very useful traits for selection programs aimed to improve the safety and quality of eggs.

## Acknowledgements

The authors are grateful for financial support through the grants: CGL2011-25906 (Ministerio de Economía y Competitividad); CEI2013-MP-11 and CEI2013-P-14 (Universidad de Granada), and RNM-179 research group (Junta de Andalucía). We also thank Avícola Garrido-García for providing fresh eggs and Bendición Funes and Alicia González (Universidad de Granada) for their assistance with analyses. We also thanks to anonymous referee for corrections and useful comments.

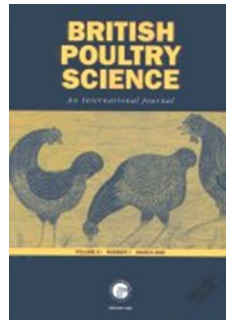
## References

- Bain, M. M., Mcdade, K., Burchmore, R., Law, A., Wilson, P. W., Schmutz, M., et al. (2013). Enhancing the egg's natural defence against bacterial penetration by increasing cuticle deposition. *Animal Genetics*, 44(6), 661–668. <http://dx.doi.org/10.1111/age.12071>.
- Baker, J. R., & Balch, D. A. (1962). A study of the organic material of hen's-eggshell. *Biochemical Journal*, 82, 352–361.
- Berrang, M. E., Frank, J. F., Buhr, R. J., Bailey, J. S., Cox, N. A., & Mauldin, J. (1998). Eggshell characteristics and penetration by *Salmonella* through the productive life of a broiler breeder flock. *Poultry Science*, 77, 1446–1450. <http://dx.doi.org/10.1093/ps/77.9.1446>.
- Board, R. G., & Halls, N. A. (1973). The cuticle: a barrier to liquid and particle penetration of the shell of the hen's egg. *British Poultry Science*, 14, 69–97. <http://dx.doi.org/10.1080/00071667308415999>.
- Board, R. G., & Tranter, H. S. (1995). The microbiology of eggs. In W. J. Stadelman, & O. J. Cotterill (Eds.), *Egg Science and Technology*. Westport: AVI Publishing Company, Inc.
- D'Alba, L., Jones, D. N., Badawy, H. T., Eliason, C. M., & Shawkey, M. D. (2014). Antimicrobial properties of a nanostructured eggshell from a compost-nesting bird. *Journal of Experimental Biology*, 217(Pt 7), 1116–1121. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.098343.1>.
- De Reu, K., Grijspeerd, K., Messens, W., Heyndrickx, M., Uyttendaele, M., Debevere, J., et al. (2006). Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*, 112(3), 253–260. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.011>.
- Dunn, I. C. (2010). *SABRE project, final brochure, 6th framework programme*.
- Dunn, I. C., Wilson, P. W., Lu, Z., Bain, M. M., Crossan, C. L., Talbot, R. T., et al. (2009). New hypotheses on the function of the avian shell gland derived from microarray analysis comparing tissue from juvenile and sexually mature hens. *General and Comparative Endocrinology*, 163(1–2), 225–232. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.03.006>.
- EFSA. (2009). Community summary report, food-borne outbreaks in the European Union in 2007. *The EFSA Journal*, 271, 1–128.
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Gast, R., Humphrey, T. J., et al. (2009). Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiology Reviews*, 33, 718–738. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00161.x>.
- Hamilton, R. M. G., Hollands, K. G., Voisey, P. W., & Grunder, A. A. (1979). Relationship between eggshell quality and shell breakage and factors that affect shell breakage in the field – a review. *World's Poultry Science Journal*, 35, 177–190. <http://dx.doi.org/10.1079/WPS19790014>.
- Hasiak, R. J., Vadehra, D. V., & Baker, R. C. (1970). Lipid composition of the egg exteriors of the chicken *Gallus gallus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 37, 429–435. [http://dx.doi.org/10.1016/0010-406X\(70\)90571-2](http://dx.doi.org/10.1016/0010-406X(70)90571-2).
- Hincke, M. T., Nys, Y., Gautron, J., Mann, K., & Rodríguez-Navarro, A. B. (2012). The eggshell: structure, composition and mineralization. *Frontiers in Bioscience*, 17, 1266–1280. <http://dx.doi.org/10.2741/3985>. Special Edition on Biomineralization.
- Jonchère, V., Rehault-Godbert, S., Hennequet-Antier, C., Cabau, C., Sibut, V., Cogburn, L. A., et al. (2010). Gene expression profiling to identify eggshell proteins involved in physical defense of the chicken egg. *BMC Genomics*, 11, 57. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-11-57>.
- Jones, D. R., Anderson, K. E., Curtis, P. A., & Jones, F. T. (2002). Microbial contamination in inoculated shell eggs: I. Effects of layer strain and hen age. *Poultry Science*, 81, 715–720. <http://dx.doi.org/10.1093/ps/81.5.715>.
- Kusuda, S., Iwasawa, A., Doi, O., Ohya, Y., & Yoshizaki, N. (2011). Diversity of the cuticle layer of avian eggshells. *The Journal of Poultry Science*, 48, 119–124. <http://dx.doi.org/10.2141/jpsa.010103>.
- Leleu, S., Messens, W., De Reu, K., De Preter, S., & Herman, L. (2011). Effect of egg washing on the cuticle quality of brown and white table eggs. *Journal of Food Protection*, 74, 1649–1654. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-013>.
- Messens, W., Grijspeerd, K., & Herman, L. (2005). Eggshell penetration by *Salmonella*: a review. *World's Poultry Science Journal*, 61, 71–85. <http://dx.doi.org/10.1079/WPS200443>.
- Miyamoto, T., Horie, T., Baba, E., Sasai, K., Fukata, T., & Arakawa, A. (1998). *Salmonella* penetration through eggshell associated with freshness of laid eggs and refrigeration. *Journal of Food Protection*, 61, 350–353.
- Musgrove, M. T., Jones, D. R., Northcutt, J. K., Cox, N. A., & Harrison, M. A. (2004). Identification of Enterobacteriaceae from washed and unwashed commercial shell eggs. *Journal of Food Protection*, 67(11), 2613–2616.
- Nascimento, V. P., Cranstoun, S., & Solomon, S. E. (1992). Relationship between shell structure and movement of *Salmonella enteritidis* across the eggshell wall. *British Poultry Science*, 33, 37–48. <http://dx.doi.org/10.1080/00071669208417442>.
- Nicholson, M. W., Barclay, A. N., Singer, M. S., Rosen, S. D., & van der Merwe, P. A. (1998). Affinity and kinetic analysis of L-selectin (CD62L) binding to glycosylation-dependent cell-adhesion molecule-1. *Journal of Biological Chemistry*, 273(2), 763–770. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.2.763>.
- Nys, Y., Bain, M., & Van Immerseel, F. (2011). Improving the safety and quality of eggs and egg products. In *Egg chemistry, production and consumption* (Vol. 1). Cambridge: Woodhead Publishing limited.
- Padron, M. N. (1990). *Salmonella typhimurium* penetration through the eggshell of hatching eggs. *Avian Diseases*, 34, 463–465. <http://dx.doi.org/10.2307/1591437>.
- Rodríguez-Navarro, A. B., Domínguez-Gasca, N., Muñoz, A., & Ortega-Huertas, M. (2013). Change in the chicken eggshell cuticle with hen age and egg freshness. *Poultry Science*, 92(11), 3026–3035. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2013-03230>.
- Rose-Martel, M., Du, J. D., & Hincke, M. T. (2012). Proteomic analysis provides new insight into the chicken eggshell cuticle. *Journal of Proteomics*, 75(9), 2697–2706. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.019>.
- Solá, R. J., Rodríguez-Martínez, J. A., & Griebenow, K. (2007). Modulation of protein biophysical properties by chemical glycosylation: biochemical insights and biomedical implications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(16), 2133–2152. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-007-6551-y>.
- Solomon, S. E. (1997). *Egg and eggshell quality*. London: Manson Publishing Ltd.
- Sparks, N. H. C., & Board, R. G. (1984). Cuticle, shell porosity and water-uptake through hens' eggshells. *British Poultry Science*, 25, 267–276. <http://dx.doi.org/10.1080/00071668408454866>.
- Sparks, N. H. C., & Board, R. G. (1985). Bacterial penetration of the recently developed oviposited shell of hens' eggs. *Australian Veterinary Journal*, 62, 169–170. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-0813.1985.tb07281.x>.
- Tung, M. A., Garland, M. R., & Gill, P. K. (1979). A scanning electron microscope study of bacterial invasion in Hen's egg shell. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 12(1), 16–22. [http://dx.doi.org/10.1016/S0315-5463\(79\)73030](http://dx.doi.org/10.1016/S0315-5463(79)73030).
- Washburn, K. W. (1982). Incidence, cause and prevention of egg shell breakage in commercial production. *Poultry Science*, 61(10), 2005–2012. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.0612005>.
- Wedral, E. M., Vadehra, D. V., & Baker, R. C. (1974). Chemical composition of the cuticle, and the inner and outer shell membranes from eggs of *Gallus gallus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 47B, 631–640. [http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491\(74\)90011-X](http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491(74)90011-X).
- Wellman-Labadie, O., Lemaire, S., Mann, K., Picman, J., & Hincke, M. T. (2010). Antimicrobial activity of lipophilic avian eggshell surface extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10156–10161. <http://dx.doi.org/10.1021/jf101954g>.
- Wellman-Labadie, O., Picman, J., & Hincke, M. T. (2008). Antimicrobial activity of the Anseriform outer eggshell and cuticle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 149, 640–649. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.01.001>.



## *Anexo II*

---



**Quality assessment of the cuticle of chicken eggshell by infrared spectroscopy and staining techniques: A comparative study.**

Journal:	<i>British Poultry Science</i>
Manuscript ID	CBPS-2016-044.R2
Manuscript Type:	Original Manuscript
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Dominguez-Gasca, Nazaret; Universidad de Granada, Departamento de Mineralogía y Petrología Muñoz, Arantxa; Universidad de Granada, Departamento de Mineralogía y Petrología Rodríguez-Navarro, Alejandro; Universidad de Granada, Departamento de Mineralogía y Petrología
Keywords:	Laying hens, Eggshell quality, Cuticle, Food safety, Shell permeability

SCHOLARONE™  
Manuscripts



1           **Quality assessment of the cuticle of chicken eggshell by infrared spectroscopy**  
2           **and staining techniques: A comparative study.**

3

4           Nazaret Domínguez-Gasca<sup>1</sup>, Arantxa Muñoz<sup>1</sup>, Alejandro B. Rodríguez-Navarro<sup>1,\*</sup>

5

6           <sup>1</sup>Departamento de Mineralogía y Petrología, Universidad de Granada, Campus  
7           Fuente Nueva s/n, 18071 Granada, Spain. E-mail: Nazaret Domínguez-Gasca:  
8           [nadoga@ugr.es](mailto:nadoga@ugr.es); Arantxa Muñoz: [arantxa@ugr.es](mailto:arantxa@ugr.es)

9

10           \*Corresponding author:

11           Prof. Alejandro B. Rodríguez-Navarro

12           Departamento de Mineralogía y Petrología, Universidad de Granada, Campus

13           Fuente Nueva s/n, 18071 Granada, SPAIN. Phone: +34 958240059 Fax: +34

14           958243368 Email: [anava@ugr.es](mailto:anava@ugr.es)

15

16

17

18

19

20

21

## 22 Abstract

- 23 1. The cuticle is a very thin organic layer that coats the eggshell surface and  
24 plugs the eggshell pores preventing bacterial penetration. It also reduces  
25 egg shell permeability which is important to maintain egg internal quality.  
26 Thus, the eggshell cuticle quality is crucial to ensure the food safety and  
27 quality of eggs.
- 28 2. In this work, we **compare** a new methodology to assess eggshell cuticle  
29 quality, based on attenuated total reflection-Fourier transform infrared  
30 spectroscopy (ATR-FTIR), **with more** traditional methods based on cuticle  
31 staining techniques.
- 32 3. Both techniques are useful to determine the amount cuticle, however the  
33 ATR-FTIR technique is independent of egg color, more sensitive and  
34 provides a complete information about the cuticle **and its** composition.  
35 Additionally, **it provides information about** eggshell permeability.
- 36 4. The methodology for cuticle quality assessment described in this work can  
37 be very useful for assistant selection programs aimed to improve the safety  
38 and quality of eggs.

## 39 Introduction

40 The egg content is protected from the environment by the eggshell (Nys *et*  
41 *al.* 1999; Hincke *et al.* 2012). The mineral shell is perforated by many pores that  
42 allow gas and water exchange necessary for the developing chick embryo but also  
43 possibilities microbial ingress and contamination of the egg content. To avoid this  
44 challenge, the eggshell surface is coated by a very thin (up to 12  $\mu\text{m}$ ) organic

1  
2  
3  
4 45 layer, the cuticle, that plugs the pore openings, preventing bacteria ingress through  
5  
6 46 the shell (Board and Halls, 1973; Board and Tranter, 1995; De Reu *et al.* 2006;  
7  
8 47 Bain *et al.* 2013). Additionally, it contains proteins and lipids with a potent  
9  
10 48 antimicrobial activity (Baker and Balch, 1962; Wellman-Labadie *et al.* 2008,  
11  
12 49 2010; Jonchere *et al.* 2010; Rose-Martel *et al.* 2012). Thus, the cuticle is an  
13  
14 50 effective barrier against bacteria penetration and it is of great importance for the  
15  
16 51 food safety of eggs. In fact, it has been shown that eggs with an absent or partially  
17  
18 52 removed cuticle are more susceptible to bacterial contamination (Board and Halls,  
19  
20 53 1973; Sparks and Board, 1984; Messens *et al.* 2005; De Reu *et al.* 2006; Bain *et*  
21  
22 54 *al.* 2013). Additionally, the cuticle is very important for maintaining egg quality.  
23  
24 55 It controls shell permeability, reduces moisture and CO<sub>2</sub> loss through the shell,  
25  
26 56 slowing down the natural decline of egg internal quality (Stadelman and Cotterill,  
27  
28 57 1995; Nys *et al.* 2011). Therefore, there is a great interest in studying the cuticle  
29  
30 58 and eggshell quality in order to assure the safety and quality of eggs (Solomon,  
31  
32 59 1997; Dunn *et al.* 2009; Jonchere *et al.* 2010; Nys *et al.* 2011; Bain *et al.* 2013).

33  
34  
35  
36  
37 60 Cuticle quality (i.e., amount, degree of coverage **on the eggshell surface**) is  
38  
39 61 traditionally assessed by the degree of staining of the eggshell with specific dyes  
40  
41 62 with an affinity to cuticle (i.e., Edicol Pea Green; Board and Halls, 1973; De Reu  
42  
43 63 *et al.* 2006; Leleu *et al.* 2011; Bain *et al.* 2013) (See Fig. 1). Although the later  
44  
45 64 techniques are very effective and easy to apply to a large number of samples, do  
46  
47 65 not provide information about the chemical composition of the cuticle. In the  
48  
49 66 present study, we use the methodology based on attenuated total reflection Fourier  
50  
51 67 transform infrared spectrometry (ATR-FTIR; Rodriguez-Navarro *et al.* 2013) **to**  
52  
53 68 **asses a more complete characterization of the quality of the cuticle, including its**  
54  
55 69 **chemical composition. To validate this technique,** we compare it to the more

1  
2  
3  
4 70 classical staining technique. Additionally, we have used scanning electron  
5  
6 71 microscopy (SEM) and energy dispersive X-rays spectroscopy (EDX) to observe  
7  
8 72 the shell surface morphology and composition in eggs showing different degrees  
9  
10 73 of staining.  
11  
12  
13  
14  
15

## 16 75 **Materials and methods**

### 17 18 19 76 2.1. Samples

20  
21  
22 77 For the cuticle staining experiment, white eggs were collected, immediately after  
23  
24 78 being laid ( $\pm 1$  hour), from a local farm (Avícola Garrido-García S.L,  
25  
26 79 Spain) from young (25 weeks) and old (60 weeks) Hy-line hens. From  
27  
28 80 each hen age group studied, 36 eggs were collected. Additionally, 10  
29  
30 81 brown eggs (from 25 weeks old Hy-line hens) were collected from the  
31  
32 82 same farm for cuticle staining. Eggs were kept at 20° C throughout the  
33  
34 83 experiments. After cuticle staining, the surface of each egg was analyzed  
35  
36 84 by infrared spectroscopy. A selection of 9 white eggs with different  
37  
38 85 degrees of staining (3 low, 3 medium, 3 high, assessed visually) from the  
39  
40 86 old hen age group were analyzed by SEM and EDX spectroscopy.  
41  
42  
43

44  
45 87 For the egg weight loss experiment, 20 white eggs from 25 weeks and 60 weeks  
46  
47 88 old Hy-line hens and 20 brown eggs from brown Hy-line hens were  
48  
49 89 collected. The weight of individual eggs was recorded every day for a  
50  
51 90 week using a precision balance (Adam PGW753e). Percentage of weight  
52  
53 91 loss after a week was determined for each egg. During experiments, room  
54  
55 92 temperature was 20 ° C and the relative humidity was 41 %. At the end of  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 93 the week, the eggshell surface of each egg was analyzed at the equatorial  
5  
6 94 region by infrared spectroscopy.  
7

8  
9 95 Cuticle staining  
10

11  
12 96 To assess the amount and degree of coverage of the eggshell cuticle,  
13  
14 97 Cuticle Blue staining was used. A solution of 1% Cuticle Blue staining (MS  
15  
16 98 Technologies Ltd., UK) was prepared. The stain was applied to one half of the  
17  
18 99 egg by laying the eggs flat on the solution for 5 min. This dye stains the eggshell  
19  
20 100 green if the cuticle is present. The amount of cuticle in white eggs was estimated  
21  
22 101 by measuring the color change after staining ( $\Delta E_{ab}$ ) in three points in the egg  
23  
24 102 equator using a color spectrophotometer (model CM-700d; Konica-Minolta,  
25  
26 103 Japan) as described by Leleu *et al.* (2011). The averaged values of color change  
27  
28 104 from each egg were used for further analyses.  
29  
30

31  
32 105 Infrared spectroscopy  
33  
34

35  
36 106 To determine the cuticle chemical composition of each egg, freshly cut  
37  
38 107 pieces of eggshell (1 cm x 1 cm in size) from three different locations (equator,  
39  
40 108 sharp and blunt end), selected from the unstained half of each egg, were analyzed  
41  
42 109 by infrared spectroscopy. Spectra were recorded in three different points within  
43  
44 110 each egg location using a FTIR spectrometer (model 6200, JASCO Analytical  
45  
46 111 Instruments, Japan) equipped with a MIRACLE single reflection ATR attachment  
47  
48 112 (PIKE Technologies, Wisconsin, USA). The amount of water, proteins, sulfate,  
49  
50 113 phosphate, carbonate, polysaccharides, and lipids were determined from the area  
51  
52 114 of absorption peaks associated to characteristic molecular groups of each  
53  
54 115 component (e.g. O-H: water; C-H: lipids or fatty acids; amide: proteins; C-O:

1  
2  
3  
4 116 carbonates; S-O: sulfates; P-O: phosphates; COC: sugars/polysaccharides;  
5  
6 117 Rodriguez-Navarro *et al.* 2013). Overlapping peaks were resolved and their  
7  
8 118 integrated areas measured using in-house specially designed curve-fitting  
9  
10 119 software. Calculated peak areas of the main bands were normalized to the total  
11  
12 120 area of their spectral region (e.g., carbonate in 900 - 1800 cm<sup>-1</sup>; OH in 900-4000  
13  
14 121 cm<sup>-1</sup>). For correlation analyses between infrared peak areas and color change  
15  
16 122 parameter, only the averaged values determined at the equator region of the egg  
17  
18 123 were used.  
19  
20  
21  
22  
23

#### 24 25 125 Scanning Electron Microscopy

26  
27  
28 126 Pieces of eggshell cut (1 cm x 1 cm in size) from the equator of selected  
29  
30 127 samples were prepared for scanning SEM and EDX analyses to study the shell  
31  
32 128 surface morphology and composition. Particularly, since the cuticle is a phosphate  
33  
34 129 rich layer (Rodriguez-Navarro *et al.*, 2013), we determined the amount of  
35  
36 130 phosphorus by EDX on eggshell surface to estimate the amount of cuticle.  
37  
38  
39 131 Samples were carbon coated (Hitachi UHS evaporator, Hitachi, Tokyo, Japan)  
40  
41 132 and analyzed with a high-resolution scanning electron microscope (SEM; Auriga,  
42  
43 133 Zeiss, Germany) operated at 3 kV. For EDX analyses the microscope was  
44  
45 134 operated at 15 kV.  
46  
47

#### 48 135 Statistical analyses

49  
50  
51 136 Basic descriptive statistics were used to analyze the determined properties.  
52  
53 137 Analysis of variance (one-way ANOVA) was used to compare the determined  
54  
55 138 eggshell properties between the different groups of samples analyzed. Pearson's  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 139 correlation analysis and linear regression models were used to study the  
5  
6 140 relationships among the different eggshell properties measured. All statistical  
7  
8 141 analyses were performed using the software package SPSS 20.0 (IBM, New York,  
9  
10 142 USA).

## 13 143 **Results**

### 144 *Cuticle staining*

145 **White eggs** stained green with different degree of staining depending on  
146 the amount of cuticle deposited on the surface (Fig 1A). **Brown eggs stained dark**  
147 **green over a brown background (Fig 1B)**. All eggs, **white or brown**, stained with a  
148 homogeneous color all over the surface. **White eggs from young hen age group**  
149 **stained to a higher degree (higher  $\Delta E_{ab}$  values) than eggs from the older hen**  
150 **group, indicating that older hens have a lower amount of cuticle deposited (Fig**  
151 **1C)**. These differences were statistically significant ( $p < 0.05$ ). Also, white eggs  
152 from older hens show a larger variability in the values of  $\Delta E_{ab}$ , indicating that the  
153 cuticle quality in older hens is more variable. However, the variability of this  
154 parameters is small (about 3 %) when comparing different parts of the same eggs  
155 and larger between eggs within a given hen age group (about 12 %).

### 156 *Scanning Electron Microscopy*

157 **White eggs from old hens** that showed the highest degree of staining had a  
158 very porous and rough eggshell surface resulting from the accumulation of a large  
159 amount of spherical nanoparticles (about 100 nm in size) typical of the cuticle  
160 (Fig. 2A). Interestingly, though these eggs have a high amount of cuticle  
161 deposition, the organic coating does not close the shell pore openings. In contrast,

1  
2  
3  
4 162 eggs that showed a **medium degree of** staining show a **smoother** eggshell surface  
5  
6 163 with a patchy distribution of the cuticle material **at the micrometer scale** (Fig. 2B).  
7  
8 164 Eggs **showing a low** degree of staining have a **lesser amount of cuticle and have**  
9  
10 165 **mineral and pore openings more exposed** (Fig. 2C). On the other hand, the  
11  
12 166 analyses the outer eggshell surface by EDX show that the outer eggshell surface is  
13  
14 167 enriched in phosphorus, particularly in eggs showing a higher degree of staining  
15  
16 168 which have a higher P to Ca signal ratio. In contrast, eggs with a low degree of  
17  
18 169 staining have a significantly lower P to Ca signal ratio (Fig. 2D).  
19  
20  
21

#### 22 *Infrared spectroscopy*

23  
24  
25 171 The different chemical components of the cuticle (e.g., proteins,  
26  
27 172 polysaccharides and lipids), the shell mineral (carbonate) and water contribute to  
28  
29 173 the IR spectra **of eggshell surface** with peaks of varying intensity depending on  
30  
31 174 the amount of each component (Fig. 3 and Table 1). Thus, from the IR spectra it is  
32  
33 175 possible to estimate the amount of cuticle present on the egg surface as well as its  
34  
35 176 chemical composition.  
36  
37

38  
39 177 On the other hand, **infrared data shows that** the composition of the cuticle  
40  
41 178 **is highly variable** within **each** group of eggs (i.e., **white eggs from** young hens).  
42  
43 179 The coefficient of variation (CV) for different compositional parameters  
44  
45 180 determined such as carbonate, amides, water, **phosphates**, polysaccharides  
46  
47 181 typically ranges from 10 up to 30 %, though for some of the determined  
48  
49 182 parameters (i.e., lipids), the variability is even larger (CV > 50%). The variability  
50  
51 183 is **lower** within the same part of the egg (**typically CV < 5 %; 15 % amide I**) **than**  
52  
53 184 **between different parts of the egg** (i.e., between equator and sharp pole; **CV: 12-**  
54  
55 185 **20 %**) and became quite large when comparing eggs (**typically CV: 15- 30 %**).  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3  
4 186 White and brown eggs show similar IR spectra with the same absorption  
5  
6 187 bands (Fig. 3). No significant differences were found when comparing the  
7  
8 188 compositional parameters of white and brown eggshells with the exception of  
9  
10 189 amide II signal which in this case show lower values for white eggs (Table 2). All  
11  
12 190 these data indicate suggest that white and brown eggs have similar amount of  
13  
14 191 cuticle and chemical composition. However, freshly laid white eggs from older  
15  
16 192 hens generally show a high water (OH) and amide I peak signal (Fig. 4). These  
17  
18 193 are the most intense egg white peaks, which is indicative that liquid water and  
19  
20 194 proteins from the egg interior (i.e., from the egg white) is able to pass through  
21  
22 195 eggshell pores. On contrast, these peaks are not as strong in brown eggs from old  
23  
24 196 hens. Thus, white eggs from older hens seem to have larger shell permeability  
25  
26 197 than brown eggs from the same age group.

27  
28  
29  
30  
31 198 Pearson correlation analyses (Table 3) show that the degree of staining in  
32  
33 199 white eggs ( $\Delta E_{ab}$ ) is positively correlated with the amount of cuticle proteins  
34  
35 200 (measured by the amides signal), confirming that Cuticle Blue dye has an affinity  
36  
37 201 to cuticle proteins. On the other hand, the intensity of carbonate peaks is strongly  
38  
39 202 and negatively correlated to that of proteins (amides), the main component of the  
40  
41 203 cuticle. Thus, as the cuticle became thicker, the signal from the cuticle  
42  
43 204 components (i.e., proteins) increased whereas the signal from the underlying shell  
44  
45 205 carbonate decreased accordingly. Another interesting finding is that the amount of  
46  
47 206 water on the eggshell surface (OH) is strongly and negatively correlated with  
48  
49 207 specific cuticle components (particularly phosphate, polysaccharides and lipids).  
50  
51  
52 208 In contrast, the OH and protein signal (amide I) are strongly and positively  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 209 correlated. This is probably due to egg white proteins and water permeating  
5  
6 210 through the shell pores in white eggs.

7  
8  
9 211 On the other hand, we observe that the total egg weight lost after a week  
10  
11 212 was negatively correlated to the amount of proteins and/ or lipids for the case of  
12  
13 213 brown eggs from young hens ( $y = -15.3 x + 4.1$ ;  $R^2 = 0.4$ ; where  $y$  is % egg  
14  
15 214 weight loss and  $x$  is amide II). However, in the case of white eggs, we did not  
16  
17 215 observe any defined relationship.

18  
19  
20  
21 216

## 22 23 217 Discussion

24  
25  
26 218 The study evaluate a novel methodology for a more complete assessment  
27  
28 219 of cuticle quality (i.e., amount and chemical composition) based on ATR-FTIR  
29  
30 220 analysis of the eggshell surface and compared it with more classical  
31  
32 221 methodologies (i.e, use of specific cuticle dyes). ATR-FTIR spectroscopy is a  
33  
34 222 surface characterization technique that is especially well suited for the analysis of  
35  
36 223 the eggshell cuticle quality. ATR signal penetration (a few microns) is comparable  
37  
38 224 to cuticle thickness (Hincke *et al.* 2012; Rodriguez-Navarro *et al.* 2013). This  
39  
40 225 technique provides detailed information about the amount and chemical  
41  
42 226 composition of the cuticle in its natural state; without the need of extracting it. It  
43  
44 227 also provides indirect but relevant information about other relevant eggshell  
45  
46 228 quality parameters such as shell permeability from the amount of surface water.  
47  
48 229 These analyses are relatively rapid (1 min per egg). However, being a destructive  
49  
50 230 measurement, it needs to be performed off line for eggshell quality assessment  
51  
52 231 during egg production. On the other hand, the eggshell pigments in brown eggs  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 232 (i.e., porphyrins) do not seem to contribute to infrared spectra. Porphyrins have  
5  
6 233 their strongest IR peaks around 1730 cm<sup>-1</sup> (Falk and Willis, 1951). However, this  
7  
8 234 peak could not be detected by our analyses. Thus, contrary to staining based  
9  
10 235 methods, the information obtained by IR spectroscopy seems to be independent of  
11  
12 236 egg color being equally applicable to white or brown eggs. In fact, brown and  
13  
14 237 white eggs seem to have similar cuticle composition. On the other hand, being a  
15  
16 238 local measurement, IR analyses does not provide information of the extent of the  
17  
18 239 cuticle coverage on the egg. Nevertheless, we have observed that the shell cuticle  
19  
20 240 has a limited variability within a given egg so that these type of local  
21  
22 241 measurements can be quite representative of the global egg surface composition.  
23  
24 242 Moreover, using complementary techniques such as scanning electron microscopy  
25  
26 243 (SEM) and energy dispersive X-rays spectroscopy (EDX), it can be observed that  
27  
28 244 even though there is a variable or patchy distribution of the cuticle at the micro  
29  
30 245 scale, there are always regions with cuticle present at mm range (ATR-probing  
31  
32 246 size).

33  
34  
35  
36  
37 247 It is important to note that different cuticle components have different  
38  
39 248 functionality. For instance, we have shown that the amount of proteins determines  
40  
41 249 the resistance of the cuticle against bacterial penetration (Muñoz *et al.* 2015). On  
42  
43 250 the other hand, egg weight loss (and shell permeability) can be controlled by the  
44  
45 251 amount of cuticle. An egg with a cuticle covering the pore openings should have a  
46  
47 252 lower shell permeability slowing the natural decline of egg internal quality and  
48  
49 253 extending its shelf life (Nys *et al.* 2011). In fact, we observe that the egg weight  
50  
51 254 lost during storage for a week was negatively correlated to the amount of proteins  
52  
53 255 and/ or lipids (at least in the case of white eggs).  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 256 Thus, analysis of cuticle chemical composition using ATR-FTIR  
5  
6 257 measurements could be highly relevant for assisted selection program aimed to  
7  
8 258 improve egg quality and safety through the optimization of the cuticle  
9  
10 259 composition.

11  
12  
13 260 In conclusion, ATR-FTIR analyses provide a more complete and detailed  
14  
15 261 information about the cuticle quality. Infrared spectroscopy is a simple, rapid,  
16  
17 262 unexpensive and highly sensitive tool that allows a quantitative estimation of the  
18  
19 263 amount of cuticle and its chemical composition on its natural state. It also allows  
20  
21 264 us to determine the shell permeability, an important eggshell property that  
22  
23 265 determines the evolution of the internal quality of eggs. Thus, quantification of  
24  
25 266 cuticle components using ATR-FTIR measurements could be highly relevant for  
26  
27 267 assisted selection program aimed to improve egg quality and safety through the  
28  
29 268 optimization of the cuticle composition.

30  
31  
32  
33  
34 269

### 35 36 270 **Acknowledgements**

37  
38  
39 271 The authors are grateful for financial support through grants: CGL2011-25906;  
40  
41 272 CGL2015-64683-P (Ministerio de Economía y Competitividad) and RNM-179  
42  
43 273 research group (Junta de Andalucía). We also thank Avícola Garrido-García for  
44  
45 274 providing fresh eggs and Bendición Funes, Alicia González and Rocío Márquez  
46  
47 275 (Universidad de Granada) for their assistance with analyses.

48  
49  
50 276

### 51 52 277 **References**

- 1  
2  
3  
4 278 BAIN, M. M., MCDADE, K., BURCHMORE, R., LAW, A., WILSON, P. W.,  
5  
6 279 SCHMUTZ, M., PREISINGER, R., & DUNN, I.C. (2013) Enhancing the egg's  
7  
8 280 natural defence against bacterial penetration by increasing cuticle deposition.  
9  
10 281 *Animal Genetics*, **44(6)**: 661-668.
- 12  
13 282 BAKER, J. R. & BALCH, D.A. (1962) A study of the organic material of hen's-  
14  
15 283 egg shell. *Biochemical Journal*, **82**: 352-361.
- 17  
18 284 BOARD, R. G. & HALLS, N.A. (1973) The cuticle: a barrier to liquid and  
19  
20 285 particle penetration of the shell of the hen's egg. *British Poultry Science*, **14**: 69-  
21  
22 286 97.
- 24  
25 287 BOARD, R. G. & TRANTER, H.S. (1995) The microbiology of eggs, in  
26  
27 288 STADELMAN, W.J. & COTTERILL, O.J. (Eds.) *Egg Science and Technology*,  
28  
29 289 pp. 81-104 (London, UK, The Haworth Press).
- 31  
32 290 DE REU, K., GRIJSPEERDT, K., MESSENS, W., HEYNDRICKX, M.,  
33  
34 291 UYTTENDAELE, M., DEBEVERE, J., & HERMAN, L. (2006) Eggshell factors  
35  
36 292 influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different  
37  
38 293 bacteria, including *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food*  
39  
40 294 *Microbiology*, **112**: 253- 260.
- 42  
43  
44 295 DUNN, I. C., WILSON, P. W., LU, Z., BAIN, M. M., CROSSAN, C. L.,  
45  
46 296 TALBOT, R. T. & WADDINGTON, D. (2009) New hypotheses on the function  
47  
48 297 of the avian shell gland derived from microarray analysis comparing tissue from  
49  
50 298 juvenile and sexually mature hens. *General and Comparative Endocrinology*,  
51  
52 299 **163(1-2)**: 225-232.

- 1  
2  
3  
4 300 FALK J.E. AND WILLIS J.B. (1951) The infra-red spectra of porphyrins and  
5  
6 301 their iron complexes. *Australian Journal of Scientific Research A* 4, 579.  
7  
8  
9 302 GAUTRON J., REHAULT-GODBERT S., PASCAL G., NYS Y. & HINCKE  
10  
11 303 M.T. (2011) Ovocalyxin- 36 and other LBP/BPI/Plunc – like proteins as  
12  
13 304 molecular actors of the mechanisms of the avian egg natural defences.  
14  
15 305 *Biochemical Society Transactions*, **39**: 971-976.  
16  
17  
18 306 HINCKE, M. T., NYS, Y., GAUTRON, J., MANN, K., RODRÍGUEZ-  
19  
20 307 NAVARRO, A. B. & MCKEE, M.D. (2012) The eggshell: structure, composition  
21  
22 308 and mineralization. *Frontiers in Bioscience*, **17**: 1266-1280.  
23  
24  
25 309 JONCHÈRE, V., REHAULT-GODBERT, S., HENNEQUET-ANTIER, C.,  
26  
27 310 CABAU, C., SIBUT, V., COGBURN, L.A., NYS, Y. & GAUTRON, J. (2010)  
28  
29 311 Gene expression profiling to identify eggshell proteins involved in physical  
30  
31 312 defense of the chicken egg. *BioMed Central Genomics*, **11**: 57.  
32  
33  
34  
35 313 LELEU, S., MESSENS, W., DE REU, K., DE PRETER, S., HERMAN, L.,  
36  
37 314 HEYNDRICKX, M., DE BAERDEMAEKER, J., MICHIELS, C.W., & BAIN,  
38  
39 315 M. (2011) Effect of egg washing on the cuticle quality of brown and white table  
40  
41 316 eggs. *Journal of Food Protection*, **74**: 1649–1654.  
42  
43  
44  
45 317 MESSENS, W., GRIJSPEERDT, K. & HERMAN, L. (2005) Eggshell penetration  
46  
47 318 by Salmonella: a review. *World's Poultry Science Journal*, **61**: 71–85.  
48  
49  
50 319 MUÑOZ, A., DOMÍNGUEZ-GASCA, N., JIMÉNEZ-LÓPEZ, C. &  
51  
52 320 RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. (2015) Importance of eggshell cuticle composition  
53  
54 321 and maturity for avoiding trans-shell Salmonella contamination in chicken eggs.  
55  
56 322 *Food Control*, **55**: 31-38.  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3  
4 323 NYS, Y., HINCKE, M.T., ARIAS, J.L., GARCIA-RUIZ, J.M. & SOLOMON, S.  
5  
6 324 E. (1999) Avian eggshell mineralization. *Poultry Avian Biology Reviews*, **10**: 143-  
7  
8 325 166.  
9  
10  
11 326 NYS, Y., BAIN, M. & VAN IMMERSEEL, F. (2011) Improving the safety and  
12  
13 327 quality of eggs and egg products. *Egg chemistry, production and consumption*,  
14  
15 328 *Volume 1*.  
16  
17  
18 329 RODRÍGUEZ-NAVARRO, A.B., DOMÍNGUEZ-GASCA, N., MUÑOZ, A. &  
19  
20 330 ORTEGA-HUERTAS, M. (2013) Change in the chicken eggshell cuticle with hen  
21  
22 331 age and egg freshness. *Poultry Science*, **92**:3026-3035.  
23  
24  
25 332 ROSE-MARTEL, M., DU, J. D. & HINCKE, M.T. (2012) Proteomic analysis  
26  
27 333 provides new Insight into the chicken eggshell cuticle. *Journal of Proteomics*,  
28  
29 334 **75(9)**: 2697-2706.  
30  
31  
32  
33 335 SOLOMON, S. E. (1997) Egg and eggshell quality. *Manson Publishing Ltd.*,  
34  
35 336 *London, UK*.  
36  
37  
38 337 SPARKS, N. H. C. & BOARD, R. G. (1984) Cuticle, shell porosity and water-  
39  
40 338 uptake through hens' eggshells. *British Poultry Science*, **25**:267-276.  
41  
42  
43 339 STADELMAN, W.J. & COTTERILL, O. J. (1995) Egg Science and Technology.  
44  
45 340 Food Products Press, New York, NY.  
46  
47  
48 341 WELLMAN-LABADIE, O., PICMAN, J. & HINCKE, M.T. (2008)  
49  
50 342 Antimicrobial activity of the Anseriform outer eggshell and cuticle. *Comparative*  
51  
52 343 *Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, **149**:  
53  
54 344 640-649.  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 345 WELLMAN-LABADIE, O., LEMAIRE, S., MANN, K., PICMAN, J. AND  
5  
6 346 HINCKE, M.T. (2010) Antimicrobial activity of lipophilic avian eggshell surface  
7  
8 347 extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**: 10156-10161.  
9

10  
11 348 **Tables**

12  
13  
14 349 Table 1. Main IR peaks in the chemical components and the relevant information  
15 350 that they provide

<i>Position (cm<sup>-1</sup>)</i>	<i>Molecular groups</i>	<i>Information</i>
3400	(OH) Water, Amide A	Surface water; Shell permeability; cuticle proteins
2900	(C-H) Lipids	Cuticle lipids; shell permeability
1650	(C=O) Amides I	Cuticle proteins, eggwhite proteins
1540	(C-N) Amides II	Cuticle proteins; Shell permeability
1400	(C-O) Carbonate	Shell mineral exposure; Amount of cuticle
1240	(S-O) Sulfates	Sulfates in the cuticle components
1060	(COC) Polysaccharides	Cuticle polysaccharides; Shell permeability
874	(C-O) Carbonate	Shell mineral exposure; Amount of cuticle

16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29 351

30  
31 352

32  
33 353

34  
35 354

36  
37 355

38  
39 356

40  
41 357

42  
43 358

44  
45 359

46  
47 360

48  
49 361

50  
51 362



363 Table 2. Cuticle compositional parameters determined by IR spectroscopy for  
 364 White and brown eggs.

	<i>White eggs</i>		<i>Brown eggs</i>		<i>Anova</i>	
	<i>Mean ± SD</i>	<i>N</i>	<i>Mean ± SD</i>	<i>N</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<b><i>Water</i></b>	0.088±0.015	20	0.079±0.019	20	2.730	0.107
<b><i>Amides I</i></b>	0.114±0.034	20	0.129±0.040	20	1.870	0.180
<b><i>Amides II</i></b>	0.093±0.021	20	0.110±0.022	20	6.046	<b>0.019</b>
<b><i>Carbonates</i></b>	0.237±0.042	20	0.221±0.041	20	1.499	0.228
<b><i>Phosphates Sugars</i></b>	0.196±0.061	20	0.195±0.065	20	0.002	0.966

365 *N*: Number of samples; *F*: Variance of the group means; *P*: Significance for  $\alpha= 95\%$ .

366

367 Table 3. Pearson correlation analyses of color change ( $\Delta E_{ab}$ ) and main IR peaks  
 368 for white eggs laid by young hens (25 weeks old).

	$\Delta E_{ab}$	<i>OH</i>	<i>Amide I</i>	<i>Amides II</i>	<i>Carbonate</i>	<i>CH</i>	<i>Sulfates</i>	<i>Phosphates</i>	<i>Sugars</i>
<i><math>\Delta E_{ab}</math></i>	1								
<i>OH</i>	-0,059	1							
<i>Amides I</i>	0.234*	0.562**	1						
<i>Amides II</i>	0.328**	0,069	0.730**	1					
<i>Carbonate</i>	-0.294**	-0,046	-0.731**	-0.851**	1				
<i>CH</i>	-0,063	-0.704**	-0.730**	-0.282**	0.347**	1			
<i>Sulfates</i>	-0.325**	0.197*	-0.514**	-0.713**	0.814**	0,182	1		
<i>Phosphates</i>	0,078	-0.789**	-0.498**	0,002	-0,175	0.559**	-0.422**	1	
<i>Sugars</i>									1

369

370 \*\*. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

371 \*. Correlation is significance at the 0.05 level (2-tailed).

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

1  
2  
3  
4 384 **Figures and table captions**  
5

6  
7 385 **Figure 1.** Eggshell cuticle quality evaluation using Cuticle Blue staining method.

8  
9 386 A) White eggs before staining (left) and with medium (middle) and high (right)  
10  
11 387 degree of staining. B) Brown eggs before staining (left) and with medium  
12  
13 388 (middle) and high (right) degree of staining. C) Color change ( $\Delta E_{ab}$ ) in white  
14  
15 389 eggs after staining for eggs from young (25 wks) and old (60 wks) hens. Error  
16  
17 390 bars represent standard deviation. The (\*) indicates that differences in color  
18  
19 391 change between eggs from old and young hens were statistically significant ( $p$   
20  
21 392  $<0.05$ ).  
22  
23  
24

25 393 **Figure 2.** Scanning electron microscopy images of the surface of eggshells that  
26  
27 394 have different degrees of cuticle staining. A) degree of staining showing a  
28  
29 395 nanoparticle; B) Medium. Inset: detail of an eggshell pore (C) Low. Scale bars: 10  
30  
31 396  $\mu\text{m}$ . D) EDX determined P to Ca peak intensity ratio for egg with different  
32  
33 397 degrees of staining.  
34  
35

36 398 **Figure 3.** ATR-FTIR analyses of the outer surface of eggshell: A) white egg  
37  
38 399 (from young hen); B) brown egg (from young hen).  
39  
40

41  
42 400 **Figure 4.** A) ATR-FTIR spectra of the surface of a freshly laid (3 hours) white egg  
43  
44 401 (from old hens). B) ATR-FTIR spectra of egg white.  
45

46  
47 402

48  
49 403

50  
51 404

52  
53 405  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

406

For Peer Review Only

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

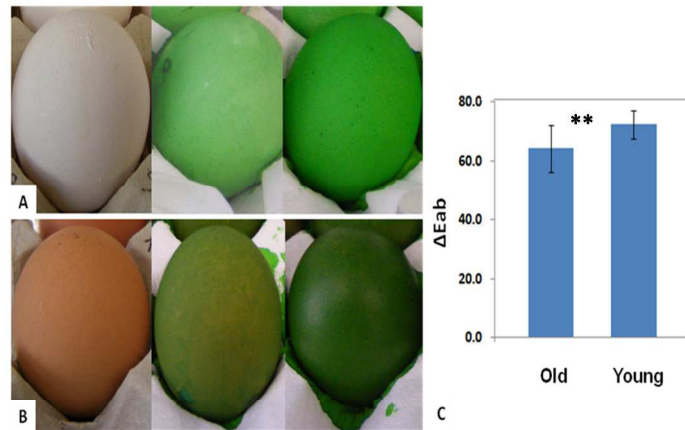


Figure 1. Eggshell cuticle quality evaluation using Cuticle Blue staining method. A) White eggs before staining (left) and with medium (middle) and high (right) degree of staining. B) Brown eggs before staining (left) and with medium (middle) and high (right) degree of staining. C) Color change ( $\Delta E_{ab}$ ) in white eggs after staining for eggs from young (25 wks) and old (60 wks) hens. Error bars represent standard deviation. The (\*) indicates that differences in color change between eggs from old and young hens were statistically significant ( $p < 0.05$ ).

254x190mm (300 x 300 DPI)

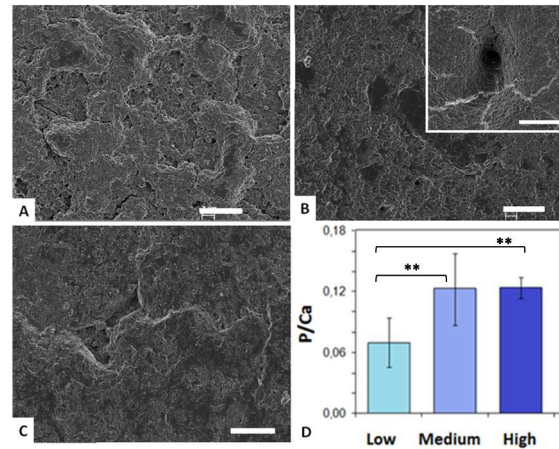


Figure 2. Scanning electron microscopy images of the surface of eggshells that have different degrees of cuticle staining. A) degree of staining showing a nanoparticle; B) Medium. Inset: detail of an eggshell pore (C) Low. Scale bars: 10  $\mu\text{m}$ . D) EDX determined P to Ca peak intensity ratio for egg with different degrees of staining.

254x190mm (300 x 300 DPI)

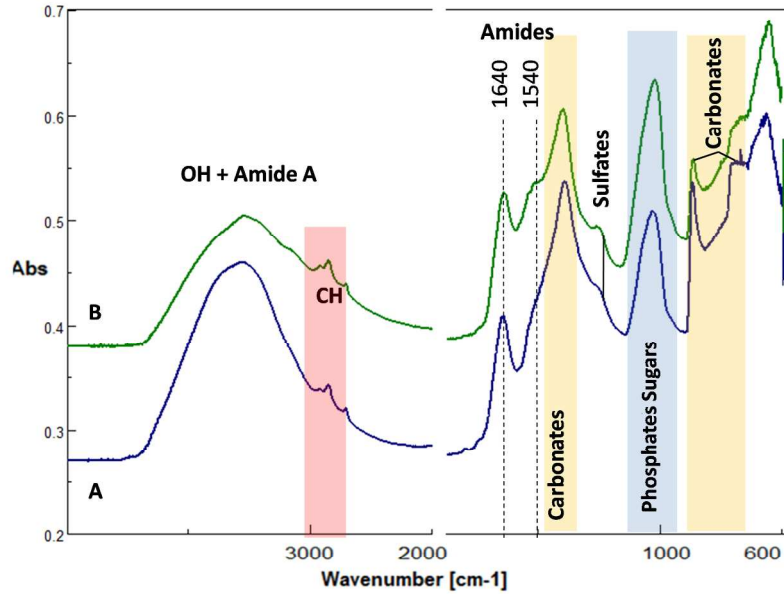


Figure 3. ATR-FTIR analyses of the outer surface of eggshell: A) white egg (from young hen); B) brown egg (from young hen).

254x190mm (300 x 300 DPI)

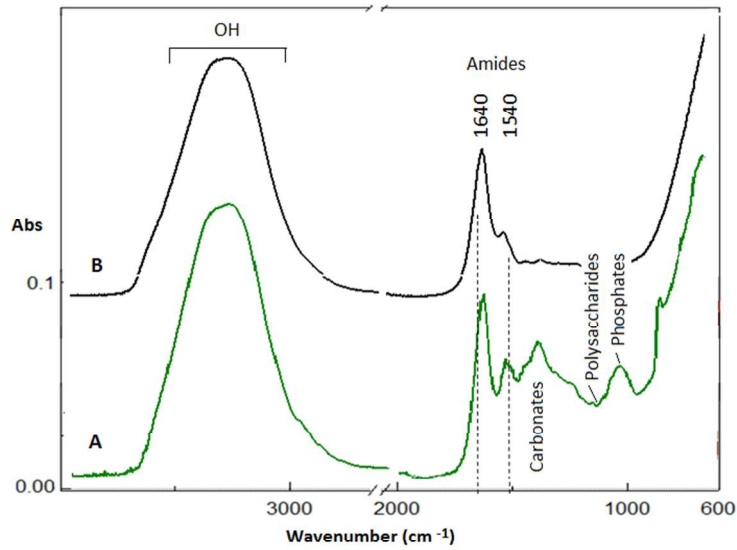


Figure 4. A) ATR-FTIR spectra of the surface of a freshly laid (3 hours) white egg (from old hens). B) ATR-FTIR spectra of egg white.

254x190mm (300 x 300 DPI)



**Table 1.** Main IR peaks in the chemical components and the relevant information that they provide.

<i>Position (cm<sup>-1</sup>)</i>	<i>Molecular groups</i>	<i>Information</i>
3400	(OH) Water, Amide A	Surface water; Shell permeability; cuticle proteins
2900	(C-H) Lipids	Cuticle lipids; shell permeability
1650	(C=O) Amides I	Cuticle proteins, eggwhite proteins
1540	(C-N) Amides II	Cuticle proteins; Shell permeability
1400	(C-O) Carbonate	Shell mineral exposure; Amount of cuticle
1240	(S-O) Sulfates	Sulfates in the cuticle components
1060	(COC) Polysaccharides	Cuticle polysaccharides; Shell permeability
874	(C-O) Carbonate	Shell mineral exposure; Amount of cuticle

**Table 2.** Cuticle compositional parameters determined by IR spectroscopy for White and brown eggs.

	<i>White eggs</i>		<i>Brown eggs</i>		<i>Anova</i>	
	<i>Mean ± SD</i>	<i>N</i>	<i>Mean ± SD</i>	<i>N</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<b><i>Water</i></b>	0.088±0.015	20	0.079±0.019	20	2.730	0.107
<b><i>Amides I</i></b>	0.114±0.034	20	0.129±0.040	20	1.870	0.180
<b><i>Amides II</i></b>	0.093±0.021	20	0.110±0.022	20	6.046	<b>0.019</b>
<b><i>Carbonates</i></b>	0.237±0.042	20	0.221±0.041	20	1.499	0.228
<b><i>Phosphates Sugars</i></b>	0.196±0.061	20	0.195±0.065	20	0.002	0.966

*N*: Number of samples; *F*: Variance of the group means; *P*: Significance for  $\alpha=95\%$ .

Table 3. Pearson correlation analyses of color change ( $\Delta E_{ab}$ ) and main IR peaks for white eggs laid by young hens (25 weeks old).

	$\Delta E_{ab}$	<i>OH</i>	<i>Amide I</i>	<i>Amides II</i>	<i>Carbonate</i>	<i>CH</i>	<i>Sulfates</i>	<i>Phosphates</i>	<i>Sugars</i>
<i><math>\Delta E_{ab}</math></i>	1								
<i>OH</i>	-0,059	1							
<i>Amides I</i>	<b>0.234*</b>	<b>0.562**</b>	1						
<i>Amides II</i>	<b>0.328**</b>	0,069	<b>0.730**</b>	1					
<i>Carbonate</i>	<b>-0.294**</b>	-0,046	<b>-0.731**</b>	<b>-0.851**</b>	1				
<i>CH</i>	-0,063	<b>-0.704**</b>	<b>-0.730**</b>	<b>-0.282**</b>	<b>0.347**</b>	1			
<i>Sulfates</i>	<b>-0.325**</b>	<b>0.197*</b>	<b>-0.514**</b>	<b>-0.713**</b>	<b>0.814**</b>	<b>0,182</b>	1		
<i>Phosphates</i>	0,078	<b>-0.789**</b>	<b>-0.498**</b>	0,002	-0,175	<b>0.559**</b>	<b>-0.422**</b>	1	
<i>Sugars</i>									1

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

\* . Correlation is significance at the 0.05 level (2-tailed).



## *Anexo III*

---

Elsevier Editorial System(tm) for Bone  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: INFLUENCE OF GENETIC SELECTION AND PHYSICAL ACTIVITY ON BONE  
QUALITY PARAMETERS OF LAYING HENS

Article Type: Full length article

Keywords: Laying hens; avian osteoporosis; bone; apatite; collagen;  
oestrogens

Corresponding Author: Prof. Alejandro RODRIGUEZ NAVARRO,

Corresponding Author's Institution: Universidad de Granada

First Author: Alejandro RODRIGUEZ NAVARRO

Order of Authors: Alejandro RODRIGUEZ NAVARRO; Heather A McCormack; Pedro  
Alvarez-Lloret; Julia Romero-Pastor; Nazaret Dominguez-Gasca; Tanya  
Prozorov; Ian C Dunn

Abstract: Laying hens develop a type of osteoporosis that arises from a  
progressive loss of structural bone, due to high calcium demand for  
eggshell calcification, resulting in high incidence of bone fracture in  
commercial flocks. In this study, two White leghorn lines, selected based  
on its high or low bone breaking strength, were used to analyze how bone  
main characteristics and constituting material properties contribute to  
bone mechanical properties. The results showed that the improvement of  
bone biomechanics in high line birds is mainly due to an increased bone  
mass (i.e. thicker cortical bone and higher amount of medullary bone)  
compared to low line birds. However, bone constituent material properties  
did not differ between lines. On the other hand, different physical  
exercise regimes due to type of housing had a greater influence on bone  
constituent material properties. Specifically, birds housed in aviary  
systems (with unrestricted mobility) have stronger bones with a thicker  
cortex and a greater amount of medullary bone than birds housed in cage  
system (with restricted mobility). Also bone tissue in aviary birds had a  
lower degree of mineralization and bone mineral is less mature and has a  
lower degree of structural organization than that of caged birds. All  
these characteristics are indicative of high bone turnover rates. Thus,  
high physical activity in aviary birds stimulated bone formation and  
remodeling provoking a marked increase in bone strength. This knowledge  
could help in designing selection strategies aimed to reduce the  
incidence of osteoporosis and the risk of bone fracture in laying hens.

Suggested Reviewers: Daniel Chappard

LUNAM Université

daniel.chappard@univ-angers.fr

Similarity of studies on laying hens bone quality and exercise

Hanna Isaksson

Lund University, Sweden

hanna.isaksson@bme.lth.se

Similarity of studies; Characterization of bone properties using infrared  
spectroscopy.

Effect of exercise on bone quality.

Wolfgang Wagermaier:

Max Plank Institute, Postdam

wolfgang.wagermaier@mpikg.mpg.de

Similarity of studies relating bone structure and mechanical properties.

Opposed Reviewers:

INFLUENCE OF GENETIC SELECTION AND PHYSICAL ACTIVITY ON BONE QUALITY PARAMETERS OF LAYING HENS.

A. B. Rodriguez-Navarro 1,\* , H. A. McCormack 2, P. Alvarez-Lloret 3, J. Romero-Pastor 1, N. Dominguez-Gasca 1, Tanya Prozorov 4, I. C. Dunn 2.

1. Departamento de Mineralogía y Petrología, Universidad de Granada, 18002 Granada, Spain.

2. The Roslin Institute, University of Edinburgh, Scotland, RU.

3. Departamento de Geología, Universidad de Oviedo, 33005 Oviedo, Spain.

4. Ames Laboratory. Iowa State University, Ames, IA 50100, USA

\*Corresponding author: [anava@ugr.es](mailto:anava@ugr.es)

Abstract

*Laying hens develop a type of osteoporosis that arises from a progressive loss of structural bone, due to high calcium demand for eggshell calcification, resulting in high incidence of bone fracture in commercial flocks. In this study, two White leghorn lines, selected based on its high or low bone breaking strength, were used to analyze how bone main characteristics and constituting material properties contribute to bone mechanical properties. The results showed that the improvement of bone biomechanics in high line birds is mainly due to an increased bone mass (i.e. thicker cortical bone and higher amount of medullary bone) compared to low line birds. However, bone constituent material properties did not differ between lines. On the other hand, different physical exercise regimes due to type of housing had a greater influence on bone constituent material properties. Specifically, birds housed in aviary systems (with unrestricted mobility) have stronger bones with a thicker cortex and a greater amount of medullary bone than birds housed in cage system (with restricted mobility). Also bone tissue in aviary birds had a lower degree of mineralization and bone mineral is less mature and has a lower degree of structural organization than that of caged birds. All these characteristics are indicative of high bone turnover rates. Thus, high physical activity in aviary birds stimulated bone formation and remodeling provoking a marked increase in bone strength. This knowledge could help in designing selection strategies aimed to reduce the incidence of osteoporosis and the risk of bone fracture in laying hens.*

KEYWORDS: Laying hens, avian osteoporosis, bone, apatite, collagen, oestrogens.

1 INTRODUCTION



1 Laying hens are an interesting model for studying bone pathologies such as  
2 osteoporosis [1-3]. They have developed specific physiological adaptations to possibiliate  
3 adequate calcium supply for the rapid eggshell calcification [4]. They need to mobilize about 2  
4 g of calcium daily (equivalent to 10 % of the total body calcium) [5, 6]. In general, calcium  
5 comes in part from the diet and in part from the skeleton, the contribution of each source  
6 varying depending on the calcium available on the diet [7]. Particularly, as hens reach sexual  
7 maturity and came into lay, oestrogens induce the formation of medullary bone, in the  
8 marrow cavities of long bones, as a temporary calcium reservoir for eggshell calcification [8, 9,  
9 2]. During lay, osteoblast function switches from producing cortical and trabecular bone to  
10 produce medullary bone. However, osteoclasts continue cortical bone resorption resulting in a  
11 progressive loss of structural bone [6]. The loss of structural bone is compensated in part by  
12 the formation of medullary bone. However, medullary bone is less organized than cortical  
13 bone and therefore mechanically weaker [10, 11] making bones more prompt to fracture [1,  
14 12]. This skeletal weakling condition is considered a type of osteoporosis which is prevalent in  
15 commercial flocks of laying hens and is responsible for the high incidence of bone fractures (up  
16 to 30%) and skeletal deformities in these birds [1, 12, 13]. Avian osteoporosis is considered a  
17 mayor welfare problem that also causes large economic losses for the producers.  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30

31 Bone is a complex composite materials constituted by carbonated apatite nanocrystals  
32 mineralizing an organic matrix of cross-linked collagen fibres [14- 16]. The mechanical  
33 properties of bone are not only determined by the total bone mass but also by its geometrical  
34 distribution, porosity, its structural organization at different scales and the quality of the  
35 constituting bone materials [17, 18]. Important bone quality parameters that are now used to  
36 evaluate the fracture risks are mineral crystallinity and collagen maturity (amount of cross-  
37 linking) as well as their distribution and organization in different bone structures (i.e, osteons,  
38 collagen fibres; [16- 22]. On the other hand, bone is a living tissue that is under constant  
39 remodeling [14, 23]. During remodeling, old bone matrix is being resorbed and replaced  
40 with new bone. The removal of old bone tissue, and its replacement by new bone through the  
41 remodeling process, allows for the functional adaptation of bone to mechanical loads and  
42 avoids the accumulation of microfractures in the tissue [24 -27]. Different bone pathologies  
43 result from an altered or unbalanced bone remodeling rate [16, 21, 24]Other bone diseases  
44 result from a decreases capacity of bone formation or an impaired formation of a bone  
45 component (i.e., collagen as in osteogenesis imperfecta; [28]). These bone pathologies are  
46 mainly determined by genetic factors [16, 28].  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 Avian osteoporosis is known to have also an important genetic component [2, 3] making it  
2 possible to ameliorate the problem by selecting birds with bone traits that lower the risk of  
3 bone fracture. To better understand how bone quality can be improved by genetic selection,  
4 we have studied two White Leghorn lines (High and Low), which had been divergently selected  
5 for seven generations based on high or low bone breaking strength [3]. Thus, in order to define  
6 the main bone characteristics contributing to the observed improvement of the bone  
7 mechanical properties during the selection process, we have determined different material  
8 properties of cortical and medullary bone (i.e., degree of mineralization, mineral crystallinity,  
9 collagen cross-linking, mineral organization) using complementary analytical techniques (i.e.,  
10 electron microscopy, infrared spectroscopy, X-ray diffraction). These techniques provide detail  
11 information about the chemical composition and structural organization of the main bone  
12 material components in the different types of bone and can help to better understand how  
13 different bone properties contribute to the mechanical properties of this complex material.  
14 Additionally, we have investigated how physical activity modify the bone material properties  
15 by studying birds from this two lines and that were housed either in conventional cages (with  
16 restricted mobility) or aviary systems (unrestricted physical activity). New knowledge acquired  
17 in this study could allow for a redesign of the selection and/or rearing strategies aimed to  
18 improve bone quality and reduce the incidence of bone fractures in commercial poultry farms.  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34

## 35 2 MATERIALS AND METHODS

### 36 *Bone samples*

37  
38  
39  
40  
41 Tibia samples from two lines of White Leghorn hens (56 weeks old) with either high or  
42 low bone breaking strength were collected from a previous study [2]. Hens were reared  
43 together in a 60 m<sup>2</sup> pen until 15 weeks old. After 15 weeks, hens were transferred to individual  
44 cages or aviary-type housing systems. For this study, a total of 54 specimens from the Low line  
45 and 39 from the High line were used in this study. Of them, 24 hens were housed in individual  
46 cages (14 from the Low line and 10 from the High line) and 69 from hens housed in aviary  
47 systems (40 from the Low line and 29 from the High line). Bones have been stored in a freezer  
48 at -20 °C until being analyzed.  
49  
50  
51  
52  
53  
54

### 55 *Bone properties*

56  
57  
58 Main macroscopic properties of bones used in this study were measured in a previous  
59 study according to the protocols described within [2]. Briefly, bone dimensions (i.e., tibiae  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 length) and bone mass (whole tibiae radiographic densities) were determined by X-ray  
2 radiography of whole tibiae. Histomorphological preparations of mid-diaphysis cross-sections  
3 were used to measure the tibiae outer and inner diameter, the cortical thickness and porosity  
4 of cortical bone. Biomechanical properties (i.e., tibiae breaking strength) were determined by  
5 measuring the maximum load at yield (Max Load) using a three points bending tests with a  
6 material testing machine (JJ Lloyd LRX50). Additionally, in the present study, we measured  
7 bone material specific properties (e.g., bone microstructure, chemical composition of the  
8 cortical and medullary bone, mineral and collagen maturity) using electron microscopy,  
9 infrared spectroscopy and X-ray diffraction as described below.

### 16 *Electron Microscopy.*

19 SEM observation was carried on polished cross-sections of the tibiae mid-diaphyses. To  
20 prepare the sections, bone samples were embedded in resin, cut, polished, coated with carbon  
21 (Hitachi UHS evaporator) and observed with an environmental SEM (FEI Quanta 400) using BSE  
22 detector and an accelerating voltage of 15 KeV. A selection of bone samples (2 from each line  
23 and housing system) were analyzed by transmission electron microscopy (TEM). Bone samples  
24 were fixed with 2.5 % glutaraldehyde and cacodilate buffer (0.1M pH=7.4) for 4 h at 4°C. Later  
25 on samples were dehydrated using an ethanol gradient (50, 70, 90, and 100%), embedded in  
26 resin. Then, they were ultra-thin sectioned (50-70 nm thick) with a LEICA Ultracut R (Germany),  
27 carbon coated and analyzed using a Carl Zeiss LIBRA 120 PLUS (Germany) TEM microscope.

### 36 *Infrared spectrometry*

39 The chemical composition of bone tissues (cortical and medullary bone) were analyzed  
40 by infrared spectroscopy. Before, the cortical and medullary bone collected from the tibiae  
41 mid-diaphyses were manually separated using a scalpel and homogenized by grounding on an  
42 agate ball mill. Bone tissue in powder form was pressed against the ATR diamond crystal  
43 window (MIRacle Single Reflection ATR, PIKE Technologies) and the infrared spectra recorded  
44 at a 2 cm<sup>-1</sup> resolution over 100 scans with a FTIR spectrometer (mod 6200, JASCO). The  
45 relative amounts of water, proteins (collagen), lipids, phosphate and carbonate in the bone  
46 samples were determined from the peak area of absorption bands associated to characteristic  
47 molecular group of each component (e.g., O-H: water; C-H: lipids; amide I: collagen;  $\nu_2, \nu_3$  CO<sub>3</sub>:  
48 carbonates;  $\nu_1, \nu_3$  PO<sub>4</sub>: phosphates; [21, 29]. Overlapping peaks were resolved and their  
49 integrated areas measured using a specifically designed curve fitting software. From peak  
50 areas, the following compositional parameters were determined to define bone material  
51 properties: 1) the relative amount of mineral to organic matrix (PO<sub>4</sub>/AmideI) determined as

1 the main phosphate ( $\nu_1, \nu_3 \text{ PO}_4$ ; 900 - 1200  $\text{cm}^{-1}$ ) to Amide I (1590-1710  $\text{cm}^{-1}$ ) band area ratio.  
2 2) The amount of carbonate substituted in the mineral (MinCO3\_870) as the  $\nu_2 \text{ CO}_3$  (850-890  
3  $\text{cm}^{-1}$ ) to the main phosphate (900 - 1200  $\text{cm}^{-1}$ ) band area ratio that mainly represent  
4 carbonate ions substituting phosphate ions in the apatite crystalline structure and which  
5 increases as bone mineral mature (Type B carbonate; [30, 31]). 3) Total carbonate relative to  
6 mineral content (MinCO3\_1415) determined as the main carbonate band ( $\nu_3 \text{ CO}_3$ ; 1390-1440  
7  $\text{cm}^{-1}$ ) to the main phosphate (900 - 1200  $\text{cm}^{-1}$ ) band area ratio which decreases as bone  
8 mineral matures [32, 29]; 4) The mineral crystallinity index (CI) determined as the area ratio  
9 between phosphate subbands 1030 and 1020  $\text{cm}^{-1}$  which increases as the mineral crystal size  
10 and perfection increases [31]. 5) The amount of collagen cross-links (XLR) as the area ratio  
11 between amide I subbands at 1660 and 1690  $\text{cm}^{-1}$  which increases with collagen maturity [33,  
12 31]. Additionally, the absolute water, organic matter, carbonate and phosphate content was  
13 determined by thermogravimetry (TGA) in selected bone samples. For these analyses, about 40  
14 mg of the powdered bone was introduced in a crucible and analyzed using a TGA system from  
15 METTLER-TOLEDO (mod. TGA/DSC1). A heating rate of 20 C/min was used for registering the  
16 TGA curves.  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28

### 29 *X-ray diffraction*

30  
31 Tibiae cortical bone (about 1x1 cm) cut from the midshaft of the diaphysis were  
32 analyzed in transmission mode with a single crystal diffractometer equipped with an area  
33 detector (D8 SMART APEX from Bruker) and Mo radiation (50 KV and 30 mA; 0.5 mm  
34 collimator). A quantitative estimation of the degree of alignment of the c-axis of apatite  
35 crystals in the cortical bone was determined from the angular breadth of bands displayed in  
36 the intensity profile along the Debye-Scherrer ring associated with the 002 reflection of  
37 apatite. The wider the band the greater the scattering in distribution of c-axis of apatite  
38 crystals and the lower the degree of alignment of apatite crystals. This also represent a  
39 measurement of the alignment of mineralized collagen fibers as the apatite crystals nucleate  
40 within the collagen fibres zone gap with their c-axis aligned with the collagen fibrils [16, 34].  
41 Additionally, crystallinity of bone mineral was determined by measuring the full width at half  
42 maximum (FWHM) of main apatite peaks (e.g., 002, 211, 310) displayed in 2theta scans. The  
43 sharper the peaks and smaller the FWHM, the greater is the crystallinity. XRD2DScan software  
44 was used to analyze the collected 2D-XRD diffraction patterns [35]. Alternatively, XRD  
45 crystallinity of bone mineral was determined from powdered samples analyzed with a X-ray  
46 powder diffractometer Panalytical Expert Pro (The Netherlands) with Cu radiation (40 KV and  
47 35 mA) (1D-XRD).  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

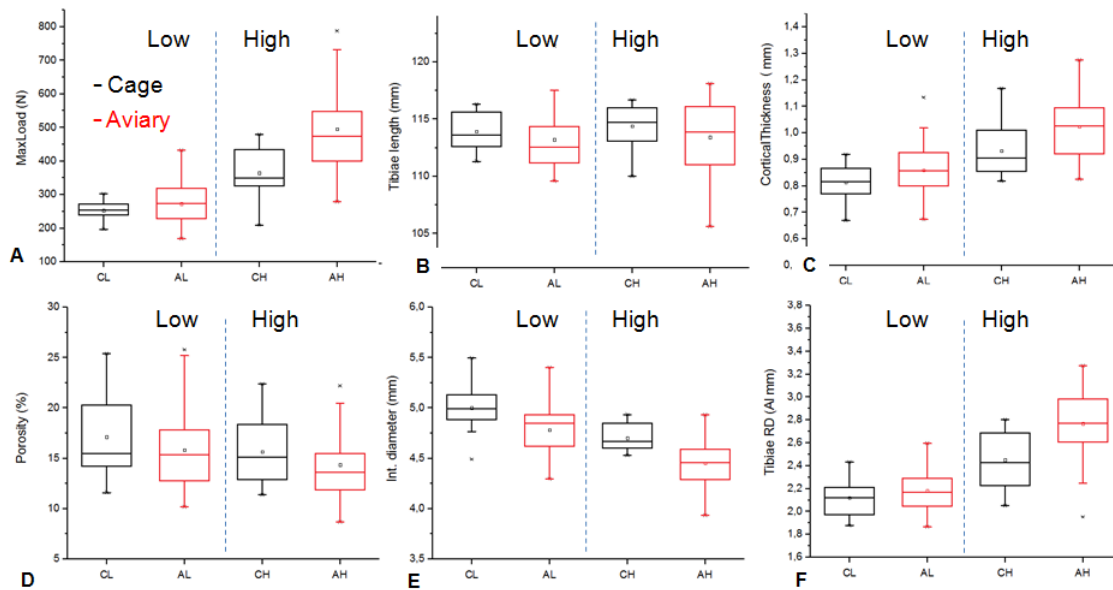
## *Statistical analyses*

Basic descriptive statistics were used to characterize bone properties. Analysis of variance (two-way ANOVA) was used to compare bone properties between birds from different lines and housing types considered. Pearson's correlation analysis and multivariable lineal regression models were used to study the relationships among the different properties of bone and bone mechanical properties. Since cage and aviary birds have very different bone material properties, the later analyses were done separately for each type of housing system. All statistical analyses were performed using Origin Pro (Microcal) or SPSS 22.0 (SPSS Inc.) software packages.

## 3 RESULTS

### *3.1 Bone properties*

Main bone macroscopic properties determined for birds from the two lines and housing systems are summarized in Figure 1 and Table 1. Length of tibiae was not significantly different between birds from the two lines and/or housing systems though birds housed in aviary systems had slightly shorter tibiae. It can be seen than bone mechanical properties (i.e., bone breaking strength measured as the maximum load before yield; Max Load), whole tibiae radiographic density (Tibiae RD) and cortical thickness were significantly higher for birds from the High line than those of the Low line ( $p < 0.001$ ). Birds housed in aviary systems showed a notable increase in these properties compared to cage birds. This increase was significantly larger in aviary birds from the High line. On the other hand, the external and internal diameters of bones were significantly smaller in birds from the High line than those of the Low line. Also, the later properties were significantly lower in birds housed in aviary systems compared to those housed in cage systems from the same line. Also, the porosity of cortical bone was higher in birds from the Low line (or housed in cage systems) compared to birds from the High line (or housed in aviary systems) though these differences did not attain significance in any case.



**Figure 1.** Bone macroscopic properties of birds from Low and High lines housed either in caged (black) or aviary (red) systems. A) Maximum load at fracture for three points bending test. B) Tibiae length. C) Cortical thickness at mid-diaphysis. D) Cortical porosity at mid-diaphysis. E) Internal bone diameter at mid-diaphysis. F) Radiographical density of whole tibiae.

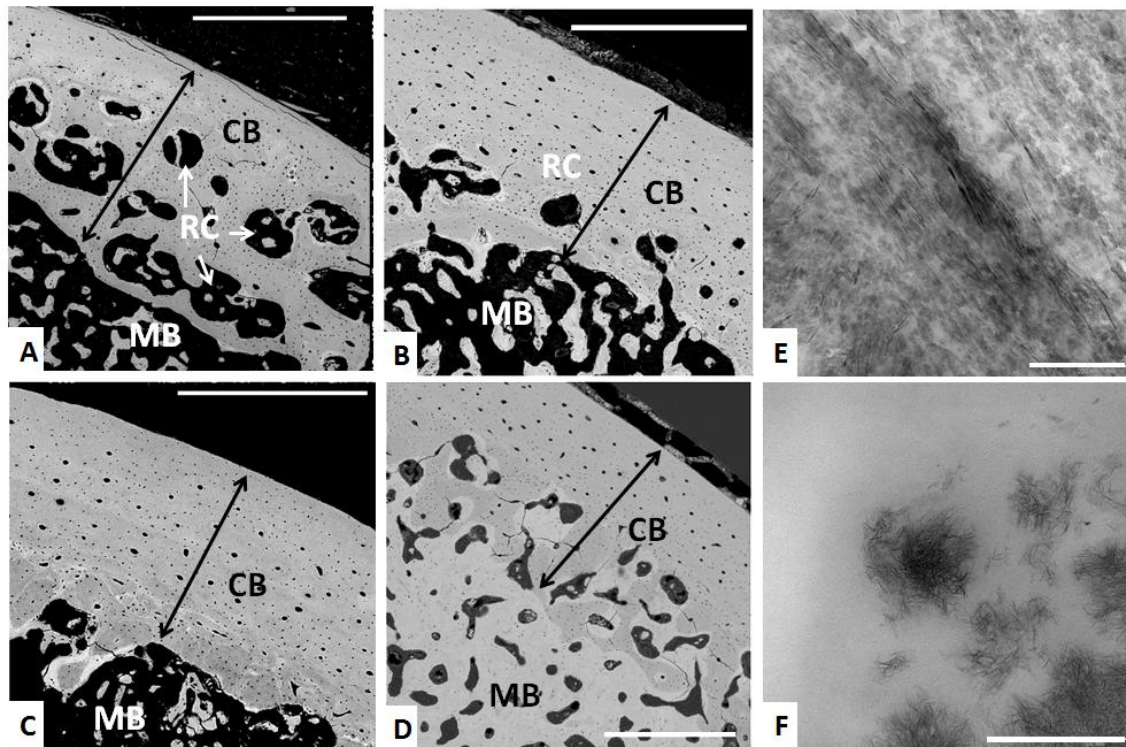
Pearson correlation analyses among bone macroscopic properties reveal some interesting relationships. Particularly, mechanical properties (e.g., bone breaking strength) are positively and significantly correlated with cortical thickness ( $R = 0.64$ ;  $p < 0.001$ ) and even more strongly with whole tibiae radiographical density ( $R = 0.94$ ;  $p < 0.001$ ). This is indicative that in this case bone mass determines bone mechanical properties. There was also a negative but marginally significant correlation between mechanical properties (e.g., bone breaking strength) and cortical bone porosity ( $R = -0.20$ ;  $p = 0.05$ ). On the other hand, there is a negative correlation between the cortical thickness and bone internal diameter ( $R = -0.63$ ;  $p < 0.001$ ). This relationship could indicate that the internal (endosteal) bone resorption is responsible for the cortical thinning observed in caged birds (which have the largest bone internal diameter). The later relationship could also explain the observed negative correlation between the Cage mechanical properties and bone diameter ( $R = -0.55$ ;  $p < 0.001$ ).

Figure 2A-D displays representative BSE-SEM images of tibiae cross-section at mid-diaphyses of birds from different lines and housing systems. The outer bone shell or cortex is constituted by dense cortical bone with evenly distributed osteons formed by the concentric deposition of bone tissue around blood vessels (e.g., Haversian channels). The marrow cavity is partially mineralized with trabecula of medullary bone which generally are isolated. BSE-SEM images show cortical and medullary bone with similar brightness (i.e., electron density)

1 indicating that they have similar degree of mineralization. Tibiae cross-sections from birds of  
2 different lines and/or housing systems show evident differences in the cortical bone thickness,  
3 porosity and amount of medullary bone present in the marrow cavity. In general, the cortical  
4 bone of Low line birds is thinner than that of High line birds. On the other hand, bone from  
5 birds housed in cage systems show large resorption cavities in which the cortical bone is  
6 partially replaced by medullary bone (Figure 2 A and B). In contrast, the cortical bone of birds  
7 housed in aviary systems is thicker and generally do not show resorption centers. Some birds  
8 from the High line and housed in aviary systems have the marrow cavity highly mineralized  
9 with medullary bone with connected trabecula bound to the cortical bone inner surface. These  
10 birds showed the highest bone mechanical properties (e.g. Breaking strength of 790 N  
11 compared to an average of 500 N for High Line birds).  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19

20 Figure 2E-F displays representative TEM images of the cortical and medullary bone  
21 from the tibiae mid-diaphysis. Cortical bone is constituted by mineralized collagen fibrils  
22 aligned parallel to the bone long axis. The collagen fibrils shows their characteristic periodic  
23 banding which matches with more densely mineralized areas. The collagen fibrils are  
24 mineralized with needle-like apatite crystals oriented with their c-axis parallel to the fibrils and  
25 which have a size of about 66 nm long and 6.7 nm wide. Medullary is constituted by randomly  
26 arranged collagen fibrils and ribbon-shaped apatite crystals distributed in separated bundles.  
27 The size of apatite crystals in medullary bone is much smaller than in cortical bone. They have  
28 an average length of 15 nm and a width of 1.7 nm.  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36

37 TEM imaging of cortical and medullary bone did not revealed obvious differences  
38 between birds from different lines and/or housing systems regarding the size or shape of  
39 apatite crystals and/or its relationship with collagen fibril distribution. However, image  
40 analyses of cortical bone sections revealed that this tissue has generally a higher degree of  
41 mineralization in caged birds than in aviary birds.  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



**Figure 2.** Backscattering electron (BSE-SEM) images of the cross-section of middle-shaft tibiae from birds from Low and High lines kept either in aviary or cage housing systems: A) Low line cage. B) High line cage. C) Low line aviary. D) High line aviary. CB: cortical bone; MB: medullary bone; RC: resorption center. Scale bars: 500  $\mu\text{m}$ . E-F) TEM imaging of bone from the mid-shaft tibiae. E) Longitudinally-sectioned cortical bone. F) Section of medullary bone. Scale bars: 200 nm.

Thus, birds from the High line had stronger bones than those from the Low line due to a greater bone mass (e.g., higher whole radiographical density, thicker cortical bone). On the other hand, birds housed in aviary systems have notably improved mechanical properties, compared to bird housed in cage systems, due to an increased bone cortical thickness, a lower bone cortical porosity, larger amount of medullary bone and overall a greater total bone mass.

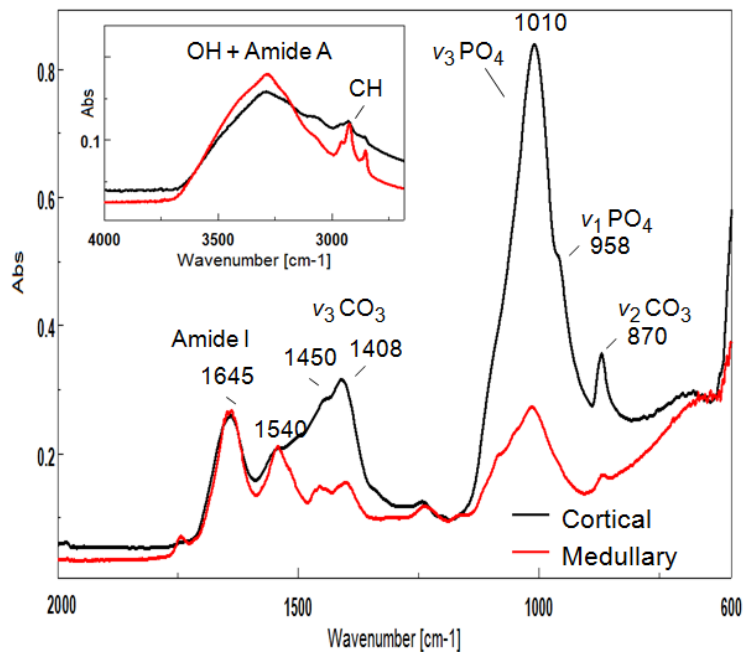
### 3.2 Bone material properties

#### 3.2.1 Infrared spectroscopy

FTIR spectra of cortical and medullary bone (Figure 3) show the same infrared absorption bands (i.e., amide bands from bone collagen, phosphate and carbonate bands from bone mineral). However, FTIR spectra of cortical bone show much more intense  $\nu_1$ ,  $\nu_3$   $\text{PO}_4$  and  $\nu_2$ ,  $\nu_3$   $\text{CO}_3$  bands than medullary bone which indicate that cortical bone has a greater relative



1 amount of mineral (phosphate and carbonate) than medullary bone. It should be noted that  
 2 medullary bone is mixed with marrow organic material so that the degree of mineralization  
 3 determined by FTIR (PO<sub>4</sub>/Amide I ratio) is more exactly a measure of the amount of medullary  
 4 bone mineral in the marrow cavity. On the other hand, cortical bone mineral has a higher  
 5 degree of carbonate substitution (*MinCO<sub>3</sub>\_870*) than medullary bone mineral. In contrast,  
 6 cortical bone mineral has a relatively lower total amount of carbonate (*MinCO<sub>3</sub>\_1415*) than  
 7 that of medullary bone mineral. Note that the later parameters are calculated exclusively from  
 8 mineral components (phosphate and carbonate) of the medullary bone and therefore are not  
 9 affected by the presence of marrow organic matter. All in all, these characteristics indicate  
 10 that mineral maturity is greater in cortical bone than in medullary bone.

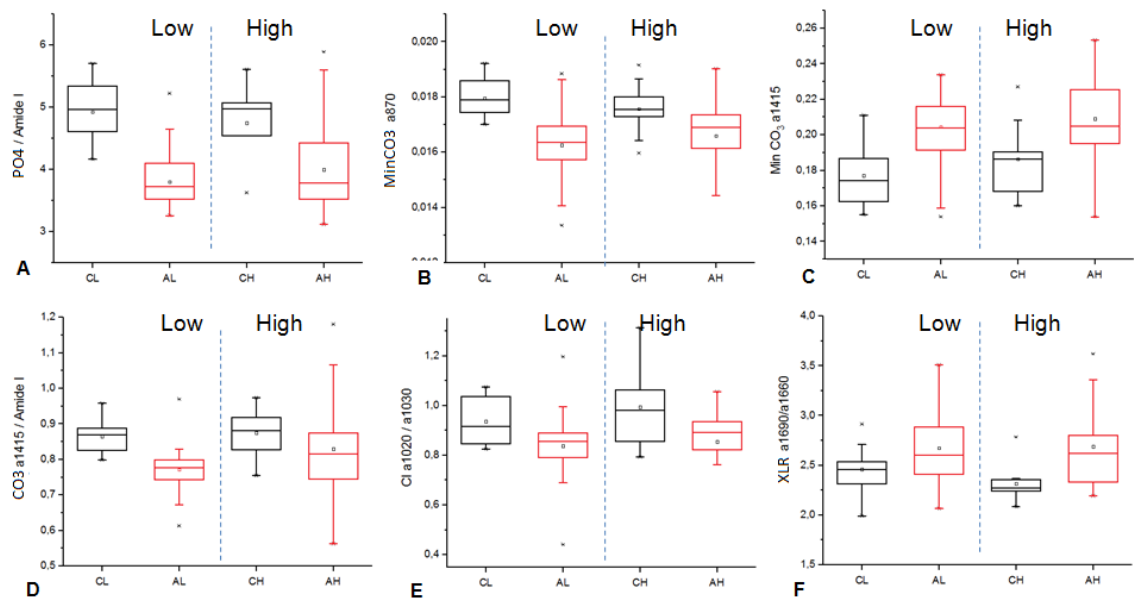


11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42 **Figure 3.** Representative FTIR spectra of cortical (black) and medullary (red) bone displaying  
 43 characteristic bands corresponding to the absorption of main molecular components of bone  
 44 tissue (e.g., water (OH), lipids (CH), collagen (amide I), carbonates ( $v_2$ ,  $v_3$  CO<sub>3</sub>), phosphates ( $v_1$ ,  
 45  $v_3$  PO<sub>4</sub>)).

46  
47  
48  
49  
50 The determined FTIR compositional parameters for cortical and medullary bone also  
 51 reveal important differences among birds from different lines and/or housing systems. Main  
 52 results are summarized in figures 4 and Table 2 (cortical bone) and figure 5 and Table 3  
 53 (medullary bone). In the case of cortical bone, compositional parameters did not show any  
 54 significant differences between Low and High line birds. However, there are marked  
 55 differences in cortical bone material properties between birds housed in cage and aviary  
 56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 systems. Cortical bone in birds housed in aviary systems have a lower amount of mineral  
 2 (about 25 % less) than caged birds ( $PO_4/Amide\ I = 3.88$  (aviary) and  $4.84$  (caged); equivalent  
 3 to 34 % and 42 % of mineral by weight as determined by TGA analyses) and also a lower  
 4 carbonate content than in caged birds ( $CO_3_{1420}/Amide\ I = 0.80$  (aviary) and  $0.87$  (cage);  
 5 equivalent to 1.26 % and 1.38 % carbonate by weight). Also the cortical bone mineral, in  
 6 aviary birds, has a significantly lower degree of carbonate substitution (MinCO<sub>3\_870</sub>) and  
 7 lower crystallinity (Cl) than in cage birds. In contrast, the degree of carbonation of the bone  
 8 mineral (MinCO<sub>3\_1415</sub>) was higher in aviary birds compared to caged birds. On the other  
 9 hand, the degree of collagen cross-linking (XLR) in cortical bone (estimated as the  $a_{1660}/a_{1690}$   
 10 ratio) was slightly higher in birds from aviary systems than in birds from cage systems ( $P = 0.02$ ).  
 11  
 12  
 13  
 14  
 15  
 16  
 17  
 18  
 19  
 20  
 21  
 22  
 23  
 24  
 25  
 26  
 27  
 28  
 29  
 30  
 31  
 32

33 Thus, cortical bone in aviary birds is less mineralized and the bone mineral has a lesser  
 34 amount of carbonate substitution and is less crystalline than in cage birds. These  
 35 characteristics are typical of younger/ less mature bone mineralization which indicate that  
 36 cortical bone in aviary birds is more metabolic active and/or had a faster turnover rate so that  
 37 bone tissues is continuously being renewed and does not have time to become fully  
 38 mineralized or the mineral to mature.  
 39  
 40  
 41  
 42  
 43  
 44  
 45  
 46  
 47  
 48  
 49  
 50  
 51  
 52  
 53  
 54  
 55  
 56  
 57  
 58  
 59  
 60  
 61  
 62  
 63  
 64  
 65



54 **Figure 4.** FTIR compositional parameters of cortical bone for caged (black) and aviary (red)  
 55 birds: A) degree of mineralization ( $PO_4/Amide\ I$ ). B) Degree of carbonate substitution in bone  
 56 mineral. C) Total amount of carbonate relative to bone mineral ( $MinCO_3_{1415}$ ). D) Amount of  
 57  
 58  
 59  
 60  
 61  
 62  
 63  
 64  
 65

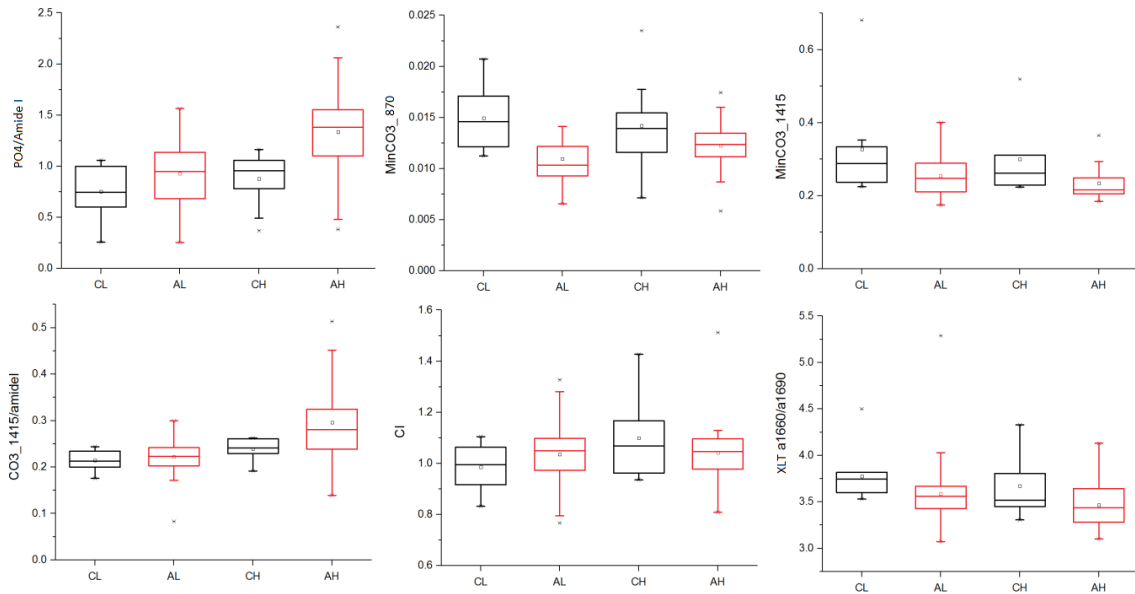
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

carbonate in bone (CO3\_1415/Amide I). E) Crystallinity index (CI). F) Collagen cross-linking (a1660/a1690).

Pearson correlation analyses among cortical bone compositional parameters reveal that the amount of phosphate (a900\_1200) and total carbonate (a1415) in this tissue are positively and highly correlated ( $R = 0.73$ ;  $p < 0.001$ ), confirming that carbonate is bound to phosphate as part of the bone mineral. On the other hand, there is significant positive correlation between the degree of mineralization (PO4/Amide I) and the amount of carbonate substituted in the mineral (MinCO3\_870) ( $R = 0.42$ ;  $p = 0.002$ ). There is also a positive correlation between the degree of mineralization and the crystallinity index (CI) ( $0.36$ ;  $p = 0.008$ ) as well as between the amount of carbonate substitution (MinCO3\_870) and the crystallinity index (CI) ( $R = 0.81$ ;  $p < 0.001$ ). In contrast, there is a significant negative correlation between the degree of mineralization and the total amount of carbonate in the mineral (MinCO3\_1415;  $R = -0.67$ ;  $p < 0.001$ ). All these relationships are consistent and indicate that as bone mineralization progresses, the bone mineral increases in crystallinity and incorporates more carbonate into its crystalline structure (type B carbonate). At the same time, the mineral losses labile carbonate, which is more abundant in young bone and can be more easily resorbed, accounting for the reduction of the total amount of carbonate (CO3\_1415). Additionally, there is a significant positive correlation between the degree of cross-linking (a1660/a1690) and the crystallinity index (CI), indicating that as bone tissue matures, the density of collagen cross-linking also increases. The later changes are typical of the normal bone mineral maturation process.

In the case of medullary bone, FTIR compositional parameters show that birds from the High line, or housed in aviary systems, had a greater amount of medullary bone mineral than birds from the Low line, or those housed in cage systems. Particularly, birds from the High line housed in aviary systems had the greatest amount of medullary bone mineral (PO4/Amide I) ( $p < 0.001$ ). On the other hand, there was not significant differences in the rest of bone material properties investigated (i.e., MinCO3\_870, MinCO3\_1415, CO3\_1415, CI, collagen cross-linking (XRL) between birds from the two lines. However, the type of housing did seem to have an effect on the composition of medullary bone mineral. Particularly, the amount of carbonate substitution in the mineral (MinCO3\_870) is significantly lower for aviary birds ( $p = 0.01$ ), indicating the medullary bone mineral is less mature. Also, collagen cross-linking is lower in medullary bone of aviary birds. Thus, the type of housing have a larger influence on the amount and composition of medullary bone than the bird line. Specifically, aviary birds have a

greater amount of medullary bone which is less mature suggesting a high metabolism status and/or faster turnover rate for this bone tissue in aviary birds.



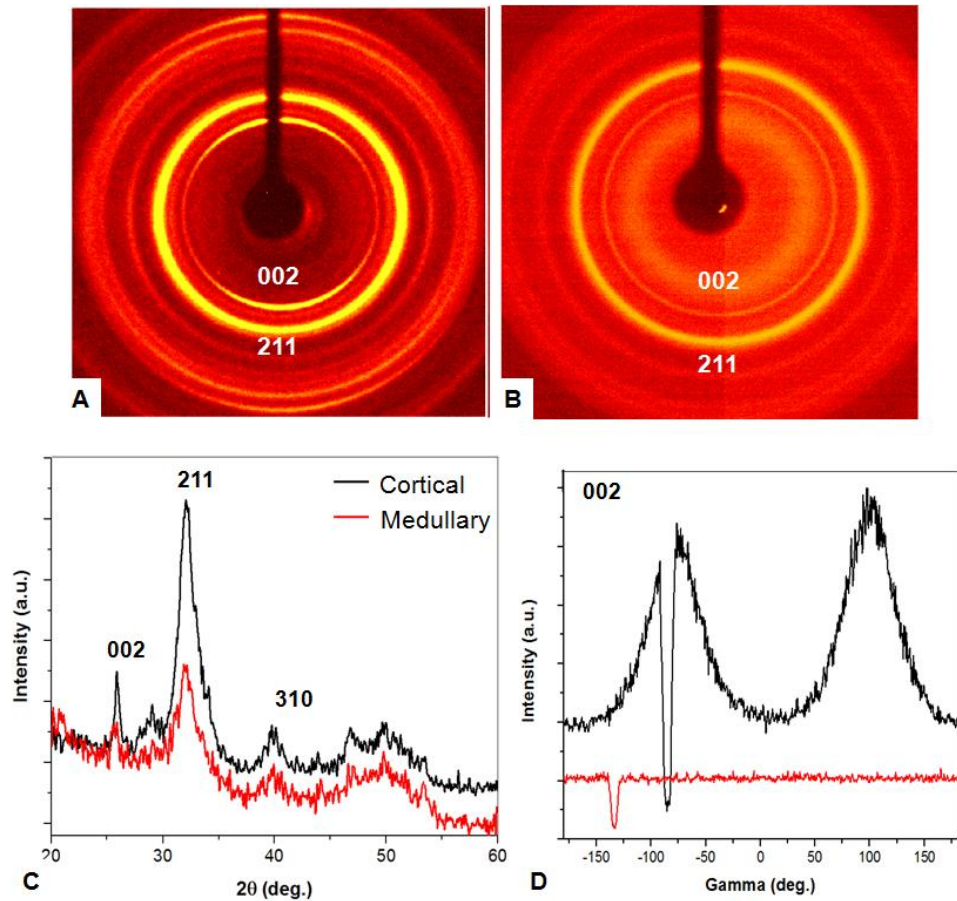
**Figure 5.** FTIR compositional parameters for medullary bone. A) degree of mineralization (PO4/Amide I). B) Degree of carbonate substitution in bone mineral (MinCO3). C) Total amount of carbonate relative to bone mineral (MinCO3\_1415) . D) Amount of carbonate in bone (CO3\_1415/Amide I). E) Crystallinity index (CI). F) Collagen cross-linking ( $\alpha$ 1660/ $\alpha$ 1690).

Pearson correlation analyses among medullary bone compositional parameters reveals the amount of phosphate (PO4) and total carbonate ( $\alpha$ 1415) are positively and highly correlated ( $R = 0.92$ ;  $p < 0.001$ ) confirming that carbonate is bound to the phosphate forming part of the bone mineral. On the other hand, there is strong negative correlation ( $R = -0.71$ ;  $p < 0.001$ ) between the degree of mineralization (PO4 / Amide I) and the relative amount of carbonate in the mineral (MinCO3\_1415) indicating that as the medullary bone mineralization progresses, the mineral losses carbonate content which is typical of the normal bone mineral maturation process.

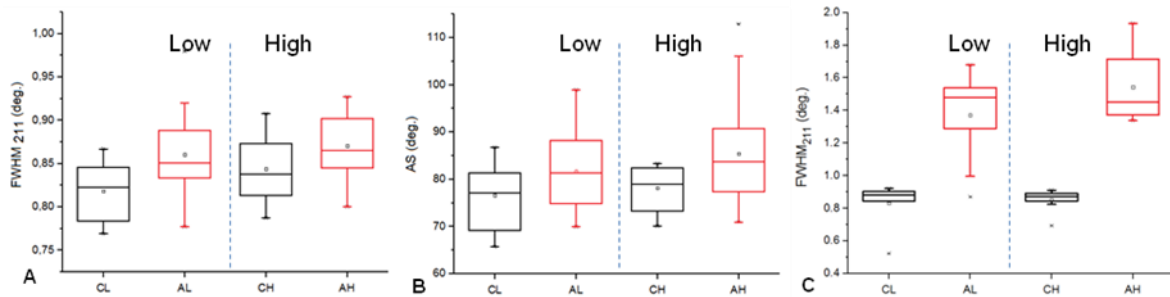
### 3.2.2 X-ray diffraction

X-ray diffraction shows notable differences between the cortical and medullary bone mineral crystallinity and organization (Figure 6). Although in both tissues the main mineral phase detected was nanocrystalline carbonated-apatite, cortical bone mineral showed a higher degree of crystallinity than medullary bone as seen by their better defined and sharper Bragg reflection peaks in the formed tissue. On the other hand, 2D-XRD patterns of cortical bone shows that the intensity of Debye-Scherrer rings is not homogenous but concentrated in arcs

(i.e., 002 reflection) which is due to the preferential orientation of apatite crystals which typically have their c-axis aligned parallel to the elongation of long bones. In contrast, 2D-XRD patterns of medullary bone shows complete Debye-Scherrer rings of homogeneous intensity characteristic of randomly oriented materials.



**Figure 6.** 2D and 1D X-ray diffraction patterns from cortical and medullary bone. A) 2D XRD of cortical bone. B) 2D XRD pattern of medullary bone. C) 2theta scan of cortical (black) and medullary (red) bone. D) Gamma scan displaying the intensity variation along the 002 Debye ring for cortical (black) and medullary (red) bone.



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Figure 7.** XRD determined parameters for cortical and medullary bone mineral for caged (black) and aviary (red) birds: A) FWHM of 211 reflection of apatite in cortical bone. B) Angular spread (AS) of 002 reflection in cortical bone. C) FWHM of 211 reflection of apatite in medullary bone.

On the other hand, X-ray diffraction analyses show that the cortical bone mineral of birds from the Low line, or from cage systems, produce shaper Bragg peaks (with lower FWHM values) indicating that it has higher crystallinity than cortical bone of birds from the High line, or from aviary systems (Figure 7 and Table 2). The effect of type of housing on bone mineral crystallinity is larger than between lines. Also, the angular spread (AS) of cortical bone in aviary birds was larger then in cage birds, indicating that bone mineral is less organized in the former group. These results are in agreement with FTIR measurements which showed the bone mineral in aviary birds was less mature than in cage birds. In fact, FTIR parameters related to the mineral crystallinity (i.e., CI, MinCO3\_870) are strongly and negatively correlated to XRD peak width (i.e., FWHM211). Thus, the cortical bone in aviary bones is less mineralized, the mineral has a lower crystallinity and is more disorganized, having a lesser degree of alignment of crystals, and collagen fibres. These characteristics are typical of younger bone tissue which further highlight that cortical bone in aviary birds is more metabolically active and have a faster turnover rate than in cage birds.

On the other hand, XRD patterns of medullary bone from aviary birds show much less defined and broader Bragg peaks than in cage birds (higher FHWM values), indicating that the crystallinity of the mineral in this tissue is much lower in former group (Figure 7 and Table 3). These results are in agreement with FTIR measurements and indicate that medullary bone in aviary birds has a higher metabolism and a faster turnover rate than in cage birds.

### 3.3 Influence of bone material properties on mechanical properties

A multivariable lineal regression model was built to better understand the contribution of cortical and medullary bone to the global bone mechanical properties. Cortical bone properties considered were: cortical thickness, degree of mineralization, porosity, degree of crystal orientation (AS). For medullary bone, degree of mineralization was the only parameter used. Since bone properties of cage and aviary birds were markedly different, data from each group were treated separately.

In the case of cage birds, the contribution of cortical bone and medullary bone was moderate. Each type of bone tissue could explain only 20 % of variance of bone mechanical properties

1 (cortical bone:  $R^2= 0.20$ ;  $p =0.05$ ; medullary bone:  $R^2= 0.21$ ;  $p =0.03$ ). Putting the cortical and  
2 medullary bone properties in the model did not improve the fitting ( $R^2= 0.21$ ;  $p =0.03$ ). In  
3 contrast, in the case of aviary birds, the contribution of cortical bone and medullary bone was  
4 high. Cortical bone properties could explain up to 59 % of variance of bone mechanical  
5 properties (cortical bone:  $R^2= 0.59$ ). Putting medullary bone properties (PO4/Amidel) in the  
6 model did significantly improve the fitting ( $R^2= 0.68$ ). Thus, in the case of aviary birds, both  
7 type of tissues contribute significantly to bone mechanical properties though the contribution  
8 of cortical bone is notably more important.  
9

#### 10 4. DISCUSSION

11 The present study is an extension of previous work aimed to analyze the influence of  
12 different factors (e.g., genetic, environmental, nutritional) on the incidence and severity of  
13 osteoporosis on laying hens [36, 2, 3] (Bishop et al., 2000; Fleming et al., 2006; Dunn et al.,  
14 2007). In these previous studies, it was shown that genetic is the main factor determining bone  
15 strength and that is possible to select birds with improved bone mechanical properties in just a  
16 few generations while maintaining egg production. On the other hand, Dunn et al. [2] were  
17 able to identify a QTL marker of bone strength in these birds populations. It is the intention of  
18 the present study to gain an in-depth knowledge on how different types of bone tissue  
19 (cortical and medullary bone) and their material properties contribute to the global  
20 mechanical properties of bone. Also, we want to understand how bone material properties are  
21 modified during the selection process and by different intensity of physical activity. Thus, we  
22 compared bone material properties in birds from two lines, with high or low bone strength,  
23 and that were housed in conventional cages (with restricted mobility) or aviary systems  
24 (unrestricted physical activity).  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42

43 Some of the most relevant findings of this study are that the improvement of bone  
44 mechanical properties of birds from the High line are mainly due to an increased bone mass  
45 (e.i., thicker cortical bone, higher radiographical density) compared to Low line birds. However,  
46 cortical and medullary bone material properties analyzed (i.e., degree of mineralization,  
47 carbonate substitution in the mineral, mineral crystallinity, collagen cross-linking, degree of  
48 alignment of apatite crystals and collagen fibres) are essentially the same in both lines. Bone of  
49 Low and High line birds are indistinguishable at the material level. Thus the selection process did  
50 not change the properties of bone constituting materials (e.g., mineral, collagen) but mostly  
51 the amount of bone and its geometrical distribution. Fleming et al. [2] and Whitehead [1]  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 attributed the increased bone mass in High line birds to better bone formation during rearing  
2 and less resorption during the laying period due to a reduced density of osteoclasts.  
3

4 On the other hand, the type of housing had a large influence on bone properties. Birds housed  
5 in aviary systems showed a marked increase in bone strength compared to cage birds, in  
6 particular for High line birds that showed the largest improvement in bone strength. This  
7 increase in bone strength is due to an increase in bone cortical thickness, a lower bone cortical  
8 porosity and a greater amount of medullary bone. Thus, it seems that physical activity  
9 stimulates medullary bone formation and reduced cortical bone resorption in agreement with  
10 other studies [37- 39]. In contrast, birds housed in cages (with restricted mobility) have a  
11 smaller aposition and increased endosteal resorption which increases bone diameter while  
12 making bone cortex thinner and more porous. Lack of physical exercise in caged birds  
13 stimulates bone resorption producing large resorption cavities in their cortical bone. The more  
14 intense osteoclastic resorption of medullary and cortical bone in Low and caged birds is due to  
15 higher density of osteoclasts in those birds [2].  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

26 In any case, High line birds seems to have a greater capacity to form bone and to  
27 respond to mechanical stimuli (from physical exercise in aviary systems) than Low line birds. It  
28 could be due to a increased calcium metabolism and/or a greater capacity to absorb calcium.  
29 In fact, physical exercise stimulates intestinal calcium absorption through an increase in  
30 vitamin D synthesis [40]. The smaller influence of the type of housing on Low line birds could  
31 be due also to the fact that these birds have bones too weak to exercise without damage  
32 and/or pain.  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39

40 On the other hand, during bone mineralization and remodeling there are well defined  
41 compositional and structural changes in bone tissue [14, 11]. During remodeling, old bone  
42 matrix is being resorbed and replaced with new bone by active bone cells. Newly laid bone  
43 matrix progressively increases its mineral content (up to a 70 %) during a rapid first phase of  
44 bone mineralization [11]. During a secondary phase of mineralization, bone mineral became  
45 more crystalline and the amount of carbonate ionic substitution (mainly Type B carbonate) in  
46 the mineral increases [30]. On the other hand, labile carbonate bound to the mineral surface is  
47 progressively removed during mineral maturation [30, 32, 41]. At the same time, the degree of  
48 bone mineral organization increases [42, 43]. Additionally, collagen cross-links density  
49 increases with ageing making bones more fragile [28, 18]. Thus, bone material properties are  
50 informative of bone metabolism and health status as changes in bone metabolism produce  
51 characteristic changes in bone composition, bone density and structural organization [16, 21,  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

24, 28, 43]. For instance, a high turnover rate in bone would not give time for new bone to mineralize and would result in a decreased bone density as in osteoporosis. On the contrary, an slow bone turnover (as during aging) would increase the bone mineral density, mineral crystallinity and collagen maturity. A the same time, tissue microdamage would not be repaired and increase overtime, all resulting in greater fragility of bone.

Aviary and cage birds had markedly different bone material properties which is indicative that they have different bone metabolism. Particularly, cortical bone in aviary birds is less mineralized and the bone mineral is less mature and less organized (lower degree of crystals and collagen orientation) which indicate that bone in aviary birds is more metabolic active and had a higher turnover rate than in cage birds. Thus, physical activity in aviary birds have greatly stimulated bone formation and increased bone turnover rate which is very rapid and does not allow it to fully mineralize and/or became more organized. Also medullary bone mineral in aviary birds is less mature than in caged birds which suggest a higher rate of bone formation and turn over in the former group of birds. These laying hens are very efficient forming large amount of medullary bone, a type of bone much less crystalline than cortical bone and that has a much faster turnover rate [9, 44]. Medullary bone turned over time is only a few days compared to several months in cortical bone. The larger amount of medullary bone in aviary birds (particularly in high line birds) is also responsible for the marked increase in bone strength observed in these birds [12].

The best predictor of bone mechanical properties in this study was the total bone mass determined as the whole radiographical density. However, multivariable statistical analyses shows that cortical and medullary bone contribute differently to the breaking strength of bone. Cortical bone has a greater contribution to bone strength than medullary bone. The cortex thickness is the most important parameter while the degree of mineralization of cortical bone has a smaller contribution. In the case of medullary bone, its degree of minerlization is directly correlated with breaking bone strength eventhough, its contribution is less important than cortical bone. Thus, the geometrical distribution of bone is very important. On the other hand, the weaker relationship between bone material properties and breaking strength found in caged birds could be due to the higher porosity of cortical bone in these birds. Large resorption cavities found in cortical bone are important flaws that greatly reduces the fracture toughness of bone as these defects act as a crack initiation sites.

Finally, mineral organization (defined as the degree of crystal alignment (AS) determined by XRD) did not significantly contribute to the global mechanical properties of bone. However,

1 aviary birds which showed the highest bone strength has also a lower degree of crystal  
2 orientation. Thus, we can not preclude that mineral organization is an important contributor to  
3 bone strength. In fact, mineral and collagen organization in bone are responsible of the large  
4 anisotropy of bone mechanical properties at the microscale [15, 43].  
5  
6

7  
8 In conclusions, global bone mechanical properties are determined by many bone  
9 properties (i.e., bone geometry, porosity, degree of mineralization, type of bone tissue and  
10 structural organization). Cortical bone has the greatest contribution to global bone mechanical  
11 properties. Medullary bone also contributes significantly to bone strength particularly when  
12 present at greater amounts as a highly mineralized dense material. On the other hand, this  
13 study shows that birds selection based solely on bone strength does not produce significant  
14 changes in the bone constituent materials. In contrast, the type of housing produced larger  
15 changes in bone material properties. The observed changes in bone materials properties  
16 between cage and aviary birds are mainly linked to differences in bone metabolism resulting  
17 from different physical exercise regimes. The increased physical activity of birds housed in  
18 aviary systems stimulates bone formation and turnover rates. High line birds have a greater  
19 capacity to form bone and more rapidly respond to mechanical stimuli of increasing physical  
20 activity in aviary systems. Finally, knowledge acquired in this study could help in designing  
21 better selection strategies and/or housing systems aimed to reduce the incidence of  
22 osteoporosis in laying hens.  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

#### 34 35 ACKNOWLEDGEMENTS 36

37  
38 We are grateful for financial support through grants CGL2011-25906 (Ministerio de  
39 Ciencia e Innovación, Spain) (ARN), RNM-179 group (Junta de Andalucía, Spain) (ARN). We  
40 thank Bendicion Funes, Maria Jose Martinez, Jose Romero, Isabel Sanchez and Juan de Dios  
41 Buenos (U. Granada), and Tracey M. Pepper (Iowa State University) for their help during  
42 sample preparation and analyses.  
43  
44  
45  
46

#### 47 48 REFERENCES 49

50 [1] Whitehead, C.C. 2004. Overview of Bone Biology in the Egg-Laying Hen. Poultry Science.  
51

52 [2] Fleming, R.H., McCormack, H.A., Mcteir, L., Whitehead, C.C.. Relationships between genetic,  
53 environmental and nutritional factors influencing osteoporosis in laying hens. 2006. British  
54 Poultry Science, 47, (6), 742-755.  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 [3] Dunn IC, Fleming R.H., McCormack H.A., et al. A QTL for osteoporosis detected in an F2  
2 population derived from White anihwa pre-proposal BetterBones 12 of 21 Leghorn chicken  
3 lines divergently selected for bone index. *Anim Gen* 38 (2007) 45  
4

5  
6 [4] Jonchère V1, Brionne A, Gautron J, Nys Y. Identification of uterine ion transporters for  
7 mineralisation precursors of the avian eggshell. *BMC Physiol.* 2012 Sep 4;12:10. doi:  
8 10.1186/1472-6793-12-10.  
9

10  
11 [5] Miller, S.C., 1992. Calcium homeostasis and mineral turnover in the laying hen. In,  
12 Whitehead C.C. (Ed.) *Bone Biology and Skeletal Disorders in Poultry*. Vol. 23. Carfax, Abingdon,  
13 pp. 103-113.  
14  
15  
16

17  
18 [6] Loveridge, N., Thomson, B.M. & Farquharson, C., 1992 . Bone growth and turnover. In, C.C.  
19 Whitehead (Ed.) *Bone Biology and Skeletal Disorders in Poultry*. Vol. 23. Carfax, Abingdon, pp.  
20 3-11.  
21  
22  
23

24 [7] Taylor TG, Moore JH. Skeletal depletion in hens laying on a low-calcium diet. *Br J Nutr.*  
25 1954;8(2):112-24.  
26  
27

28  
29 [8] Van de Velde, J.P., Vermeiden, J.P.W., Touw J.J.A. Changes in activity of chicken medullary  
30 bone cell populations in relation to the egg laying cycle. *Metabolic Bone Disease and Related*  
31 *Research* 5, 191-194 (1984).  
32  
33  
34

35 [9] Van de Velde, J.P., Vermeiden, J.P.W., Bloot A.M. Medullary bone matrix formation  
36 mineralization and remodeling related to dialy egg-laying cycle of Japanese quail. A histological  
37 and radiological study. *Bone* 6, 321-328 (1985).  
38  
39  
40

41 [10] Ascenzi, A., Franoics, C. and Bocciarelli, S.. On the bone induced by oestrogens in birds. *J.*  
42 *Ultrastruct. Res.* 8 (1963), 491–505.  
43  
44

45 [11] Bonucci, E. and Gherardi, G.. Histochemical and electron microscope investigations on  
46 medullary bone. *Cell Tissue Res.* 163 (1975), 81–97.  
47  
48  
49

50 [12] Fleming, R. H., H. A. McCormack, L. McTeir, and C. C. Whitehead. Medullary bone and  
51 humeral breaking strength in laying hens. *Res. Vet. Sci.* 64 (1998) 63–67.  
52  
53  
54

55 [13] Webster, A. B. 2004. Welfare implications of avian osteoporosis. *Poult. Sci.* 83, 184-192.  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 [14] Glimcher, M. J. (The nature of the mineral phase in bone: Biological and clinical  
2 implications. In *Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders*; Alvioli, L. V., Krane, S.  
3 M., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, 1998; pp 23-50.  
4

5  
6 [15] Weiner, S. and Wagner, H. D. The material bone: Structure-Mechanical Function  
7 Relations. *Annu. Rev. Mater. Sci.* 28:271–98 (1998).  
8  
9

10 [16] Fratzl P., Gupta H.S, Paschalis E.P., Roschger P. Structure and mechanical quality of the  
11 collagen-mineral nano-composite in bone. *J. Mater. Chem.*14:2115–23 (2004).  
12  
13

14 [17] R. Gupta, M. Grasruck, C. Suess, S. Bartling, B. Schmidt, K. Stierstorfer, S. Popescu, T.  
15 Brady, T. Flohr. Ultra-high resolution flat-panel volume CT: fundamental principles, design  
16 architecture, and system characterization. *European Radiology*, 16 (2006), pp. 1191–1205  
17  
18  
19

20 [18] Zimmermann EA, Schaible E, Bale H, Barth HD, Tang SY, Reichert P, Busse B, Alliston T,  
21 Ager JW 3rd, Ritchie RO. Age-related changes in the plasticity and toughness of human cortical  
22 bone at multiple length scales. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Aug 30;108(35):14416-21  
23  
24  
25

26 [19] Martin, RB., Ishida, J., 1989. The relative effect of collagen fiber orientation, porosity,  
27 density and mineralization on bone strength. *Journal of Biomechanics* 22, 416-426.  
28  
29  
30

31 [20] Nakano T, Kaibara K, Tabata Y, Nagata N, Enomoto S, Marukawa E, Umakoshi Y. Unique  
32 alignment and texture of biological apatite crystallites in typical calcified tissues analyzed by  
33 microbeam X-ray diffractometer system. *Bone.* 2002;31:479–87.  
34  
35  
36

37 [21] Boskey, A.; Mendelsohn, R. Infrared analysis of bone in health and disease. *J. Biomed.*  
38 *Opt.* (2005), 10, 031102-1-031102-9.  
39  
40  
41

42 [22] Gourion-Arsiquaud S, Faibish D, Myers E, Spevak L, Compston J, Hodsman A, Shane E,  
43 Recker RR, Boskey ER, Boskey AL. Use of FTIR spectroscopic imaging to identify parameters  
44 associated with fragility fracture. *J Bone Miner Res.* 2009;24:1565–71.  
45  
46  
47

48 [23] Bonucci, E. The mineralization of bone and its analogies with other hard tissues. In  
49 *Advanced Topics in Crystal Growth*; Ferreira, S.O., Ed.; InTech: Rijeka, Croazia, 2013; pp. 145–  
50 184.  
51  
52  
53

54 [24] Isaksson H, Grongroft I, Wilson W, van Donkelaar CC, van Rietbergen B, Tami A, Huiskes R,  
55 Ito K. Remodeling of fracture callus in mice is consistent with mechanical loading and bone  
56 remodeling theory. *J Orthop Res.* 2009;27:664–72.  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 [25] Wang, J., Ishimoto, T., Nakano, T. Preferential Orientation of Collagen/Biological Apatite  
2 in Growing Rat Ulna under an Artificial Loading Condition. *Materials Transactions*, 54, 1257 -  
3 1261 (2013)  
4

5 [26] Warden, S.J., Davis, I.S., Fredericson M., Management and Prevention of Bone Stress  
6 Injuries in Long-Distance Runners. *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy*, 2014:44,  
7 10, 749–765.  
8  
9

10 [27] Aido, M., Kerschnitzki, M., Hoerth, R., Checa, S., Spevak, L., Boskey, A.L., Fratzl, P., Duda,  
11 G.N., Wagermaier, W., Willie, B.M., 2015. Effect of in vivo loading on bone composition varies  
12 with animal age. *Exp. Gerontol.* 63, 48-58.  
13  
14  
15  
16

17 [28] Paschalis, E. P., Mendelsohn, R., Boskey, A. L. 2011. Infrared Assessment of Bone Quality:  
18 A Review. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 469: 2170-2178.  
19  
20  
21

22 [29] Rodriguez-Navarro, A. B.; P. Alvarez-Lloret, C.S. Romanek, K. Gaines. Effect of in ovo  
23 exposure to PCBs and Hg on bone chemistry of Clapper Rail from a contaminated salt marsh in  
24 coastal Georgia. *Environmental Science and Technology*, 40, 4936-4942 (2006).  
25  
26  
27  
28

29 [30] Rey C, Collins B, Goehl T, Dickson IR, Glimcher MJ.. The carbonate environment in bone  
30 mineral: a resolution-enhanced Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study. *Calcif Tissue*  
31 *Int.* 1989 Sep;45(3):157-64  
32  
33  
34

35 [31] Donnelly E, Boskey AL, Baker SP, van der Meulen MC. Effects of tissue age on bone tissue  
36 material composition and nanomechanical properties in the rat cortex. *J Biomed Mater Res A.*,  
37 92 (2010):1048-56.  
38  
39  
40

41 [32] Ou-Yang H, Paschalis EP, Mayo WE, Boskey AL, Mendelsohn R. Infrared microscopic  
42 imaging of bone: spatial distribution of CO<sub>3</sub>(<sup>2-</sup>) *J Bone Miner Res.* 2001 May;16(5):893-900.  
43  
44  
45

46 [33] Paschalis EP, Verdelis K, Doty SB, Boskey AL, Mendelsohn R, Yamauchi M. Spectroscopic  
47 characterization of collagen cross-links in bone. *J Bone Miner Res.* 2001 Oct;16(10):1821-8.  
48  
49

50 [34] Nudelman, F., Lausch A. J., Sommerdijk N. A. J. M., Sone E. D., 2013: In Vitro models of  
51 collagen biomineralization. *J Struct Biol* 183: 258-269.  
52  
53  
54

55 [35] Rodriguez Navarro, A. B. XRD2DScan a new software for polycrystalline materials  
56 characterization using two-dimensional X-ray diffraction. *Journal of Applied Crystallography*  
57 39, 905- 909 (2006b).  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 [36] Bishop, S.C., Fleming, R.H., McCormack, H.A., Flock, D.K., Whitehead, C.C. Inheritance of  
2 bone characteristics affecting osteoporosis in laying hens. *British Poultry Science*, 41 (2000),  
3 33-40.  
4

5 [37] Jendral, M. J., Korver, D. R., Church, J. S., Feddes, J. J. R.. Bone Mineral Density and  
6 Breaking Strength of White Leghorns Housed in Conventional, Modified, and Commercially  
7 Available Colony Battery Cages. *Poultry Science* 2008, 87: 838–837.  
8  
9

10 [38] Shipov A, Sharir A, Zelzer E, Milgram J, Monsonego-Ornan E, Shahar R. The influence of  
11 severe prolonged exercise restriction on the mechanical and structural properties of bone in  
12 an Avian Model. *Vet J* 2010;183(2):153–60.  
13  
14  
15  
16

17 [39] Aguado E, Pascaretti-Grizon F, Goyenvalle E, Audran M, Chappard D. Bone Mass and Bone  
18 Quality Are Altered by Hypoactivity in the Chicken. *PLoS ONE* 10 (2015): e0116763.  
19  
20  
21

22 [40] Yeh JK, Aloia JF, Yasumura S. Effect of physical activity on calcium and phosphorus  
23 metabolism in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 256: E1–E6, 1989  
24  
25  
26

27 [41] Delgado-Lopez, J. M., M. Lafisco, I. Rodríguez, M. Prat, J. Gómez-Morales. Crystallization  
28 of bioinspired citrate-functionalized nanoapatite with tailored carbonate content. *Acta*  
29 *Biomater.*, 8 (2012), 3491.  
30  
31  
32

33 [42] Ambekar, R., Chittenden, M., Jasiuk, I, Toussaint, K.C. Quantitative second-harmonic  
34 generation microscopy for imaging porcine cortical bone: Comparison to SEM and its potential  
35 to investigate age-related changes. *Bone* 50 (2012) 643–650.  
36  
37  
38  
39

40 [43] Ishimoto, T, Nakano, T, Umakoshi, Y, Yamamoto, M., Tabata, Y. Degree of Biological  
41 Apatite c-Axis Orientation Rather Than Bone Mineral Density Controls Mechanical Function in  
42 Bone Regenerated Using Recombinant Bone Morphogenetic Protein-2. *J. Bone Mine. Research*,  
43 28 (2013), 1170–1179  
44  
45  
46

47 [44] Kerschnitzki M, Zander T, Zaslansky P, Fratzl P, Shahar R, Wagermaier W. Rapid  
48 alterations of avian medullary bone material during the daily egg-laying cycle. *Bone* 69 (2014)  
49 109–117  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49

Tables

Table 1. Summary of bone macroscopic properties for birds from Low and High lines housed either in individual cage or aviary systems. Values of properties are reported as mean ± standard deviation. Values among groups are significantly different if p < 0.05.

	Low		Low		High		High		Two-ways ANOVA test		
	Cage	N	Aviary	N	Cage	N	Aviary	N	Line P	Housing P	Interaction P
<i>Tibiae length (mm)</i>	114 ± 2	13	113 ± 3	40	114 ± 2	10	113 ± 3	29	0.621	0.220	0.831
<i>Cortical thickness (mm)</i>	0.81 ± 0.07	12	0.86 ± 0.09	39	0.93 ± 0.11	10	1.02 ± 0.12	29	< 0.001	< 0.001	0.007
<i>Ext diameter (mm)</i>	5.81 ± 0.24	12	5.64 ± 0.22	39	5.63 ± 0.16	10	5.48 ± 0.25	29	0.003	0.004	0.913
<i>Int diameter (mm)</i>	5.00 ± 0.25	12	4.78 ± 0.26	39	4.70 ± 0.15	10	4.45 ± 0.26	29	< 0.001	< 0.001	0.783
<i>Porosity (%)</i>	17.1 ± 4.5	13	15.8 ± 3.8	40	15.7 ± 3.4	10	14.4 ± 3.6	29	0.120	0.168	0.997
<i>Tibiae RD (Al mm)</i>	2.12 ± 0.16	13	2.18 ± 0.17	40	2.45 ± 0.27	10	2.77 ± 0.30	29	< 0.001	0.001	0.023
<i>Max load (N)</i>	253 ± 29	13	273 ± 57	40	364 ± 82	10	496 ± 130	29	< 0.001	0.001	0.010

Table 2. Summary of cortical bone compositional and structural properties for birds from Low and High lines housed either in individual cage or aviary systems. Values of properties are reported as mean ± standard deviation. Values among groups are significantly different if p < 0.05.

	Low		Low		High		High		Two-ways ANOVA test		
	Cage	N	Aviary	N	Cage	N	Aviary	N	Line P	Housing P	Interaction P
<i>PO4/Amide I</i>	4.88 ± 0.57	8	3.80 ± 0.42	38	4.75 ± 0.65	10	4.00 ± 0.71	27	0.824	< 0.001	0.289
<i>MinCO3_900</i>	0.02 ± 0.00	8	0.02 ± 0.00	38	0.02 ± 0.00	10	0.02 ± 0.00	27	0.975	< 0.001	0.341
<i>MinCO3_1415</i>	0.18 ± 0.02	8	0.20 ± 0.02	38	0.19 ± 0.02	10	0.21 ± 0.02	27	0.336	< 0.001	0.905

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49

<i>CO3_1415/amidel</i>	0.87 ± 0.04	8	0.77 ± 0.06	38	0.88 ± 0.06	10	0.83 ± 0.12	27	0.192	0.002	0.228
<i>XLR (α1660/α1690)</i>	2.45 ± 0.28	8	2.67 ± 0.35	38	2.32 ± 0.18	10	2.69 ± 0.40	27	0.511	0.002	0.425
<i>CI (α1020/α1030)</i>	0.93 ± 0.09	8	0.84 ± 0.12	38	0.99 ± 0.16	10	0.85 ± 0.15	27	0.246	0.002	0.476
<i>FWHM002</i>	0.62 ± 0.02	8	0.57 ± 0.03	37	0.62 ± 0.04	10	0.57 ± 0.03	22	0.468	0.468	0.118
<i>FWHM211</i>	0.81 ± 0.03	8	0.86 ± 0.04	36	0.84 ± 0.04	10	0.87 ± 0.04	22	0.077	0.001	0.387
<i>AS 002 (deg.)</i>	77 ± 8	8	82 ± 8	37	78 ± 5	10	85 ± 12	23	0.309	0.016	0.599

Table 3. Summary of medullary bone compositional and structural properties for birds from Low and High lines housed either in individual cage or aviary systems. Values of properties are reported as mean ± standard deviation. Values among groups are significantly different if  $p < 0.05$ .

	Low		Low		High		High		Two-ways ANOVA test		
	Cage	N	Aviary	N	Cage	N	Aviary	N	Line P	Housing P	Interaction P
<i>PO4/Amide I</i>	0.75 ± 0.28	8	0.93 ± 0.30	37	0.88 ± 0.26	10	1.41 ± 0.63	26	0.011	0.002	0.171
<i>MinCO3_900</i>	0.01 ± 0.00	8	0.01 ± 0.00	37	0.01 ± 0.00	10	0.01 ± 0.00	26	0.749	0.001	0.215
<i>MinCO3_1415</i>	0.33 ± 0.15	8	0.25 ± 0.06	37	0.30 ± 0.10	10	0.23 ± 0.05	26	0.237	0.001	0.826
<i>CO3_1415/amidel</i>	0.21 ± 0.02	8	0.22 ± 0.04	37	0.24 ± 0.02	10	0.31 ± 0.12	26	0.002	0.044	0.132
<i>XLR (α1660/α1690)</i>	3.77 ± 0.30	9	3.59 ± 0.34	38	3.67 ± 0.33	10	3.44 ± 0.29	26	0.177	0.018	0.885
<i>CI α1020/α1030</i>	1.02 ± 0.10	8	0.98 ± 0.12	37	0.93 ± 0.13	10	0.97 ± 0.11	26	0.106	0.944	0.160
<i>FWHM002</i>	0.63 ± 0.09	6	1.27 ± 0.38	2	0.63 ± 0.07	8	1.25 ± 0.19	2	0.937	< 0.001	0.936
<i>FWHM211</i>	0.83 ± 0.14	7	1.37 ± 0.28	9	0.85 ± 0.07	8	1.54 ± 0.27	4	0.238	< 0.001	0.356









El objetivo principal de esta tesis es el estudio de la mineralogía, estructura y funcionalidad de los tejidos calcificados. En particular, nos hemos centrado en dos tejidos calcificados, formados por las aves hembras durante el periodo reproductivo, muy importantes y relacionados entre sí: el hueso medular y la cáscara de huevo. Durante la deposición de la cáscara de huevo, las aves hembras, y las gallinas ponedoras en particular, necesitan movilizar grandes cantidades de calcio (2 gramos), que equivale a cerca del 10% del calcio total del cuerpo. Para ello, durante el periodo de puesta, las gallinas desarrollan un tipo especial de hueso, el hueso medular, que puede ser fácilmente reabsorbido para una rápida liberación y suministro de calcio necesario para la formación de la cáscara del huevo. La mineralización de la cáscara de huevo de gallina es el proceso de calcificación más rápido conocido en la naturaleza, y dentro de los procesos de biomineralización, es uno de los más interesantes. El resultado de este proceso es la formación de una estructura mineral con excelentes propiedades mecánicas cuyas principales características pueden modificarse por diferentes factores, como la edad, la dieta o enfermedad.



# UNIVERSIDAD DE GRANADA