



Volumen 2, (enero 2024 a enero 2025)

Padilla.C, Tako.E (2024). Alimentación In Ovo como herramienta para mejorar la salud en Broilers

Alimentación In Ovo como herramienta para mejorar la salud en Broilers

In Ovo Feeding as a tool to improve health in Broilers

A alimentação In Ovo como ferramenta para melhorar a saúde de Frangos de Corte

Camila S. Padilla

Escuela de Medicina y Cirugía Veterinaria San Francisco de Asís

Universidad Veritas, Costa Rica

Contacto: camiladlapadilla@gmail.com

ORCID <https://orcid.org/0009-0005-0720-6874>

Elad Tako

Department of Food Science, Stocking Hall, Cornell University, Ithaca,

New York, Estados Unidos de América

Contacto: et79@cornell.edu

ORCID <https://orcid.org/0000-0002-7856-5197>



Resumen

La avicultura es una de las industrias más importantes debido a que la carne de pollo es la fuente de proteína animal más consumida a nivel mundial. Debido a la alta demanda que existe hacia las granjas avícolas, se genera la necesidad de encontrar nuevas tecnologías que ayuden a mejorar la producción y salud de las aves. Una de las tecnologías más recientes es la alimentación in ovo, la cual consiste en suplementar directamente al embrión antes de la eclosión. En esta revisión de literatura, se analizó la metodología de la alimentación in ovo, y los efectos de distintas sustancias utilizadas en este enfoque. Entre los nutrientes evaluados se incluyen los carbohidratos, aminoácidos, vitaminas y minerales. Asimismo, se consideraron sustancias bioactivas como probióticos, prebióticos y simbióticos. Los estudios revisados destacan el potencial de la alimentación in ovo para mejorar la salud y rendimiento de los pollos de engorde. No obstante, se identificaron limitaciones en la implementación de esta técnica, por lo que es necesario realizar mayores investigaciones que permitan la validación de esta técnica y su aplicación a gran escala.

Palabras claves: Alimentación In Ovo, Broilers, Avicultura.

Abstract

Poultry farming is one of the most important industries worldwide, as chicken meat is the most consumed source of animal protein globally. Due to the high demand for poultry farms, there is a need to develop new technologies that improve both production and bird health. One of the most recent technologies is in ovo feeding, which involves directly supplementing the embryo before hatching. In this literature review, the methodology of in ovo feeding was analyzed, along with the effects of

various substances used in this approach. The nutrients evaluated included carbohydrates, amino acids, vitamins, and minerals. Additionally, bioactive substances such as probiotics, prebiotics, and symbiotics were considered. The reviewed studies highlight the potential of in ovo feeding to enhance the health and performance of broiler chickens. However, limitations in the implementation of this technique were identified, emphasizing the need for further research to validate the method and enable its large-scale application.

Keywords: In Ovo Feeding, Broilers, Poultry.

Resumo

A avicultura é uma das indústrias mais importantes, pois a carne de frango é a fonte de proteína animal mais consumida no mundo. Devido à alta demanda das granjas avícolas, surge a necessidade de desenvolver novas tecnologias que melhorem tanto a produção quanto a saúde das aves. Uma das tecnologias mais recentes é a alimentação in ovo, que consiste em suplementar diretamente o embrião antes da eclosão. Nesta revisão de literatura, foi analisada a metodologia da alimentação in ovo e os efeitos de diferentes substâncias utilizadas nessa abordagem. Entre os nutrientes avaliados estão carboidratos, aminoácidos, vitaminas e minerais. Além disso, foram consideradas substâncias bioativas, como probióticos, prebióticos e simbióticos. Os estudos revisados destacam o potencial da alimentação in ovo para melhorar a saúde e o desempenho dos frangos de corte. No entanto, foram identificadas limitações na implementação dessa técnica, ressaltando a necessidade de mais pesquisas que possibilitem a validação desse método e sua aplicação em larga escala.

Palavras-chave: Alimentação In Ovo, Frango de Corte, Avicultura.

Introducción

La carne de pollo es la principal fuente de proteína cárnica a nivel mundial, la cual es altamente demandada entre los consumidores debido a sus precios asequibles y por su relación saludable entre proteína y grasa. Se calcula que para el año 2031, la carne de ave constituirá el 41 % de todas las proteínas de origen animal (OECD & Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2023). Por lo que es debido a esta alta demanda que existe hacia la avicultura una búsqueda de nuevas y eficientes tecnologías que ayuden al crecimiento de la industria y el bienestar animal.

De tal manera que es aquí donde entra la alimentación in ovo, la cual se encuentra basada en la vacunación in ovo y consiste en introducir sustancias estimulantes o nutrientes en la región del amnios o en la cámara de aire, con el objetivo de mejorar el estatus nutricional del pollito y ayudar con el desarrollo del tracto gastrointestinal después de que este haya eclosionado (E.E.U.U. Patente N.º 6,592,878 B2, 2003).

Entre las sustancias que se han estudiado en la inyección in ovo se encuentran distintos nutrientes como carbohidratos, vitaminas, aminoácidos y minerales. Además, en años recientes se han estudiado el uso de prebióticos, probióticos y simbióticos, ya que estos se han asociado al establecimiento temprano de un microbioma beneficioso en el tracto gastrointestinal antes de que el ave sea expuesta a patógenos (Roto *et al.*, 2016).

Algunos de los beneficios que han sido asociados con la alimentación in ovo son la reducción en la tasa de mortalidad embrionaria, mejora en la conversión alimenticia y mayor desarrollo del tracto gastrointestinal y

del sistema inmune (Das *et al.*, 2021; Kadam *et al.*, 2013; Saeed *et al.*, 2019).

Metodología

Para la realización de este artículo de revisión se utilizaron distintas bases de datos, principalmente, PubMed y Google Scholar para la recopilación de fuentes bibliográficas, y entre las palabras claves utilizadas se encuentran las siguientes: in ovo feeding, in ovo inoculation, in ovo injection. En su mayoría, se consultaron artículos científicos de distintas revistas, entre las cuales se destaca Poultry Science (publicada por Elsevier), Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (publicada por Wiley), Frontiers in Veterinary Medicine (publicada por Frontiers), Nutrients, Veterinary Sciences y Animals (publicadas por MDPI). Los materiales que se utilizaron para realizar este trabajo constituyen los artículos científicos, libros y páginas web. A partir de estos, se realizó la recopilación y análisis de información para la elaboración del artículo.

Discusión

La inoculación in ovo de sustancias exógenas comenzó en la década de los años 80 en investigaciones relacionadas con la Enfermedad de Marek (MD) (Peebles, 2018). Antes de que existiera la inyección in ovo, las aves eran inmunizadas contra MD después de la eclosión, pero, aun así, era común que las granjas experimentaran una alta mortalidad a causa de este virus (Roto *et al.*, 2016). En el año 1982, los doctores Sharma y Bumester realizaron un experimento en el cual inoculaban en el día 18 a los embriones con la cepa FC126 de Herpesvirus de Pavo (HVT) y una vez que las aves eclosionaban estas eran desafiadas al virus patogénico de

MD; los investigadores descubrieron que las aves vacunadas in ovo estaban mejor inmunizadas que aquellas que fueron vacunadas poseclósion (Sharma & Burmester, 1982). Fue así como la vacunación in ovo fue incluida como método de prevención a enfermedades avícolas en distintas partes del mundo.

Ahora bien, en la industria avícola existe un concepto conocido como ventana de nacimiento, el cual consiste en el tiempo desde que eclosiona el primer pollito hasta el último en la incubadora (Such *et al.*, 2023) y, en términos prácticos significa que las aves recién nacidas no son removidas de la incubadora hasta que el mayor número de huevos haya eclosionado (Kornasio *et al.*, 2011). Esto significa que desde el momento que los pollitos eclosionan hasta que llegan a la granja, pueden estar sin acceso a alimento y agua por dos-tres días (Kadam *et al.*, 2013). Esto conlleva muchos problemas, ya que cuando el acceso a alimento es retrasado, los pollitos son más susceptibles a patógenos, su peso muscular disminuye, tienen desarrollo restringido de órganos y tejidos como el intestino y el sistema inmune (Kadam *et al.*, 2013; Kornasio *et al.*, 2011; Roto *et al.*, 2016).

Esto conlleva a que, en el año 2004, la Dra. Zehava Uni y el Dr. Peter Ferket patentaron el protocolo utilizado para realizar la alimentación in ovo bajo el nombre "Mejora del desarrollo de especies ovíparas mediante alimentación in ovo". En esta se estableció como objetivo mejorar el desarrollo de especies ovíparas como aves, reptiles o peces con la administración in ovo de nutrientes, moduladores entéricos o ambos (E.E.U.U. Patente N.º 6,592,878 B2, 2003). A raíz de esto, se han desarrollado investigaciones sobre esta técnica, ya que su principal objetivo consiste en proporcionar al embrión con los nutrientes vitales para

que pueda continuar con el desarrollo óptimo de distintos sistemas, principalmente, el tracto gastrointestinal y el sistema inmune, así como el establecimiento temprano de un microbioma beneficioso (Das *et al.*, 2021; Roto *et al.*, 2016). Si bien es cierto, muchos de los principales objetivos de las investigaciones ha sido mejorar los parámetros productivos como el peso corporal al nacimiento o conversión alimenticia, indirectamente, estas investigaciones, también, buscan el bienestar de las aves.

En referencia al método de inyección in ovo, existen distintos sitios para la administración de sustancias, pero a grandes rasgos se puede dividir en inoculación en la región del amnios (incluyendo el líquido amniótico, el saco vitelino y el embrión) y la cámara de aire (Hou & Tako, 2018; Saeed *et al.*, 2019). En el caso de inyectar en el líquido amniótico, este se debe realizar entre el día 17 y 18 de desarrollo embrionario, antes de que el ave lo consuma de manera natural en el día 19 (Hou & Tako, 2018). Esta metodología permite que cualquier solución administrada sea ingerida por el embrión y es presentada a los tejidos entéricos como los enterocitos (E.E.U.U. Patente N.º 6,592,878 B2, 2003). Este método es conocido como "alimentación in ovo" o "inyección intraamniótica".

En el caso de utilizar la cámara de aire, esta se realiza en el día 12 de desarrollo embrionario, cuando la membrana corioalantoica está completamente desarrollada y el embrión está rodeado por restos del líquido amniótico que está en contacto con el tracto gastrointestinal, lo que permite el transporte de sustancias de la cámara de aire al intestino (Hou & Tako, 2018; Siwek *et al.*, 2018). Asimismo, se ha mencionado que los compuestos pueden ser ingeridos cuando el ave comienza a romper el cascarón. (E.E.U.U. Patente N.º 6,592,878 B2, 2003). Esta metodología está reservada para el uso de simbióticos y prebióticos, ya que su principal

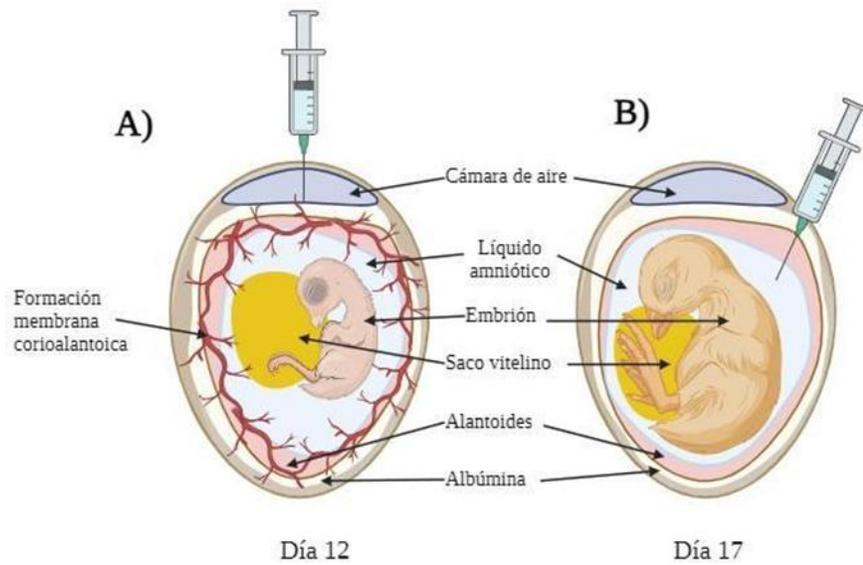
objetivo es estimular el microbioma nativo del ave, por lo que algunos autores prefieren referirse a este método como “estimulación in ovo” (Siwek *et al.*, 2018).

Sin embargo, en este último método existen varios factores a tomar en cuenta. En primer lugar; se puede reducir, seriamente, el porcentaje de incubabilidad, ya que existen mayores posibilidades de crear una reacción alérgica en la cámara de aire y, por lo tanto, se detiene la respiración del embrión (Joshua *et al.*, 2016). En segundo lugar, se debe tener mayor cuidado con la sustancia a inocular, ya que el volumen por inyectar debe ser sumamente bajo o de lo contrario se puede llenar la cámara de aire de líquido o se puede crear un desbalance de presiones (Kolba, comunicación personal, 14 de abril de 2023). En tercer lugar, si se considera la aplicación de este método en sistemas industriales, resulta poco práctico, pues requiere una excesiva manipulación de los huevos en varios días durante la incubación y, por lo tanto, existe el riesgo de afectar los porcentajes de incubabilidad y de mortalidad embrionaria.

Por lo tanto, el método mayoritariamente aceptado por diversos autores corresponde a inocular sustancias en el líquido amniótico entre el día 17-18 de desarrollo embrionario antes de que el embrión lo consuma por vía oral en el día 19 (Hou & Tako, 2018; Kadam *et al.*, 2013; Roto *et al.*, 2016).

Figura 1

Métodos de alimentación in ovo



Nota: la figura es de elaboración propia. A) Alimentación in ovo en la cámara de aire en el día 12 de desarrollo embrionario con la formación de la membrana corioalantoica, este método es llamado por algunos autores como “estimulación in ovo” B) Alimentación in ovo con inyección de la sustancia en el líquido amniótico en el día 17 antes de que el ave lo consuma en el día 19.

Durante la administración de sustancias es importante tomar en cuenta no dañar tejidos u órganos del embrión para no afectar los índices de mortalidad embrionaria. Esto se realiza con la ayuda de la ovoscopia, ya que esta permite diferenciar las diferentes estructuras (Kolba *et al.*, 2022). Para este método es preferible usar una jeringa calibre 22 y cuando se retira la aguja, es recomendable sellar el lugar de inoculación con algún

material como cera para evitar la proliferación de bacterias no deseadas (E.E.U.U. Patente N.º 6,592,878 B2, 2003).

Respecto a la sustancia por inyectar, si se inyecta en la cámara de aire, el volumen del inyectable es de 0,2 ml, mientras que en el caso del líquido amniótico el volumen es mayor y puede estar entre 0,5 ml - 1,7 ml (Shehata *et al.*, 2021; Siwek *et al.*, 2018). Asimismo, la osmolaridad del compuesto es importante, ya que esta puede influir en la incubabilidad. El rango aceptable de osmolaridad es de 400-600 mOsm, ya que soluciones que sobrepasaron los 800 mOsm obtuvieron porcentajes de incubabilidad inaceptables (E.E.U.U. Patente N.º 6,592,878 B2, 2003).

En el caso de las sustancias a inyectar, se debe tomar en cuenta que durante el desarrollo embrionario, las aves son dependientes del saco vitelino, de la albúmina y de la cáscara como fuente de energía y nutrientes (Wong & Uni, 2021). Nutrientes complejos como proteínas, lípidos y carbohidratos son movilizados del saco vitelino y convertidos en aminoácidos, ácidos grasos y glucosa en el hígado durante la embriogénesis y transportados por los tejidos mediante la circulación (Ács *et al.*, 2022). El uso de carbohidratos, principalmente, la glucosa, como fuente de energía sobre los lípidos o proteínas se debe a que esta provee más energía y utiliza menos oxígeno que el catabolismo por lípidos, sin embargo, la concentración de carbohidratos dentro del huevo corresponde a menos del 1 % del total de nutrientes y solo se encuentra aproximadamente 0,3 % glucosa libre (Ács *et al.*, 2022; Retes *et al.*, 2018).

El pensamiento que ha llevado a utilizar sustancias ricas en carbohidratos y proteínas en la alimentación in ovo es porque al haber una mayor cantidad de estas, el embrión no agotaría las reservas de glucógeno

y no utilizaría proteína muscular para la gluconeogénesis (Fatemi *et al.*, 2021; Retes *et al.*, 2018). Por ejemplo, en el caso de Uni *et al.* (2005), se demostró que la administración en el día 17,5 de desarrollo embrionario con una solución de carbohidratos (maltosa, sacarosa, dextrina) y β -hidroxi β -metilbutirato (HMB) incrementó entre un 5-6 % el peso de los pollitos sobre el control, así como la cantidad de glucógeno hepático y el porcentaje de masa muscular en el pecho. En este mismo estudio se llegó a la teoría de que el aumento en los niveles de glucógeno salvó la utilización de proteína muscular para producir glucosa y, por lo tanto, se obtuvo un mayor peso en las aves. Tako *et al.* (2004) utilizaron la misma solución que el estudio mencionado anteriormente, y descubrió que tuvo una mejoría en el desarrollo intestinal al incrementar el tamaño de las vellosidades y, por lo tanto, aumentó la capacidad intestinal para digerir disacáridos. Kornasio *et al.* (2011) afirman que utilizar una solución de carbohidratos con HMB en el líquido amniótico antes de que el ave eclosione apoya el crecimiento de los broilers que cuentan con un acceso retrasado de agua y alimento.

En un estudio realizado por Yu *et al.* (2018) la administración in ovo de 1 % de L-arginina incrementó las concentraciones de glucógeno y glucosa en el hígado y en el músculo pectoral y aumentó el nivel de glucosa en plasma, para concluir que la arginina administrada in ovo puede incrementar las reservas de energía en hígado y músculo y mejoraría el desarrollo posteclosión de las aves. De manera complementaria, de acuerdo con Subramaniyan *et al.* (2020), la suplementación de L-arginina junto con nanopartículas de plata aumentó la tasa de sobrevivencia y de incubabilidad, así como que incrementó los niveles de IgM en suero y la expresión de proteínas relacionadas con el desarrollo muscular. Zhao *et al.* (2018) incrementaron la ganancia de peso corporal en los primeros

siete días de los pollitos, así como un mayor estado de energía neonatal en las aves al mejorar la concentración de ATP en el músculo después de una inyección en el líquido amniótico de piruvato de creatina, pero no obtuvieron diferencias en el consumo de alimento. Con estos estudios, se ha demostrado que el uso de carbohidratos y/o aminoácidos ha tenido efectos positivos en el estatus de energía del embrión, y, por ende, mejora el desarrollo y crecimiento del pollito

Las vitaminas han sido estudiadas como sustancias a inocular in ovo, sin embargo, no se obtuvieron efectos significativos en parámetros como la embriogénesis, supervivencia embrionaria, conversión alimenticia o desarrollo esquelético posecisión.

En un estudio realizado por Yair *et al.* (2015) inyectaron distintos minerales orgánicos e inorgánicos, fosfatos y vitamina D3 para examinar las propiedades de los huesos y consumo mineral, y si bien es cierto, descubrieron un mayor contenido mineral en la yema, así como un mayor consumo embrionario y cambios en la composición y propiedades mecánicas del esqueleto, no tuvo efectos funcionales positivos, como una mejor capacidad de las aves de mantenerse de pie. En el caso de los minerales, se han obtenido resultados similares a este estudio anterior, en donde los investigadores al inocular distintos minerales no obtuvieron diferencias significativas en parámetros relacionados con la mineralización del hueso ni efectos a largo plazo (Oliveira, Bertechini, Bricka, Hester, *et al.*, 2015; Oliveira, Bertechini, Bricka, Kim, *et al.*, 2015)

En el caso del establecimiento del sistema inmune, su desarrollo empieza en etapas tempranas del crecimiento embrionario y termina en etapas tardías, aunque la maduración y respuesta hacia antígenos aumenta con en la edad posecisión (Kpodo & Proszkowiec-Weglarz,

2023). En un estudio realizado por Alizadeh *et al.*, (2022), el grupo de aves que recibió ácido retinoico in ovo fue el que obtuvo mayor expresión de citoquinas y mejoró la respuesta mediada por anticuerpos ante antígenos T-dependientes. Asimismo, en este mismo estudio, se destaca que el ácido retinoico tiene un rol importante en el desarrollo y diferenciación de células B y no tanto en la proliferación de estas, aunque se desconoce el mecanismo por el cual esto ocurre.

Asimismo, se destaca el estudio por Moreira Filho *et al.* (2018), quienes utilizaron una inyección in ovo de treonina y después de dos días de nacidas las aves, las desafiaron con *Salmonella enteritidis* y obtuvieron que la suplementación in ovo disminuyó los efectos perjudiciales por esta bacteria, así como disminuyó el recuento de bacterias en el contenido cecal y conservó la integridad de la mucosa intestinal. De manera similar Omidi *et al.* (2020) obtuvieron que al inyectar L-arginina al 0,5 % aumentó la población cecal de *Lactobacillus* y disminuyó las poblaciones de coliformes y *Escherichia coli*.

El microbioma gastrointestinal de las aves está compuesto por varios microorganismos, dentro de los cuales las bacterias juegan un papel fundamental en la absorción y metabolismo de nutrientes, actividad inmune y desempeño de las aves (Kpodo y Proszkowiec-Weglarz, 2023; Roto *et al.*, 2016). De acuerdo con Ferket (2021) el establecimiento de un microbioma intestinal sano no empieza en la eclosión, sino cuando el ave es un embrión y la alimentación in ovo ayuda al desarrollo del tracto gastrointestinal y favorece a los microorganismos del microbioma existente.

Como se mencionó anteriormente, el uso de prebióticos, probióticos y/o simbióticos en alimentación in ovo generalmente se utiliza la cámara

de aire como sitio de inoculación en el día 12 de desarrollo embrionario. Sin embargo, este método se puede llamar estimulación in ovo y no alimentación in ovo, ya que la sustancia al no ser inyectada en el líquido amniótico nunca es ingerida por el ave. El establecimiento del sistema gastrointestinal, en conjunto con un microbioma beneficioso, es de suma importancia, ya que este ha sido asociado a una imagen general de salud y desempeño de las aves en granja.

Tomando esto en cuenta, se destaca el estudio realizado por Calik *et al.* (2017), quienes al inyectar un simbiótico (constituido de inulina y *Enterococcus faecium*) en el día 17 de desarrollo embrionario observaron mejorías en la integridad intestinal de las aves y en el aumento de las poblaciones cecales de bacterias benéficas. En el caso de Alizadeh *et al.* (2022), quienes al utilizar una solución que contenía ácido retinoico, 25 hidroxivitamina D3 y un coctel de *Lactobacilli* mejoraron la inmunocompetencia de las aves recién nacidas, así como un aumento de citoquinas.

De acuerdo con Tako *et al.* (2004), la administración de HMB mejora el desarrollo intestinal, ya que aumenta la proliferación y diferenciación de enterocitos y esto fue evidenciado al tener una mayor superficie de área en las vellosidades intestinales. Moreira Filho *et al.* (2018) aseguraron que la administración in ovo de treonina benefició el desarrollo del tracto gastrointestinal, ya que los animales suplementados poseían vellosidades intestinales con mayor altura y área de superficie, así como mayor expresión del gen MUC2 y de IgA.

En el caso de Calik *et al.* (2017), en el cual administraron un simbiótico (*Enterococcus faecium* con inulina), se mejoró el desarrollo morfológico del intestino, ya que las vellosidades intestinales contaban con

mayor altura y cantidad de células de Goblet. Agrizzi Verediano *et al.* (2022) demostraron que al utilizar extractos de maíz negro se incrementó la población de *Bifidobacterium* y *Clostridium* en el ciego, así como se redujo la población de *E. coli*, mientras se mantenía la morfología y funcionalidad intestinal. Jackson *et al.* (2022) demostraron que la inoculación de puré y hollejo de manzana aumentó la población de *Clostridium* y, por lo tanto, se mejoró la salud intestinal.

Conclusión

La alimentación in ovo es una tecnología que hasta el momento solo se ha utilizado por propósitos de investigación científica y no es utilizada a gran escala en sistemas de producción. De acuerdo con Ferket (2021), esta tecnología no está disponible a nivel comercial y existen muchos obstáculos por superar para implementarla, pero cuenta con mucho potencial en beneficio de las aves. De acuerdo con Kpodo y Proszkowiec-Weglarz (2023) existen distintas razones por las cuales la industria avícola puede no estar interesada en implementar esta tecnología a gran escala como, por ejemplo, la falta de estandarización del método de alimentación in ovo, para lo cual se necesita llevar a cabo más investigaciones. Sin embargo, es una tecnología que de manera definitiva tienen gran potencial para mejorar la salud de las aves y, por lo tanto, sus parámetros productivos.

Bibliografía

- Ács, V., Áprily, S., Nagy, J., Kacsala, L., Tossenberger, J., Szeli, N. K., & Halas, V. (2022). Multiple Effects of Egg Weight, in Ovo Carbohydrates, and Sex of Birds on Posthatch Performance in Broilers. *Veterinary Sciences*, 9(9), 491. <https://doi.org/10.3390/vetsci9090491>
- Agarwal, N., Shukla, V., Kolba, N., Jackson, C., Cheng, J., Padilla-Zakour, O. I., & Tako, E. (2022). Comparing the Effects of Concord Grape (*Vitis labrusca* L.) Puree, Juice, and Pomace on Intestinal Morphology, Functionality, and Bacterial Populations In Vivo (*Gallus gallus*). *Nutrients*, 14(17), 3539. <https://doi.org/10.3390/nu14173539>
- Agrizzi Verediano, T., Agarwal, N., Stampini Duarte Martino, H., Kolba, N., Grancieri, M., Dias Paes, M. C., & Tako, E. (2022). Effect of Black Corn Anthocyanin-Rich Extract (*Zea mays* L.) on Cecal Microbial Populations In Vivo (*Gallus gallus*). *Nutrients*, 14(21), 679. <https://doi.org/10.3390/nu14214679>
- Alizadeh, M., Astill, J., Alqazlan, N., Shojadoost, B., Taha-Abdelaziz, K., Bavananthasivam, J., Doost, J. S., Sedeghiisfahani, N., & Sharif, S. (2022). In ovo co-administration of vitamins (A and D) and probiotic lactobacilli modulates immune responses in broiler chickens. *Poultry Science*, 101(4), 101717. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101717>
- Araújo, I. C. S., Café, M. B., Noleto, R. A., Martins, J. M. S., Ulhoa,

- C. J., Guareshi, G. C., Reis, M. M., & Leandro, N. S. M. (2019). Effect of vitamin E in ovo feeding to broiler embryos on hatchability, chick quality, oxidative state, and performance. *Poultry Science*, 98(9), 3652–3661. <https://doi.org/10.3382/ps/pey439>
- Bello, A., Zhai, W., Gerard, P. D., & Peebles, E. D. (2013). Effects of the commercial in ovo injection of 25-hydroxycholecalciferol on the hatchability and hatching chick quality of broilers. *Poultry Science*, 92(10), 2551–2559. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03086>
 - Calik, A., Ceylan, A., Ekim, B., Adabi, S. G., Dilber, F., Bayraktaroglu, A. G., Tekinay, T., Özen, D., & Sacakli, P. (2017). The effect of intra-amniotic and posthatch dietary synbiotic administration on the performance, intestinal histomorphology, cecal microbial population, and short-chain fatty acid composition of broiler chickens. *Poultry Science*, 96(1), 169–183. <https://doi.org/10.3382/ps/pew218>
 - Das, R., Mishra, P., & Jha, R. (2021). In ovo Feeding as a Tool for Improving Performance and Gut Health of Poultry: A Review. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 754246. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.754246>
 - Fatemi, S. A., Alqhtani, A., Elliott, K. E. C., Bello, A., Zhang, H., & Peebles, E. D. (2021). Effects of the in ovo injection of vitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D3 in Ross 708 broilers subsequently fed commercial or calcium and phosphorus-restricted

diets. I. Performance, carcass characteristics, and incidence of woody breast myopathy^{1,2,3}. *Poultry Science*, 100(8), 101220. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101220>

- Ferket, P. (marzo, 2021). *Good gut health starts before hatch, expert says*. Poultry HealthToday. <https://poultryhealthtoday.com/good-gut-health-starts-before-hatch-expert-says/>
- Hou, T., & Tako, E. (2018). The In Ovo Feeding Administration (Gallus Gallus)—An Emerging In Vivo Approach to Assess Bioactive Compounds with Potential Nutritional Benefits. *Nutrients*, 10(4), 418. <https://doi.org/10.3390/nu10040418>
- Jackson, C., Shukla, V., Kolba, N., Agarwal, N., Padilla-Zakour, O. I., & Tako, E. (2022). Empire Apple (*Malus domestica*) Juice, Pomace, and Pulp Modulate Intestinal Functionality, Morphology, and Bacterial Populations In Vivo (*Gallus gallus*). *Nutrients*, 14(23), 4955. <https://doi.org/10.3390/nu14234955>
- Joshua, P. P., Valli, C., & Balakrishnan, V. (2016). Effect of in ovo supplementation of nano forms of zinc, copper, and selenium on post-hatch performance of broiler chicken. *Veterinary World*, 9(3), 287–294. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.287-294>
- Kadam, M. M., Barekatin, M. R., K Bhanja, S., & Iji, P. A. (2013). Prospects of *in ovo* feeding and nutrient supplementation for poultry: The science and commercial applications—a review. *Journal of the*

Science of Food and Agriculture, 93(15), 3654–3661.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.6301>

- Kolba, N., Cheng, J., Jackson, C. D., & Tako, E. (2022). Intra-Amniotic Administration—An Emerging Method to Investigate Necrotizing Enterocolitis, In Vivo (Gallus gallus). *Nutrients*, 14(22), 4795.
<https://doi.org/10.3390/nu14224795>
- Kornasio, R., Halevy, O., Kedar, O., & Uni, Z. (2011). Effect of in ovo feeding and its interaction with timing of first feed on glycogen reserves, muscle growth, and body weight. *Poultry Science*, 90(7), 1467–1477. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-01080>
- Kpodo, K. R., & Proszkowiec-Weglarz, M. (2023). Physiological effects of in ovo delivery of bioactive substances in broiler chickens. *Frontiers in Veterinar Science*, 10, 1124007. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1124007>
- Mellor, D. J., Beausoleil, N. J., Littlewood, K. E., McLean, A. N., McGreevy, P. D., Jones, B., & Wilkins, C. (2020). The 2020 Five Domains Model: Including Human–Animal Interactions in Assessments of Animal Welfare. *Animals*, 10(10), 1870. <https://doi.org/10.3390/ani10101870>
- Meneguelli, T. S., Kolba, N., Misra, A., Dionísio, A. P., Pelissari

Kravchychyn, A. C., Da Silva, B. P., Stampini Duarte Martino, H., Hermsdorff, H. H. M., & Tako, E. (2023). Intra-Amniotic Administration of Cashew Nut (*Anacardium occidentale* L.) Soluble Extract Improved Gut Functionality and Morphology In Vivo (*Gallus gallus*). *Nutrients*, *15*(10), 2378. <https://doi.org/10.3390/nu15102378>

- Mishima, M. D. V., Da Silva, B. P., Gomes, M. J. C., Toledo, R. C. L., Mantovani, H. C., José, V. P. B. D. S., Costa, N. M. B., Tako, E., & Martino, H. S. D. (2022). Effect of Chia (*Salvia hispanica* L.) Associated with High-Fat Diet on the Intestinal Health of Wistar Rats. *Nutrients*, *14*(22), 4924. <https://doi.org/10.3390/nu14224924>
- Mishima, M. D. V., Martino, H. S. D., Kolba, N., Agarwal, N., Jackson, C., Da Silva, B. P., Grancieri, M., De Assis, A., São José, V. P. B. D., & Tako, E. (2023). Chia Phenolic Extract Appear to Improve Small Intestinal Functionality, Morphology, Bacterial Populations, and Inflammation Biomarkers In Vivo (*Gallus gallus*). *Nutrients*, *15*(16), 3643. <https://doi.org/10.3390/nu15163643>
- Moreira Filho, A. L. D. B., Oliveira, C. J. B., Freitas Neto, O. C., De Leon, C. M. C. G., Saraiva, M. M. S., Andrade, M. F. S., White, B., & Givisiez, P. E. N. (2018). Intra-Amniotic Threonine Administered to Chicken Embryos Reduces *Salmonella* Enteritidis Cecal Counts and Improves Posthatch Intestinal Development. *Journal of Immunology Research*, *2018*, 1-9.

<https://doi.org/10.1155/2018/9795829>

- OECD & Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2023). *OECD-FAO Agricultural Outlook 2023-2032*. OECD. <https://doi.org/10.1787/08801ab7-en>
- Oliveira, T. F. B., Bertechini, A. G., Bricka, R. M., Hester, P. Y., Kim, E. J., Gerard, P. D., & Peebles, E. D. (2015). Effects of in ovo injection of organic trace minerals and post-hatch holding time on broiler performance and bone characteristics. *Poultry Science*, *94*(11), 2677–2685. <https://doi.org/10.3382/ps/pev249>
- Oliveira, T. F. B., Bertechini, A. G., Bricka, R. M., Kim, E. J., Gerard, P. D., & Peebles, E. D. (2015). Effects of in ovo injection of organic zinc, manganese, and copper on the hatchability and bone parameters of broiler hatchlings. *Poultry Science*, *94*(10), 2488–2494. <https://doi.org/10.3382/ps/pev248>
- Omid, S., Ebrahimi, M., Janmohammadi, H., Moghaddam, G., Rajabi, Z., & Hosseintabar-Ghasemabad, B. (2020). The impact of in ovo injection of L -arginine on hatchability, immune system and caecum microflora of broiler chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *104*(1), 178–185. <https://doi.org/10.1111/jpn.13222>
- Peebles, E. D. (2018). In ovo applications in poultry: A review. *Poultry Science*, *97*(7), 2322–2338.

<https://doi.org/10.3382/ps/pey081>

- Retes, P. L., Clemente, A. H. S., Neves, D. G., Espósito, M., Makiyama, L., Alvarenga, R. R., Pereira, L. J., & Zangeronimo, M. G. (2018). *In ovo* feeding of carbohydrates for broilers—A systematic review. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(2), 361–369. <https://doi.org/10.1111/jpn.12807>
- Roto, S. M., Kwon, Y. M., & Ricke, S. C. (2016). Applications of In Ovo Technique for the Optimal Development of the Gastrointestinal Tract and the Potential Influence on the Establishment of Its Microbiome in Poultry. *Frontiers in Veterinary Science*, 3. <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00063>
- Saeed, M., Babazadeh, D., Naveed, M., Alagawany, M., Abd El-Hack, M. E., Arain, M. A., Tiwari, R., Sachan, S., Karthik, K., Dhama, K., Elnesr, S. S., & Chao, S. (2019). *In ovo* delivery of various biological supplements, vaccines, and drugs in poultry: Current knowledge. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(8), 3727–3739. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9593>
- Sharma, J. M., & Burmester, B. R. (1982). Resistance of Marek's Disease at Hatching in Chickens Vaccinated as Embryos with the Turkey Herpesvirus. *Avian Diseases*, 26(1), 134. <https://doi.org/10.2307/1590032>
- Shehata, A. M., Paswan, V. K., Attia, Y. A., Abdel-Moneim, A.-M.

E., Abougabal, M. Sh., Sharaf, M., Elmazoudy, R., Alghafari, W. T., Osman, M. A., Farag, M. R., & Alagawany, M. (2021). Managing Gut Microbiota through In Ovo Nutrition Influences Early-Life Programming in Broiler Chickens. *Animals*, *11*(12), 3491. <https://doi.org/10.3390/ani11123491>

- Siwek, M., Slawinska, A., Stadnicka, K., Bogucka, J., Dunislawska, A., & Bednarczyk, M. (2018a). Prebiotics and synbiotics – in ovo delivery for improved lifespan condition in chicken. *BMC Veterinary Research*, *14*(1), 402. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1738-z>
- Siwek, M., Slawinska, A., Stadnicka, K., Bogucka, J., Dunislawska, A., & Bednarczyk, M. (2018b). Prebiotics and synbiotics – in ovo delivery for improved lifespan condition in chicken. *BMC Veterinary Research*, *14*(1), 402. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1738-z>
- Subramaniyan, S. A., Kang, D., Siddiqui, S. H., Park, J., Tian, W., Park, B., & Shim, K. (2020). Effects of In Ovo Supplementation with Nanonutrition (L-Arginine Conjugated with Ag NPs) on Muscle Growth, Immune Response and Heat Shock Proteins at Different Chicken Embryonic Development Stages. *Animals*, *10*(4), 564. <https://doi.org/10.3390/ani10040564>
- Such, N., Schermann, K., Pál, L., Menyhárt, L., Farkas, V., Csitári, G., Kiss, B., Tewelde, K. G., & Dubleczyk, K. (2023). The Hatching

Time of Broiler Chickens Modifies Not Only the Production Traits but Also the Early Bacteriota Development of the Ceca. *Animals*, 13(17), 2712. <https://doi.org/10.3390/ani13172712>

- Tako, E., Ferket, P. R., & Uni, Z. (2004). Effects of in ovo feeding of carbohydrates and beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on the development of chicken intestine. *Poultry Science*, 83(12), 2023–2028. <https://doi.org/10.1093/ps/83.12.2023>
- Uni, Z., y Ferket, P.R. (2003). E.E.U.U. Patente No. 6,592,878 B2. U.S. Patent and Trademark Office. <https://imageppubs.uspto.gov/dirsearch-public/print/downloadPdf/6592878>
- Uni, Z., Ferket, P. R., Tako, E., & Kedar, O. (2005). In ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. *Poultry Science*, 84(5), 764–770. <https://doi.org/10.1093/ps/84.5.764>
- Wong, E. A., & Uni, Z. (2021). Centennial Review: The chicken yolk sac is a multifunctional organ. *Poultry Science*, 100(3), 100821. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.11.004>
- Yair, R., Shahar, R., & Uni, Z. (2015). In ovo feeding with minerals and vitamin D3 improves bone properties in hatchlings and mature broilers. *Poultry Science*, 94(11), 2695–2707. <https://doi.org/10.3382/ps/pev252>

- Yu, L. L., Gao, T., Zhao, M. M., Lv, P. A., Zhang, L., Li, J. L., Jiang, Y., Gao, F., & Zhou, G. H. (2018). In ovo feeding of L-arginine alters energy metabolism in post-hatch broilers. *Poultry Science*, 97(1), 140–148. <https://doi.org/10.3382/ps/pex272>
- Zhao, M., Gong, D., Gao, T., Zhang, L., Li, J., Lv, P., Yu, L., Zhou, G., & Gao, F. (2018). In Ovo Feeding of Creatine Pyruvate Increases the Glycolysis Pathway, Glucose Transporter Gene Expression, and AMPK Phosphorylation in Breast Muscle of Neonatal Broilers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(29), 7684–7691. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02557>