

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN**



**“RESPUESTA PRODUCTIVA, MINERALIZACIÓN E
INTEGRIDAD DE TIBIAS DE POLLOS DE CARNE CON
DIETAS SUPLEMENTADAS CON FITASA Y 25-
HIDROXICOLECALCIFEROL”**

Presentada por:

GABRIELA PECEROS RIPA

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAGISTER SCIENTIAE EN
NUTRICIÓN**

Lima - Perú

2015

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN**

**“RESPUESTA PRODUCTIVA, MINERALIZACIÓN E
INTEGRIDAD DE TIBIAS DE POLLOS DE CARNE CON
DIETAS SUPLEMENTADAS CON FITASA Y 25-
HIDROXICOLECALCIFEROL”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE**

Presentada por:

GABRIELA PECEROS RIPA

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Ph.D. Sergio Rojas Montoya
PRESIDENTE

Ph.D. Carlos Vílchez Perales
PATROCINADOR

Ph.D. Víctor Guevara Carrasco
MIEMBRO

Ph.D. Mariano Echevarría Rojas
MIEMBRO

DEDICATORIA

A mis queridos padres Gerardo y Concepcion, con cariño, respeto y eterna gratitud; por su invaluable amor, comprensión y apoyo incondicional en mi anhelo profesional.

Con cariño a mis hermanos David y Rony por la comprensión y apoyo en mi superación a nivel profesional.

A Díos por guiarme y cuidarme a lo largo de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

- Al Ph.D. Carlos Vílchez Perales, por su acertada dirección y apoyo incondicional como patrocinador del presente trabajo.
- Al Ph.D. Sergio Rojas Montoya, Ph.D. Mariano Echevarría Rojas y Ph.D. Víctor Guevara Carrasco por su asesoramiento en el presente trabajo
- Finalmente, a todas las personas y amigos, en especial a Paulo, Margot, Freddy y Brando; que directa e indirectamente contribuyeron a la culminación del presente trabajo.

ÍNDICE

	Pag.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 DESARROLLO DEL TEJIDO ÓSEO	3
2.2 FITASA	5
2.3 CONTENIDO DE FÓSFORO EN LAS FUENTES VEGETALES	7
2.3.1 ÁCIDO FÍTICO	8
2.4 VITAMINA D	10
2.4.1 SÍNTESIS Y METABOLISMO DE LA VITAMINA D	10
2.4.2 RELACIÓN DE LA 1,25-(OH) ₂ D ₃ CON LA HOMEOSTASIS DEL CALCIO Y FÓSFORO	12
2.5 REQUERIMIENTO DE CALCIO Y FÓSFORO EN POLLOS DE CARNE	13
2.6 CRITERIOS O MÉTODOS PARA EVALUAR LA DISPONIBILIDAD DE CALCIO Y FÓSFORO	15
2.6.1 CANTIDAD DE CENIZAS, CALCIO Y FÓSFORO DE LOS HUESOS	15
2.6.2 RESISTENCIA ÓSEA A LA COMPRESIÓN	16
2.6.3 DENSIDAD DEL HUESO	17
2.6.4 SANGRE	18
2.6.5 RESPUESTA PRODUCTIVA	19
2.6.6 RETENCIÓN Y DIGESTIBILIDAD PRE-CECAL	19
2.7 INVESTIGACIONES SOBRE EL USO DE FITASA Y VITAMINA D ₃ EN DIETAS PARA POLLOS DE CARNE	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1 LUGAR Y DURACIÓN	24
3.2 INSTALACIONES, EQUIPOS Y MATERIALES	24
3.3 ANIMALES EXPERIMENTALES	24
3.4 SUPLEMENTOS DIETÉTICOS EVALUADOS	25
3.4.1 ENZIMA FITASA	25
3.4.2 25-HIDROXICOLECALCIFEROL (25-OHD ₃)	25
3.5 TRATAMIENTOS	25
3.6 FORMULACIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES	26
3.7 MEDICIONES	26
3.7.1 RESPUESTA PRODUCTIVA	28
3.7.2 CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DE LA TIBIA	29
3.7.3 INDICADORES DE MINERALIZACIÓN DE LA TIBIA	31
3.7.4 MEDICIONES COMPLEMENTARIAS	32
3.8 DISEÑO ESTADÍSTICO	33
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34

4.1 PESO VIVO Y GANANCIA DE PESO	34
4.2 CONSUMO DE ALIMENTO Y CONVERSIÓN ALIMENTICIA	36
4.3 LARGO, PESO DE LA TIBIA, DIÁMETRO DE LA DIÁFISIS Y VOLUMEN DE LA TIBIA	37
4.4 DENSIDAD, ÍNDICE MODIFICADO DE SEEDOR, ÍNDICE DE QUETELET E ÍNDICE DE ROBUSTICIDAD DE LA TIBIA	40
4.5 PORCENTAJE DE CENIZAS, CALCIO Y FÓSFORO DE LA TIBIA	43
4.6 CAPACIDAD PARA CAMINAR	45
V. CONCLUSIONES	47
VI. RECOMENDACIONES	48
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
VIII. ANEXOS	63

ÍNDICE DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1: Promedio (y rango) del fósforo total y fósforo fítico, y proporción del fósforo fítico en ingredientes utilizados para la alimentación de pollos de carne	8
Cuadro 2: Composición porcentual en ingredientes y nutricionales de las dietas experimentales (1-21 días)	27
Cuadro 3: Análisis químico del contenido de calcio y fósforo total de las dietas experimentales (1- 21 días) (base tal como ofrecido)	28
Cuadro 4: Comportamiento productivo de pollos de carne (1-21 días de edad)	35
Cuadro 5: Efecto de la suplementación de la fitasa, 25-OHD ₃ y ambos en dietas para pollos de carne (1-21 días) sobre el largo, peso de las tibias, diámetro de la diáfisis y volumen de la tibia	38
Cuadro 6: Efecto de la suplementación de la fitasa, 25-OHD ₃ y ambos en dietas para pollos de carne (1-21 días) sobre los indicadores de la mineralización ósea de la tibia	42
Cuadro 7: Efecto de la suplementación de la fitasa, 25-OHD ₃ y ambos en dietas para pollos de carne (1-21 días) sobre el número de pollos con problemas locomotores	46

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pag.
Anexo I: Ficha técnica de la enzima fitasa comercial	63
Anexo II: Ficha técnica de la vitamina 25-OHD ₃ comercial	64
Anexo III: Requerimientos nutricionales para pollos de carne Cobb 500 (2012)	65
Anexo IV: Registro sobre los pesos vivos (g/pollo) y ganancias de peso (g/pollo) por tratamiento con sus respectivas repeticiones	66
Anexo V: Registro sobre los consumos de alimentos para cada tratamiento con sus respectivas repeticiones	67
Anexo VI: Registro sobre las conversiones alimenticias para cada tratamiento con sus respectivas repeticiones	68
Anexo VII: Registro sobre mortalidad (N° de pollos) para cada tratamiento con sus respectivas repeticiones	69
Anexo VIII: Registro sobre el largo (cm) y peso (g) de la tibia derecha para cada tratamiento	70
Anexo IX: Registro sobre el volumen (ml) y densidad (g/ml) de la tibia derecha para cada tratamiento	71
Anexo X: Registro sobre el diámetro de la diáfisis (cm) de la tibia derecha para cada tratamiento	72
Anexo XI: Registro sobre la cantidad de ceniza (%), calcio (%) y fósforo (%) de la tibia izquierda para cada tratamiento	73
Anexo XII: Registro sobre el índice de Seedor (mg/mm) de la tibia derecha para cada tratamiento	74
Anexo XIII: Registro sobre el índice de Quetelet (mg/mm ²) de la tibia derecha para cada tratamiento	75
Anexo XIV: Registro sobre el índice de Robusticidad (cm/g ^{1/3}) de la tibia derecha para cada tratamiento	76

RESPUESTA PRODUCTIVA, MINERALIZACIÓN E INTEGRIDAD DE TIBIAS DE POLLOS DE CARNE CON DIETAS SUPLEMENTADAS CON FITASA Y 25-HIDROXICOLECALCIFEROL

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la suplementación de la enzima fitasa, vitamina 25-hidroxicolecalciferol (25-OHD₃) ó ambos en dietas para pollos de carne a través de su comportamiento productivo y características de la tibia. Para ello, se utilizaron 200 pollos machos de la Línea Cobb 500 de un día de edad, distribuidos al azar en cuatro grupos de 50 aves cada uno y cada grupo fue alimentado *Ad Libitum* durante 21 días, y los tratamientos fueron: T1, control positivo; T2, iso-nutritivo como el T1, considerando la matriz de la fitasa (0.178% Ca y 0.15% Pd); T3, iso-nutritivo como el T1, considerando la matriz de la 25-OHD₃ (0.1% Ca y 0.05% Pd) y T4, iso-nutritivo como el T1, considerando ambas matrices de la fitasa y 25-OHD₃. Los resultados mostraron que el comportamiento productivo de los pollos de carne alimentados con dietas de los tratamientos T2, T3 y T4 fueron similares ($P>0.05$) al del grupo control positivo (T1). Mientras que los pollos alimentados con la dieta T3 resultaron con valores menores sobre el largo, peso y densidad de la tibia ($P<0.05$) a comparación a los demás tratamientos. Los porcentajes de cenizas y calcio de la tibia de los pollos correspondientes a los T2 ó T4 fueron menores ($P<0.05$) a los pollos alimentados con las dietas de los T1 ó T3. El porcentaje de fósforo de la tibia de los pollos correspondientes a los T2, T3 y T4 fueron similar ($P>0.05$) al del grupo control positivo (T1). En conclusión, los pollos de carne alimentados con dietas reformuladas, pero suplementados con fitasa, 25-OHD₃ ó ambos presentaron similares respuestas productivas. También hubo diferencias, por los tratamientos dietarios, sobre las características de la tibia como, largo, peso, densidad, y porcentajes de cenizas y calcio de la tibia.

Palabras claves: 25-hidroxicolecalciferol, fitasa, pollos de carne, comportamiento productivo, porcentajes de ceniza y calcio de la tibia

**PERFORMANCE, TIBIAS MINERALIZATION AND INTEGRITY OF
BROILERS FED DIETS FORMULATED TO CONTAIN PHYTASE AND 25-
HYDROXYCHOLECALCIFEROL**

ABSTRACT

The objective of the experiment was to evaluate the effects of the inclusion, alone or in combination, of phytase and 25-hydroxycholecalciferol vitamin (25-OHD₃) on the performance and tibia characteristics of male broilers from 1 to 21 d of age. A completely randomized design with four treatments was applied and the treatments were: T1, Positive Control; T2, Isonutritive to T1 considering phytase matrix (0.178% Ca and 0.15% AP); T3, Isonutritive to T1 considering 25-OHD₃ matrix (0.1% Ca and 0.05% AP) and T4, Isonutritive to T1 considering both phytase and 25-OHD₃ matrixes. Each treatment included five replicate pens with 10 broilers per pen (200 total chicks). All broilers were fed with a mash corn-soybean meal diets formulated according to Cobb-500 recommendations. Broilers were weighed and feed intake determined on days 7, 14, and 21. On day 21, lengths and weights of tibias from twelve broilers per treatment were measured. Left tibias were tested for ash, calcium and phosphorus contents. Broilers fed with T2, T3 and T4 had body weights, feed intakes and feed conversion rates similar ($p>0.05$) to those of broilers fed the control diet (T1). Broilers fed T3 exhibited low density, shorter and lighter ($p<0.05$) tibias than those fed the other treatments. Ash contents and calcium concentrations in tibias from broilers fed T2 or T4 were lower ($p<0.05$) than those fed T1 or T3. Phosphorus concentration in tibia from broilers fed T2, T3 and T4 were similar ($p>0.05$) to those fed T1. In conclusion, dietary treatments had similar effects on broiler performance, but did result in differences in tibia characteristics as indicated by length, ash content and calcium concentration.

Key Words: 25-hydroxycholecalciferol, phytase, broilers, performance, tibia, ash

I. INTRODUCCIÓN

En la industria avícola, los avances en la selección genética han venido mejorando significativamente la tasa de crecimiento en los pollos de carne, pero se siguen presentando limitaciones con respecto al aprovechamiento de ciertos nutrientes existentes en los ingredientes de origen vegetal, como es el caso del fósforo, ya que el 50-80% de este elemento se encuentran ligado a las moléculas de ácido fítico. El ácido fítico es considerado como un agente anti-nutricional puesto que las aves no disponen de la enzima correspondiente para hidrolizarla y liberar los elementos ligados a ella con el consecuente aprovechamiento de dichos elementos por parte del ave; además, el ácido fítico puede formar complejos (quelatos) con otros minerales, principalmente con el calcio debido al alto contenido de este mineral en las dietas en relación a los otros minerales.

La vitamina D cumple un rol importante en el metabolismo de calcio y fosforo, particularmente en el desarrollo y mantenimiento del esqueleto así como también sobre la calidad de la cascara de huevo. Datos en la literatura reportan que el metabolito de la vitamina D, 25-Hydroxy vitamina D₃ (25-OHD₃), es tan eficiente como la vitamina D₃ misma y que su uso es considerado con frecuencia en los programas de alimentación de los pollos de carne y de otras especies de aves comerciales.

En la actualidad el uso de diferentes fuentes de fitasas comerciales es común con el propósito de aprovechar los nutrientes ligados en el ácido fítico; asimismo, el uso de 25-OHD₃ es considerado por su influencia en el metabolismo del calcio. Sin embargo, sus formas de participación en la dietas pueden ser variables (como un ingrediente sin matrices, como ingrediente con matrices u “on top”). En algunos casos solo puede ser considerado la fitasa o la 25-OHD₃ y en otros casos ambos productos. Este hecho, de una u otra manera, no facilita una interpretación adecuada de los resultados de las investigaciones donde se usaron estos productos en la alimentación de pollos de carne,

siendo necesario establecer con claridad la forma en que se usan estos productos en la formulación de las dietas.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio es determinar el efecto de la inclusión de una fitasa y/o 25-OHD₃ comerciales, considerando sus respectivas matrices nutricionales, sobre la respuesta productiva y mineralización e integridad de las tibias de pollos de carne de 1 a 21 días de edad.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 DESARROLLO DEL TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo es un material compuesto de 50 a 70 % mineral, 20 a 40% de matriz orgánica, 5 a 10% de agua y menos de 3% de lípido. El contenido mineral del hueso es en esencia como fosfato de calcio en la forma de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$), y con pequeñas cantidades de carbonato, magnesio y ácido de fosfato. La matriz orgánica está en relación estrecha con el contenido mineral y compuesta de 90-95% por colágeno de tipo I (Rath et al., 2000; König y Liebich, 2005; Clarke, 2008; Welsch, 2008). Las características y las propiedades específicas de un hueso se deben a su composición, dado que las sustancias inorgánicas le imparten al hueso dureza, resistencia a la compresión y a la tracción, y en cambio las sustancias orgánicas le imparten al hueso elasticidad (König y Liebich, 2005; Welsch, 2008; Adebisi et al., 2009). Por lo que, se considera al tejido óseo como un tejido conjuntivo especializado en la función esquelética y de sostén (Welsch, 2008).

Como órgano, el hueso está formado por hueso cortical (hueso compacto) y por hueso esponjoso (hueso trabecular). Ambos tipos de tejidos óseos están compuestos por las mismas células y los mismos elementos de la matriz, pero tienen diferencias estructurales y funcionales. La principal diferencia estructural es cuantitativa: del 80 al 90% del volumen del hueso cortical está calcificado, mientras que sólo del 15% al 25% del volumen del hueso esponjoso está calcificado (el resto ocupado por médula ósea, vasos sanguíneos y tejido conectivo). En la sustancia esponjosa (u hueso trabecular) existe un depósito móvil de calcio y fósforo, que será liberado hacia la sangre cuando el cuerpo los necesite para mantener la homeostasis en el organismo (König y Liebich, 2005; Vitti y Kebreab, 2010).

Durante el crecimiento de los huesos se produce cambios notorios en su forma, aunque hay

que recordar que incluso en los adultos el hueso se remodela continuamente principalmente bajo el control directo de las hormonas que estabilizan los niveles de calcio en la sangre, pero también como respuesta a largo plazo ante los cambios en los patrones de fuerza que soporta el hueso. Tanto en el crecimiento, como la remodelación, dependen de la actividad equilibrada de dos tipos de células, una de las cuales elimina el tejido óseo (osteoclastos) mientras que la otra deposita tejido óseo nuevo (osteoblastos) (Palastanga et al., 2007; Welsch, 2008). El proceso de osteogénesis (u osificación) es producido por dos mecanismos diferentes: 1) osificación intra-membranosa y 2) osificación endocondral. La osificación intra-membranosa se da en los huesos planos del cráneo, este mecanismo de osificación es directa en el cual el tejido óseo surge inmediatamente a partir de las células mesenquimáticas. En cambio, en la osificación endocondral que se da en la mayor parte de los huesos del cuerpo, el elemento esquelético futuro primero se establece en forma de cartílago y luego, esta pieza de cartílago se degrada y es reemplazada por los tejidos óseos (Eynard et al., 2008; Ross y Pawlina, 2008; Welsch, 2008).

En la osificación, el hueso que crece en torno a la circunferencia de la diáfisis sirve para aumentar el diámetro; al mismo tiempo, las capas más profundas van desapareciendo, y como resultado se mantiene un espesor razonable de hueso cortical y se alarga la cavidad de la medula ósea (Palastanga et al., 2007). En la osificación que se produce entre la epífisis y la diáfisis, resta un área diferenciada para el crecimiento en longitud del hueso, la metáfisis. La metáfisis, que también se denomina cartílago de conjunción o lamina de crecimiento, en esta región hay un proceso continuo de proliferación del cartílago, y simultáneamente hay osificación del lado diafisario que aseguran el crecimiento en longitud del hueso; en donde, a medida que pasa el tiempo, la matriz del cartílago de la zona más antigua se impregna de sales cálcicas y se calcifica. Cuando el cartílago desaparece y es reemplazado por hueso mineralizado, la epífisis y diáfisis se fusionan, y finalmente el crecimiento del hueso cesa (Palastanga et al., 2007; Eynard et al., 2008; Cheeke y Dierenfeld, 2010).

En pollos, se ha demostrado que el tiempo para lograr la madurez del tejido óseo es mayor que el proceso de crecimiento. En un estudio realizado con pollos en crecimiento, desde el 1er día hasta los 43 días de edad, observaron incrementos en la resistencia del hueso y en el contenido de cenizas de la tibia, llegando a sus máximos valores entre la 3ra y 5ta semana

de edad, posteriormente hubo disminución en la resistencia del hueso, mas no se observó cambios en el contenido de cenizas del hueso (Rath et al., 2000). Según Ward (2004), el contenido de cenizas de la tibia y del fémur en los pollos, está prácticamente completo hacia los 21 días de edad. La longitud y la anchura de estos dos huesos a los 21 días de edad representan el 60 % de sus valores respectivos a los 42 días de edad. Es por ello que durante las primeras semanas de vida del ave existe intensa presión para que se proporcione cantidades suficientes de nutrientes como calcio, fósforo y vitamina D₃, a fin de asegurar un desarrollo esquelético óptimo.

2.2 FITASA

La fitasa (mio-inositol hexafosfato fosfohidrolasa) es una enzima que puede hidrolizar el ácido fítico, para obtener derivados de mio-inositol menos fosforilados y fosfatos inorgánicos (Khalid et al., 2013). Las fitasas están presentes en las plantas, en las secreciones digestivas (origen animal) y pueden ser producidas por microorganismos (fitasas exógenas) (Selle y Ravindran, 2006; Khalid et al., 2013). Las fitasas en las plantas son termolábiles, tienen actividad a niveles de pH 5.0 (aproximadamente) y son muy sensibles a los cambios de pH. Por esta razón, las fitasas de origen vegetal son poco eficientes para aumentar la disponibilidad del fósforo-fítico y ser consideradas en las formulaciones de las dietas (Méndez, 1998; Khalid et al., 2013).

En la mucosa intestinal de las aves se han demostrado la presencia de fitasas endógenas, pero la actividad de estas enzimas son casi nulas. Estudios realizados con vesículas del borde de la mucosa han demostrado que el pH óptimo para la actividad de la fitasa de la mucosa intestinal es de alrededor de 6 (Adeola et al., 2005). Las fitasas que son producidas por los microorganismos (fitasas exógenas), son producidas comercialmente y pueden ser adicionadas en las dietas para aves y cerdos (Chung et al., 2013).

La Unión Internacional de Química Aplicada y la Unión Internacional de Bioquímica (IUPAC-IUB) ha clasificado a las fitasas en dos tipos, la 3-fitasa ó por la Enzyme Commission (EC) como EC 3.1.3.8 (de origen microbiano) y la 6-fitasa ó EC 3.1.3.26 (de origen vegetal). La 3-fitasa es simplemente una enzima que inicia la desfosforilación del

ácido fítico en la posición 3' del anillo de inositol. En forma similar, la 6-fitasa inicia la desfosforilación en la posición 6' (Khalid et al., 2013). Según Wodzinski y Ullah (1996), la 3-fitasa no hidroliza completamente el ácido fítico, pues no puede degradar el inositol monofosfato, lo que significa que libera cinco de los seis fosfatos del ácido fítico; mientras que la 6-fitasa si es capaz de hidrolizar completamente el ácido fítico.

Entre los productos comercialmente disponibles se tiene a la 6-fitasa que se puede originar a partir de la *Escherichia coli* y *Peniophora lycii*, etc., y la 3-fitasa que se puede generar a partir del *Aspergillus niger* (Adeola et al., 2004; Selle y Ravindran, 2006; Khalid et al., 2013). Según Adeola et al. (2004), la fitasa que se origina del *E. coli* manifiesta actividad en un intervalo de pH óptimo de 2.5 a 3.5; en cambio la 3-fitasa fúngica (*A. niger*) tiene un rango de actividad amplio, con pH entre 2.5- 5.5. No se han demostrado sinergias en la utilización de las fitasas de origen fúngico y las de origen bacteriana sobre el nivel de fósforo plasmático (Pattacini et al., 2012). La interpretación de eficiencia de una enzima comercial, puede ser influenciado por el nivel de pH óptimo debido a que las fitasas, de origen fúngico o bacteriano, necesitan un medio ácido para alcanzar su máxima eficiencia y así poder liberar el fósforo proveniente del ácido fítico (Ioli, 2013).

En pollos de carne, debido a que el nivel de pH en el intestino delgado es entre 5.5-6.6, puede haber un impacto negativo sobre la disponibilidad del fósforo-fítico y sobre la disponibilidad de los minerales quelados con el ácido fítico. La mayor parte de la fitasa es activa en los segmentos proximales del tracto gastrointestinal (buche, proventrículo y molleja) del ave, en donde los niveles de pH son bajos e incrementa la degradación del ácido fítico (Campbell y Bedford, 1992). Además, se ha demostrado que la adición de calcio en las dietas aumenta el pH en el buche, lugar principal de degradación del ácido fítico por las fitasas exógenas, reduciendo la eficiencia de la fitasa para liberar el fósforo fítico (Tamim et al., 2004; Selle et al., 2009).

Para la medición de la actividad de la fitasa no existe una unidad internacional, debido a esto siempre hay confusión en las comparaciones de eficiencia de las diferentes fuentes de fitasa. Para definir la unidad de medición de la actividad de la fitasa, va depender de las condiciones del ensayo, concentración del sustrato utilizado (fitato de sodio), temperatura del ensayo y nivel de pH. Sobre la fitasa proveniente del *A. niger*, la actividad de esta fitasa

se define como unidad de fitasa (FTU), donde el valor de un FTU es la cantidad de fitasa que libera 1 μmol de ortofosfato inorgánico/minuto a partir de 0.0051 mol/L de fitato de sodio bajo condiciones de pH 5.5 y a 37° C de temperatura. Otras abreviaturas, como la FYT, U y PU se han venido utilizando para referirse sobre la actividad de diferentes fitasas comerciales, aunque al parecer estas actividades han sido determinadas bajo similares condiciones *in vitro* (Selle y Ravindran, 2006; Khalid et al., 2013).

2.3 CONTENIDO DE FÓSFORO EN LAS FUENTES VEGETALES

Las fuentes vegetales que son utilizados en la alimentación animal, presentan un amplio rango de variación en contenido de fósforo. En general, los forrajes de gramíneas tienen un contenido superior a los de las leguminosas, y las semillas (granos de cereales, leguminosos y oleaginosos) mayor que los forrajes. Los subproductos del procesado de granos (salvados de trigo, salvado de arroz o harinas de oleaginosas) son especialmente ricos en fósforo, mientras que los tubérculos, raíces, hojas y bulbos son los más pobres (Cuadro 1) (Khalid et al., 2013).

En los vegetales, la mayor parte del fósforo se encuentra principalmente en forma de ácido fítico, que representa aproximadamente entre 50 a 80% del fósforo total, el fósforo restante se encuentra formando parte de los compuestos tales como fosfolípidos, fosfoproteínas, ácidos nucleicos y una pequeña proporción (8-12%) como fosfatos inorgánicos (Godoy y Chicco, 2005). Sin embargo, el fósforo como parte del ácido fítico no es disponible para los animales monogástricos, debido a que éstos no están previstos de suficiente actividad de fosfatasas endógenas (fitasas), enzimas que son capaces de liberar el grupo fosfato de la estructura del ácido fítico (Adeola et al., 2005).

Cuadro 1: Promedio (y rango) del fósforo total y fósforo fítico, y proporción del fósforo fítico en ingredientes utilizados para la alimentación de pollos de carne

Ingredientes	Número de conjuntos de datos / muestras	Fósforo total (g/Kg)	Fósforo fítico (g/Kg)	Proporción de fósforo fítico (%)
Cereales				
Cebada	4/41	3.21±0.48	1.96±0.17	61.0 (59-68)
Maíz	7/45	2.62± 0.30	1.88±0.25	71.6 (66-85)
Sorgo	5/41	3.01±0.5	2.18± 0.40	72.6 (65-83)
Trigo	6/97	3.07±0.17	2.19±0.55	71.6 (55-79)
Harina de semillas oleaginosas				
Harina de canola	4/28	9.72±1.5	6.45±1.89	66.4 (36-76)
Harina de semilla de algodón	3/21	10.02±2.1	7.72±2.1	77.1 (70-80)
Harina de soya	6/89	6.49±0.62	3.88±0.5	59.9 (53-68)
Sub- productos				
Salvado de arroz	6/37	17.82±6.7	14.17±8.15	79.5 (42-90)
Salvado de trigo	6/25	10.96±3.02	8.36±1.3	76.3 (50-87)

Fuente: Khalid et al. (2013)

2.3.1 ÁCIDO FÍTICO

En la literatura se usan tres nombres para los sustratos de la enzima fitasa: fitato (ácido fítico); ó fitina. El ácido fítico, también denominado mio-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6-hexaquis fosfato deshidrogenado (IP6), es un fosfato orgánico de estructura alcohólica cíclica formado por la esterificación del alcohol inositol cíclico con un máximo de seis grupos de ácido fosfórico, en donde el contenido de fósforo alcanza el 28%, lo que representa un suministro apreciable de fósforo para el animal (Adeola et al., 2005; Pérez, 2013). El fitato, es el término más usado, refiriéndose como a la sal mixta del ácido fítico, presenta la forma mono- a dodeca-aniónica. El término fitina se ha empleado para designar como mezcla de

sales de calcio, potasio y magnesio del ácido fítico, esta mezcla de sales se encuentra en las semillas. El ácido fítico puede formar complejos con minerales y/o proteínas, muchos de estos complejos son insolubles y biológicamente no disponibles en condiciones fisiológicas normales para los monogástricos, debido a que son más difícilmente atacados por las enzimas digestivas (Adeola et al., 2005; Khalid et al., 2013).

La afinidad del ácido fítico hacia los minerales en forma de cationes depende del nivel de pH que se encuentre, y está relacionado con su constante de disociación (pKa) (Santos, 2012). El ácido fítico tiene una estructura simétrica hexa-ortofosfato y es un ácido moderadamente fuerte con doce protones ionizables; seis de los doce protones (uno de cada fosfato) tienen valores pKa de 1.1-2.1 (fuertemente ácidos), otros tres son débilmente ácidos con valores pKa de 5.7-7.6 y para los tres valores restantes pKa de 10.0- 12.0. Esto significa que la carga iónica neta del ácido fítico varía de acuerdo al nivel de pH, teniendo una cantidad aproximada de -3 a pH 1.5 y -8 a pH 7.6. Por tanto, a pH neutro el ion fítico puede quelar fuertemente varios minerales entre dos grupos fosfato o débilmente dentro de un grupo fosfato, la solubilidad del complejo mineral-fítico disminuye drásticamente a niveles próximos de pH neutro (entre 4 a 7). Por lo contrario, a niveles bajos de pH (< 3.5) la solubilidad del complejo mineral-fítico aumenta (Adeola et al., 2005; Selle et al., 2009).

Debido a que el ácido fítico tiene carga negativa, ya sea en condiciones de pH ácido, neutro o básico, se puede unir a moléculas cargadas positivamente (cationes) que se encuentran en las dietas y en el tracto-gastrointestinal, por lo que puede provocar la reducción en la digestibilidad de nutrientes e incrementar la secreción endógena de nutrientes (Woyengo y Nyachoti, 2013).

En esencia, a lo largo del rango de pH que se encuentra en el tracto digestivo o el nivel de pH del alimento, el ácido fítico puede unirse o quelar varios iones polivalentes (incluyendo calcio, zinc, hierro, magnesio, manganeso, cobalto y cobre, resultando en complejos mineral-fítico) (Tamim et al., 2004; Adeola et al., 2005). Según Tamim et al. (2004), la fuerza en que los diferentes tipos de minerales cargados positivamente inhiben o afectan la actividad de la fitasa a niveles de pH neutro, sigue el siguiente orden: $Zn^{2+} \gg Fe^{2+} > Mn^{2+} > Fe^{+3} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$. Sin embargo, debido al alto contenido de calcio en las formulaciones de las dietas, con respecto a otros minerales, hay mayor tendencia en el tracto digestivo de

las aves a la formación del complejo calcio-fítico (Selle et al., 2009).

2.4 VITAMINA D

El término vitamina D, incluye a las dos principales fuentes naturales de la vitamina que son el colecalfiferol (vitamina D₃) y ergocalciferol (vitamina D₂). El primero es de origen animal y se obtiene a partir del 7-dehidrocolesterol y el segundo es de origen vegetal y su precursor es el ergosterol. Ambas formas de vitaminas, D₂ y D₃, no son equivalentes y su valor antirraquítico es relativo dependiendo de la especie. Así, ambos tienen la misma actividad antirraquítica para los mamíferos de granja, pero la vitamina D₂ es menos satisfactoria para las aves, razón por la cual no debe ser usada en dietas para avicultura (McDowell, 2000; Bowman y Russell, 2003).

La función general de la vitamina D es elevar los niveles de calcio y fósforo en el plasma para una normal mineralización del hueso así como otras funciones del cuerpo (McDowell, 2000). Los efectos genómicos de la vitamina D es mediada a través de la interacción con los receptores celulares nucleares o citoplasmáticos y el complejo formado regula la transcripción genética con la síntesis de proteínas típicas, jugando un rol en la regulación de la diferenciación celular (respuestas genómicas) y en muchos tejidos como en el sistema inmunológico, hueso y piel. Los efectos genómicos pueden durar horas y envuelve genes para la síntesis de osteocalcina, osteoclastos y así como la síntesis de proteínas de la matriz extracelular. En cambio, los efectos no genómicos de la vitamina D se vincula con procesos asociados a la membrana celular, duran sólo minutos y envuelven canales de calcio iónico y receptores de membrana (Oviedo, 2009).

2.4.1 SÍNTESIS Y METABOLISMO DE LA VITAMINA D

Se ha demostrado la presencia de la 7-dehidrocolesterol en la epidermis de la piel y secreciones sebáceas que en condiciones de exposición a la irradiación ultravioleta, ya sea proveniente del sol o de una fuente artificial, se convierte en vitamina D (Cunningham y Klein, 2009). La máxima formación de vitamina D se da cuando la longitud de onda se

encuentra entre 290 y 315 nm, de modo que el intervalo para la formación de la vitamina es muy pequeño y la irradiación que reciben los animales enclaustrados, si es que lo reciben, resulta insuficiente (McDonald et al., 1999). La vitamina D presente en los alimentos se absorbe en el intestino delgado junto con el resto de los lípidos mediante la formación de micelas (Shimada, 2009), la cual es dependiente de la presencia de sales biliares. La eficiencia del proceso de absorción de la vitamina D es relativamente baja; aproximadamente el 50% del colecalciferol de la dieta se absorbe en el intestino delgado, luego es transportada por la sangre hasta el hígado (McDonald et al., 1999; Combs, Jr., 2008).

La vitamina D es una molécula inactiva y para activarse requiere de doble hidroxilación sucesiva en el hígado y el riñón (Cunningham y Klein, 2009). La mayor parte de la vitamina D que ha sido transportada hacia el hígado es hidroxilada por la enzima 25-hidroxilasa a nivel del carbono-25 para obtener la 25-OHD₃ y este metabolito de la vitamina D es el más abundante en la sangre (Combs, Jr., 2008). En pollos, la enzima 25-hidroxilasa está presente en los tejidos hepáticos y extra hepáticos incluyendo el intestino y el riñón, pero en los mamíferos el hígado es el lugar principal (McDowell, 2000). Luego, la 25-OHD₃ es transportada hacia el riñón donde es hidroxilada a nivel del carbono-1 para producir la sustancia biológicamente activa, la 1,25-(OH)₂D₃, esta hidroxilación es catalizada por la enzima 1-hidroxilasa (Combs, Jr., 2008).

El punto de control más importante en la síntesis de la 1,25-(OH)₂D₃ es mediante el efecto de la paratohormona (PTH) sobre la 1-hidroxilasa renal (Combs, Jr., 2008). Otros puntos de controles se realizan mediante los bajos niveles de fósforo en la sangre, que reducen la inhibición en la hidroxilación del carbono-1 del 25-OHD₃, lo que conduce a una mayor producción de 1,25-(OH)₂D₃. Así, en común con otros sistemas hormonales, la molécula 1,25-(OH)₂D₃ se controla a sí misma disminuyendo la actividad de la enzima 1-hidroxilasa y promoviendo la hidroxilación del C-24 en el riñón lo cual da lugar a la formación de 24,25-(OH)₂D₃, que es una molécula inactiva (Cunningham y Klein, 2009).

2.4.2 RELACIÓN DE LA 1,25-(OH)₂D₃ CON LA HOMEOSTASIS DEL CALCIO Y FÓSFORO

Dos hormonas, la calcitonina y la paratohormona (PTH), funcionan estrechamente con la 1,25-(OH)₂D₃ para controlar los niveles de calcio y fósforo en la sangre. Al contrario de las otras dos hormonas, la calcitonina es hipocalcemiante y se secreta en respuesta a altos niveles de calcio plasmático, funcionando como inhibidor en la resorción del hueso y por tanto disminuyendo la concentración de calcio en el plasma. El mayor efecto de la 1,25-(OH)₂D₃ es aumentar las concentraciones plasmáticas de calcio y fosfato mediante la estimulación de mecanismos de transporte en el intestino, hueso y riñón (McDowell, 2000; Shimada, 2009).

a. Efecto sobre el intestino

La paratohormona regula indirectamente la absorción intestinal del calcio mediante la estimulación en la producción de 1,25-(OH)₂D₃ bajo condiciones de hipocalcemia. En el intestino, la 1,25-(OH)₂D₃ estimula la absorción de calcio y de fosfato mediante el incremento en la producción de proteínas transportadoras de calcio y fósforo en las células epiteliales; la absorción del fosfato en el intestino es independiente al del calcio (McDowell, 2000; Cunningham y Klein, 2009).

b. Efecto sobre el hueso

Actuando sobre las células óseas, la 1,25-(OH)₂D₃ es uno de los factores que controlan el balance entre la mineralización y desmineralización (McDowell, 2000). La 1,25-(OH)₂D₃ aumenta la actividad osteoblástica (mediante los receptores de los osteoblastos), regula la síntesis de una variedad de proteínas como el colágeno y la fosfatasa alcalina para la actividad de resorción ósea, y estimula la diferenciación de los precursores osteoclasticos (Church et al., 2007; Gal et al., 2007); esta última función es sinérgica con la PTH. El efecto hipercalcemiante de la vitamina D es tal que un exceso de la misma puede causar raquitismo u osteomalacia por remoción excesiva del calcio óseo (Shimada, 2009).

c. Efecto sobre el riñón

En el riñón, el 99% del calcio filtrado es reabsorbido en ausencia de la 1,25-(OH)₂D₃ y la paratohormona, y el restante 1% está bajo el control de estos dos agentes hormonales (McDowell, 2000). La 1,25-(OH)₂D₃ estimula la reabsorción tanto del calcio como del fósforo en los túbulos renales distales; simultáneamente la paratohormona induce fosfaturia al reducir la reabsorción de fósforo en los túbulos renales para mantener una relación adecuada de calcio y fósforo en la sangre (Adeola et al., 2005). Se ha demostrado que la deficiencia de vitamina D disminuye la concentración de receptores y la actividad de la paratohormona en los riñones (Proszkowiec y Angel, 2013).

2.5 REQUERIMIENTO DE CALCIO Y FÓSFORO EN POLLOS DE CARNE

Un adecuado aporte nutricional de calcio y fósforo no depende solo de la cantidad presente en la dieta o cantidad en los suplementos, sino también de las formas químicas de los suplementos y de la vitamina D₃ que son aportadas en las dietas para pollos de carne ó otros animales. Los niveles de calcio y fósforo que son necesarios para obtener una máxima tasa de crecimiento en los animales, no son necesariamente adecuados para obtener una adecuada mineralización ósea (McDowell, 2003).

El requerimiento de fósforo en los pollos, es inferior al del calcio (Adeola et al., 2005) y se asume que la relación de 2:1 de calcio: fósforo disponible es ideal para el crecimiento y la formación de los huesos, ya que estas relaciones es aproximadamente similar a la proporción de los dos minerales presentes en los huesos (McDowell, 2003). Relaciones altas de calcio: fósforo total ó exceso de calcio con relación al fósforo en la dieta reduce e interfiere con la disponibilidad de otros minerales, incluido fósforo, magnesio, manganeso y zinc, y resulta en menores crecimientos en los animales y peores índices de mineralización ósea (NRC, 1994; Rebollar y Mateos, 1999). De la misma manera, un exceso de fósforo en la dieta puede interferir en la absorción y el metabolismo del calcio, también puede disminuir la disponibilidad de otros minerales y provocar anomalías en los huesos por un exceso de reabsorción ósea profunda dentro del hueso resultando en osteodistrofia; esta condición se caracteriza desde el punto de vista histológico reemplazo

del tejido óseo por tejido conectivo fibroso (Church et al., 2007; Shimada, 2009).

En los pollos de carne, el peso corporal puede duplicarse en cuestión de días; por tanto, la intensidad del metabolismo de los minerales del esqueleto es muy alta y una deficiencia de calcio podría producir alteraciones en los huesos después de pocos días (Church et al., 2007). En pollos en crecimiento la deficiencia en calcio produce una menor mineralización de la matriz que genera una zona de crecimiento débil y ensanchado (Underwood y Suttle, 2003). En pollos adultos cuando el consumo de calcio es deficiente se produce osteomalacia debido a que los animales agotan sus reservas del calcio en el hueso (McDowell, 2003). En dietas con bajo niveles de calcio (0.75% Ca) se reducen la densidad ósea, peso y grosor de la capa esponjosa de la tibia en pollos Cobb, pero no en pollos Avian Farms, demostrándose que algunas líneas genéticas de aves son más sensibles a la reducción de calcio en la dieta (Soares da Silva et al., 2003).

Driver et al. (2005b) concluyeron que el actual nivel de calcio (1.09%) recomendado por la NRC (1994) para pollos de inicio de la línea Cobb es adecuada para una máxima mineralización del hueso. Pero para pollo en crecimiento, el requerimiento de calcio a 0.9% es excesivo para obtener un óptimo crecimiento, eficiencia alimenticia y cenizas del hueso. Según McDowell (2003), cuando el nivel de fósforo en la dieta para pollos de carne es adecuado, dependiendo de la edad y estado de producción, el máximo nivel de tolerancia de calcio es 1.2%, para la mayoría de los pollos.

La principal característica por la deficiencia de fósforo en la alimentación de todas las especies animales es la pérdida de apetito. Otras repuestas causadas por los bajos niveles de fósforo en las aves son baja ganancia de peso, deformidad y fragilidad de los huesos (Suttle, 2010). En un estudio realizado por Leske y Coon (2002), observaron que en pollos de carne (0-6 semanas de edad) alimentados con dietas conteniendo bajos niveles de fósforo disponible (por debajo de 0.45 %) disminuían la ganancia de peso, cantidad de cenizas del hueso, resistencia a la rotura de los huesos, la eficiencia alimenticia e incrementaba la mortalidad. Ñaupay (2001) observó que en pollos de carne (en la etapa de inicio) alimentados con dietas conteniendo 0.35% de fósforo disponible y con una disponibilidad de 100% disminuía la ganancia de peso, consumo de alimento y porcentaje de cenizas en la tibia.

Las recomendaciones del NRC (1994) para pollos de carne en las edades de 1 a 21 días, 22 a 42 días y 43 a 56 días son de 1, 0.9 y 0.8 % de calcio y 0.45, 0.35 y 0.30 % de fósforo no-fítico, respectivamente. Sin embargo, según Bar et al. (2003b) para obtener un óptimo crecimiento y óptima cantidad de ceniza del hueso en pollos de carne se necesita ligeramente mayor cantidad de fósforo en las dietas: 0.48-0.52 % fósforo no fítico.

Los requerimientos de calcio y de fósforo para pollos de carne recomendados por el Manual de Cobb 500 (2012) se presentan en el Anexo III.

2.6 CRITERIOS O MÉTODOS PARA EVALUAR LA DISPONIBILIDAD DE CALCIO Y FÓSFORO

Existen varios criterios para evaluar el estatus alimenticio del calcio y/o fósforo en humanos y animales, los cuales son: ganancia de peso, consumo de alimento, y eficiencia alimenticia; y niveles séricos de calcio, fósforo; y criterios de dimensión, composición y mecánicos a partir de los huesos (McDowell, 2003).

2.6.1 CANTIDAD DE CENIZAS, CALCIO Y FÓSFORO DE LOS HUESOS

La estimación de disponibilidad del fósforo y calcio se realiza evaluando al hueso, debido a que cerca del 80% del fósforo y 99% del calcio es localizado en el esqueleto y su contenido de estos minerales son casi constantes (Shastak, 2012). Existen varios métodos invasivos (cenizas del hueso, resistencia a la compresión, peso y volumen del hueso) y no-invasivos para determinar la mineralización de los huesos en las aves (Adebiyi et al., 2009). Según Rodehutsord (2011), los huesos se analizan en cuanto a su contenido de cenizas, fósforo y calcio, y también son utilizados criterios indirectos tales como resistencia a la rotura, densidad, etc.

Gillis et al. (1954) fueron los primeros en cuantificar la disponibilidad del fosforo en las aves, utilizando como criterio de respuesta al porcentaje de ceniza en la tibia. Observaron

que la relación del porcentaje de ceniza de la tibia y el fósforo ingerido en la dieta, fue lineal cuando se aplicaron los niveles de fósforo por debajo de los requerimientos. La ceniza del hueso es el parámetro más usado para cuantificar la mineralización ósea (García y Dale, 2006). Field et al. (1974) encontraron que el porcentaje de calcio en la ceniza del hueso varía poco entre las especies o entre la ubicación anatómica de los huesos, también es válido para el fósforo debido a su relación como componente de la hidroxiapatita (Ca: P= 2:1). Además la concentración de ceniza en el hueso puede ser disminuido por las dietas con bajos niveles de calcio y fósforo (Field, 1999). La mineralización ósea de la tibia y fémur se ha usado como criterio de respuesta en la evaluación del nivel de fósforo y calcio en la dieta o el requerimiento de estos minerales en los pollos de carne (Coto et al., 2008; Hemme et al., 2005; Angel et al., 2006).

Se ha considerado por muchos años que la tibia, es el hueso con mayor velocidad de crecimiento y por ello es el más sensible ante las deficiencias de calcio y fósforo en las aves (Yan et al., 2005). Sin embargo, se demostró que el fémur y la tibia exhiben diferentes patrones de desarrollo durante el periodo de crecimiento, observándose en los pollos de carne que las mediciones sobre el fémur son más sensibles que la tibia (Angel et al., 2006; Applegate y Lilburn, 2002). La obtención de cenizas a partir de la tibia o fémur es una técnica bastante laboriosa, debido a las desventajas de disección y limpieza de los huesos y el largo periodo para la extracción y limpieza de los huesos. Por tal motivo, se propuso el uso del dedo (ó falange) de la pata del ave, en lugar de la tibia, para obtener las cenizas como criterio de calcificación y así evaluar la vitamina D de la dieta. Además, el uso de los dedos de la pata hace posible que las pruebas sean realizadas sin la necesidad de sacrificar al ave y, así eliminar el laborioso trabajo y tiempo para la extracción y limpieza del hueso (Campbell et al., 1945; Shastak, 2012). Yan et al. (2005), observaron que existe alto grado de relación entre la ceniza de la tibia, ceniza del tarso y ceniza del dedo de la pata de las aves.

2.6.2 RESISTENCIA ÓSEA A LA COMPRESIÓN

La resistencia ósea es la dureza o la capacidad para soportar la compresión (ó tensión); por tanto, está relacionado con la carga o la tensión que al aplicarse sobre el hueso, este se

rompe. La resistencia del hueso a la compresión es un buen indicador del estatus para el fósforo y calcio que está presente en la dieta (McDowell, 2003). En otro estudio se observó que hay un alto coeficiente de correlación (de 0.98) entre la ceniza de la tibia y la resistencia del hueso a la compresión (Shastak, 2012).

Sin embargo, en otros estudios se han reportado poca sensibilidad de la resistencia ósea como criterio para la evaluación del fósforo en dietas para pollos en crecimiento, debido a que los valores de la resistencia ósea pueden ser afectados por el tipo de instrumento usado, procedimiento para evaluar los huesos, así como las propiedades físicas y mecánicas de los huesos (Ravindran et al., 1995; Kornegay y Yi, 1999; Orban et al., 1993). En general, la resistencia ósea está relacionada con sus propiedades física (forma, tamaño, masa), arquitectónico (orientación de la fibra del colágeno) y materiales (moléculas de la matriz) de los huesos (Rath et al., 2000).

2.6.3 DENSIDAD DEL HUESO

La densidad del hueso es uno de los indicadores más importantes para medir la integridad y calidad del hueso (Almeida Paz, 2008). Según Rath et al. (2000), la densidad ósea es la masa del material por volumen de hueso, en donde está incluido la masa orgánica y mineral. Debido a que la matriz inorgánica es la mayor componente de la matriz celular; la densidad mineral del hueso se considera como un reflejo sobre el estado de salud del hueso, por lo que la baja densidad del hueso es considerado con un factor de riesgo ante una fractura. La densidad ósea es considerada como el reflejo del contenido mineral del hueso, sin embargo, estudios recientes han demostrado que la densidad puede estar condicionada por la química de la matriz orgánica de los huesos; debido a las modificaciones de las moléculas de la matriz, como enlaces intermoleculares cruzadas de colágeno, interacciones de los proteoglicanos y otras proteínas no colágenos, y cambios glico-oxidativas en el colágeno y proteoglicanos que pueden alterar la mineralización y las propiedades bioquímicas. En estudios sobre humanos, la pérdida de enlaces cruzados de colágeno en los huesos ha sido relacionada con la osteoporosis (Eyre, 1996).

Para determinar la densidad ósea, existen varias técnicas que son precisas, seguras y de

ensayos rápidos que pueden ser capaces de reemplazar la cenizas de los huesos en la evaluación mineral (Shastak, 2012). Meyer et al. (1968), adaptaron la técnica de Cameron-Sorenson para la medición del contenido mineral del hueso (BMC) en humanos y hasta en aves, que consiste en la medición de la transmisión de un haz de fotones mono-energéticos a través de la tibia derecha con un detector de centelleo para determinar el BMC; la fuente radioactiva fue 125 yodo, y el contenido mineral fue expresado en unidad de masa ósea. La correlación entre la unidad de masa ósea y peso de la ceniza por centímetro de hueso fue 0.955. Akpe et al. (1987) evaluaron la precisión de la densitometría ósea (absorciometría fotónica simple) y la ceniza del hueso como criterio de respuesta en la medición de la biodisponibilidad de fósforo a partir de varios suplementos para pavos, reportándose que el coeficiente de correlación para porcentaje de cenizas del hueso y la densidad ósea fue de 0.986.

Entre otras técnicas, la Absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA) es utilizada para medir el estatus de mineral óseo en pollos de carne (Onyango et al., 2003). Sin embargo, el método DEXA solo permite determinar la densidad mineral ósea (g/cm^2) en un área del hueso. En cambio, una tomografía computarizada cuantitativa (QCT) es una técnica médica que mide la densidad ósea volumétrica (g/cm^3), así valores de la densidad trabecular y cortical (g/cm^3) pueden ser medidos (Shastak, 2012). Según Rath et al. (2000), el principio de Arquímedes es usado convenientemente para medir la densidad de piezas de huesos pequeños, luego de la recolección post-mortem. Muhammad et al. (2013) compararon el uso de dos técnicas para estimar la densidad de la masa ósea; la técnica de detección de bordes del histograma por rayos X y la técnica del principio de Arquímedes. En donde concluyeron que entre los grupos tratados por las dos técnicas tuvieron buena correlación sobre la estimación de la densidad de la masa ósea.

2.6.4 SANGRE

Los niveles de calcio y fósforo séricos son resultados de la regulación homeostática de calcio y fósforo (Zhou et al., 2008). Según Hurwitz (1964), quien al suplementar con dos fuentes diferentes de fósforo mineral en dietas basales con contenido de bajo nivel de fósforo observó una respuesta lineal con el aumento de fósforo suplementario sobre la

cantidad de fósforo en la tibia y así como en el fósforo inorgánico en la sangre. Sin embargo, Rodehutsord (2011) señaló que el nivel de fósforo en el suero/plasma no es adecuado para la determinación de la biodisponibilidad de fósforo en las aves. La concentración de fosfato inorgánico en sangre es muy variable, por lo que el fósforo inorgánico sérico no es un indicador adecuado de los depósitos corporales porque las concentraciones pueden aparecer normales cuando algunos depósitos corporales están vacíos; la hipofosfatemia también puede producirse como resultado de la redistribución histórica del fósforo inorgánico de los depósitos extracelulares a los intracelulares, que ocurre en diferentes situaciones, como en el ejercicio intenso (Bowman y Russell, 2003; Rodehutsord, 2011).

Por otro lado, según Bowman y Rusell (2003) indican que las concentraciones séricas de calcio no reflejan el estado nutricional, ya que la regulación homeostática del calcio sérico para asegurar el aporte constante a los tejidos, es compleja y no se comprende enteramente.

2.6.5 RESPUESTA PRODUCTIVA

Desde los años 1940, la performance del animal junto con la ceniza del hueso son usadas como criterios de respuesta para evaluar el nivel de fósforo de la dieta (Shastak, 2012). Varios autores observaron mejora sobre la conversión alimenticia al incrementar la cantidad de fósforo en la dieta; también reportaron que la tasa de crecimiento y la ceniza del hueso, fue un buen criterio para determinar el nivel adecuado de fósforo en las dietas. Además, se demostró que la tasa de crecimiento es menos sensible que la ceniza del hueso como criterio para evaluar el fósforo y calcio de la dieta (Shastak, 2012). Sin embargo, los principales signos clínicos ante la deficiencia de calcio y fósforo es la reducción en el crecimiento y bajo consumo de alimento de las aves de corral (McDowell, 2003).

2.6.6 RETENCIÓN Y DIGESTIBILIDAD PRE-CECAL

Los bioensayos basados en los criterios de crecimiento, hueso o sangre son capaces de proporcionar valores relativos de la disponibilidad del fósforo ó calcio, siendo estos datos

cualitativos. La determinación del contenido de digestibilidad de calcio y fósforo en los ingredientes, se utilizan habitualmente en la formulación de las dietas como estimaciones razonables de biodisponibilidad de estos minerales; el concepto de biodisponibilidad se relaciona con los nutrientes que realmente son utilizados para fines metabólicos (Ammerman, 1995). El término de digestibilidad se relaciona indistintamente con la absorción, el mineral que es absorbido desde el tracto gastrointestinal; luego se asume que el mineral es disponible para ser almacenado o para ser usado en diversos procesos fisiológicos por el animal (Vitti y Kebreab, 2010).

Se sabe muy poco acerca de la disponibilidad del calcio en los insumos vegetales, tal vez se deba al hecho en que la mayoría de estos alimentos contienen poco calcio. Además, 20-30% del calcio contenidos en los tejidos vegetales no se encuentran disponibles para los animales, debido a que están unidos al oxalato. En consecuencia, para lograr un contenido adecuado de calcio en las dietas se tiene que suplementar con calcio de origen animal e inorgánico (NRC, 2005; Vitti y Kebreab, 2010). Los estudios que miden la retención del fósforo pueden usarse para estimar su disponibilidad; una forma de medir la retención es mediante ensayos de balance, donde se cuantifican el consumo y la excreción del fósforo durante un cierto periodo de tiempo ó por el cálculo del valor de retención con la ayuda de marcadores indigestible (Shastak, 2012).

Otro concepto es la digestibilidad en el final del íleon (digestibilidad pre-cecal), este es un método establecido para medir la calidad de la proteína en aves. Su principal ventaja está en que los valores obtenidos no están influenciados por la actividad microbiana post-ileal y también cualquier contribución de la orina puede ser excluida. Esto puede suponer ventaja en estudios sobre disponibilidad del fósforo, ya que la excreción urinaria es el vía principal de excreción del fósforo cuando el consumo es por encima de las necesidades, pero despreciable cuando se consume por debajo de las necesidades (Rodehutsord, 2011; Shastak, 2012). Además, se observó una respuesta lineal sobre la digestibilidad pre-cecal del fósforo ante los incrementos en la concentración del fósforo en la dieta (Rodehutsord, 2011)

2.7 INVESTIGACIONES SOBRE EL USO DE FITASA Y VITAMINA D₃ EN DIETAS PARA POLLOS DE CARNE

La efectividad de las fitasas en la liberación del fósforo fítico de las dietas a base de insumos vegetales para pollos de carne y cerdos está bien investigada y documentada. Sin embargo, dichos trabajos indicaron variabilidad en las mejoras sobre la disponibilidad del fósforo que van desde 20 a 45 % (Ravindran, 2010). Esto se debe a que la cantidad de fósforo fítico liberado por la fitasa depende de varios factores, siendo entre ellos los más importantes: 1) nivel de fitasa suplementada en la dieta, 2) cantidad de calcio en la dieta, 3) suplementación con otros aditivos, tales como los metabolitos sintéticos de la vitamina D₃ (25-OHD₃, 1,25-(OH)₂D₃ ó 1 α -OHD₃) (Selle y Ravindran, 2006; Liem et al., 2009; Ravindran, 2010).

En un estudio se observó, que al suplementar fitasas a niveles de 125, 250 y 500 FYT/Kg en dietas para pollos de carne se obtuvo incremento en la ganancia de peso en 4.6, 6.4 y 8.5 %, respectivamente. Sin embargo, para que el efecto de la fitasa sea máxima sobre el rendimiento productivo, se debe suplementar en dietas con bajos niveles de fósforo no fítico (Khalid et al., 2013). Shirley y Edwards (2003), evaluaron la suplementación de fitasa en dietas para pollos de carne, basadas en maíz-soya y conteniendo bajos niveles de fósforo (0.46% de P total y 0.188% de P no fítico), en donde la inclusión de fitasa fue en varios niveles crecientes (hasta un máximo de 12,000 FTU/Kg). Ellos observaron que la adición de niveles crecientes de fitasas están asociadas con incrementos sustanciales en la degradación de los ácidos fíticos en el tracto digestivo, que variaron desde el 40.3 hasta el 94.8%. Además, la degradación de los ácidos fíticos estuvo correlacionada con mejoras importantes en el rendimiento productivo de las aves, retención de calcio y contenido de cenizas de la tibia; estos incrementos fueron numéricamente más pronunciados para el nivel más alto de inclusión de fitasa. Sin embargo, Selle y Ravindran (2006) afirmaron que en dietas de pollos de carne con altos niveles de fósforo, las adiciones crecientes de niveles de fitasas en las dietas no necesariamente puede generar mayor rendimiento productivo.

Varias investigaciones realizadas en aves, han demostrado que las fitasas tienen la capacidad de mejorar la digestibilidad del calcio (Selle et al., 2009; Shirley y Edwards, 2003; Khalid et al., 2013). Según Ravindran et al. (2008), observaron que con la

suplementación de fitasa, derivada de *E. Coli*, a niveles de 500 FTU/Kg en dietas de pollos de carne y basadas en maíz-soya (conteniendo 7.8 g/Kg de Ca), hubo incremento en la digestibilidad del calcio a nivel del íleon en un 27%. Sin embargo, Plumstead et al. (2008) demostraron que al incrementar los niveles de calcio, de 0.47% a 1.16%, en dietas de pollos de carne (con 0.35% de P disponible), obtuvieron una disminución lineal en la digestibilidad del fósforo-fítico a nivel del íleon en un 71%. Tamim y Angel (2003) investigaron *in vitro*, el efecto del calcio sobre la hidrólisis del ácido fítico por la fitasa microbial. Observaron que al adicionar calcio, hay disminución en la liberación del fósforo a partir del sodio-fítico por las fitasas (de 350 a 175 µg fósforo/unidad de fitasa) a nivel de pH 6.5. Sin embargo, a nivel de 2.5 pH, fue mayor la magnitud de hidrólisis del ácido fítico, aunque similarmente la adición de calcio disminuyó relativamente la liberación del fósforo (de 1250 a 625 µg fósforo/unidad de fitasa).

Está demostrado que la suplementación de derivados sintéticos de la vitamina D₃, como la 25-hidroxicolecalciferol (25-OHD₃), 1α-hidroxicolecalciferol (1α-OHD₃) y 1,25-dihidroxicolecalciferol (1,25-(OH)₂D₃) en dietas para pollos de carne aumenta la cantidad de cenizas del hueso y las retenciones de calcio, fósforo y fósforo-fítico (Edwards, Jr., 2002; Liem et al., 2009). Existe una correlación positiva entre la 25-OHD₃ y la absorción del calcio; según los investigadores de la Universidad de Wisconsin, quienes encontraron una correlación bivariada significativa entre los niveles sanguíneos de 25-OHD₃ y la absorción del calcio. En otro estudio, en el que se comparó la absorción de la 25-OHD₃ y la vitamina D₃ en pollos de carne, se observó que en la primera, ésta era más eficiente (83%) que en la vitamina D₃ (66%), ocurriendo principalmente en la porción anterior del yeyuno. También demostraron que la excreción diaria de metabolitos de la vitamina D, fue mayor para la vitamina D₃ a comparación de la 25-OHD₃; las diferencias en la absorción y retención neta entre las dos fuentes de vitamina D pueden ayudar también a explicar la mayor biopotencia de la 25-OHD₃ (Bar et al., 2003a; Ward, 2004; Chou et al., 2009).

Se ha comprobado mediante varios estudios, que los efectos de los compuestos hidroxilados de la vitamina D₃ sobre la absorción de calcio y fósforo a nivel intestinal, pueden aumentar cuando son suplementados junto con la enzima fitasa en dietas con bajos niveles de fósforo y calcio (Driver et al., 2005a; Selle y Ravindran, 2006; Yan y Waldroup, 2006; Khalid et al., 2013). Coto et al. (2008) estudiaron en pollos de carne de 1 a 18 días,

el efecto de la suplementación de 25-OHD₃ y la fitasa en dietas basales de maíz-soya, y deficientes en fósforo disponible (0.12 %) y calcio (0.80%). Para ello, elaboraron un diseño factorial de 2x2x4x4, combinando dos niveles de 25-OHD₃ (0 ó 69 µg/Kg), dos niveles de fitasa (0 ó 1200 FTU/Kg), cuatro niveles de calcio (0.60, 0.80, 1.00 y 1.20 %) y cuatro niveles de fósforo disponible (0.35, 0.40, 0.45 y 0.50 %). En base a los resultados, hubo interacción entre la 25-OHD₃ y la fitasa solo sobre la mortalidad; mas no hubo interacción entre estos dos suplementos sobre el peso vivo, conversión alimenticia, cenizas y porcentaje sobre la incidencia de discondroplasia tibial. En las dietas que contenían fitasa, no se observaron efecto sobre el peso vivo, mientras que la adición de la 25-OHD₃ en las dietas tuvo un efecto negativo sobre la conversión alimenticia.

En otra investigación realizado por Hermes et al. (2013), evaluaron en pollos de carne (1 a 48 días) el efecto de la 25-OHD₃ (69 µg/Kg) y fitasa (1000 FTU /Kg) suplementados en dietas negativas con bajos niveles de calcio y fósforo disponible. Además, se usó una dieta control con contenidos normales de calcio y fósforo disponible. En base a los resultados, en las dietas suplementadas con la 25-OHD₃ y fitasa se obtuvo bajo porcentaje de cenizas de la tibia y se obtuvo similar respuesta productiva en comparación de pollos alimentados con dieta control. Sin embargo en las dietas negativas (sin suplementación de la 25-OHD₃ y fitasa) se obtuvo baja respuesta productiva y menor porcentaje de cenizas de la tibia comparando con pollos que recibieron dietas suplementadas con 25-OHD₃ y fitasa. Por lo que concluyeron, que la inclusión de la 25-OHD₃ y fitasa en dietas con bajos niveles de calcio y fósforo, tiene un efecto positivo sobre la respuesta productiva en los pollos de carne.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR Y DURACIÓN

El trabajo experimental se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Investigación en Nutrición y Alimentación de Aves, Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM) Lima-Perú. La duración fue de 21 días, comprendidos entre el 12 de septiembre y el 3 de octubre del 2014.

3.2 INSTALACIONES, EQUIPOS Y MATERIALES

Para el alojamiento de las aves se utilizaron dos criadoras metálicas, las cuales tienen calefacción eléctrica controlada por termostatos. Cada criadora cuenta con cinco pisos, y cada piso estuvo dividido en dos compartimentos, dando un total de diez de ellos por criadora. En cada compartimento había dos comederos y un bebedero lineal. Para el pesaje de los pollos y del alimento se utilizó una balanza digital con capacidad de 15 kg y aproximación de 0.5 g. Para la limpieza de los equipos e instalaciones se disponía de escobas, baldes de agua, desinfectante, etc. Adicionalmente, para los registros de las aves se utilizó libretas de campo, lapiceros y cámara fotográfica.

3.3 ANIMALES EXPERIMENTALES

Se criaron 200 pollos de carne machos de la línea Cobb-500, los cuales fueron distribuidos al azar en cuatro grupos de 50 aves cada uno y éstos a su vez fueron subdivididos en cinco subgrupos (repeticiones) con 10 pollos cada uno. Se mantuvo homogeneidad de condiciones en el manejo de todas las aves experimentales.

3.4 SUPLEMENTOS DIETÉTICOS EVALUADOS

3.4.1 ENZIMA FITASA

La fitasa evaluada en este trabajo de investigación es un producto comercial. La dosis utilizada fue de 100 mg del suplemento comercial/Kg de alimento (1000 FTU/Kg) (la ficha técnica del producto se presenta en el Anexo I).

3.4.2 25-HIDROXICOLECALCIFEROL (25-OHD₃)

La vitamina 25-OHD₃ evaluada en este trabajo de investigación es un producto comercial. La dosis utilizada fue de 200 mg del suplemento comercial/Kg de alimento (69 µg de 25-OHD₃/Kg), (la ficha técnica del producto se presenta en el Anexo II).

3.5 TRATAMIENTOS

Se evaluaron 4 tratamientos, definidos a continuación:

Tratamiento 1 (T1): Dieta control, formulada según especificaciones nutricionales para pollos de carne de la línea Cobb-500.

Tratamiento 2 (T2): Dieta del T1, reformulada y considerando la matriz de la fitasa (0.178% Ca y 0.15% PD).

Tratamiento 3 (T3): Dieta del T1, reformulada y considerando la matriz de la 25-OHD₃ (0.1% Ca y 0.05% PD).

Tratamiento 4 (T4): Dieta del T1, reformulada y considerando ambas matrices de fitasa y 25-OHD₃ (0.278% Ca y 0.20 % PD).

3.6 FORMULACIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES

Las dietas experimentales fueron “formuladas” utilizando un programa lineal de formulación al mínimo costo usando el programa comercial DAPP Nutrition. Las especificaciones nutricionales que se consideraron, son las indicadas en la guía nutricional para pollos de carne de la línea Cobb-500 (2012). Los aportes nutricionales de los productos comerciales evaluados: fitasa y 25-OHD₃, fueron según las indicadas en sus matrices nutricionales correspondientes (Anexos I y II).

Los ingredientes considerados fueron maíz, torta de soya y aceite vegetal. La “forma física” de las dietas fue de harina. La “preparación” de dichas dietas se llevó a cabo en la planta de alimentos balanceados de la Facultad de Zootecnia, UNALM. La composición en ingredientes y nutricional estimado de las dietas se muestra en el Cuadro 2 y los valores del análisis químico de calcio y fósforo total de los tratamientos se presentan en el Cuadro 3.

3.7 MEDICIONES

Durante el periodo de crianza de los pollos de 21 días se registro la respuesta productiva. Al finalizar el periodo experimental, fueron sacrificados al azar 12 pollos de cada tratamiento para su posterior extracción de las tibias derecha e izquierda de cada ave, y se evaluó un conjunto de variables relacionadas con la integridad esquelética, como la morfometría y mineralización ósea, y otras mediciones complementarias que son indicativas de alteraciones en los huesos.

Luego del sacrificio de las aves de cada tratamiento, se procedió a muestrear muslos, piernas y patas. Luego, las muestras fueron colocadas en agua hirviendo durante 15 minutos (Martínez, 2012). Seguidamente, se procedió a retirar manualmente de los huesos cualquier tipo de tejido restante y así se obtuvo los correspondientes huesos: tibias derechas e izquierdas de los pollos. Por ultimo, los huesos muestreados se dejaron secar durante 24 horas a temperatura ambiente en un lugar ventilado (Mutus et al., 2006; Martínez, 2012).

Cuadro 2: Composición porcentual en ingredientes y nutricionales de las dietas experimentales (1-21 días)

Ingredientes	Tratamientos ¹			
	T1	T2	T3	T4
Maíz amarillo	59.825	61.276	60.489	61.940
Torta de soya	32.223	31.967	32.106	31.849
Aceite crudo de soya	4.277	3.801	4.059	3.583
Carbonato de calcio	0.810	0.870	0.731	0.791
Fosfato dicalcico	1.578	0.786	1.306	0.515
Sal común	0.466	0.465	0.465	0.465
Metionina DL	0.258	0.256	0.257	0.255
Lisina HCL	0.144	0.149	0.146	0.151
Treonina L	0.050	0.051	0.051	0.051
Premezcla vitamínico-mineral ²	0.120	0.120	0.120	0.120
Cloruro de colina 60	0.100	0.100	0.100	0.100
Antox plus (antioxidante)	0.050	0.050	0.050	0.050
Zinc Bacitracina 10 (antibiótico)	0.050	0.050	0.050	0.050
Mycosorb (secuestrante)	0.050	0.050	0.050	0.050
Vitamina 25-OHD ₃	-	-	0.020	0.020
Enzima fitasa	-	0.010	-	0.010
Nutrientes (calculado)				
E. Metabolizable (Kcal/Kg)	3072	3072	3072	3072
Proteína total, %	20.5	20.5	20.5	20.5
Lisina digestible, %	1.12	1.12	1.12	1.12
Metionina digestible,%	0.55	0.55	0.55	0.55
Metionina + cistina digestible,%	0.84	0.84	0.84	0.84
Triptófano digestible,%	0.21	0.21	0.21	0.21
Treonina digestible, %	0.73	0.73	0.73	0.73
Calcio, %	0.87	0.87	0.87	0.87
Fósforo disponible, %	0.44	0.44	0.44	0.44
Sodio,%	0.20	0.20	0.20	0.20

¹Tratamientos: T1: control positivo; T2: dieta conteniendo fitasa; T3: dieta conteniendo 25-OHD₃; T4: dieta conteniendo fitasa más 25-OHD₃.

²Contenido de la premezcla vitamínico-mineral (por Kg de alimento): Vitamina A, 14400 UI; Vitamina D₃, 3000 UI; Vitamina E, 36 UI; Vitamina K₃, 36 mg; Tiamina, 1.8 mg; Riboflavina, 6.6 mg; Piridoxina, 3.6 mg; Cianocobalamina, 0.018 mg; Ac. Pantoténico, 13.2 mg; Ac. Fólico, 1.2 mg; Niacina, 36 mg; Biotina, 0.18 mg; Manganeso, 78 mg; Zinc, 54 mg; Hierro, 96 mg; Cobre, 9.6 mg; Yodo, 1.2 mg; Selenio, 0.18 mg.

Cuadro 3: Análisis químico del contenido de calcio y fósforo total de las dietas experimentales (1- 21 días) (base tal como ofrecido).

Componentes	Tratamientos ¹			
	T1	T2	T3	T4
Calcio, %	0.83	0.61	0.70	0.57
Fósforo total, %	0.66	0.52	0.61	0.46

¹Tratamientos: T1: control positivo; T2: dieta conteniendo fitasa; T3: dieta conteniendo 25-OHD₃; T4: dieta conteniendo fitasa más 25-OHD₃.

Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos de la UNALM.

3.7.1 RESPUESTA PRODUCTIVA

3.7.1.1 PESO VIVO Y GANANCIA DE PESO

El pesado se realizó individualmente para todos los pollos, en los días 7, 14 y 21 de edad. Luego se obtuvo el peso semanal en gramos (g) por pollo de cada una de las repeticiones de los tratamientos.

Para obtener ganancia de peso se registró el “peso vivo semanal” de los pollos, y mediante la diferencia de la semana actual (peso final) y la semana anterior (peso inicial) se determinó la ganancia de peso semanal por pollo.

$$\text{Ganancia de peso} = \text{Peso final (g)} - \text{Peso inicial (g)}$$

(g/pollo en 21 días)

3.7.1.2 CONSUMO DE ALIMENTO Y CONVERSION ALIMENTICIA (CA) EN 21 DÍAS

Se registró el consumo de alimento acumulado en 21 días por ave (g)

$$\text{Consumo de alimento (g/pollo)} = \frac{\text{Consumo de alimento en 21 días (g)}}{\text{Número de pollos por tratamiento}}$$

La “conversión alimenticia” (CA) de pollos se obtuvo al relacionar el consumo de alimento (g) en 21 días y la ganancia de peso (g) en 21 días por tratamiento y por ave.

$$\text{C.A} = \frac{\text{Consumo de alimento acumulado (g)}}{\text{Ganancia de peso en 21 días (g)}}$$

3.7.1.3 PORCENTAJE DE MORTALIDAD

Se registró diariamente a individuos que yacen muertos por diversas causas dentro de cada unidad experimental, vale decir dentro de cada repetición de 10 pollos de las que constaron los tratamientos que se evaluaron.

3.7.2 CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DE LA TIBIA

Estas características fueron determinadas a partir de la tibia derecha en 12 pollos beneficiados en cada tratamiento.

3.7.2.1 DIÁMETRO DE LA DIÁFISIS

Se determinó los diámetros latero-lateral (DLL) y los diámetros cráneo-caudal (DCC) de la diáfisis en la mitad de la longitud de la tibia (Quarantelli et al., 2007; Martínez, 2012). El

diámetro promedio de la diáfisis (DP) se expreso en centímetros (cm) y se calculó empleando la siguiente fórmula (Martínez, 2012):

$$DP= \frac{DLL + DCC}{2}$$

3.7.2.2 LARGO DEL HUESO

Se determinó considerando la longitud mayor de extremo a extremo de la tibia, manteniendo el eje longitudinal del hueso paralelo al brazo principal del vernier La unidad de medida que se empleo fue centimeros (cm).

3.7.2.3 VOLUMEN DEL HUESO

El volumen de cada tibia se determinó por el principio de Arquimedes, midiendo el desplazamiento de agua en probetas graduadas al sumergir completamente cada hueso (Quarantelli et al., 2007; Martínez, 2012). La unidad de medida que se usó fue mililitros (ml).

3.7.2.4 PESO DEL HUESO

Las tibias muestreadas fueron pesadas de forma individual. La unidad de medida que se utilizó fue en gramos (g).

3.7.3 INDICADORES DE MINERALIZACIÓN DE LA TIBIA

3.7.3.1 DENSIDAD ÓSEA

Se determinó mediante la relación peso (g) y volumen (ml). De esta forma se ha considerado como densidad ósea a la masa de material orgánico e inorgánico en el hueso por unidad de volumen del mismo (Martínez, 2012). Se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad (g/ml)} = \frac{\text{Peso, g}}{\text{Volumen, ml}}$$

3.7.3.2 ÍNDICE MODIFICADO DE SEEDOR

El índice modificado de Seedor se basa en el concepto de que es la fracción mineral del hueso la que tiene la mayor densidad específica. Cuando el índice de Seedor es mayor; indica que mayor es la densidad del hueso (Martínez, 2012). Se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Índice modificado de Seedor} = \frac{\text{Peso, mg}}{\text{Largo, mm}}$$

3.7.3.3 ÍNDICE QUETELET

También llamado “índice de masa corporal”, se determinó utilizando la relación peso/largo². Según Martínez (2012), cuanto mayor sea el índice de Quetelet, el hueso es relativamente más pesado pero más corto. Mientras cuanto menor sea el índice, el hueso es relativamente más liviano pero más largo. Se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de Quetelet} = \frac{\text{Peso, mg}}{\text{Largo, mm}^2}$$

3.7.3.4 ÍNDICE DE ROBUSTICIDAD

Este índice fue utilizado para describir la mineralización del hueso (Mutus et al., 2006). Según Martínez (2012), cuanto menor es este índice se considera que la estructura del hueso es más fuerte. Se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de robusticidad} = \frac{\text{Largo, mm}}{\sqrt[3]{\text{Peso, g}}}$$

3.7.3.5 PORCENTAJE DE CENIZAS, CALCIO Y FÓSFORO DE LA TIBIA

Luego de la extracción de los muslos, piernas y patas izquierdas de los pollos beneficiados a los 21 días de edad de cada tratamiento, se procedió a colocarlas en agua hirviendo durante 15 minutos, proceso que no afecta el contenido mineral, densidad ósea, pero que puede extraer alrededor del 80% de la grasa (Orban et al., 1993; Kokabagli, 2001; Applegate y Lilburn, 2002; Almeida, 2008). Posteriormente se retiró manualmente de los huesos cualquier tipo de tejido restante para así obtener las correspondientes tibias izquierdas.

Los análisis químicos fueron determinados a partir de las muestras de tibia izquierda. El análisis de cenizas se realizó por calcinación de las tibias (método 942.05- AOAC, 2005), y los análisis de calcio y fósforo se hicieron utilizando el método 927.02-AOAC (2005) y el método 965.12-AOAC (2005), respectivamente.

3.7.4 MEDICIONES COMPLEMENTARIAS

3.7.4.1 CAPACIDAD PARA CAMINAR

Antes del sacrificio de las aves, en el día 21 de edad, se observó la presencia de problemas locomotores y se midió empleando una versión modificada del score de la capacidad para

caminar propuesto previamente por Kestin et al. (1992), lo cual tiene una escala de 1 a 6, donde:

Score	Descripción
6	Normal.
5	Defectos leves.
4	Anormalidad definida para caminar.
3	Lesión evidente, por ejemplo: cojera o inestabilidad. En este caso las aves suelen estar postradas.
2	Grave daño y dificultad para caminar.
1	Incapacidad para sostenerse sobre sus patas, para su traslado requieren de alas, se apoyan sobre los corvejones.

3.8 DISEÑO ESTADÍSTICO

En el presente estudio se utilizó el Diseño “Completamente al Azar” con 4 tratamientos y 5 repeticiones por tratamiento. Las mediciones luego de ser obtenidas, fueron evaluadas mediante un ANOVA usando el programa SAS (1999) y la prueba de comparaciones múltiples de Duncan (1955) entre las medias de los tratamientos a un nivel $\alpha=0.05$. El Modelo Aditivo Lineal General que se aplicó fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Observación experimental.

t_i = Efecto del i-ésimo tratamiento.

μ = Media general.

e_{ij} = Error experimental.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PESO VIVO Y GANANCIA DE PESO

El peso vivo inicial y peso vivo final (g/ave) y las ganancias de peso (g/ave), obtenidos a los 21 días de edad de los pollos, de cada tratamiento se presentan en el Cuadro 4 y en el Anexo IV.

En peso vivo final y en ganancias de peso (g) por ave en 21 días, no se observaron diferencias estadísticas ($P>0.05$) entre los cuatro tratamientos (T1, T2, T3 y T4). Estos resultados indican que las dietas experimentales con fitasa (T2), 25-OHD₃ (T3) y ambos (T4) cubrieron los requerimientos de calcio y fósforo de manera similar a la dieta control (T1). Se obtuvo un adecuado crecimiento de los pollos de carne de 1-21 días de edad en todos los tratamientos.

Estos resultados no son contrarios a los hallazgos de otros estudios realizados en pollos de carne, donde observaron que los metabolitos de la vitamina D₃ ó la fitasa incrementan la utilización del fósforo-fítico y el calcio provenientes de dietas a base de maíz-soya, mediante la obtención de valores adecuados en la ganancia de peso vivo (Driver et al., 2005a; Selle y Ravindran, 2006; Santos et al., 2008; Zhou et al., 2008; Liem et al., 2009). Además, Hermes et al. (2013) encontraron que la combinación de fitasa (1000 FYT/Kg) más 25-OHD₃ (69 µg/Kg) en una dieta para pollos de carne, mejoró la ganancia de peso. Según Shirley y Edwards (2003), la inclusión de niveles altos de fitasa (de 1,500 y 12,000 U/Kg) en dietas con bajos niveles de calcio y fósforo, provocan mayor incremento (60-80%) en la ganancia de peso de los pollos.

Cuadro 4: Comportamiento productivo de pollos de carne (1-21 días de edad)

MEDICIONES¹	TRATAMIENTOS²			
	T1	T2	T3	T4
Peso vivo inicial (g/ave)	48.38 ^a	48.16 ^a	49.24 ^a	48.52 ^a
Peso vivo final (g/ave)	972.62 ^a	978.64 ^a	975.00 ^a	986.44 ^a
Ganancia de peso en 21 días (g/ave)	924.24 ^a	930.48 ^a	925.76 ^a	937.92 ^a
Consumo de alimento total (g/ave)	1215.22 ^a	1206.48 ^a	1208.62 ^a	1236.22 ^a
Conversión alimenticia acumulada (g/g)	1.32 ^a	1.30 ^a	1.31 ^a	1.32 ^a

^{ab}Letras distintas en una misma fila son valores diferentes estadísticamente ($P < 0,05$).

¹Los valores para cada tratamiento representan el promedio de las cinco repeticiones

²Tratamientos: T1: control positivo; T2: dieta conteniendo fitasa; T3: dieta conteniendo 25-OHD₃; T4: dieta conteniendo fitasa más 25-OHD₃.

Por otro lado, se ha encontrado efectos negativos; Liem et al. (2009) mostraron que el incremento en la suplementación de fitasa de 250 a 1,000 U/Kg en dietas que contenían 3µg de 1α-OHD₃/Kg (metabolito sintético de la vitamina D₃), y bajos niveles de calcio (0.60 %) y fósforo disponible (0.26 %), provocó una disminución en la ganancia de peso de los pollos de carne. Además, observaron bajas ganancias de peso en pollos alimentados con dietas conteniendo altos niveles de 1α-OHD₃, calcio y/o fitasa, y lo relacionaron como un efecto por hipercalcemia.

4.2 CONSUMO DE ALIMENTO Y CONVERSIÓN ALIMENTICIA

El consumo de alimento total (g/ave) y la conversión alimenticia acumulada, obtenidos a los 21 días de edad de los pollos, de cada tratamiento también se presentan en el Cuadro 4 y los datos de consumo de alimento por semana se encuentran en los Anexos V y VI.

En los resultados sobre el consumo de alimento y la conversión alimenticia, igual que los datos sobre ganancias de peso, no muestran diferencias estadísticas ($P > 0.05$) entre los cuatro tratamientos (T1, T2, T3 y T4). Lo cual indica que los valores de consumo de alimento y la conversión alimenticia en los pollos alimentados con fitasa (T2) y 25-OHD₃ (T3) y ambos (T4) fueron similares a los obtenidos en los pollos alimentados con la dieta control (T1) sin suplementación.

Caso similar se observó en otro estudio realizado por Hermes et al. (2013), en donde los pollos que fueron alimentados con una dieta conteniendo fitasa (1000 FYT/Kg) más 25-OHD₃ (69 µg/Kg) no se afectaron los valores de consumo de alimento y conversión alimenticia, siendo similares a los valores de las aves alimentadas con una dieta control (sin contenido de fitasa y 25-OHD₃). En otros estudios también observaron que la suplementación de fitasa ó 25-OHD₃ en dietas para pollos de carne, no afectó negativamente el consumo de alimento y la conversión alimenticia (Denbow et al., 1995; Ahmad et al., 2000; Driver et al., 2005b; Roberson et al., 2005; Santos et al., 2008).

Por el contrario, en un estudio realizado por Powell et al. (2011) observaron disminución

en el consumo de alimento en los pollos cuando incrementaron los niveles de calcio (de 0.67 a 1.33 %) en dietas que contenían 0.20 % de fósforo disponible. Coto et al. (2008), evaluaron la suplementación de 25-OHD₃ y fitasa en dietas para pollos de carne de 1 a 18 días, mediante un diseño factorial de 2x2x4x4; combinando dos niveles de 25-OHD₃ (0 ó 69 µg/Kg), dos niveles de fitasa (0 ó 1200 FTU/Kg), cuatro niveles de calcio (de 0.60 a 1.20 %) y cuatro niveles de fósforo disponible (de 0.35 a 0.50 %). La suplementación con 25-OHD₃ en las dietas tuvo un efecto negativo sobre la conversión alimenticia; sugiriendo que posiblemente la 25-OHD₃ provocó hipercalcemia en los pollos mediante el aumento en la absorción de calcio a nivel intestinal. La suplementación de fitasa en las dietas mejoró significativamente la conversión alimenticia. No hubo efecto sobre la conversión alimenticia ante cualquier nivel de fósforo, indicando que los diferentes niveles de fósforo utilizados en las dietas fueron adecuados.

4.3 LARGO, PESO DE LA TIBIA, DIÁMETRO DE LA DIÁFISIS Y VOLUMEN DE LA TIBIA

Los resultados sobre el largo (mm), peso (g), diámetro de la diáfisis (mm) y volumen (ml) de la tibia derecha de cada tratamiento se presenta en el Cuadro 5 y en los Anexos VIII y IX.

Se observa que la suplementación de 25-OHD₃ (T3) disminuyó significativamente ($P < 0.05$) el largo de la tibia (6.595 cm) en relación a la combinación de 25-OHD₃ más fitasa (T4). No hubo diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos T1, T2 y T4. En general, viendo los valores de largo de la tibia, aparentemente la suplementación con 25-OHD₃ (T3) no tuvo efecto sobre el largo de las tibias en comparación con la dieta control. En la variable, peso de las tibias se observó similar tendencia que en la variable largo de las tibias. Es decir, la suplementación con 25-OHD₃ (T3) disminuyó significativamente ($P < 0.05$) el peso de la tibia (2.252 g) en relación a la dieta control no suplementada (2.528 g). Sin embargo, el tratamiento T3 fue similar a los tratamientos T2 y T4.

Cuadro 5: Efecto de la suplementación de la fitasa, 25-OHD₃ y ambos en dietas para pollos de carne (1-21 días) sobre el largo, peso de las tibias, diámetro de la diáfisis y volumen de la tibia

MEDICIONES ¹	TRATAMIENTOS ²			
	T1	T2	T3	T4
Largo (cm)	6.708 ^{ab}	6.766 ^{ab}	6.595 ^b	6.784 ^a
Peso (g)	2.528 ^a	2.361 ^{ab}	2.252 ^b	2.441 ^{ab}
Diámetro de la diáfisis, promedio (cm)	0.651 ^a	0.627 ^a	0.635 ^a	0.652 ^a
Volumen (ml)	2.483 ^a	2.208 ^a	2.508 ^a	2.358 ^a

^{ab}Letras distintas en una misma fila son valores diferentes estadísticamente ($P < 0,05$).

¹Los valores para cada tratamiento representan el promedio de las cinco repeticiones

²Tratamientos: T1: control positivo; T2: dieta conteniendo fitasa; T3: dieta conteniendo 25-OHD₃; T4: dieta conteniendo fitasa más 25-OHD₃.

Shim et al. (2011) reportaron que los pollos que presentan una mayor tasa de crecimiento poseen huesos más largos, anchos, pesados y fuertes que aquellos pollos que presentan menor tasa de crecimiento. En otro estudio se disminuyó el nivel de fósforo disponible a menos de 0.40 % en dietas para pollos de carne (0 a 20 días), provocando disminución en el largo de la tibia y fémur en comparación de un grupo de pollos alimentados con la dieta control (Karimi et al., 2011).

La calidad de los huesos consiste tanto en su organización arquitectural y de las matrices orgánicas y minerales, en donde la matriz inorgánica constituye 60-70 % del peso del hueso (Rath et al., 2000; Robison et al., 2015). Han et al. (2012) observaron que la suplementación con 5 y 10 μg $1\alpha\text{-OHD}_3/\text{Kg}$ en dietas para pollos de carne con bajos niveles de calcio (0.50 %) y bajos niveles de fósforo disponible (0.13 %), aumentaron significativamente el largo y peso de la tibia a comparación de una dieta control negativo (con 0.50 % Ca y 0.13 % PD).

Por otro lado, la suplementación con la enzima fitasa (T2), vitamina 25-OHD₃ (T3) o ambos (T4) productos comerciales afectaron de manera similar ($P>0.05$) el diámetro de diáfisis de las tibias en relación a la dieta control no suplementada (T1). Los valores de diámetro de las diáfisis de las tibias están en el rango de 0.627- 0.652 cm. De manera similar, se encontró que la suplementación con la enzima fitasa (T2), vitamina 25-OHD₃ (T3) o ambos productos comerciales (T4) tuvieron un efecto similar ($P>0.05$) en el parámetro volumen de las tibias en comparación a la dieta control (T1). Los valores respectivos están en el rango 2.208- 2.508 ml.

Prisby et al. (2014), realizaron un estudio en pollos de carne de 7 a 42 días de edad a nivel histo-morfométrico óseo, quienes indicaron que los huesos que presentan bajo volumen óseo pueden estar relacionados con una disminución en la actividad de los osteoblastos y un aumento marcado en la actividad de los osteoclastos, dando como resultado una mayor resorción ósea y menor formación del hueso. Según Baranova et al. (2008), la variación en el contenido de calcio y fósforo dietario no produce cambios en el diámetro externo de los huesos de cerdos pero si se puede observar cambios en el diámetro interno.

Cabe resaltar que en el presente estudio, la medición del promedio del diámetro de las

tibias en pollos pertenecientes a los cuatro tratamientos fue a partir de la parte externa del hueso y se consideró el promedio entre la cara latero-lateral y cráneo-caudal de la diáfisis en la mitad de la longitud de la tibia.

4.4 DENSIDAD, ÍNDICE MODIFICADO DE SEEDOR, ÍNDICE DE QUETELET E ÍNDICE DE ROBUSTICIDAD DE LA TIBIA

La densidad (g/ml), índice modificado de Seedor (mg/mm), índice de Quetelet (mg/(mm)²) y el índice de robusticidad (cm/(g)^{1/3}) de la tibia derecha de cada tratamiento se encuentran en el Cuadro 6 y en los Anexos IX, XII, XIII y XIV.

En los resultados sobre la “densidad de la tibia”, se observa una disminución estadística significativa ($P < 0.05$) en el tratamiento T3 en relación a los tratamientos T1, T2 y T4; las densidades en estos (T1, T2 y T4) fueron similares ($P > 0.05$) entre ellos. Rath et al. (2000), indicaron que la densidad ósea es un indicador de la fortaleza del hueso y refleja el contenido mineral del hueso, por lo cual a menor densidad ósea aumenta el riesgo de fracturas. Por tanto, al obtenerse valores similares sobre la densidad de la tibia en los pollos alimentados con dietas conteniendo fitasa (T2) y fitasa más 25-OHD₃ (T4) a comparación del grupo de pollos alimentado con la dieta control (T1); los huesos de los tratamientos T2 y T4 podrían estar relacionados con una mayor fortaleza en comparación al tratamiento T3 (dieta conteniendo la vitamina 25-OHD₃).

Caso similar observaron con Rutherford et al. (2012), quienes al suplementar con fitasa en dietas para pollos de carne con bajo nivel de fósforo disponible (0.35%) y nivel normal de calcio; obtuvieron similar “densidad mineral” de la tibia (mg/cm²) en comparación de los pollos que recibieron una dieta con niveles normales de calcio y fósforo. Según Hester et al. (2004), la densidad mineral de la tibia y del húmero en gallinas leghorn, las cuales fueron alimentadas con dietas conteniendo diferentes niveles de calcio (altos niveles con 5.4% Ca, niveles normales con 3.6% Ca y bajos niveles con 1.8% Ca), concluyeron que la densidad mineral de los huesos sigue una tendencia lineal negativa cuando se reduce el nivel de calcio en la dieta. Sin embargo, según Clarke (2008) la geometría y composición del hueso son importantes porque los huesos más largos son más fuertes en comparación a

huesos pequeños inclusive si las densidades minerales óseas son equivalentes.

Los índices de Seedor y Robusticidad sirven para describir la mineralización del hueso (Seedor et al., 1991). Según Monteagudo et al. (1997), a mayor valor en el índice de Seedor el hueso es más denso, y cuando el valor en el índice de Robusticidad es bajo la estructura del hueso es fuerte (Riensefeld, 1972). Riensefeld (1981) realizó un estudio en el cual comparó los huesos de ratas jóvenes con los huesos de ratas senescentes, concluyó que el uso del índice de Robusticidad sirve como indicador de la osteoporosis. De acuerdo a Whithead y Fleming (2000), la osteoporosis es una condición fisiológica donde los huesos son menos densos, más porosos y más susceptibles a las fracturas.

El índice de Quetelet, ha sido empleado en pollos de carne por Rutten et al. (2002) y Martínez (2012) para evaluar el desarrollo y mineralización de los huesos.

En este estudio, en los pollos alimentados con las dietas de los tratamientos T2, T3 y T4 se obtuvieron los valores más bajos en los índices de Seedor y de Quetelet y valores altos en el índice de Robusticidad con respecto al grupo de pollos pertenecientes al tratamiento T1; sugiriendo que las dietas que contenían fitasa (T2), 25-OHD₃ (T3) y ambos (T4) no incrementaron el grado de mineralización y desarrollo del hueso en los pollos. Estos resultados no coinciden con Kocabagli (2001), quien evaluó el efecto de la suplementación de diferentes niveles de fitasa (300, 500 y 700 U de fitasa/Kg) en dietas para pollos de carne a base de maíz-soya. Observó que los pollos alimentados con las dietas conteniendo la enzima fitasa, obtuvieron incremento en el índice de Seedor ($P < 0.05$) y bajo valor en el índice de robusticidad ($P < 0.05$).

En otro estudio realizado por Garcia et al. (2013), evaluaron el uso de la vitamina D₃ y sus metabolitos en dietas a base de maíz-soya para pollos de carne. El índice de Seedor de la tibia y otros parámetros óseos (diámetro, porcentaje de calcio y fósforo, cenizas, etc.), no presentaron diferencias estadísticas ($P > 0.05$) entre el grupo alimentado con la dieta conteniendo vitamina D₃ (dieta control) y los otros grupos de pollos alimentados con las dietas conteniendo 25-OHD₃, 1,25-(OH)₂D₃ ó 1 α -OHD₃.

Cuadro 6: Efecto de la suplementación de la fitasa, 25-OHD₃ y ambos en dietas para pollos de carne (1-21 días) sobre los indicadores de la mineralización ósea de la tibia

MEDICIONES ¹	TRATAMIENTOS ²			
	T1	T2	T3	T4
Densidad del hueso (g/ml)	1.03 ^a	1.07 ^a	0.91 ^b	1.05 ^a
Índice modificado de Seedor (mg/mm)	37.640 ^a	34.859 ^b	34.115 ^b	35.925 ^{ab}
Índice de Quetelet (mg/(mm) ²)	5.610 ^a	5.151 ^b	5.171 ^b	5.292 ^b
Índice de robusticidad (cm/(g) ^{1/3})	4.934 ^b	5.088 ^a	5.037 ^a	5.044 ^a
ANÁLISIS QUÍMICO³				
Ceniza (%)	44.66 ^a	42.90 ^b	43.42 ^{ab}	42.40 ^b
Calcio (%)	37.16 ^{ab}	36.40 ^b	37.76 ^a	36.85 ^{ab}
Fósforo (%)	17.41 ^a	17.29 ^a	17.29 ^a	17.60 ^a

^{a, b} Letras distintas en una misma fila son valores diferentes estadísticamente ($P < 0,05$).

¹ Los valores para cada tratamiento representan el promedio de las cinco repeticiones.

² Tratamientos: T1: control positivo; T2: dieta conteniendo fitasa; T3: dieta conteniendo 25-OHD₃; T4: dieta conteniendo fitasa más 25-OHD₃.

³ Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos de la UNALM.

4.5 PORCENTAJE DE CENIZAS, CALCIO Y FÓSFORO DE LA TIBIA

Los porcentajes de ceniza, calcio y fósforo de la tibia izquierda de los pollos de cada tratamiento también se encuentran en el Cuadro 6 y en el Anexo XI.

Se observó que la suplementación de la fitasa (T2) y la combinación de fitasa más 25-OHD₃ (T4) disminuyeron significativamente ($P < 0.05$) el valor de cenizas de la tibia en relación a la dieta control (T1). Sin embargo, la suplementación con 25-OHD₃ (T3) tuvo un efecto similar a la dieta control. Además, la dieta T3 tuvo un valor de cenizas similar a las dietas T2 y T4. Los valores de cenizas se encuentran en el rango 42.40- 44.66 %. Por otro lado, se encontró que la suplementación con fitasa (T2) redujo significativamente ($P < 0.05$) el valor del calcio a comparación de la suplementación con 25-OHD₃ (T3) (36.40 % versus 37.76%). Los valores de calcio en la dieta suplementada con fitasa más 25-OHD₃ (T4) y en la dieta control (T1) fueron similares con 36.85 % y 37.16 %, respectivamente.

Los resultados coinciden con los encontrados por Zhou et al. (2008) en pollos de carne (0-28 días), quienes obtuvieron bajo porcentaje de calcio de la tibia ($P < 0.05$) al suplementar con fitasa en las dietas. Sin embargo, observaron que el porcentaje de cenizas de la tibia en los pollos alimentados con dietas conteniendo fitasa fue similar ($P > 0.05$) al grupo de pollos alimentados con una dieta control. Ellos concluyeron que el nivel de calcio (0.67% Ca) contenido en las dietas suplementadas con fitasa fue inferior a la cantidad necesaria para cubrir el requerimiento de calcio en los pollos. Según Viveros et al. (2002), la alimentación de los pollos de carne con dietas deficientes en calcio y fósforo tienden a presentar disminución en el porcentaje de cenizas de la tibia.

En otro estudio realizado por Hermes et al. (2013), observaron que en los pollos alimentados con dietas suplementadas con fitasa (1000 FYT/Kg) más 25-OHD₃ (69 µg/Kg) pero deficientes en calcio (0.72%) y fósforo disponible (0.30%), obtuvieron bajo porcentaje de cenizas de la tibia ($P < 0.05$) en comparación con pollos alimentados con una dieta control. Adicionalmente, Liem et al. (2009) observaron efectos negativos sobre el porcentaje de cenizas del hueso al incrementar los niveles de calcio de 0.6% a 1% y de 1α-OHD₃ de 3 a 7 µg/Kg en una dieta de pollos de carne que contenía fitasa (250 FTU/Kg) y

bajo nivel de fósforo disponible (0.26 %). Por lo contrario, encontraron aumento en el porcentaje de cenizas del hueso cuando disminuyeron el nivel de calcio a 0.6% en dietas que contenían 1α -OHD₃ (7 µg/Kg) y fitasa (250 FTU/Kg): indicando que el bajo nivel de calcio en la dieta permite a las aves incrementar la utilización de fitasa, y mientras que el alto nivel de la 1α -OHD₃ aumenta la absorción de calcio a nivel intestinal de los pollos.

Varios investigadores, indican que la fitasa exógena no reduce el requerimiento de calcio ó libera una cantidad mínima de calcio a partir de las dietas para pollos de carne (Mitchell y Edwards, 1996; Yan et al., 2006). En un estudio realizado por Ahmad et al. (2000) observaron que en pollos (0-28 días) alimentados con una dieta conteniendo fitasa y con nivel normal de calcio (0.1% Ca) y bajo de fósforo no fítico (0.36 %) obtuvieron similar ($P>0.05$) contenido de ceniza, calcio y fósforo del hueso en relación a pollos alimentados con una dieta conteniendo niveles normales de calcio y fósforo.

Santos et al. (2008), evaluaron la suplementación de tres niveles crecientes de fitasa en diferentes dietas para pollos de carne (0-21 días) con bajos niveles de calcio y fósforo: 500 U/Kg de fitasa añadido en dieta con 0.84% de calcio y 0.55% de fósforo total; 700 FTU/Kg de fitasa añadido en dieta con 0.76% de calcio y 0.51% de fósforo total; y 1000 U/Kg de fitasa añadido en dieta con 0.70% calcio y 0.44% de fósforo total. Observaron que la suplementación de los tres niveles de fitasa en las diferentes dietas provocó en los pollos aumento en el porcentaje de cenizas, calcio y fósforo de la tibia en comparación con pollos alimentados con una dieta control (con 0.95% Ca y 0.75% P total).

En el presente estudio, la respuesta productiva y el porcentaje de cenizas ó calcio de la tibia de las dietas que contienen fitasa (T2) y la combinación de fitasa más 25-OHD₃ (T4) responden de una manera inferior con respecto al tratamiento control (T1). Esto puede ser debido a que los niveles de calcio y fósforo requeridos en la dieta para maximizar la respuesta productiva de los pollos de carne no son suficientes para obtener un adecuada mineralización de los huesos (McDowell, 2003). Sin embargo, Bar et al. (2003b) indicaron que el nivel adecuado de calcio para la mineralización de los huesos es mayor que lo requerido para maximizar la ganancia de peso vivo, pero que son similares los niveles de fósforo requeridos para la obtención de una alta ganancia de peso y buena mineralización del hueso.

En el presente trabajo, en el porcentaje de fósforo de las tibias no se observaron diferencias estadísticas ($P>0.05$) entre los cuatro tratamientos (T1, T2, T3 y T4). Estos resultados coinciden con varios autores, los cuales sugieren que la suplementación de la fitasa ó la 25-OHD₃ incrementan la absorción del fósforo a nivel intestinal y no afectan negativamente el porcentaje de fósforo de los huesos de pollos de carne (Applegate et al., 2003; Fritts y Waldroup, 2005; Driver et al., 2005a; Santos et al., 2008).

4.6 CAPACIDAD PARA CAMINAR

El número de pollos con problemas locomotores según el score aplicado por Kestin et al. (1992) y Martínez (2012) para cada tratamiento se presenta en el Cuadro 7. En este estudio, el registro de pollos con problemas locomotores se hizo en cada unidad experimental. Anotando los pollos que presentaron físicamente algún tipo de deformidad en las patas o piernas. Se observó la presencia de pollos con problemas locomotores en todos los tratamientos; se registró el mayor número de pollos afectados en el tratamiento T4, y el menor número de pollos afectados en el tratamiento T3 con respecto a los demás tratamientos.

En pollos de carne de rápido crecimiento los huesos corticales son muy porosos, por lo que pueden presentar fácilmente deformaciones en los huesos (Baranova et al, 2008). Varus/valgus (VVD), dedos torcidos, discondroplasia tibial (TD), condrodistrofia, piernas torcidas, raquitismo, y necrosis de la cabeza femoral son las patologías esqueléticas más comunes que causan problemas en las piernas de las aves. Los problemas de patas y los trastornos del desarrollo de los huesos largos en los pollos de carne pueden ser debido a varias causas como: genéticas, nutrición (toxicidad, deficiencia e imbalances), incubación, enfermedades infecciosas y metabólicas y factores de estrés ambiental (Cook, 2000; Bradshaw et al., 2002; Oviedo, 2009).

Por tanto, en este estudio probablemente la presentación de problemas locomotores en los pollos no sea específicamente por deficiencia nutricional como el calcio y/o el fósforo, sino que también hay varios factores que pudieron haber influido en la presentación de este problema para los cuatro tratamientos.

Cuadro 7: Efecto de la suplementación de la fitasa, 25-OHD₃ y ambos en dietas para pollos de carne (1-21 días) sobre el número de pollos con problemas locomotores

SCORE ¹	TRATAMIENTOS ²			
	T1	T2	T3	T4
1				
2				1
3	3	2	1	10
4	2	5	1	2
5	4	1	4	2
TOTAL³	9	8	6	15

¹Score: (1) Incapacidad para sostenerse sobre sus patas, para su traslado requieren de alas, se apoyan sobre los corvejones; (2) Grave daño y dificultad para caminar; (3) Lesión evidente, en este caso las aves suelen estar postradas; (4) Anormalidad definida para caminar; (5) Defectos leves.

²Tratamientos: T1: control positivo; T2: dieta conteniendo fitasa; T3: dieta conteniendo 25-OHD₃; T4: dieta conteniendo fitasa más 25-OHD₃.

³Los valores para cada tratamiento representan el número de pollos encontrados con problemas locomotores de las cinco repeticiones.

V. CONCLUSIONES

La conducción de la presente investigación ha permitido arribar a las conclusiones siguientes:

1. La enzima fitasa (T2), la vitamina 25-OHD₃ (T3) y la combinación de ambas (T4) cubrieron los requerimientos de calcio y fósforo, lo cual resultó en una respuesta productiva comparable al tratamiento control (T1).
2. El diámetro de la diáfisis y volumen de tibias aumentaron por efecto de la enzima fitasa (T2), la vitamina 25-OHD₃ (T3) y la combinación de ambas (T4) de manera similar al tratamiento control (T1). En cambio, peso, largo y densidad de tibias se incrementaron por acción de la fitasa (T2) y la combinación de fitasa más 25-OHD₃ (T4), más no así por la 25-OHD₃ (T3).
3. Los porcentajes de calcio y fósforo de las tibias aumentaron por acción de la vitamina 25-OHD₃ (T3) y la combinación de fitasa más 25-OHD₃ (T4) de manera similar al tratamiento control (T1), y solo la vitamina 25-OHD₃ (T3) mejoró el porcentaje de cenizas.
4. En general, la enzima fitasa (T2), la vitamina 25-OHD₃ (T3) y la combinación de ambas (T4) no contribuyeron a una eficaz mineralización de la tibia.

VI. RECOMENDACIONES

1. Conducir otras investigaciones con diseño en factorial considerando varios niveles de la enzima fitasa, la vitamina 25-OHD₃ y calcio a fin de encontrar una optima respuesta productiva y una eficiente calidad de hueso en pollos de carne.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBIYI, O. A.; SOKUNBI, O. A. y EWUOLA, E. O. 2009. Performance evaluation and bone characteristics of growing cockerel fed diets containing diferente levels of diatomaceous earth. Middle-East Journal of Scientific Research 4 (1): 36-39.

ADEOLA, O.; DILGER, R. N.; ONVANGO, E. M. y JENDZA, J. A. 2005. Utilización del fósforo en aves y ganado porcino. FEDNA. XXI Curso de Especialización (en línea). <http://www.etsia.upm.es/fedna.com> (Citado 25 de enero del 2015).

ADEOLA, O.; SANDS, J. S; SIMMINS, P. H. y SCHULZE, H. 2004. The efficacy of an Escherichia coli-derived phytase preparation. J. Anim. Sci. 2004. 82:2657–2666.

AHMAD, T.; RASOOL, S.; MUHAMMAD, S.; HAQ, A. y ZIA-UL H. 2000. Effect of microbial phytase produced from a fungus *Aspergillus niger* on bioavailability of phosphorus and calcium in broiler chickens. Animal Feed Science and Technology 83: 103-114.

AKPE, M. P.; WAIBEL, P. E.; LARNTZ, K.; METZ, A. L.; NOLL, S. L. y WALSER, M. M. 1987. Phosphorus availability bioassay using bone ash and bone densitometry as response criteria. Poult. Sci. 66:713-720.

ALMEIDA, P. 2008. Bone mineral density: review. Brazilian Journal of Poultry Science / v.8 / n.2 / 69 – 73.

AMMERMAN, C. B. 1995. In bioavailability of nutrients for animals. Academic Press. San Diego, CA. 4: 83-94.

ANGEL, R.; SAYLOR, W. W.; MITCHELL, A. D.; POWERS, W. y APPELEGATE, T. J. 2006. Effect of dietary phosphorus, phytase, and 25-hydroxycholecalciferol on broiler chicken bone mineralization, litter phosphorus, and processing yields. *Poult. Sci.* 85:1200-1211.

AOAC. 2005. Official methods of analysis. Quinceava edición. Association of official analytical chemists, Arlington, VA.

APPELEGATE, T. J.; ANGEL, R. y CLASSEN, H. L. 2003. Effect of dietary calcium, 25-hydroxycholecalciferol, or bird strain on small intestinal phytase activity in broiler chickens. *Poult. Sci.* 82:1140– 1148.

APPELEGATE, T. J. y LILBURN, M. S. 2002. Growth of the femur and tibia of a commercial broiler line. *Poult. Sci.* 81:1289-1294.

BAR, A.; RAZAPHKOVSKY, V.; VAX, E. y PLAVNIK, I. 2003a. Performance and bone development in broiler chickens given 25-hydroxycholecalciferol. *British Poultry Science* Volume 44, Number 2 (May 2003), pp. 224–233.

BAR, A.; SHINDER, D.; YOSEFI, S.; VAX, E. y PLAVNIK, I. 2003b. Metabolism and requirements for calcium and phosphorus in the fast-growing chicken as affected by age. *Brit. J. Nutr.* 2003; 89:51–60.

BARANOVA, D.; PESEK, L. y SALY, J. 2008. Mechanical properties of bones. *Folia veterinaria*, 52, 3-4: 168-173.

BOWMAN, A. B y RUSSELL, R. M. 2003. Conocimientos actuales sobre nutrición. Octava edición. Editorial Organización panamericana de la salud. 829 páginas.

BRADSHAW, R. H., KIRKDEN, R. D. y BROOM, D. M. 2002. A review of the aetiology and pathology of leg weakness in broilers in relation to welfare. *Avian Poultry Biology Reviews* 13: 45–103.

CAMPBELL, G. L. y BEDFORD, M. R. 1992. Enzyme applications for monogastric feeds: A review. *Can. J. Anim. Sci.* 72:449–466.

CAMPBELL, J. A.; MIGICOVSKY, B. B. y EMSLIE, A. R. G. 1945. Studies on the chick assay for vitamin D. I. Precision of tibia and toe ash as criteria for response. *Poult. Sci.* 24:3-7.

CHEEKE, R. P y DIERENFELD, S. E. 2010. *Comparative animal nutrition and metabolism.* CABI.

CHOU, S. H.; CHUNG, T. K. y YU, B. 2009. Effects of supplemental 25-hydroxycholecalciferol on growth performance, small intestinal morphology, and immune response of broiler chickens. *Poultry Science* 88 :2333–2341.

CHUNG, T. K.; RUTHERFURD, S. M.; THOMAS, D. V. y MOUGHAN, P. J. 2013. Effect of two microbial phytases on mineral availability and retention and bone mineral density in low-phosphorus diets for broilers. *British Poultry Science*, Vol. 54, No. 3: 362–373.

CHURCH, D. C.; POND, W. G. y POND, K. R. 2007. *Fundamentos de nutrición y alimentación de animales.* Segunda edición. Editorial Limusa. México. 635 páginas.

CLARKE, B. 2008. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 3: S131–S139.

COMBS, G. F. JR. 2008. *The vitamins, fundament aspects in nutrition and health.* Tercera edición. Editorial Elsevier. USA. 583 páginas.

COOK, M. E. 2000. Skeletal deformities and their causes: introduction. *Poultry science* 79:982–984.

COTO, C.; YAN, F.; CERRATE, S.; WANG, Z.; SACAKLI, P.; HALLEY, J. T.; WIERNUSZ, C. J.; MARTINEZ, A. y WALDROUP, P. W. 2008. Effects of dietary levels of calcium and nonphytate phosphorus in broiler starter diets on live performance, bone development and growth plate conditions in male chicks fed a corn-based diet. *International Journal of Poultry Science* 7 (7): 638-645.

CUNNINGHAM, G. J. y KLEIN, G. B. 2009. *Fisiología veterinaria*. Cuarta edición. Editorial Elsevier. España. 720 páginas.

DENBOW, D.M.; RAVINDRAN, V.; KORNEGAY, E.T.; YI, Z. y HULET, R.M. 1995. Improving phosphorus availability in soyabean meal for broilers by supplemental phytase. *Poult. Sci.* 74, 1831-1842.

DRIVER, J. P.; PESTI, G. M.; BAKALLI, R. I. y EDWARDS, H. M. 2005a. Phytase and 1 α -hydroxycholecalciferol supplementation of broiler chickens during the starting and growing/finishing phases. *Poultry Sci.* 84:1616–1628.

DRIVER, J. P.; PESTI, G. M.; BAKALLI, R. I. y EDWARDS, H. M. 2005b. Effects of calcium and nonphytate phosphorus concentrations on phytase efficacy in broiler chicks. *Poultry Science* 84:1406–1417.

DUNCAN, D. B. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11: 1–42.

EDWARDS, H. M. JR. 2002. Studies on the efficacy of cholecalciferol and derivatives for stimulating phytate utilization in broilers. *Poultry Science* 81: 1026–1031.

EYNARD, R. A.; VALENTICH, A. M. y ROVASIO, A. R. 2008. *Histología y embriología del ser humano: bases celulares y moleculares*. Cuarta edición. Edición médica panamericana. España. 660 páginas.

EYRE, D. R. 1996. Biochemical markers of bone turnover. Pages 114–118 in: *Primers on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, M. J. Favus, ed. Lippincot- Raven, New York, NY.

FIELD, R. A. 1999. Ash and calcium as measures of bone in meat and bone mixtures. *Meat Sci.* 55:255-264.

FIELD, R. A.; RILEY, M. L.; MELLO, F. C.; CORBRIDGE, M. H. y KOTULA, A. W. 1974. Bone composition in cattle, pigs, sheep and poultry. *J. Anim. Sci.* 39:493-499.

FRITTS, C. A., y WALDROUP, P. W. 2005. Comparison of Cholecalciferol and 25-Hydroxycholecalciferol in Broiler Diets Designed to Minimize Phosphorus Excretion. *J. Appl. Poult. Res.* 14:156–166.

GAL, I. B.; LÓPEZ, G. M.; MARTÍN, V. A. y PRIETO, M. J. 2007. Bases de la fisiología. Segunda edición. Editorial Tóbar. España. 623 páginas.

GARCIA, A. R. y DALE, N. M. 2006. Foot ash as a means of quantifying bone mineralization in chicks. *Journal app. Poult. Res.* 15:103-109.

GARCIA, M. Q.; EIKO, M. A; DO AMARAL, D.; OSPINA R.; PICOLI, P. y MANGILI, P. 2013. Use of Vitamin D₃ and its metabolites in broiler chicken feed on performance, bone parameters and meat quality. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* Vol. 26, No. 3 : 408-415.

GILLIS, M. B.; NORRIS, L. C. y HEUSER. G. F. 1954. Studies on the biological value of inorganic phosphates. *J. Nutr.* 52:115-12.

GODOY, S. y CHICCO, C. F. 2005. Utilización del fósforo fítico en la nutrición de rumiantes. *Revista Digital CENIAP HOY* N° 9.

HAN, J. C.; WANG, Y. L.; QU, H. X.; LIANG, F.; ZHANG, J. L.; SHI, C. X.; ZHANG, X. L.; LI, L.; XIE, Q.; WANG, C. L.; YAN, Y. Y.; DONG, X. S. y CHENG, Y. H. 2012. One alpha-hydroxycholecalciferol improves growth performance, tibia quality, and meat color of broilers fed calcium and phosphorus deficient diets. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* Vol. 25, No. 2: 267 – 271.

HEMME A.; SPARK, M.; WOLF, M.; PASCHERTZ, H. y KAMPHUES, J. 2005. Effects of different phosphorus sources in the diet on bone composition and stability (breaking strength) in broilers. *J. Anim. Physiol. and Anim. Nutr.* 89:129-133.

HERMES, R.; IGLESIAS, B. F.; AZCONA, J. O.; LOLI, G.; CHARIERE, M. V. y HERNANDEZ, J. M. 2013. Assess the efficacy of a phytase and 25-hydroxycholecalciferol (25-OHD₃) on mineral metabolism and performance of broilers fed a corn-soybean diet. Publicado por DSM Nutritional Products.

HESTER, P. Y.; SCHREIWEIS, M. A.; ORBAN, J. I.; MAZZUCO, H.; KOPKA, M. N.; LEDUR, M. C. y MOODY, D. E. 2004. Assessing bone mineral density in vivo: dual energy X-Ray absorptiometry. *Poultry Science* 83:215–221.

HURWITZ, S. 1964. Estimation of new phosphorus utilization by the “slope” method.. *Journal of nutrition* 84, 83-92

IOLI, G. 2013. Como seleccionar la fitasa correctamente- DSM Nutritional Products. IV Congreso CAENA- Agroindustria- Año 31- Número 128 (en línea). <http://www.caena.org.ar/pdf/revista128.pdf> (Citado 11 de febrero del 2015).

KARIMI, A.; BEDFORD, M. R.; SADEGHI, G. H.; GHOBADI, Z. 2011. Influence of dietary non-phytate phosphorous levels and phytase supplementation on the performance and bone characteristics of broilers. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* vol.13 no.1.

KESTIN, S. C.; KNOWLES, T. G.; TINCH, A. F. y GREGORY, N. G. 1992. The prevalence of leg weakness in broiler chickens and its relationship with genotype. *Vet. Rec.* 131:190–194.

KHALID, M. F.; HUSSAIN, M.; REHMAN, A. U.; SHAHZAD, M. A.; SHARIF, M. y RAHMAN, Z. U. 2013. Broiler performance in response to phytate and supplemented phytase. *Iranian Journal of Applied Animal Science* 3(1), 1-12.

KOCABAGLI, N. 2001. The effect of dietary phytase supplementation at different levels on tibial bone characteristics and strength in broilers. *Turk J Vet Anim Sci* 25 797-802.

KÖNIG, H. E. y LIEBICH, H. G. 2005. Anatomía de los animales domésticos: texto y atlas en color. Editorial médica panamericana. España. 304 páginas.

KORNEGAY, E. T. y YI, Z. 1999. Evaluation of response criteria for assessing biological availability of phosphorus supplements in broilers and turkeys. Pages 145-149 in Phytase in Animal Nutrition and Waste Management. BASF Reference Manual, Mount Olive, NJ.

LESKE, K. y COON, C. 2002. The development of feedstuff retainable phosphorus values for broilers. Poultry Science 81 (11): 1681-1693.

LIEM, A.; PESTI, A.; ATENCIO, A. y EDWARDS, JR., H. M. 2009. Experimental approach to optimize phytate phosphorus utilization by broiler chickens by addition of supplements. Poultry Science 88 :1655–1665.

MANUAL DE MANEJO DE LA LÍNEA COBB 500. 2012. Suplemento informativo de rendimiento y nutrición del pollo de engorde (en línea). http://www.cobb-vantress.com/docs/default-source/cobb-500_guides/cobb500_bpn_supp_spanish.pdf?sfvrsn=2 (Citado 29 de enero 2015).

MARTÍNEZ, P-P. D. 2012. Evaluación de un producto a base de aceite esencial de orégano sobre la integridad intestinal, incapacidad de absorción de nutriente y el comportamiento productivo de pollos de carne BB. Tesis Mag. Sc. Perú, Universidad Nacional Agraria la Molina de la Facultad de Zootecnia. 150 páginas.

McDONALD, P., EDWARDS, R. A., GREENHALGH, J. F. y MORGAN, C. A. 1999. Nutrición animal. Quinta edición. Editorial Acribia. Zaragoza 576 páginas.

McDOWELL, L. R. 2000. Vitamins in animal and human nutrition. Segunda edición. Editorial Iowa State University Press. USA. 793 páginas.

MCDOWELL, L. R. 2003. Minerals in animal and human nutrition. Segunda edición. Editorial Elsevier. Amsterdam. 644 páginas.

MÉNDEZ, J. 1998. Fitasas en avicultura. FEDNA. XIV Curso de Especialización (en línea). <http://www.etsia.upm.es/fedna.com> (Citado 30 de enero del 2015).

MEYER, G. B.; BABCOCK, S. W y SUNDE, M. L. 1968. An accurate *in vivo* technique for measuring bone mineral mass in chickens. J. Nutr. 96:195-205.

MITCHELL, R. D. y EDWARDS, H. M. 1996. Effects of phytase and 1,25-hydroxycholecalciferol on phytate utilization and the quantitative requirement for calcium and phosphorus in young broiler chickens. Poultry science. 75, 95-110.

MONTEAGUDO, M. D.; HERNANDEZ, E. R.; SECO, C.; GONZALES-RIOLA, J.; REVILLA, M.; VILLA, L. F. y RICO H. 1997. Comparison of the bone rousticity index and bone weight/bone length index with the results of bone densitometry and bone histomorphometry in experimental studies. Acta anat. 160:195-199.

MUHAMMAD, S. I.; ISMAIL, M.; ROZI MAHMUD, R. B.; MAHER, F. E. y ZUKI A. Z. 2013. Bone mass density estimation: Archimede's principle versus automatic X-ray histogram and edge detection technique in ovariectomized rats treated with germinated brown rice bioactives. Clinical Interventions in Aging 2013:8 1421–1431.

MUTUS, R.; KOCABAG, N.; ALP, M.; ACAR, N.; EREN, M. y GEZEN, S. 2006. The effect of dietary probiotic supplementation on tibial bone characteristics and strength in broilers. Poultry Science 85:1621–162

NRC. 1994. Nutrient requirements of poultry. Novena edición. National Academy Press, Washington, DC.

NRC. 2005. Mineral tolerance of animals, 2nd edn. National Academy of Sciences, Washington, DC.

ÑAUPAY, V. M. 2001. Efecto del fosfato dicalcico dihidratado y la disponibilidad biológica sobre el comportamiento productivo y mineralización ósea de pollos de carne. Tesis Mag. Sc. Perú, Universidad Nacional Agraria la Molina de la Facultad de Zootecnia. 77 páginas.

ONYANGO, E. M.; HESTER, P. Y.; STROSHINE, R. y ADEOLA, O. 2003. Bone densitometry as an indicator of percentage tibia ash in broiler chicks fed varying dietary calcium and phosphorus levels. *Poultry Science* 82:1787–1791.

ORBAN, J. I; ROLAND, D. A.; BRYANT, SR., M. M. y WILLIAMS, J. C. 1993. Factors influencing bone mineral content, density, breaking strength, and ash as response criteria for assessing bone quality in chickens. *Poult. Sci.* 72:437-446.

OVIEDO, R. E. 2009. Aspectos nutricionales que influyen sobre la incidencia de problemas de patas en pollos de engorde. FEDNA. XXV Curso de Especialización (en línea). <http://www.etsia.upm.es/fedna.com> (Citado 7 de marzo del 2015).

PALASTANGA, N.; FIELD, D. y SOAMES, R. 2007. Anatomía y movimiento humano. Estructura y funcionamiento. Primera edición. Editor service, S.L. España. 606 páginas.

PATTACINI, S. H.; SCOLES, G. E. y BRAUN, R. O. 2012. Digestibilidad aparente de nutrientes en cerdos alimentados con dietas compuestas por diferentes niveles de fitasas obtenidas de *Aspergillus oryzae*. Contaminación ambiental de los residuos orgánicos derivados. *Revista Argentina de Producción Animal* Vol 32 N° 2: 107-115.

PÉREZ, J. F. 2013. Fisiología digestiva y utilización de aditivos y nutrientes. FEDNA. XXIX Curso de Especialización.

PLUMSTEAD, P. W.; LEYTEM, A. B.; MAGUIRE, R. O.; SPEARS, J. W.; KWANYUEN, P. y BRAKE, J. 2008. Interaction of calcium and phytate in broiler diets. Effects on apparent prececal digestibility and retention of phosphorus. *Poultry Science* 87: 449-458.

POWELL, S.; BINDER, T. D. y SOUTHERN, B. 2011. Phytase supplementation improved growth performance and bone characteristics in broilers fed varying levels of dietary calcium. *Poultry Science* 90:604–608.

PRISBY, R.; MENEZES, T.; CAMPBELL, J.; BENSON, T.; SAMRAJ, E.; PEVZNER, I. Y WIDEMAN JR., R. F. 2014. Kinetic examination of femoral bone modeling in broilers. *Poultry Science* 93: 1122–1129.

PROSZKOWIEC, W. M. y ANGEL, R. 2013. Calcium and phosphorus metabolism in broilers: Effect of homeostatic mechanism on calcium and phosphorus digestibility. *J. Appl. Poult. Res.* 22: 609–627.

QUARANTELLI, A.; CACCHIOLO, A.; ROMANELLI, S.; RIGHI, F.; ALPIGIANI, I. y GABBI, C. 2007. Effects of different levels of dietary biotin on the performance and bone structure of broilers. *ITAL.J.ANIM.SCI.* VOL. 6, 5-17.

RATH, C. N.; HUFF, R. G.; HUFF, E. W. y BALOG, M. J. 2000. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. *Poultry Science* 79:1024–1032.

RAVINDRAN, V. 2010. Aditivos en alimentación animal: presente y futuro. XXVI Curso de especialización FEDNA.

RAVINDRAN, V.; BRYDEN, W. y KORNEGAY, E. T. 1995. Phytin: Occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poult. Avian Biol. Rev.* 6:125–143.

RAVINDRAN, V.; COWIESON, A. J. y SELLE, P. H. 2008. Influence of dietary electrolyte balance and microbial phytase on growth performance, nutriente utilization and excreta quality of broiler chickens. *Poultry Science* 87: 677-688.

REBOLLAR, P. G. y MATEOS, G. G. 1999. El fósforo en nutrición animal, necesidades, valoración de materias primas y mejora de la disponibilidad. FEDNA. XV Curso de Especialización (en línea). <http://www.etsia.upm.es/fedna.com> (Citado 15 de marzo del 2015).

RIENSENFELD, A. 1972. Metatarsal robusticity in bipedal rats. *Am.J. Phys. Anthropol.*, 40: 229–234.

RIENSENFELD, A. 1981. Age changes of bone size and mass in two strains of senescent rats. *Acta anat.* 109:64-69.

ROBERSON, K. D.; LEDWABA, M. F. y CHARBENEAU, R. A. 2005. Studies on the efficacy of twenty-five-hydroxycholecalciferol to prevent tibial dyschondroplasia in ross broilers fed marginal calcium to market age. *International Journal of Poultry Science* 4 (2): 85-90.

ROBISON, I. C.; RICE, M.; MAKAGON, M. M. y KARCHER, M. D. 2015. Duck gait: relationship to hip angle, bone ash, bone density, and morphology. *Poultry Science* 94:1060–1067.

RODEHUTSCORD, M. 2011. Avances en la valoración del fósforo en aves. FEDNA. XXVII Curso de Especialización.

ROSS, H. M. y PAWLINA, W. 2008. *Histología, texto y atlas color con biología celular y molecular*. Quinta edición. Edición médica panamericana. España. 974 páginas.

RUTHERFURD, S. M.; CHUNG, T. K.; THOMAS, D. V.; ZOU, M. L. y MOUGHAN, P. J. 2012. Effect of a novel phytase on growth performance, apparent metabolizable energy, and the availability of minerals and amino acids in a low-phosphorus corn-soybean meal diet for broilers. *Poultry science* 91: 1118–1127.

RUTTEN, M.; LETERRIER, C.; CONSTANTIN, P.; Klaus, R.; EITER y BESSEI, W. 2002. Bone development and activity in chickens in response to reduced weight-load on legs. *Anim. Res.* 51: 327–336.

SANTOS, T. T. 2012. Phytate: anti-nutrient for poultry and swine. *Feedstuffs*, 84:1-3.

SANTOS, F. R.; HRUBY, M.; PIERSON, E. E. M.; REMUS, J. C. y SAKOMURA, N. K. 2008. Effect of phytase supplementation in diets on nutrient digestibility and performance in broiler chicks. *J. Appl. Poult. Res.* 17:191–201

SAS INSTITUTE.1999.SAS user's guide: statistics, versión 8. SAS Institute, Inc. Cary.NC

SEEDOR, J. G.; QUARTUCCIO, H. A. y THOMPSON, D. D. 1991. The biophosphonate alendronate (MK - 217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. *J. Bone Miner. Res.* 6:339-346.

SELLE, H. P.; COWIESON, J. A. y RAVINDRAN, V. 2009. Consequences of calcium interactions with phytate and phytase for poultry and pigs. *Livestock science* 124 (2009) 126-141.

SELLE, H. P. y RAVINDRAN, V. 2006. Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology* 135: 1-41.

SHASTAK, Y. 2012. Evaluation of the availability of different mineral phosphorus sources in broilers. Tesis para doctorado. Institute of Animal Nutrition University of Hohenheim.

SHIM, M. Y.; PARR, C. y PESTI, G. M. 2011. The effects of dietary fluoride on growth and bone mineralization in broiler chicks. *Poultry Science* 90 :1967-1974.

SHIMADA, M. A. 2009. Nutrición animal. Segunda edición. Editorial Trillas. México. 397 páginas.

SHIRLEY, R. B. y EDWARDS, H. M. 2003. Graded levels of phytase past industry standards improves broiler performance. *Poultry Science* 82: 671-680.

SOARES DA SILVA, A., MARTINEZ, B. A., ARAÚJO, S., QUIRINO, L., JUNQUEIRA, O. M. y ROQUE, R. 2003. Desarrollo óseo de pollos de carne que consumen diferentes niveles de aminoácidos y de calcio en la fase inicial de cría. *Int. J. Morphol.*, 21(2):101-106.

SUTTLE, N. 2010. Mineral nutrition of livestock. Cuarta edición. Editorial CABI. USA. 587 páginas.

TAMIM, N. y ANGEL, R. 2003. Phytate phosphorus hydrolysis as influenced by dietary calcium and micro-mineral source in broiler diets. *J. Agric. Food. Chem.* 51: 4687-4693.

TAMIM, M. N.; ANGEL, R. y CHRISTMAN, M. 2004. Influence of dietary calcium and phytase on phytate phosphorus hydrolysis in broiler chickens. *Poultry Science* 83: 1358-1367.

UNDERWOOD, E. J. y SUTTLE, N. F. 2003. Los minerales en la nutrición del Ganado. Tercera edición. Editorial Acribia, S. A. España. 637 páginas.

VITTI, M. S. y KEBREAB, E. 2010. Phosphorus and calcium utilization and requirements in farm animals. Primera edición. CAB International. USA. 178 páginas.

VIVEROS, A.; BRENES, A.; ARIJA, I. y CENTENO C. 2002. Effects of microbial phytase supplementation on mineral utilization and serum enzyme activities in broiler chicks fed different levels of phosphorus. *Poult. Sci.* 81:1172–1183.

WARD, N. E. 2004. Es necesario considerar la absorción de la vitamina D₃. *Feedstuffs*, volumen 76, numero 4.

WELSCH, U. 2008. Histología. Segunda edición. Editorial medica panamericana. España. 676 páginas.

WHITHEAD, C. C. y FLEMING, R. H. 2000. Osteoporsis in cage layers. *Poultry Science*; 78:1033-1041.

WODZINSKI, R. J. y ULLAH, A. H. 1996. Phytase in: advances in applied microbiology, vol. 42, Academic Press, Inc., pp. 263-302.

WOYENGO, T. A. y NYACHOTI, C. M. 2013. Review: anti-nutritional effects of phytic acid in diets for pigs and poultry current knowledge and directions for future research. *Can. J. Anim. Sci.* (2013) 93: 9-21.

YAN, F.; ANGEL, R.; ASHWELL, C.; MITCHELL, A. y CHRISTMAN, M. 2005. Evaluation of the broiler's ability to adapt to an early moderate deficiency of phosphorus and calcium. *Poultry Science* 84 (8):1232-1241.

YAN, F.; KERSEY, J. H.; FRITTS, C. A. y WALDROUP, P. W. 2006. Effect of phytase supplementation on the calcium requirement of broiler chicks. *Int. Journal poultry science*. 5, 112-120.

YAN, F. y WALDROUP, P. W. 2006. Nonphytate phosphorus requirement and phosphorus excretion of broiler chicks fed diets composed of normal or high available phosphate corn as influenced by phytase supplementation and vitamin D source. *Int. J. Poult. Sci.* 5, 683-228.

ZHOU, J. P.; YANG, Z. B.; YANG, W. R.; WANG, X. Y.; JIANG, S. Z. y ZHANG, G. G. 2008. Effects of a new recombinant phytase on the performance and mineral utilization of broilers fed phosphorus-deficient diets. *J. Appl. Poult. Res.* 17:331–339.

VIII. ANEXOS

Anexo I: Ficha técnica de la enzima fitasa comercial

Descripción:

la fitasa comercial hidroliza los fitatos, liberando fosforo, calcio y otros nutrientes como energía.

Composición: 6-fitasa, expresada por *Aspergillus oryzae*. Actividad mínima: 10'000 FTU/g.

Dosis recomendada por tonelada de alimento: pollos: 100 a 200g.

Para el uso de la fitasa comercial en uno de los tratamientos, las dietas fueron reformuladas con uso de la matriz nutricional del producto, que se presenta a continuación:

Etapa	1 a 21 días
Matriz para P disponible (%)	1460
Matriz para Ca (%)	1776

Dosis (ppm): 100

Dosis (FTU/Kg): 1000

Anexo II: Ficha técnica de la vitamina 25-OHD₃ comercial

Descripción:

La 25-OHD₃ es un paso adelante en el metabolismo de la vitamina D₃. Ello evita el primer paso crítico de la hidroxilación en el hígado y llega al torrente sanguíneo de forma rápida.

Dosis recomendada por tonelada de alimento: pollos: 200g.

Para el uso de la vitamina 25-OHD₃ comercial en uno de los tratamientos, las dietas fueron reformuladas con uso de la matriz nutricional del producto, que se presenta a continuación:

Etapa	1 a 21 días
Matriz para P disponible (%)	250
Matriz para Ca (%)	500

Anexo III: Requerimientos nutricionales para pollos de carne Cobb-500 (2012).

Nutrientes	Inicio	Crecimiento
	0-10 días	11-22 días
E. Metabolizable (Kcal/Kg)	3035	3108
Proteína %	21-22	19-20
Lisina total, %	1.32	1.19
Lisina digestible	1.18	1.05
Metionina total, %	0.50	0.48
Metionina + Cistina total,%	0.98	0.89
Treonina, %	0.86	0.78
Triptófano, %	0.20	0.19
Sodio,%	0.16- 0.23	0.16- 0.23
Calcio, %	0.90	0.84
Fósforo disponible, %	0.45	0.42
Vitamina A, MIU	13	10
Vitamina D ₃ , MIU	5	5
Vitamina E, KIU	80	50
Vitamina K, g	3	3
Vitamina B12, mg	20	15
Biotina, mg	150	120
Colina, mg	500	400
Acido fólico, g	2	2

FUENTE: Manual de pollos de carne Cobb 500, 2012

Anexo IV: Registro sobre los pesos vivos (g/pollo) y ganancias de peso (g/pollo) por tratamiento con sus respectivas repeticiones.

TRATAMIENTO/ REPETICIÓN		PESO (g/pollo)				Ganancia de peso (g/pollo)			
		Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	(0-7 d)	(8-14d)	(15-21d)	Total (0-21d)
T1	1	49.70	189.20	509.50	1020.70	139.50	320.30	511.20	971.00
	2	47.30	178.70	489.20	987.00	131.40	310.50	497.80	939.70
	3	48.30	174.40	482.20	947.90	126.10	307.80	465.70	899.60
	4	48.60	179.20	485.20	958.30	130.60	306.00	473.10	909.70
	5	48.00	182.70	483.80	949.20	134.70	301.10	465.40	901.20
Promedio (T1)		48.38	180.84	489.98	972.62	132.46	309.14	482.64	924.24
T2	1	48.20	179.20	496.10	931.80	131.00	316.90	435.70	883.60
	2	47.20	187.10	498.20	1003.40	139.90	311.10	505.20	956.20
	3	48.70	180.80	501.80	1016.50	132.10	321.00	514.70	967.80
	4	47.90	181.90	489.30	965.50	134.00	307.40	476.20	917.60
	5	48.80	188.50	506.70	976.00	139.70	318.20	469.30	927.20
Promedio (T2)		48.16	183.50	498.42	978.64	135.34	314.92	480.22	930.48
T3	1	49.20	173.10	490.70	985.40	123.90	317.60	494.70	936.20
	2	48.90	177.00	480.20	935.70	128.10	303.20	455.50	886.80
	3	48.60	178.50	488.10	945.80	129.90	309.60	457.70	897.20
	4	51.90	191.40	517.70	1028.60	139.50	327.70	510.90	976.70
	5	47.60	184.20	489.30	979.50	136.60	305.10	490.20	931.90
Promedio (T3)		49.24	180.84	493.20	975.00	131.60	312.64	481.80	925.76
T4	1	49.20	193.00	499.80	982.70	143.80	306.80	482.90	933.50
	2	48.50	184.90	488.63	978.00	136.40	303.73	489.38	929.50
	3	48.50	194.40	510.60	1005.80	145.90	316.20	495.20	957.30
	4	49.40	190.00	505.70	1000.40	140.60	315.70	494.70	951.00
	5	47.00	182.38	483.38	965.30	135.38	301.00	481.93	918.30
Promedio (T4)		48.52	188.94	497.62	986.44	140.42	308.69	488.82	937.92

Anexo V: Registro sobre los consumos de alimentos para cada tratamiento con sus respectivas repeticiones.

TRATAMIENTO/ REPETICIÓN		CONSUMO (g/pollo)			CONSUMO TOTAL 0-21 d (g/pollo)
		(0-7 d)	(8-14d)	(15-21d)	
T1	1	143.70	414.60	702.20	1260.50
	2	129.10	409.10	681.40	1219.60
	3	131.70	397.50	663.80	1193.00
	4	130.90	394.70	664.90	1190.50
	5	131.90	400.40	680.20	1212.50
Promedio (T1)		133.46	403.26	678.50	1215.22
T2	1	129.00	401.90	662.80	1193.70
	2	136.20	407.40	679.50	1223.10
	3	135.20	408.80	688.30	1232.30
	4	131.30	393.40	668.30	1193.00
	5	133.40	405.30	651.60	1190.30
Promedio (T2)		133.02	403.36	670.10	1206.48
T3	1	128.00	393.70	656.60	1178.30
	2	127.60	399.00	651.30	1177.90
	3	125.70	402.40	693.70	1221.80
	4	139.00	418.80	695.40	1253.20
	5	139.50	394.20	678.20	1211.90
Promedio (T3)		131.96	401.62	675.04	1208.62
T4	1	147.40	398.60	667.10	1213.10
	2	136.60	389.98	708.00	1234.58
	3	145.20	422.10	692.90	1260.20
	4	140.50	420.00	689.20	1249.70
	5	135.00	408.38	680.13	1223.50
Promedio (T4)		140.94	407.81	687.47	1236.22

Anexo VI: Registro sobre las conversiones alimenticias para cada tratamiento con sus respectivas repeticiones.

TRATAMIENTO/ REPETICIÓN		CONVERSIÓN ALIMENTICIA			C. A ACUMULADO (0-21d)
		(0-7 d)	(8-14d)	(15-21d)	
T1	1	1.03	1.29	1.37	1.298
	2	0.98	1.32	1.37	1.298
	3	1.04	1.29	1.43	1.326
	4	1.00	1.29	1.41	1.309
	5	0.98	1.33	1.46	1.345
Promedio (T1)		1.01	1.30	1.41	1.315
T2	1	0.98	1.27	1.52	1.351
	2	0.97	1.31	1.35	1.279
	3	1.02	1.27	1.34	1.273
	4	0.98	1.28	1.40	1.300
	5	0.95	1.27	1.39	1.284
Promedio (T2)		0.98	1.28	1.40	1.297
T3	1	1.03	1.24	1.33	1.259
	2	1.00	1.32	1.43	1.328
	3	0.97	1.30	1.52	1.362
	4	1.00	1.28	1.36	1.283
	5	1.02	1.29	1.38	1.300
Promedio (T3)		1.00	1.29	1.40	1.306
T4	1	1.03	1.30	1.38	1.300
	2	1.00	1.28	1.45	1.328
	3	1.00	1.33	1.40	1.316
	4	1.00	1.33	1.39	1.314
	5	1.00	1.36	1.41	1.332
Promedio (T4)		1.00	1.32	1.41	1.318

Anexo VII: Registro sobre mortalidad (N° de pollos) para cada tratamiento con sus respectivas repeticiones.

TRATAMIENTO/ REPETICIÓN		MORTALIDAD (N° de pollos)
T1	1	0
	2	0
	3	0
	4	0
	5	0
Total (T1)		0
T2	1	0
	2	0
	3	0
	4	0
	5	0
Total (T2)		0
T3	1	0
	2	0
	3	0
	4	0
	5	0
Total (T3)		0
T4	1	0
	2	0
	3	0
	4	0
	5	2
Total (T4)		2

Anexo VIII: Registro sobre el largo (cm) y peso (g) de la tibia derecha para cada tratamiento.

Para cada tratamiento se escogió al azar 12 pollos en el día 21 de edad.

POLLO	LARGO (cm)				PESO (g)			
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
1	7.050	6.965	6.790	6.760	2.755	2.754	2.638	2.470
2	7.160	6.620	6.290	6.875	2.906	2.390	2.167	2.489
3	6.780	6.910	6.735	6.900	2.784	2.583	2.347	2.605
4	6.645	6.800	6.350	7.065	2.128	2.490	2.155	2.601
5	6.600	7.060	6.800	6.630	2.789	2.624	2.519	2.397
6	6.515	6.635	6.630	6.570	2.458	2.478	2.044	2.160
7	6.425	6.890	6.680	6.440	2.163	2.377	2.228	1.951
8	6.810	6.480	6.600	6.970	2.647	2.085	2.237	2.638
9	6.720	6.510	6.630	6.620	2.527	2.065	2.244	2.244
10	6.360	6.850	6.710	7.080	2.249	2.107	2.325	2.681
11	6.700	6.610	6.545	6.775	2.795	2.137	2.236	2.620
12	6.730	6.860	6.380	6.720	2.135	2.242	1.885	2.432
PROMEDIO	6.708	6.766	6.595	6.784	2.528	2.361	2.252	2.441

Anexo IX: Registro sobre el volumen (ml) y densidad (g/ml) de la tibia derecha para cada tratamiento.

Para cada tratamiento se escogió al azar 12 pollos en el día 21 de edad.

POLLO	VOLUMEN (ml)				DENSIDAD (g/ml)			
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
1	2.0	2.5	2.8	2.1	1.377	1.102	0.942	1.176
2	3.0	2.2	2.5	2.2	0.969	1.086	0.867	1.131
3	2.8	2.5	3.0	2.3	0.994	1.033	0.782	1.133
4	2.0	2.5	2.0	3.0	1.064	0.996	1.077	0.867
5	3.0	2.5	3.0	2.5	0.930	1.050	0.840	0.959
6	2.2	2.2	2.0	2.0	1.117	1.126	1.022	1.080
7	2.0	2.1	2.8	2.0	1.082	1.132	0.796	0.976
8	2.5	1.9	2.0	2.0	1.059	1.097	1.118	1.319
9	3.0	2.0	2.5	2.2	0.842	1.032	0.898	1.020
10	2.3	2.1	3.0	3.0	0.978	1.003	0.775	0.894
11	3.0	2.0	2.5	2.8	0.932	1.068	0.895	0.936
12	2.0	2.0	2.0	2.2	1.067	1.121	0.942	1.105
PROMEDIO	2.483	2.208	2.508	2.358	1.03	1.07	0.91	1.05

Anexo X: Registro sobre el diámetro de la diáfisis (cm) de la tibia derecha para cada tratamiento.

Para cada tratamiento se escogió al azar 12 pollos en el día 21 de edad.

POLLO	DIÁMETRO DE LA DIÁFISIS (cm)											
	T1			T2			T3			T4		
	DLL	DCC	\bar{X}	DLL	DCC	\bar{X}	DLL	DCC	\bar{X}	DLL	DCC	\bar{X}
1	0.620	0.610	0.615	0.720	0.670	0.695	0.705	0.730	0.718	0.620	0.610	0.615
2	0.665	0.635	0.650	0.600	0.620	0.610	0.710	0.660	0.685	0.670	0.650	0.660
3	0.735	0.710	0.723	0.650	0.630	0.640	0.750	0.680	0.715	0.700	0.625	0.663
4	0.630	0.580	0.605	0.650	0.610	0.630	0.650	0.610	0.630	0.660	0.650	0.655
5	0.725	0.705	0.715	0.700	0.635	0.668	0.640	0.610	0.625	0.705	0.645	0.675
6	0.665	0.630	0.648	0.640	0.625	0.633	0.580	0.575	0.578	0.675	0.660	0.668
7	0.620	0.610	0.615	0.700	0.645	0.673	0.660	0.620	0.640	0.620	0.565	0.593
8	0.680	0.640	0.660	0.620	0.575	0.598	0.570	0.575	0.573	0.700	0.670	0.685
9	0.690	0.610	0.650	0.610	0.560	0.585	0.640	0.605	0.623	0.620	0.570	0.595
10	0.640	0.620	0.630	0.560	0.545	0.553	0.660	0.645	0.653	0.710	0.650	0.680
11	0.770	0.680	0.725	0.650	0.615	0.633	0.635	0.590	0.613	0.730	0.690	0.710
12	0.580	0.565	0.573	0.640	0.575	0.608	0.585	0.550	0.568	0.640	0.610	0.625
Promedio	0.668	0.633	0.651	0.645	0.609	0.627	0.649	0.621	0.635	0.671	0.633	0.652

Diámetros latero-lateral (DLL) y cráneo-caudal (DCC) de la diáfisis en la mitad de la longitud del hueso

Anexo XI: Registro sobre la cantidad de ceniza (%), calcio (%) y fósforo (%) de la tibia izquierda para cada tratamiento.

Para cada tratamiento se escogió al azar 12 pollos en el día 21 de edad. De los cuales solo se escogió 10 muestras para el análisis químico.

POLLOS	CENIZA, %				CALCIO, %				FÓSFORO, %			
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
1	43.73	43.82	41.90	-	38.35	37.12	38.98	-	17.59	16.71	16.74	-
2	45.09	-	43.52	-	36.79	-	37.94	-	17.07	-	17.89	-
3	43.01	41.47	44.49	45.18	35.57	36.91	37.40	34.99	17.44	16.79	17.90	17.72
4	45.13	45.92	45.79	42.55	36.00	36.59	37.14	36.79	17.28	17.70	16.72	16.55
5	43.38	-	-	43.75	37.99	-	-	36.99	17.55	-	-	17.81
6	46.02	42.34	41.54	39.70	38.17	35.99	36.53	36.19	17.37	17.36	16.55	17.79
7	44.93	43.21	45.29	40.86	36.36	35.99	37.58	36.39	17.40	17.32	17.29	17.82
8	43.66	42.05	41.28	43.09	37.99	36.00	37.08	37.39	17.38	16.71	16.84	17.79
9	-	44.64	43.36	45.27	-	35.39	36.78	38.38	-	17.55	17.52	18.02
10	47.04	40.76	41.51	41.11	37.40	35.59	39.78	36.59	17.27	17.38	17.55	17.42
11	44.59	40.13	45.54	41.44	36.96	37.60	38.38	36.19	17.71	17.77	17.91	17.47
12	-	44.67	-	41.06	-	36.80	-	38.59	-	17.60	-	17.62
Promedio	44.66	42.90	43.42	42.40	37.16	36.40	37.76	36.85	17.41	17.29	17.29	17.60

Anexo XII: Registro sobre el índice de Seedor (mg/mm) de la tibia derecha para cada tratamiento.

POLLO	ÍNDICE DE SEEDOR (mg/mm)			
	T1	T2	T3	T4
1	39.071	39.5391	38.845	36.534
2	40.592	36.0997	34.455	36.201
3	41.065	37.3835	34.840	37.755
4	32.027	36.6103	33.931	36.821
5	42.262	37.1714	37.044	36.154
6	37.734	37.3459	30.824	32.872
7	33.665	34.5007	33.353	30.298
8	38.863	32.1759	33.891	37.848
9	37.600	31.7127	33.843	33.893
10	35.368	30.7562	34.642	37.873
11	41.713	32.3283	34.170	38.667
12	31.721	32.6880	29.539	36.189
Promedio	37.640	34.859	34.115	35.925

Anexo XIII: Registro sobre el índice de Quetelet (mg/mm^2) de la tibia derecha para cada tratamiento.

POLLO	ÍNDICE DE QUETELET ($\text{mg}/(\text{mm})^2$)			
	T1	T2	T3	T4
1	5.542	5.677	5.721	5.404
2	5.669	5.453	5.478	5.266
3	6.057	5.410	5.173	5.472
4	4.820	5.384	5.343	5.212
5	6.403	5.265	5.448	5.453
6	5.792	5.629	4.649	5.003
7	5.240	5.007	4.993	4.705
8	5.707	4.965	5.135	5.430
9	5.595	4.871	5.105	5.120
10	5.561	4.490	5.163	5.349
11	6.226	4.891	5.221	5.707
12	4.713	4.765	4.630	5.385
Promedio	5.610	5.151	5.171	5.292

Anexo XIV: Registro sobre el índice de Robusticidad ($\text{cm}/\text{g}^{1/3}$) de la tibia derecha para cada tratamiento.

POLLO	ÍNDICE DE ROBUSTICIDAD ($\text{cm}/\text{g}^{1/3}$)			
	T1	T2	T3	T4
1	5.029	4.969	4.914	5.001
2	5.017	4.952	4.861	5.073
3	4.819	5.036	5.068	5.015
4	5.166	5.017	4.916	5.137
5	4.689	5.118	4.998	4.954
6	4.827	4.903	5.225	5.083
7	4.968	5.163	5.115	5.154
8	4.923	5.072	5.047	5.044
9	4.934	5.113	5.064	5.057
10	4.854	5.343	5.065	5.096
11	4.757	5.132	5.005	4.915
12	5.227	5.241	5.165	4.997
Promedio	4.934	5.088	5.037	5.044