



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE
LA SALUD ANIMAL.

“Efecto de los minerales traza orgánicos sobre el comportamiento productivo, calidad de huevo y respuesta inmune en gallinas Bovans White en postura”.

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
**MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SAUD
ANIMAL**

PRESENTA:
DAVID RAMOS VIDALES.

Tutor:
ERNESTO ÁVILA GONZÁLEZ (FMVZ-UNAM)

Comité Tutor:
GABRIELA GUADALUPE GÓMEZ VERDUZCO (FMVZ-UNAM)
JUAN CARLOS DEL RÍO GARCÍA (FES CUAUTITLÁN-UNAM)

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

Enero 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria

A mi Familia, amigos y todos aquellos que han formado parte de mi vida y me han permitido ser parte de la suya.

A la memoria Sarahí Donajy Ramírez Estrada, gran amiga y colega.

Agradecimientos

A la UNAM y a la FMVZ es un orgullo haber sido formado en sus aulas.

A todo el personal académico del CEIEPAv especialmente al Doctor Ernesto Ávila González por ser un excelente tutor, profesor, guía y ejemplo a seguir durante toda mi formación profesional, al Doctor Arturo Cortes y al Doctor Benjamín Fuente por haberme obsequiado sus enseñanzas y conocimientos en avicultura y en la conducción de pruebas experimentales.

A CONACyT por el estímulo económico brindado por el programa de posgrado.

Al laboratorio DSM por su apoyo, facilidades y financiamiento para la elaboración del experimento, en especial al Doctor Sergio Fernández y al Ingeniero Silvestre Charraga que en todo momento estuvieron pendientes de la prueba.

A mi comité tutor, Doctora Gabriela Gómez y Doctor Juan Carlos del Río, que tan amablemente me han asesorado y acompañado durante toda la Maestría; y a la Doctora Silvia Carrillo por sus observaciones en la edición final de la tesis.

A Aida, has sido un gran motivo de inspiración para dar lo mejor de mí y de verdad que tu apoyo se hace sentir.

A Viridiana por el apoyo que me has brindado durante estos años dentro y fuera de la granja, muchas gracias por tu amistad.

A Jorge Miguel, Óscar y Monse, así como los chicos de Servicio Social y Estancias del CEIEPAv que me apoyaron antes, durante y después de la fase experimental.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue comparar el efecto de la adición de Carbo-Amino-Fosfo-Quelatos (CAFQ) y su reducción en 30% con respecto a sales inorgánicas (MTI) y Complejos Metal Aminoácido (CMA) sobre variables productivas, calidad de huevo, vida de anaquel, resistencia de la tibia a la fractura y respuesta inmune de gallinas en postura. Se utilizaron 480 gallinas Bovans White de 60 semanas de edad asignadas aleatoriamente en 4 tratamientos con 10 réplicas de 12 aves cada una. Los tratamientos consistieron en: T1 (100% MTI), T2 (100% CAFQ), T3 (70% CAFQ) y T4 (MTI+CMA). Las aves fueron alimentadas con dietas base sorgo-pasta de soya durante 14 semanas. Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza univariado para un diseño completamente aleatorizado y un diseño de mediciones repetidas, se utilizaron contrastes ortogonales para la comparación de medias. Se utilizó un modelo de regresión para las unidades Haugh (UH) como función de los días de almacenamiento en temperatura ambiente y refrigeración. No se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos para porcentaje de postura, peso de huevo, consumo de alimento, masa de huevo, índice de conversión y peso del ave, ni para porcentaje de huevo sucio, roto y fáfara, UH, color de la yema, grosor y resistencia del cascarón a la fractura ($p>0.05$). Los tratamientos fueron similares para resistencia de la tibia a la fractura, títulos de anticuerpos, respuesta a hipersensibilidad cutánea por basófilos y hemograma ($p>0.05$). Se observó un efecto del tiempo y las condiciones de almacenamiento sobre las UH, existiendo menor pérdida en refrigeración ($p<0.05$). Las aves alimentadas con CAFQ (independientemente de la dosis) presentaron un desempeño similar a aquellas alimentadas con MTI y con CMA *on top*. En promedio los tratamientos suplementados con minerales traza orgánicos (T2, T3 y T4) presentaron 5% más resistencia del cascarón a la fractura que el adicionado con MTI. Los resultados de este estudio sugieren la posibilidad de disminuir las inclusiones de minerales traza en dietas prácticas con el empleo de fuentes con mayor biodisponibilidad que reducen el desperdicio y consecuentemente aminoran el impacto ambiental ligado al uso de MTI como son los CAFQ.

Palabras Clave: minerales traza, minerales orgánicos, quelatos gallinas de postura, calidad de huevo, respuesta inmune.

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the effect of the addition of Carbo-Amine-Phospho-Chelates (CAPC) and its reduction by 30% regarding to inorganic salts (ITM) and Metal Amino Acid Complex (MAAC) on layer performance, egg quality, egg store time, tibia breaking strength and immune response. 480 Bovans White laying hens were randomly allocated to 4 treatments of 10 replicates with 12 hens each. Treatments were as follow: T1 (100% ITM), T2 (100% CAPC), T3 (70% CAPC) and T4 (ITM+MAAC). Birds were fed with sorghum-soybean meal basal diets during 14 weeks. Data were analyzed using a one-way ANOVA to a completely randomized design and a repeated measures design, orthogonal contrasts were used to the mean comparisons. A regression model was applied to the Haugh units (HU) as function of storage days in room temperature and refrigeration. No statistical differences were found between treatments for egg production, egg weight, feed intake, egg mass production, feed conversion ratio and body weight, neither for dirty, cracked and shell-less eggs, HU, egg yolk color, egg thickness and egg breaking strength ($p>0.05$). Treatments were similar for tibia breaking strength, antibody titers, cutaneous basophil hypersensitivity test and blood count ($p>0.05$). An effect of time and storage conditions was observed on HU, lower loss was observed in refrigeration temperature ($p>0.05$). Birds fed with CAPC (regardless of the dose) showed similar performance compared with those fed with ITM and *on top* MAAC. On average treatments supplemented with organic trace minerals (T2, T3 and T4) showed 5% more egg breaking strength than treatment added with ITM. The results of this study suggest the possibility of decreasing trace minerals inclusions in practical diets with the employment of high bioavailability sources that reduce waste and consequently lessen the environment impact related with ITM such as CAPC.

Key Words: trace minerals, organic minerals, laying hens, egg quality, immune response.

Índice

	<i>Página</i>
INTRODUCCIÓN	1
Minerales Traza.....	1
Funciones	2
Necesidades y Recomendaciones de Inclusión.....	7
Biodisponibilidad.....	7
Factores que afectan la Biodisponibilidad	8
Biodisponibilidad Relativa	9
Minerales Traza Inorgánicos.....	9
Fuentes	9
Fisiología Digestiva y Metabolismo.	10
Minerales Traza Orgánicos	15
Fuentes	15
Fisiología Digestiva y Metabolismo.	17
Uso de MTO en Gallinas en Postura.....	20
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	24
MATERIAL Y MÉTODOS	25
Manejo de los animales y dietas.....	25
Variables productivas	26
Calidad de huevo y Vida de anaquel	26
Resistencia de la tibia a la fractura.....	27
Evaluación de la respuesta inmune humoral	27
Evaluación de la respuesta inmune celular.....	28
Análisis Estadístico	29
RESULTADOS	31
Variables productivas	31
Calidad de huevo	32
Resistencia de la Tibia a la Fractura	33
Vida de anaquel.....	33

Respuesta Inmune.....	33
DISCUSIÓN.....	35
Variables productivas	35
Calidad de Huevo.....	37
Vida de Anaquel.....	38
Resistencia de la Tibia a la Fractura	40
Respuesta Inmune.....	40
CONCLUSIONES.....	42
REFERENCIAS	43
FIGURAS	53
CUADROS	62

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Mecanismo de Absorción del Hierro.	53
Figura 2. Mecanismo de Absorción del Cinc.	54
Figura 3. Mecanismo de Absorción del Cobre.	55
Figura 4. Mecanismo de Absorción del Manganeso.	56
Figura 5. Mecanismo de Absorción del Selenio.	57
Figura 6. Mecanismo de Absorción del Yodo.	58
Figura 7. Estructura química de los complejos metálicos, quelatos, sales metálicas y fuentes orgánicas de selenio.	59
Figura 8. Unidades Haugh como función del periodo de almacenamiento en refrigeración (4°C).	60
Figura 9. Unidades Haugh como función del periodo de almacenamiento a temperatura ambiente.	61

Lista de Cuadros

	Página
Cuadro 1. Necesidades y Toxicidad de MT para pollo de engorda y gallina en postura de acuerdo al National Research Council (1994).	62
Cuadro 2. Recomendaciones de inclusión en dietas prácticas de MT para pollo de engorda.	63
Cuadro 3. Recomendaciones de inclusión en dietas prácticas de MT para gallinas en postura blancas.	64
Cuadro 4. Principales fuentes de MTI utilizadas en avicultura y su Biodisponibilidad Relativa.	65
Cuadro 5. Principales fuentes de MTO utilizadas en avicultura y su Biodisponibilidad Relativa.	66
Cuadro 6. Composición y análisis calculado de la dieta basal para gallinas en postura Bovans Blancas de 60 semanas de edad.	67
Cuadro 7. Composición de las premezclas utilizadas en las dietas para gallinas en postura Bovans Blancas de 60 semanas de edad.	68
Cuadro 8. Resultados de los parámetros productivos de gallinas Bovans Blancas obtenidos de la semana 60 a 72 de edad.	69
Cuadro 9. Resultados de la prueba de t para la comparación de la media general de algunas variables productivas contra los valores establecidos por el manual de gallinas Bovans Blancas de 60 a 72 semanas de edad.	70
Cuadro 10. Resultados de huevo sucio, roto-fárfara, y calidad de huevo de gallinas Bovans Blancas obtenidos de la semana 60 a 72 de edad.	71
Cuadro 11. Resultados de resistencia del cascarón y de la tibia a la fractura de gallinas Bovans Blancas obtenidos de las semanas 60 a 72 de edad.	72
Cuadro 12. Efecto del tratamiento, tiempo y su interacción sobre la vida de anaquel del huevo bajo dos temperaturas de almacenamiento.	73
Cuadro 13. Efecto del tratamiento, tiempo y su interacción sobre los títulos de anticuerpos contra la ENC mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación.	73
Cuadro 14. Resultados de la prueba de hipersensibilidad cutánea por basófilos (HCB) y cantidad de IgA en contenido intestinales obtenida mediante la prueba de ELISA.	74
Cuadro 15. Resultados obtenidos en el hemograma de gallinas en postura Bovans Blancas de 76 Semanas de edad.	75

Abreviaturas

BD	Biodisponibilidad Relativa
CAFQ	Carbo-Amino-Fosfo-Quelato
CMA	Complejos Metal Aminoácidos
CEIEPA _v	Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola
Cu	Cobre
DB	Dieta Basal
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Fe	Hierro
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
g	Gramos
HCB	Prueba de Hipersensibilidad Cutánea por Basófilos
HI	Prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación
I	Yodo
Kcal/Kg	Kilocalorías por Kilogramo
ml	Mililitro
µg	Microgramo
mg	Miligramo
ng	Nanogramo
Mn	Manganeso
MT	Mineral(es) Traza
MTI	Mineral(es) Traza Inorgánico(s)
MTO	Mineral(es) Traza Orgánico(s)
ppm	Partes por millón
QMA	Quelato Metal Aminoácido
QMHAM	Quelato Metal Hidroxi-Análogo de Metionina
Se	Selenio
TGI	Tracto Gastrointestinal
UH	Unidades Haugh
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
Zn	Cinc

INTRODUCCIÓN

Minerales Traza

Los minerales son elementos inorgánicos esenciales, que desempeñan funciones estructurales, fisiológicas, catalíticas y regulatorias (Costa E Silva et al., 2015). De acuerdo a su inclusión en las dietas para aves pueden clasificarse en macrominerales y minerales traza (Cuca et al., 2009).

Los *minerales traza* (MT) o microminerales son iones metálicos que actúan como cofactores de enzimas y factores de transcripción, participando en una amplia variedad de procesos bioquímicos (Richards et al., 2010). Se ha estimado que más del 50% de las proteínas incluyen cofactores (Sousa et al., 2009). Están involucrados en mecanismos catalíticos, estabilizan y determinan la estructura terciaria o cuaternaria de las proteínas y aquellos con actividad Redox están implicados en la transferencia de electrones (Andreini et al., 2006). Se les ha asociado con el crecimiento y división celular, desarrollo e integridad de los tejidos, respuesta inmune, reproducción y protección ante radicales libres (Richards et al., 2010; Świątkiewicz et al., 2014). Son adicionados en las dietas a razón de partes por millón (ppm) e incluyen el cinc, manganeso, hierro, cobre, selenio y el yodo (López, 2013). En conjunto, representan aproximadamente el 0.25% del costo de la dieta avícola (Leeson, 2005).

Los cambios clínicos y patológicos debidos a deficiencias de MT son inespecíficos y dependerán de él o los MT implicados, sus interacciones, el nivel de producción del animal, la edad, el sexo, el grado de severidad, las reservas corporales y la presencia de factores que disminuyan su absorción o utilización (Suttle, 2010). El exceso de MT no mejora el desempeño productivo de las aves, contrariamente puede generar antagonismos o toxicidad, esta última es menos frecuente por los amplios márgenes de seguridad que presentan la mayoría de los MT (López, 2013). El uso de cantidades mayores a las recomendadas ha sido criticado por sus implicaciones ambientales y el riesgo que conlleva su acumulación en los suelos (Vitti, 2010; Brugger y Windisch, 2015). En la actualidad se ha suscitado un interés creciente por los MT a nivel mundial, relacionado con las necesidades del animal, el uso de fuentes orgánicas con mayor biodisponibilidad y el empleo responsable con el fin de aminorar los posibles daños ambientales generados por su utilización.

Funciones

Hierro

Es el MT más abundante en el organismo, participa en el transporte de oxígeno y producción de energía (Suttle, 2010; Cao et al., 2014). Cerca del 60-70% está presente en la hemoglobina; 10% en la mioglobina, citocromos y enzimas y el 20-30% restante es almacenado en ferritina y hemosiderina dentro de los hepatocitos y macrófagos reticuloendoteliales (Ahmad et al., 2015). Por sus propiedades químicas participa en reacciones Redox como parte del grupo prostético HEME de las hemoproteínas (Suttle, 2010). Interviene en la unión y transporte de oxígeno (hemoglobina y mioglobina), en la cadena de transferencia de electrones durante la fosforilación oxidativa (citocromos con actividad Redox), en el proceso de detoxificación (citocromos P450), en la síntesis de óxido nítrico (óxido nítrico sintasa) y prostaglandinas (prostaglandina sintasa) y como protector celular ante daño por estrés oxidativo (peroxidasas) (Winter et al., 2014). Su deficiencia en aves se ha asociado a cuadros de anemia microcítica hipocrómica y pérdida de la pigmentación en animales de plumaje rojizo (NRC, 1994).

Cinc

Es el segundo ion metálico de transición más abundante después del hierro (Andreini et al., 2006; Ahmad et al., 2015). Sus propiedades químicas le permiten participar en reacciones catalíticas, entre ellas destacan: alta biodisponibilidad, ausencia de actividad Redox, actúa como ácido de Lewis, posee una geometría de coordinación flexible con intercambio rápido entre sus ligandos y forma enlaces de coordinación con nitrógeno, oxígeno y azufre (Sousa et al., 2009).

Está presente en más de 300 enzimas principalmente en hidrolasas y transferasas (Molokwu y Li, 2006). Se distribuye en todos los tejidos del cuerpo y es necesario para el correcto funcionamiento del sistema inmune, la integridad de las membranas y la regulación del apetito. Juega un papel fundamental en la división y crecimiento celular, la reparación de heridas y el metabolismo de nutrientes. Adicionalmente es vital para la maduración sexual y la reproducción, el mantenimiento óseo y la protección ante estrés oxidativo (Molokwu y Li, 2006; Salim et al., 2008; Zastrow y Pecoraro, 2014; Ahmad et al., 2015). Las deficiencias de cinc generan retraso en el crecimiento, deformidades óseas (huesos largos más cortos y anchos), aumento de tamaño de la articulación tibiotarsiana, plumas quebradizas y de fácil desprendimiento, así como disminución de la postura e incubabilidad (NRC, 1994).

El Zn participa en la síntesis de ADN y proteínas como parte de las polimerasas de ADN y ARN, que catalizan la replicación y transcripción del genoma celular. Por sí mismo es capaz de modular la expresión de genes por alteración de la estructura del ADN, y es importante para mantener la integridad de los ácidos nucleicos (Park et al., 2004).

La timulina es una hormona peptídica sintetizada por el timo que posee Zn en su estructura (Bach et al., 1977). Originalmente fue nombrada Factor Tímico Sérico (FTS), pero ésta denominación sólo se refiere a la estructura peptídica sin actividad biológica. Para realizar sus funciones el FTS requiere unirse con una proteína acarreadora y a una proporción equimolecular de Zn^{2+} integrando el complejo metalopéptido FTS- Zn^{2+} (Haddad, 2009; Reggiani et al., 2009). La timulina sigue un ritmo circadiano de secreción, tiene actividad inmunomoduladora, antiinflamatoria, analgésica y neuroendocrina; participa en la diferenciación de células T y en la activación de células T y NK (Haddad, 2009; Reggiani et al., 2009; Sato et al., 2012).

Confiere protección ante daño por estrés oxidativo al formar parte de la CuZnSOD encargada de la dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno (Liao et al., 2013). Asimismo induce la producción de metalotioneínas, proteínas ricas en cisteína con gran afinidad por el ion hidroxilo (Prasad, 2008; Li et al., 2015).

Las carboxipeptidasas A (CPA) son otro grupo de enzimas que contienen Zn, actúan liberando los aminoácidos residuales C-terminales de las proteínas, su función puede ser modulada por la presencia de cinc e inhibida por ácido fítico y compuestos fenólicos (Fernández et al., 2011). Las enzimas alcohol deshidrogenasa y fosfolipasa A2 también lo incluyen en su estructura. La primera está relacionada con la oxidación de etanol, vitamina A, esteroides, y la reducción de aldehídos y cetonas (Park et al., 2004); la última se encarga de la hidrólisis de fosfatidilcolina y está asociada con la formación de micelas y absorción de grasas (Suttle, 2010).

Es cofactor de colagenasas y gelatinasas, implicadas en la preservación de la integridad, remodelamiento y degradación del elemento orgánico de la matriz ósea (Velada et al., 2011). La estructura de la fosfatasa alcalina incorpora 4 átomos de Zn por molécula, 2 de los cuales son esenciales para su actividad (Zastrow y Pecoraro, 2014). Por sí sólo puede incrementar la síntesis en el hígado del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1) necesario para la formación y el remodelamiento óseo, y la homeostasis del calcio (Molokwu y Li, 2006).

Interviene en la síntesis de bicarbonato a través de la anhidrasa carbónica, razón por la cual se le ha relacionado con la calidad del cascarón al aumentar indirectamente la secreción de carbonato de calcio (Salim et al., 2008; Tsai et al., 2016).

Por último se le ha relacionado con el control del apetito, por lo que su deficiencia puede producir disminución en el consumo de alimento y retraso en el crecimiento (Wojciak, 2013). La incorporación de cinc en las dietas de aves promueve la producción de neuropéptidos orexigénicos (neuropéptido Y), además de disminuir la producción de citocinas como TNF- α relacionada con la disminución del consumo de alimento durante el proceso inflamatorio (Suzuki et al., 2011; Hu et al., 2016).

Cobre

Históricamente ha sido reconocido por su importancia en el metabolismo de la hemoglobina, si bien no forma parte directa de ella, está presente en proteínas plasmáticas relacionadas con la homeostasis de Fe y su deficiencia en las aves puede resultar en anemia microcítica hipocrómica, deformaciones óseas, pérdida de la pigmentación de las plumas, hipertrofia cardíaca y aneurisma aórtico (Leeson, 2009). El Cu se encuentra en diversos sistemas enzimáticos incorporado en por lo menos 30 metaloproteínas clasificadas como cuproenzimas que regulan procesos como el transporte de electrones, protección antioxidante, síntesis de neurotransmisores y melanina, y formación de tejido conectivo (Suttle, 2010; Ramos et al., 2016).

La ceruloplasmina (Cp) es una proteína secretada por el hígado, contiene al menos dos terceras partes del Cu presente en plasma funcionando como transportador celular y tisular. Fisiológicamente participa en la oxidación de Fe²⁺ a Fe³⁺ promoviendo su movilización en los tejidos y la carga de Fe³⁺ en la transferrina por medio de una cuproenzima homóloga llamada hepaestina (Leeson, 2009; Besold et al., 2016). Además está implicada en la neutralización de especies reactivas de oxígeno y en la inactivación oxidativa de óxido nítrico y aminas biogénicas (Ramos et al., 2016).

La lisil oxidasa es necesaria para la maduración del colágeno y elastina que ayudan a mejorar la resistencia de la piel, hueso, tendones, corazón intestino y cascarón (Lim y Paik, 2003; Richards et al., 2010). La tirosinasa está relacionada con la pigmentación al catalizar la polimerización de metabolitos de tirosina para formar melanina (Kanteev et al., 2013).

Por sus atributos químicos el Cu está involucrado en reacciones Redox y de transferencia de electrones, a través del citocromo C oxidasa (COX), así como en la neutralización de radicales libres por medio de la CuZnSOD (Suttle, 2010; Besold et al., 2016; Ramos et al., 2016). Interviene en el metabolismo de las catecolaminas a través de la dopamina β -mono-oxigenasa que cataliza la hidroxilación de dopamina a noradrenalina (Nelson y Prohaska, 2009); y es parte de la peptidil-glicina- α -amidante-mono-oxigenasa (PAM) una cuproenzima que facilita la amidación y activación de hormonas peptídicas neurohipofisiales (Solomon et al., 2014).

Manganeso

El Mn es esencial durante el crecimiento y el desarrollo óseo, se ha demostrado que su presencia en la dieta previene la perosis y condrodistrofia en animales jóvenes, estas funciones se relacionan con su participación como cofactor de glucosiltransferasas, como la galactosiltransferasa necesaria para la síntesis de mucopolisacáridos en la matriz cartilaginosa (Liu et al., 2015). Se ha reportado que la deficiencia de Mn en gallinas en postura disminuye la producción de huevo, el grosor de cascarón e incrementa la cantidad de huevos con anomalías, esto atribuido a una disminución de la actividad de la Gal β 1-3-glucuronosiltransferasa (GlcAT-1) en las glándulas cascarógenas. Esta enzima está relacionada con la síntesis de glucosaminoglicanos y proteoglicanos en la matriz orgánica del cascarón, brindando una ultraestructura más sólida y mejorando la resistencia (Yildiz et al., 2011; Xiao et al., 2014). Es importante en la protección ante estrés oxidativo formando parte de la MnSOD mitocondrial enzima complementaria en función a la CuZnSOD citosólica (Zhu et al., 2015).

Selenio

Se han identificado más de 25 genes que codifican para selenoproteínas (SelP), todas contienen residuos de selenocisteína (SeCys), aminoácido análogo de la cisteína con un grupo selenol reemplazando al grupo tiol. Las SelP desempeñan diversos papeles en el organismo, actuando como antioxidantes, moduladores de la función inmune, detoxificantes de metales pesados y xenobióticos, y participan en el metabolismo de las hormonas tiroideas (Cardoso et al., 2015). Las deficiencias de selenio se manifiestan principalmente como diátesis exudativa, retraso en el crecimiento, distrofia muscular, miopatías de la molleja y corazón, fibrosis pancreática, reducción de enzimas en el jugo pancreático y mortalidad (NRC, 1994).

Glutación peroxidasa (GSH-Px o GPx) es la denominación general que se le da a una familia de isoenzimas que poseen Se y que catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o hidroperóxidos orgánicos en agua o sus correspondientes alcoholes usando glutación reducido (GSH) como donador de electrones ($H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GS-SG + 2H_2O$). En mamíferos han sido identificadas 6 isoenzimas GPx: GPx1 (clásica) localizada en el citosol, núcleo y mitocondria de los eritrocitos y las células del hígado, pulmón y riñón; GPx2 (gastrointestinal) es acumulada en el núcleo y citosol de las células de la mucosa intestinal; GPx3 (plasmática) es una proteína secretada que está presente en riñones, pulmones, epidídimo, placenta, vesícula seminal, corazón y músculo; GPx4 (hidroperoxidasa fosfolipídica o PHGPx4) está relacionada con la espermatogénesis, y se encuentra en núcleo, citosol, mitocondria y unida a las membranas; por último GPx5 y GPx6 están relacionadas funcionalmente con GPx3 (Margis et al., 2008; Suttle, 2010; Roman et al., 2014). La tioredoxina reductasa (TR1) es otra SelP que funciona como antioxidante y es capaz de reducir los enlaces disulfuro de las tioredoxinas (Narayan et al., 2015).

Las deiodinasas (D o DIO) son SelP de membrana que catalizan la remoción de los átomos de yodo de la pro-hormona T_4 (tetraiodotironina o tiroxina) generando el isómero activo T_3 (triiodotironina) y el inactivo T_2 (diiodotironina). Esta biotransformación ocurre prácticamente en cualquier tejido del organismo y es catalizada por tres diferentes isotipos de deiodinasa: D1, D2 y D3. D1 y D2 sirven como activadores de la ruta de deiodinación del anillo externo convirtiendo T_4 en T_3 ; por otra parte la deiodinación del anillo interno es catalizada tanto por D1 como por D3 que convierten T_4 y T_3 en metabolitos inactivos (T_3 reversa y $3'3-T_2$ respectivamente) (Orozco et al., 2012; Roman et al., 2014).

Yodo

El yodo o iodo (I) es utilizado para la producción de triiodotironina (T_3) y tiroxina (T_4) (Sumaiya et al., 2016). Las hormonas tiroideas son las únicas moléculas que contienen yodo en los vertebrados y son necesarias para el desarrollo y maduración del SNC, músculo esquelético y pulmones. Son también reguladoras primarias del metabolismo y su efecto modulador es importante en prácticamente todos los órganos y tejidos (Nicola et al., 2015). Las deficiencias de yodo en aves resultan en una inadecuada producción de T_3 y por ende retraso en el crecimiento y disminución de la producción y el tamaño del huevo (NRC, 1994).

Necesidades y Recomendaciones de Inclusión

Los MT sólo pueden realizar sus funciones si se absorben y retienen en cantidades suficientes para cubrir las necesidades de mantenimiento, crecimiento, producción o reproducción, y para reemplazar aquellos que fueron eliminados a través de las secreciones, orina o heces (Suttle, 2010). Existen factores que pueden influir sobre sus necesidades nutricionales como: raza, genética, sexo, fin zootécnico, consumo de alimento, nivel energético de la dieta, temperatura ambiente, humedad del aire, estado sanitario, entre otros (Rostagno et al., 2011).

Las recomendaciones de inclusión de los MT dependerán de la fuente consultada, el criterio de respuesta y el método de estimación utilizado (pruebas dietéticas o modelos factoriales). El criterio de respuesta es un determinante importante ya que los procesos metabólicos que dependen de un mineral pueden variar en cuanto a sensibilidad. Es conveniente tener en cuenta que los valores recomendados son estimaciones y deberán ser ajustados al contexto específico (Suttle, 2010). El Cuadro 1 señala las necesidades de MT acorde al NRC, los Cuadros 2 y 3 muestran las recomendaciones de inclusión de MT para pollo de engorda y gallina en postura blanca según diferentes fuentes consultadas.

Biodisponibilidad

El valor de los alimentos y suplementos como fuentes de minerales, no sólo depende de su contenido mineral sino también de la proporción que puede ser absorbida y utilizada por el animal. Este valor se define como biodisponibilidad (Littell et al., 1997). El grado de biodisponibilidad está determinado por cuatro componentes: *accesibilidad*, es la cantidad de mineral absorbido por la mucosa, en ella influyen las fuentes del mineral y sus interacciones; *absorbabilidad*, indica al potencial de transferir el mineral que fue absorbido en la mucosa al sistema para ser utilizado, es determinada por los mecanismos de absorción del enterocito; *habilidad de retención* del mineral transferido, depende de la velocidad de excreción; y *funcionalidad* o potencial de incorporar el mineral retenido en estructuras funcionales, puede ser afectado por la fuente del mineral absorbido y el sitio de retención (Saripinar-Aksu et al., 2012).

Los factores que afecten la accesibilidad y absorción del mineral influirán directamente sobre su retención y utilización, razón por la cual la investigación se ha enfocado en el uso de fuentes de minerales con mayor biodisponibilidad y en conocer y aminorar las interacciones.

Factores que afectan la Biodisponibilidad

El hecho de que un mineral esté presente en la dieta no garantiza su utilización, existen factores que pueden mermar sustancialmente su biodisponibilidad, entre los que destacan:

Intrínsecos	Extrínsecos	Luminales
<ul style="list-style-type: none"> • Especie y Genética • Edad y Sexo • Monogástrico o rumiante • Necesidades nutricionales • Estado de Salud y Fisiológico • Estrés y procesos infecciosos 	<ul style="list-style-type: none"> • Naturaleza del elemento. • Fuente (inorgánica u orgánica) • Ruta de administración • Interacciones con agentes quelantes (oxalatos, ácido fítico, taninos, etc.) • Presencia de enzimas exógenas (fitasas) 	<ul style="list-style-type: none"> • Interacciones con nutrientes (proteínas, carbohidratos etc.) • Interacciones con otros minerales • pH • Competencia por transportadores • Liberación en células blanco

Fuentes: (Ashmead, 2012; Saripinar-Aksu et al., 2012; López, 2013; Martínez et al., 2013; Mañón, 2015)

De estas las interacciones tienen el mayor impacto sobre la biodisponibilidad de los MT. Estas interacciones se pueden clasificar en seis categorías (Ashmead, 2012; Mañón, 2015):

1. Formación de complejos insolubles por agentes quelantes (p.ej. ácido fítico, oxalatos).
2. Competición por moléculas transportadoras en el lumen intestinal (p.ej. DMT1).
3. Incapacidad del organismo para sintetizar metaloproteínas como consecuencia de interferencia con metales no esenciales y subsecuente formación de complejos proteicos.
4. Sustitución del componente metálico en metaloenzimas (p.ej. cobalto por cinc).
5. Sinergismo o Antagonismo. Por ejemplo, las relaciones Se-I y Cu-Fe son sinérgicas mientras que en el caso del Zn con el Fe, Cu y Mn son antagonistas (Rosborg, 2015).
6. Codependencia de diferentes reacciones entre sí. Es resultado del grupo anterior, al generar una reacción en cadena que afecta reacciones enzimáticas posteriores.

A continuación se enlistan las interacciones más importantes entre MT:

Mineral	Antagonismo	Sinergismo
<i>Cinc</i>	Ca, Cu, Cd, P, Fe, Mn	-
<i>Manganeso</i>	Ca, Fe, P	-
<i>Cobre</i>	Zn, Fe, Mo, S, Cd	-
<i>Hierro</i>	Zn, Mn, P, Al, Ca, Cr	Cu, F
<i>Yodo</i>	Tiocianato, Nitratos, Nitritos,	Se
<i>Selenio</i>	S, As	-

Fuentes: (Kostogryns et al., 2010; Suttle, 2010; Ashmead, 2012; Rosborg, 2015)

Biodisponibilidad Relativa

Los MT pueden ser cuantificados por medio de ensayos de laboratorio que determinen su concentración en tejidos (hígado, hueso de la tibia), productos (huevo) o secreciones (leche), o mediante pruebas *in vitro* de absorción, estimación de la excreción urinaria o fecal, concentraciones de trazadores, y más recientemente a través de la evaluación de enzimas y expresión de genes (Suttle, 2010).

En algunas circunstancias es necesario conocer la biodisponibilidad de una sustancia en relación a otra (patrón o estándar). En los estudios cuantitativos de biodisponibilidad la respuesta Y a una cantidad X del nutriente bajo investigación puede ser descrita como una función. El diseño más extendido para los estudios de biodisponibilidad relativa (BR) es el método de relación de pendiente que implica la respuesta lineal a la adición de nutrientes en la dieta (Littell et al., 1997).

Minerales Traza Inorgánicos

Los nutrientes presentes en los alimentos deben sufrir un proceso de digestión antes de ser absorbidos y distribuidos. En general, el tracto gastrointestinal (TGI) de las aves es similar al de otras especies. El alimento ingerido es humedecido, macerado en pequeñas partículas, acidificado y atacado por enzimas endógenas. Los macronutrientes son fragmentados en monosacáridos, aminoácidos, ácidos grasos libres, monoglicéridos, vitaminas y minerales, para ser posteriormente absorbidos por mecanismos pasivos o activos por los enterocitos que los transportan a torrente sanguíneo y distribuyen a los tejidos (Svihus, 2014). Los MT precisan ser digeridos para su absorción y distribución, los procesos implicados dependerán de la fuente adicionada en el alimento (inorgánica [MTI] u orgánica [MTO]) y el mineral en cuestión.

Fuentes

Si bien en teoría los ingredientes de mayor inclusión (maíz, sorgo y pasta de soya) proveen suficientes minerales a las aves (Leeson, 2005), se sabe que su contenido es muy variable y dependerá de factores como el genotipo y estado de maduración de la planta, las características del suelo donde fue cultivada, el uso de fertilizantes y factores medio ambientales (Suttle, 2010). Aunado a esto los MT en los granos y semillas se pueden encontrar ligados a agentes quelantes (ácido fítico, taninos) formando complejos insolubles que comprometen su biodisponibilidad (Rimbach et al., 2008; Platel y Srinivasan, 2015). Los MT son adicionados en las dietas como

sales inorgánicas —carbonatos, óxidos, sulfatos o cloruros— cuya biodisponibilidad dependerá de su capacidad para disociarse y formar iones, así como de la calidad, pureza, origen, composición y estabilidad de la sal suplementada (López, 2013). En general, la biodisponibilidad de los sulfatos es mayor y estos son utilizados como patrón o estándar en pruebas de BR, el Cuadro 4 muestra las principales fuentes de MTI utilizadas en avicultura y su BR.

Desde el punto de vista práctico los MTI se administran con amplios márgenes de seguridad para evitar deficiencias y permitir a las aves alcanzar su máximo potencial genético. Históricamente éste ha sido el acercamiento más prudente por razones económicas, sin embargo esta práctica no sólo representa un desperdicio de minerales, sino que los excedentes pueden interactuar y formar complejos insolubles o generar daño oxidativo. Su toxicidad no se limita sólo al animal adicionalmente los excesos eliminados en orina y heces constituyen una posible fuente de contaminación ambiental (Zhao et al., 2010; Brugger y Windisch, 2015).

Fisiología Digestiva y Metabolismo.

El proceso de digestión de los MTI comienza con la exposición a las secreciones del TGI como saliva, jugo gástrico, moco, etc. que permiten su disociación en buche, proventrículo y molleja, aunque ninguno de estos órganos realiza una absorción significativa. No es sino hasta el intestino delgado donde las sales serán completamente disueltas y proclives a ser absorbidas (Ashmead, 2012). Los iones resultantes difundirán pasivamente o serán reconocidos por transportadores específicos en la mucosa intestinal. Cada mineral se absorbe y distribuye de manera específica por lo que es necesario analizarlos por separado.

Hierro

Está presente en la dieta en forma inorgánica (Fe-no hémico o iónico) y orgánica (Fe-hémico) (Przybyszewska y Zekanowska, 2014). Independientemente de cual sea su origen el principal sitio de absorción es el duodeno (Figura 1) (Jia et al., 2015).

La absorción del Fe-no hémico se realiza por transporte activo. El ion Fe^{3+} primero debe ser reducido a Fe^{2+} en la membrana duodenal a través del Citocromo B Duodenal (DcytB). El Fe^{2+} es transportado entonces al interior de las células por el transportador de iones metálicos divalentes 1 (DMT1). Dentro del enterocito, el Fe^{2+} puede ser oxidado y almacenado en la ferritina o exportado al intersticio por la ferroportina. La ferritina que no es empleada se agrega

en los lisosomas para producir hemosiderina la cual es eliminada por exfoliación de los enterocitos. En la membrana basolateral la hepaestina oxida el Fe^{2+} en Fe^{3+} permitiendo la unión a transferrina (Tf) para su distribución vía sanguínea (Tako et al., 2010; Winter et al., 2014). Este mecanismo es regulado por el estatus corporal del hierro y por la hepcidina, hormona peptídica de origen hepático que inhibe la absorción induciendo la degradación de DMT1 (Brasselagnel et al., 2011).

Por otra parte, el transporte del grupo HEME al interior del enterocito es realizado por la proteína acarreadora de HEME 1 (HCP1). Una vez internalizado es catabolizado por la enzima microsomal HEM oxigenasa generando Fe^{2+} , monóxido de carbono y biliverdina. El Fe^{2+} liberado es metabolizado como Fe inorgánico y la biliverdina es reducida a bilirrubina. Adicionalmente el Fe puede absorberse directamente en el duodeno formando complejos solubles unido con mucinas, o a través de receptores de fitoferritina (Przybyszewska y Zekanowska, 2014).

Aunque la acumulación y el ritmo de absorción del Fe están bien regulados, esto no sucede en el caso de su eliminación, el organismo tiene una limitada habilidad para excretarlo y ello no cambia inclusive bajo exposiciones a dosis altas (Kwiecien et al., 2015). A la fecha, se ha demostrado la presencia de una ruta de excreción vía intestinal en ratones pero el mecanismo molecular implicado aún no ha sido dilucidado (Musumeci et al., 2014). Algunos autores consideran la exfoliación de los enterocitos como una ruta de excreción (Przybyszewska y Zekanowska, 2014).

Cinc

Su absorción es realizada en intestino delgado vía transporte activo y en menor grado por difusión pasiva (Figura 2) (Yu et al., 2002; Suttle, 2010). Los transportadores de Zn se agrupan en dos familias: proteínas ZnT y Zip. Estas proteínas tienen roles opuestos en la homeostasis de este elemento, las ZnT reducen el Zn intracelular citoplasmático promoviendo el eflujo o el influjo hacia el interior de los organelos y vesículas; en cambio los transportadores Zip incrementan los niveles de Zn intracelular promoviendo el transporte desde el exterior o desde los organelos o vesículas hacia el citoplasma. Se conocen hasta el momento 10 transportadores ZnT y 14 Zip: el Zip4 es el principal transportador localizado en la membrana apical del enterocito y está implicado en la internalización del lumen intestinal al citoplasma; el ZnT1 se

distribuye en la membrana basolateral y se encarga de la liberación del elemento desde el citoplasma a circulación; entre tanto el Zip5 interviene en la excreción transportando Zn desde la serosa hacia la mucosa. El tráfico entre los organelos es regulado principalmente por las proteínas ZnT2, 4, 5, 6 y 7 y las Zip7, 9 y 13 (Wang y Zhou, 2010; Fujimura et al., 2012; Pechin, 2012). El DMT1 juega un papel menor en la homeostasis de cinc. En el citosol la metalotioneína 1 (MT-1) es capaz de captar Zn para su almacenamiento y tráfico intracelular. El Zn es regulado por el aporte en la dieta, así como por su ritmo de absorción y excreción (Martín et al., 2013).

En cuanto a su distribución dos terceras partes son transportadas unidas a albúmina sérica y el resto se une a macroglobulinas, aminoácidos o se encuentra en forma libre en el torrente sanguíneo, 30-40% del Zn es captado y almacenado en hígado unido a metalotioneína y metaloenzimas. Se excreta vía pancreática, biliar y en menor proporción en orina (Pechin, 2012).

Cobre

Su absorción es realizada en duodeno y depende de transporte activo (Figura 3) (Lin et al., 2015). El transportador de cobre de alta afinidad 1 (CRT1) es el principal acarreador al interior del enterocito, al ser específico para Cu^{1+} requiere la reducción del Cu^{2+} por medio de metalorreductasas (proteínas STEAP y DcytB) (Ohgami et al., 2006; Van den Berghe y Klomp, 2009); de igual forma el DMT1 es capaz de transportar Cu^{1+} (Arredondo et al., 2003; Jiang et al., 2013). Una vez internalizado el Cu^{1+} es quelado como medida preventiva ante el posible daño oxidativo que puede generar como catalizador de la reacción de Fenton y la subsecuente producción de radicales hidroxilo (Van den Berghe y Klomp, 2009).

Las chaperonas son proteínas que unen metales. Están diseñadas para entregar un ion metálico o un cofactor que contiene un metal a una proteína que lo requiere en su estructura. Hasta ahora se han identificado tres vías de tráfico de cobre que requieren de la acción de chaperonas: 1) Ruta de entrega de Cu a la vía secretoria, que permite la activación de cuproenzimas destinadas a la superficie celular o el medio extracelular. Inicia con la chaperona ATOX1 (ATX1) que se acopla a ATPasa 7A (ATP7A) permitiendo translocar el cobre al aparato de Golgi para su procesamiento y secreción. 2) Tráfico hacia CuZnSOD, se realiza en el citoplasma por la chaperona de cobre para SOD (CCS). 3) Ruta de entrega a la mitocondria, es realizada por COX17 o COX19 y permite la activación de COX (Bravo et al., 2015).

En torrente sanguíneo es transportado al hígado unido a albúmina y transcupreína, donde los hepatocitos lo procesan y secretan como ceruloplasmina que realiza su distribución a los tejidos restantes (Liu et al., 2007). Las mayores concentraciones de Cu se encuentran en hígado y su excreción es por medio de las secreciones biliar y pancreática (Leeson, 2009; Suttle, 2010).

Manganeso

El metabolismo del Mn no está bien entendido ya que no han sido identificadas proteínas específicas para su absorción, se sabe que utiliza moléculas transportadoras en común con el Fe (Figura 4) (Jenkitkasemwong et al., 2012). El manganeso entra al enterocito con la ayuda del DMT1 y de varios transportadores inespecíficos, incluyendo los de citrato, cinc (ZIP8 y ZIP14) y canales de calcio (Bai et al., 2012; Chen et al., 2015; Horning et al., 2015); sin embargo estudios recientes han demostrado que el DMT1 no interviene en la absorción de Mn, Cu y Zn (Shawki et al., 2015). La ferroportina y el transportador SLC30A10 son los únicos transportadores conocidos que facilitan la exportación de Mn al torrente sanguíneo (Chen et al., 2015; Seo y Wessling-Resnick, 2015). En plasma se encuentra unido a α -2-macroglobulina, albúmina, transferrina o de forma libre como Mn^{2+} (Jenkitkasemwong et al., 2012). Su distribución es rápida, principalmente a hígado, páncreas, hueso, riñón y cerebro que son los órganos con mayor retención. Es conjugado con bilis y excretado vía fecal, pudiendo ser reabsorbido a través de circulación entero-hepática (Horning et al., 2015).

Selenio

Las especies de Se presentes en las plantas son: selenato (SeO_4^{2-}), selenito (SeO_3^{2-}), selenio-metionina (SeMet) y en menor cantidad SeCys, SeIP, Se-metil-selenocisteína (SeMCys) y γ -glutamil-Se-metil-selenocisteína (GGSeMCys) (Rayman et al., 2008). Tanto las formas inorgánicas como orgánicas son absorbidas en la parte final del intestino delgado con una eficiencia total entre 70-90% bajo condiciones fisiológicas y de consumo normales; el selenito es la excepción ya que su absorción no supera el 60% (Fairweather-Tait et al., 2010).

La asimilación de Se requiere de la reducción de las diferentes especies a seleniuro de hidrógeno (HSe^-) (Figura 5). El SeO_3^{2-} puede absorberse por transporte activo o difusión pasiva. La presencia de glutatión reducido (GSH) en el lumen intestinal mejora la absorción de SeO_3^{2-} reaccionando con los grupos tiol del GSH para formar selenodiglutation ($GS-Se-SG$) que es metabolizado por la glutatión reductasa en HSe^- . El SeO_4^{2-} es absorbido primero vía paracelular

por difusión pasiva y luego reducido por la ATP sulfurilasa a SeO_3^{2-} . El SeO_3^{2-} es reducido por el sistema de las tioredoxinas a HSe^- . La SeMet y SeCys comparten transportadores con los aminoácidos azufrados para su absorción. El dipéptido GGSeMCys es absorbido como tal o hidrolizado por la γ -glutamyl transpeptidasa liberando SeMCys que se absorbe como SeMet. Tanto GGSeMCys como SeMCys son metilados por la β -liasa en metilselenuro (MSe). Para su utilización el HSe^- es activado en presencia de ATP por la selenofosfato sintetasa 2 (SPS2) produciendo selenofosfato (SePhp) que se une a cisteína por medio de la SeCys Sintasa (SeCysS) (Rayman et al., 2008; Fairweather-Tait et al., 2010; Roman et al., 2014).

Las especies de Se son transportadas intactas o unidas a albúmina al hígado donde son metabolizadas y liberadas en la circulación para su distribución. En el organismo el selenio se localiza en dos compartimientos: el pool metabólicamente activo como SeCys que forma parte de SeLP (GPX, DIO, etc.), metabolitos excretorios y otros productos intermediarios del metabolismo de Se; y el pool de metionina como SeMet en las proteínas musculares, esta forma representa entre 56-66% del Se total (Surai y Fisinin, 2014). La SeMet puede ser liberada y transformada en SeCys vía *trans*-selenación, un proceso análogo a la *trans*-sulfuración (Roman et al., 2014). La excreción puede tomar 2 rutas que implican un proceso de metilación: 1) Por medio del metabolito dimetilselenuro (DMSe) en la respiración o 2) en la orina a través de la conjugación de MSe con azúcares y trimetilselenuro (TMSe) (Fairweather-Tait et al., 2010).

Yodo

El yodo debe ser reducido a yoduro (I^-) antes de su absorción en intestino delgado (Figura 6). El I^- es transportado por el cotransportador de Na^+/I^- (NIS) una glicoproteína que constituye el componente central del metabolismo del yodo. El gradiente a favor de Na^+ que permite la absorción de I^- es generado por la Na^+/K^+ ATPasa en la membrana basolateral. El NIS está localizado también en las glándulas tiroides y está relacionado con la secreción de yodo en leche, saliva y jugo gástrico. Altas concentraciones de I^- en sangre reducen su absorción mediante retroalimentación negativa de tirotrópina (TSH) y expresión de NIS (Nicola et al., 2015). El I^- es transportado en torrente sanguíneo en forma libre y es depositado en la glándula tiroides donde es oxidado y enlazado a tirosina por medio de la tiroperoxidasa (TPO) generando tiroxina (T_4). La T_4 es secretada y transportada en suero unida a globulina fijadora de T_4 (TBG) o albúmina hasta los tejidos periféricos donde es deiodinada por las deiodinasas (D1, D2 y D3) produciendo

las formas metabólicamente activas (T_3) o inactivas (T_3 reversa y $3'3-T_2$) (Orozco et al., 2012; Lazarus, 2015). La excreción de I^- ocurre por medio de filtración glomerular (Michalaki et al., 2014).

Minerales Traza Orgánicos

Fuentes

Los minerales traza orgánicos (MTO) pueden encontrarse como complejos o quelatos de hierro, cobre, cinc o manganeso, o como selenoaminoácidos y sus análogos. Ya que son compuestos químicamente distintos es preciso considerar algunas de sus características así como el concepto de constante de estabilidad para comprender como influyen en su digestión y metabolismo.

Complejos y Quelatos. Un *complejo* es la entidad química formada por la asociación de dos o más componentes moleculares, unidos a través de enlaces de coordinación (Figura 7a); por otra parte una *entidad de coordinación* es aquella en cuya estructura se encuentra un átomo o ion metálico central rodeado por un grupo ordenado de átomos (ligandos). Un caso especial de entidad de coordinación son los compuestos donde existe quelación, entiéndase por quelación la formación o presencia de enlaces entre dos o más sitios de unión dentro de un mismo ligando y un solo átomo central. La molécula en la que existe quelación se denomina *quelato* (Figura 7b). El termino mono-, bi-,... multidentado es usado para indicar el número de sitios de enlace dentro de un ligando directamente unidos al átomo central. (IUPAC, 2014).

Los quelatos son de interés nutritivo debido a sus atributos físicos y químicos. En ellos el ion metálico actúa como ácido de Lewis aceptando pares de electrones y el ligando como base de Lewis donando pares de electrones. Los ligandos deben poseer grupos funcionales o de coordinación con capacidad para donar electrones, por ejemplo: $-N=$, $-NH$, $-NH_2$, $-NH_3$, $-S-$, $-NOH$, $=O$, $-COOH$, $-OH$, $-SO_3$, etc. Los quelatos se distinguen de los complejos por la presencia de por lo menos uno o más *anillos heterocíclicos* que rodean al átomo central, y que a medida que aumentan en número le brindan más estabilidad. Por ejemplo, en el caso de un aminoácido y un metal, estos se pueden unir a través de dos enlaces, uno iónico con el oxígeno del grupo $COOH$ y uno de coordinación con el nitrógeno en el grupo NH_2 , si el ion metálico tiene una valencia de 2^+ es capaz de unirse a más de un aminoácido para satisfacer su déficit de electrones, formando un segundo anillo heterocíclico. Sin embargo, a medida que el tamaño de

él o los ligandos incrementa la formación de anillos heterocíclicos adicionales se complica, por ello los grupos funcionales deben estar localizados de manera que posibiliten su creación. Las propiedades del elemento metálico pueden comprometer el establecimiento de un quelato, en especial su valencia y el número de coordinación. La valencia influirá en su formación, en general los metales de transición (hierro, cobre, cinc, manganeso) podrán producir quelatos mientras que los metales alcalinos (sodio, potasio), halógenos (yodo, cloro) y no metales (selenio) no lo harán; el número de coordinación determinará su estereoquímica y estabilidad (Ashmead, 2012; Saripinar-Aksu et al., 2012; Mañón, 2015). Por definición en lo subsecuente aquellos compuestos que carezcan de un anillo heterocíclico no se denominaran quelatos, se referirá a ellos como *complejos* o en su caso *sales metálicas* (Figura 7a y 7c).

La *constante de estabilidad* (de formación o asociación) de un complejo (K_f) es el valor inverso de la constante de disociación (K_d). Representa una medida cuantitativa de la atracción de un metal a su ligando y dependerá de la fuerza de sus enlaces (Mirrahimi et al., 2016). Valores bajos de K_f implican que un complejo puede disociarse fácilmente y viceversa. Si K_f de un complejo ingerido es menor a K_f de otro ligando en la dieta, el ion del primer ligando puede disociarse y ser intercambiado al segundo ligando. En caso de que el nuevo complejo fuera absorbido el ion lo sería también, no obstante existen en el alimento ligandos con valores K_f altos que pueden enlazarse con iones metálicos formando complejos indigestibles evitando su absorción, tal es el caso de los fitatos y los oxalatos. Por otra parte si el quelato o complejo ingerido tuviera un valor K_f muy alto y fuera absorbido, dadas sus características no se disociaría en el organismo para su metabolización y sería excretado íntegramente, como sucede con el EDTA. Un *complejo o quelato funcional* es aquel en que tanto el ligando como el metal son disponibles para el organismo y ambos pueden ser utilizados después de ser absorbidos, su K_f debe ser mayor a las K_f de los ligandos en el quimo y menor a las de los ligandos del organismo (transportadores, acarreadores, enzimas). Preferentemente el ligando debe ser una molécula pequeña, que pueda absorberse sin necesidad de digestión y ser fácilmente metabolizada por el organismo (Ashmead, 2012). No es recomendado predecir mejoras en la utilización de complejos o quelatos minerales usando valores de K_f ya que el pH del medio influye notablemente sobre su valor (Mañón, 2015). La presencia de anillos heterocíclicos hace más estables (mayor K_f) a los quelatos en comparación con los complejos.

Los minerales con estructura orgánica son definidos por la AAFCO, conocer estas definiciones permitirá dilucidar sus rutas de digestión, absorción y metabolismo (AAFCO, 2008):

- *Quelato Metal Aminoácido*: producto de la reacción de un ion metálico de una sal metálica soluble con aminoácidos en una relación molar de un mol de ion metálico con dos o tres moles de aminoácido unidos por enlaces covalentes coordinados. Los aminoácidos pesarán en promedio 150Da y la molécula resultante no debe exceder 800Da.
- *Quelato Metal Hidroxianálogo de Metionina*: producto resultante de la reacción de una sal metálica soluble con ácido 2-hidroxi-4-metiltiobutanoico (HMTBA) en una relación molar de un ion metálico con dos moles de HMTBA unidos por enlaces covalentes coordinados.
- *Complejos Metal Aminoácidos*: complejo formado por una sal metálica soluble y aminoácidos.
- *Complejo Metal Aminoácido (específico)*: complejo formado por una sal metálica soluble y un aminoácido específico.
- *Proteinato Metálico*: quelato o complejo formado por una sal soluble con aminoácidos o proteínas parcialmente hidrolizadas.
- *Complejo Metal Polisacárido*: complejo formado por una sal metálica soluble y un polisacárido.
- *Propionato metálico*: complejo formado por una sal metálica y ácido propiónico.

Selenoaminoácidos. Las fuentes orgánicas de Se disponibles comercialmente (SeMet y ácido 2-hidroxi-4-metilselenobutanoico [HMSeBA]), no son consideradas complejos ni quelatos sino el primero un aminoácido y el segundo su análogo (Figura 7d). La SeMet es producida por fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* en medios ricos en Se (Schrauzer, 2006) y el HMSeBA por síntesis química (EFSA FEEDAP, 2013).

Fisiología Digestiva y Metabolismo.

La digestión y absorción de los MTO dependerán de su ligando. Se sabe que estas fuentes tienen una biodisponibilidad superior a los MTI, pero esto no explica los mecanismos de absorción o metabolismo implicados (Mazariegos et al., 2004). La problemática de algunos MTO radica en que a su paso por el TGI se mezclarán con secreciones endógenas que alterarán el pH del medio y que pueden producir hidrólisis enzimática del ligando, por lo que es posible que se comprometa su estabilidad provocando disociación antes de alcanzar el sitio de absorción.

Quelatos Metal Aminoácido y Metal HMTBA. En su obra Ashmead (2012) describe a detalle la digestión, absorción y metabolismo de estos compuestos tomando como modelo el Cinc bis-Glicina. Los quelatos son moléculas capaces de resistir la digestión ya que se encuentran en forma de aminoácidos o dipéptidos. A su paso por el TGI el quelato sufre únicamente una reestructuración molecular (basada en el pH luminal) la cual no provocará su disociación completa. Conforme el quelato se mezcla con las secreciones gástricas y el ambiente se torna ácido (pH 2-5), los enlaces entre el metal y el nitrógeno comienzan a romperse, cuando esto sucede el ácido clorhídrico dona el H^+ al grupo amino terminal de cada aminoácido, adquiriendo una carga positiva y formando una estructura denominada Complejo/Quelato donde el metal permanece unido a través del grupo carboxilo de ambos aminoácidos. Puede existir absorción de estas moléculas en la mucosa estomacal por difusión facilitada. A medida que el Complejo/Quelato se acerca al duodeno y el pH se alcaliniza se reconfigura como un quelato. En este nuevo ambiente (pH 6-6.5) el quelato carece de carga y puede ser absorbido en la membrana apical del enterocito por difusión facilitada. Ashmead además postula que en la proximidad de las microvellosidades el microambiente es ácido (pH<5) lo que permite al quelato adquirir de nuevo la estructura Complejo/Quelato posibilitando su unión a transportadores de aminoácidos para su interiorización. Finalmente en el interior del enterocito (pH≈6.8) la molécula se vuelve a reconfigurar en quelato y puede seguir alguna de las siguientes rutas de metabólicas: 1) hidrólisis intracelular y liberación del metal y su ligando, 2) intercambio del metal por la presencia de proteínas (transportadores o acarreadores) con valores K_f mayores al quelato, 3) almacenamiento, 4) transferencia directa a plasma, o 5) exfoliación junto con el enterocito. De ser absorbido, el metal seguiría las mismas rutas metabólicas de los MTI.

El modelo de absorción del hierro bis-glicina (Fe-bis-Gly) también ha sido estudiado por su posible uso para la prevención de anemia en humanos (Ma et al., 2013). En él se sugiere que una parte del quelato es disociada y puede ser absorbida por efecto del pH en estómago (Pizarro et al., 2002), el restante se mantiene estable y es captado a nivel intestinal compitiendo con los transportadores de las fuentes de Fe-no hémico (Mazariegos et al., 2004). La suplementación de Fe-bis-Gly incrementa la expresión de DMT1, receptor de transferrina (TfR), ferritina y transportador intestinal de péptidos (PepT1). Se ha postulado que PepT1 es el transportador

responsable de la mayor absorción de Fe-bis-Gly. (Liao et al., 2014). Una vez en el interior del enterocito es metabolizado como MTI (Bovell-Benjamin et al., 2000; Ma et al., 2013).

Investigaciones recientes han demostrado que la inclusión de cinc glicina tiene efecto sobre la expresión de proteínas transportadoras en los enterocitos (Zip4, Zip5, ZnT1, MT1 y PepT1). Se ha propuesto que utiliza rutas comunes de absorción y metabolismo con las fuentes inorgánicas, sin embargo no se han dilucidado concretamente cuales son (Yue et al., 2015; Huang et al., 2016).

Proteinatos Metálicos y Polisacáridos Metálicos. A la fecha no se cuenta con literatura referente a su absorción y metabolismo, la mayoría de la investigación se enfoca en demostrar su biodisponibilidad con respecto a MTI y da por hecho su estabilidad a nivel intestinal. Se ha propuesto que los proteinatos no pueden absorberse íntegramente sino que deben ser hidrolizados, lo que resultaría en la disociación de los complejos, sin embargo se requiere mayor investigación al respecto (Ashmead, 2012). La carencia de literatura sometida a revisión por pares acerca del uso de los complejos metal polisacáridos en dietas para aves genera un poco de desconfianza en cuanto a su efectividad, aunado a lo anterior su empleo se cuestiona dados los resultados obtenidos en estudios en perros, cerdos, rumiantes y humanos (Lowe y Wiseman, 1998; Case y Carlson, 2002; Salyer et al., 2004; Santiago, 2012).

Propionato metálico. Su proceso de absorción no ha sido documentado. En concordancia con lo que ocurre con el propionato de sodio, calcio y potasio y dada la facilidad para disociarse (baja K_f) del ácido propiónico se esperaría que el ion metálico se encuentre disociado en el ambiente intestinal (EFSA FEEDAP, 2014). Se ha reportado que la absorción del ácido propiónico es realizada en duodeno, yeyuno y colon por difusión pasiva de la forma protonada o a través de intercambio iónico con bicarbonato (Kawamata et al., 2007).

SeMet y HMSeBA. La absorción de SeMet tiene lugar en yeyuno por un sistema dependiente de Na^+ que comparte competitivamente con metionina (EFSA FEEDAP, 2006). El HMSeBA se absorbe por difusión pasiva o por transportadores de aminoácidos (independientes de Na^+ o dependientes de H^+). En el interior del enterocito es oxidado a ácido 2-ceto-(4metilseleno)-Butanoico (KMB) y convertido a SeMet por transaminación (Martín-Venegas et al., 2011; EFSA FEEDAP, 2013). La SeMet puede ser transelenada a SeCys para su utilización en el pool metabólicamente activo o transportada a los tejidos como parte del pool de metionina.

Uso de MTO en Gallinas en Postura

Los MTO poseen mayor biodisponibilidad posiblemente porque aprovechan vías alternativas de absorción y proveen protección frente a antagonismos minerales y formación de complejos indigestibles (Saripinar-Aksu et al., 2012). Esto se traduce en múltiples beneficios para las aves incluyendo mejoras sobre los parámetros productivos, calidad de huevo y respuesta inmune (Zhao et al., 2010), sin embargo los resultados prácticos de su suplementación en dietas para gallinas en postura han sido muy variables, es posible que la diversidad de fuentes orgánicas, las diferencias químicas entre los ligandos, el contenido de minerales propio de los ingredientes de la dieta y los niveles de inclusión utilizados hayan enmascarado estos efectos (Stefanello et al., 2014).

En gallina en postura por lo general la inclusión de MTO no produce efectos sensibles sobre parámetros productivos como porcentaje de postura, peso y masa de huevo, consumo de alimento, conversión alimenticia y peso del ave (Maciel et al., 2010; Jlali et al., 2013; Stefanello et al., 2014; Manangi et al., 2015), sin embargo cabe destacar que la reducción en los niveles de inclusión no compromete el desempeño productivo del animal (Gheisari et al., 2011; Stefanello et al., 2014), se ha comprobado que esto representa menor excreción en heces y por ende menor deposición en el medio ambiente (Bao et al., 2007; Yenice et al., 2015).

En lo que respecta a variables de calidad de huevo se ha reportado engrosamiento del cascarón (Manangi et al., 2015) y menor pérdida de unidades Haugh por almacenamiento (mayor vida de anaquel) (Sun et al., 2012). El incremento en la resistencia del cascarón a la fractura y la reducción del porcentaje de huevo roto o en fáfara son características deseables de importancia económica en el sector del huevo, los resultados de la incorporación de minerales orgánicos confirman mejoras asociadas a un cambio en la ultraestructura del cascarón (Światkiewicz y Koreleski, 2008; Gheisari et al., 2011; Stefanello et al., 2014; Manangi et al., 2015). Asimismo las concentraciones de MT en huevo y cascarón han sido evaluadas con resultados favorables a la suplementación de MTO en ambas (Sun et al., 2012; Jlali et al., 2013; Yenice et al., 2015).

Los huesos son una reserva importante de MT para las aves, se han realizado mediciones indirectas del grado de mineralización a través de pruebas de resistencia de la tibia a la fractura, una mayor resistencia se asocia con mayor mineralización, las conclusiones de estudios

comparativos con MTI han reportado beneficios a favor de las fuentes orgánicas (Gheisari et al., 2011; Manangi et al., 2015). La adición de MTO también se ha asociado con niveles mayores de MT en suero (Yenice et al., 2015), mejor retención en órganos (Sun et al., 2012; Jlali et al., 2013) e incremento de la síntesis y actividad de enzimas (Sun et al., 2012).

La importancia del Se y Zn sobre la respuesta inmune de las aves está relacionada entre otras cosas con mayor actividad enzimática ante radicales libres (Saad et al., 2009; Boostani et al., 2015), beneficios sobre títulos de anticuerpos (Feng et al., 2010; Silva et al., 2010; Manangi et al., 2015), incremento en tamaño de órganos (Feng et al., 2010) y mejoras en la respuesta inmune celular (Moghaddam y Jahanian, 2009)

JUSTIFICACIÓN

Las aves tienen un requerimiento basal de MT que se ve acrecentado debido a la baja biodisponibilidad en las fuentes consumidas, a las barreras gastrointestinales, a interacciones o a un metabolismo ineficiente, en consecuencia, una gran cantidad de MT agregados a la dieta no son aprovechados y son excretados.

Las fuentes orgánicas de MT poseen excelente biodisponibilidad, no se ven afectados por interacciones y utilizan rutas alternativas de absorción, por lo que se requieren en menor cantidad disminuyendo su concentración en las excretas y su deposición en el medio ambiente.

Los Carbo-Amino-Fosfo-Quelatos (CAFQ) son una fuente orgánica de MT sintetizada por *Saccharomyces cerevisiae* producto resultante de la unión de iones minerales con péptidos y aminoácidos de origen vegetal, y de la unión de oligo y polisacáridos con una fuente de fósforo, mediante reacciones de fosforilación (TORTUGA®, 2016).

El efecto de la inclusión de CAFQ en dietas para gallinas en postura no ha sido documentado, por tal razón la realización de la presente investigación aporta información acerca de su efecto en los parámetros productivos, calidad de huevo, vida de anaquel, resistencia a la ruptura de la tibia y respuesta inmune en gallinas en postura de 60 semanas de edad.

HIPÓTESIS

Hipótesis 1 (Fuente): La sustitución de MTO por MTI en dietas base sorgo-pasta de soya, mejora los parámetros productivos, calidad del huevo, vida de anaquel, resistencia de las tibias a la fractura y respuesta inmune de gallinas en postura Bovans White de 60 semanas de edad.

Hipótesis 2 (Elemento orgánico): La inclusión de CAFQ como fuente de MTO en dietas base sorgo-pasta de soya mejora los parámetros productivos, calidad de huevo, vida de anaquel, resistencia de las tibias a la fractura y respuesta inmune de gallinas en postura Bovans White de 60 semanas de edad en comparación con una dieta tipo comercial adicionada *on top* con MTO en forma de Complejos Metal Aminoácidos.

Hipótesis 3 (Reducción): La reducción en 30% de las recomendaciones de inclusión de CAFQ como fuente de MTO en dietas base sorgo-pasta de soya no afectará los parámetros productivos, calidad de huevo, vida de anaquel, resistencia de las tibias a la fractura y respuesta inmune de gallinas en postura Bovans White de 60 semanas de edad.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de la inclusión de diferentes fuentes de MTO en dietas base sorgo-pasta de soya sobre los parámetros productivos, calidad de huevo, resistencia de las tibias a la fractura y respuesta inmune en gallinas en postura Bovans White de 60 semanas de edad.

Objetivos Particulares

- Evaluar el efecto de la sustitución de MTO por MTI en dietas base sorgo-pasta de soya sobre los parámetros productivos, calidad de huevo, vida de anaquel, resistencia de las tibias a la fractura y respuesta inmune de gallinas en postura Bovans White de 60 semanas de edad.
- Determinar el efecto de la inclusión de CAFQ como fuente de MTO en dietas base sorgo-pasta de soya sobre los parámetros productivos, calidad de huevo, vida de anaquel, resistencia de las tibias a la fractura y respuesta inmune de gallinas en postura Bovans White de 60 semanas de edad en comparación con una dieta tipo comercial adicionada *on top* con MTO en forma de Complejos Metal Aminoácidos.
- Analizar el efecto de la reducción en 30% de las recomendaciones de inclusión de CAFQ como fuente de MTO en dietas base sorgo-pasta de soya sobre los parámetros productivos, calidad de huevo, vida de anaquel, resistencia de las tibias a la fractura y respuesta inmune de gallinas en postura Bovans White de 60 semanas de edad.

MATERIAL Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el CEIEPAv de la FMVZ-UNAM, localizado en la calle Manuel M. López s/n, Colonia Zapotitlán, Delegación Tláhuac, Ciudad de México, México. El centro está ubicado a una altura de 2254 msnm en el paralelo 19°18'15" latitud norte y el meridiano 99° 03' 15" longitud oeste. El clima es de tipo templado subhúmedo con lluvias en verano, de humedad media [C(w_i)], el mes más frío es enero y mayo el más caluroso; la temperatura promedio anual es de 16°C y la precipitación pluvial anual media de 747 mm (INEGI, 2014).

Manejo de los animales y dietas

Los procedimientos de manejo a los que se sometieron las aves del presente experimento fueron aprobados por el Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales Experimentales (SICUAE-FMVZ-UNAM) con el número de protocolo: MC-2015/2-13.

Un total de 480 gallinas en postura (Bovans White), de 60 semanas de edad, fueron asignadas aleatoriamente en 4 tratamientos con 10 réplicas por tratamiento y 12 aves por réplica (unidad experimental). Las aves fueron alojadas en jaulas tipo California (3 aves por jaula, con dimensiones 40 x 45 x 45 cm) dentro de una caseta experimental de ambiente natural. Se proporcionó un fotoperiodo de 16 horas luz por día. El agua y el alimento fueron ofrecidos *ad libitum*. Se utilizaron comederos de canal (13 cm de comedero/ave) y bebederos tipo copa (1 bebedero/6 aves). Antes del inicio de la prueba las aves fueron sometidas a un periodo de adaptación de 2 semanas en el que se realizó su pesaje para determinar la uniformidad y se seleccionaron las aves fuera de postura o enfermas. Sólo las gallinas sanas y en postura fueron utilizadas. La duración del experimento fue de 14 semanas.

Se utilizó una dieta basal (DB) sorgo-pasta de soya (Cuadro 6) ofrecida en harina, formulada de acuerdo a las recomendaciones nutrimentales de la casa genética (ISA, 2015). La DB fue adicionada con cuatro premezclas (Cuadro 7) correspondientes al número de tratamientos, asignados de la siguiente manera:

- Tratamiento 1 (T1 - 100MTI): DB con MTI como fuente única
- Tratamiento 2 (T2 - 100CAFQ): DB con MTO en forma de CAFQ como fuente única

- Tratamiento 3 (T3 - 70CAFQ): Igual que T2 reducida 30% en el aporte de CAFQ
- Tratamiento 4 (T4 - MTI+CMA): Igual que T1 adicionada *on top* con MTO en forma de Complejos Metal Aminoácidos (CMA).

Variables productivas

Se llevaron registro de las principales variables productivas durante 12 semanas. Semanalmente se determinaron los valores promedio por réplica de las variables: consumo de alimento/ave/día (g), peso de huevo (g), porcentaje de postura gallina/día (%), masa de huevo ave/día (g), conversión alimenticia (Kg: Kg), porcentaje de huevo sucio y roto o en fáfara (%). La masa de huevo fue calculada mediante el producto del peso de huevo y el porcentaje de postura dividido entre 100. Todas las variables fueron corregidas conforme a la mortalidad. Se realizó el pesaje de las aves en las semanas 0, 4, 8 y 12 de experimentación.

Calidad de huevo y Vida de anaquel

Los parámetros de calidad de huevo fueron medidos en las semanas 0, 4, 8 y 12 de experimentación. Ochenta huevos por tratamiento (8 huevos por réplica, 10 réplicas) fueron evaluados de acuerdo a las especificaciones de cada equipo de medición para las variables peso de huevo, altura de la albúmina, unidades Haugh, color de la yema, grosor y resistencia a la fractura del cascarón. Las Unidades Haugh fueron determinadas con el sistema QCD de la empresa Technical Services and Supplies (TSS®) a través del peso del huevo y altura de la albúmina. El color de yema fue valorado con un espectrofotómetro de reflectancia (QCC de TSS®) con transformaciones a valores absolutos de abanico de DSM. El grosor del cascarón se midió con un micrómetro digital (Digimatic Micrometer Mitutoyo® Modelo APBID). La resistencia a la fractura del cascarón fue determinada con un texturómetro (QC-SPA de TSS®). Los datos de estas variables fueron capturados en un programa computacional de calidad de huevo (Eggware® V3.X de TSS®).

La prueba de vida de anaquel fue realizada durante la semana 6 de experimentación. Para la determinación de la pérdida de calidad de huevo por almacenamiento se colectaron por 5 días consecutivos 35 huevos por réplica (7 huevos/réplica/día). Los huevos del día 1 sirvieron como medición inicial (0 días de almacenamiento). Los huevos colectados los días 2 y 3 fueron identificados y almacenados en refrigeración (4°C) durante 7 y 14 días respectivamente. Los

huevos colectados los días 4 y 5 también fueron identificados pero estos fueron almacenados a temperatura ambiente durante 7 y 14 días correspondientemente. Transcurrido el tiempo de almacenamiento fueron evaluados bajo el mismo esquema anteriormente descrito para las variables peso de huevo, altura de la albúmina y unidades Haugh.

Durante las semanas 13 y 14 de la prueba se realizaron las evaluaciones de resistencia de la tibia a la fractura y respuesta inmune. Las aves continuaron recibiendo las mismas dietas, sin embargo los parámetros productivos no fueron analizados durante estas semanas.

Resistencia de la tibia a la fractura

Al finalizar el periodo de evaluación productiva (semana 12), 10 aves por tratamiento (1 ave/réplica), fueron eutanasiadas mediante dislocación cervical, ambas tibias fueron extraídas y el tejido muscular y cartílago fue removido. Posteriormente se identificaron y almacenaron en congelación hasta su análisis. Se determinó la resistencia a la fractura por flexión estática con un texturómetro (QC-SPA de TSS®) siguiendo las recomendaciones establecidas por el fabricante.

Evaluación de la respuesta inmune humoral

Una vez eutanasiadas las aves se procedió al muestreo del contenido intestinal: 10 centímetros de yeyuno fueron extraídos y se realizaron lavados con 10mL de Solución Salina Fisiológica estéril, pasando 3 veces la solución a través del lumen intestinal, la solución se recolectó y se almacenó en congelación para su posterior evaluación mediante la prueba de ELISA.

Los niveles de IgA en lavados intestinales se determinaron con un kit de cuantificación ELISA para IgA de Pollo (Bethyl Laboratories Inc, Montgomery TX). Se utilizó una placa de 96 pozos de fondo plano (Nunc MaxiSorp®) que fue cubierta con 100µL de una dilución 1:100 de anticuerpo de recubrimiento (Goat anti-Chicken IgA-Affinity Purified) con buffer de carbonatos (0.05M pH 9.6). La placa se dejó incubar por 24 horas a 4° C. Una vez transcurrido este periodo se lavó 5 veces con 300 µL de solución de lavado (PBS + Tween-20 al 0.05%). Se añadieron 100µL de solución de bloqueo (PBS + Leche descremada 0.5% + Sacarosa 0.2%) y se incubó por 30 minutos. Durante este periodo se numeraron 7 tubos para la elaboración de la curva de titulación estándar, al tubo 1 se agregó 1.9mL de PBS y 5µL de suero de pollo de referencia. Se realizaron diluciones dobles seriadas mezclando 500µL de PBS con 500µL del tubo previo hasta llegar al tubo 7. Terminada la incubación de la placa esta fue lavada 5 veces con 300µL de

solución de lavado. Se depositaron 100µL de una dilución 1:10 de la muestra de lavado intestinal en PBS y 100µL de cada uno de los tubos de la curva de titulación, hecho esto se procedió a incubar la placa por 60 minutos a 37° C. Una vez pasado el tiempo de incubación se lavaron 5 veces con 300µL de solución de lavado. Se elaboró una dilución 1:10000 del anticuerpo de detección HRP (Goat anti-Chicken IgA-HRP conjugate) con solución de bloqueo, de la cual se agregaron 100µL en cada pozo y se incubó por 60 minutos a 37° C. Finalizada la incubación se lavó 5 veces con 300 µL de solución de lavado. Por último se adicionaron 100 µL de sustrato ABTS Peroxidasa (Synbiotics Corporation, San Diego CA). Las placas fueron incubadas en la oscuridad por 20 minutos a temperatura ambiente. La medición de la absorbancia se realizó con el espectrofotómetro lector ELISA Biotek® EL X800 con filtro de 405nm.

Durante la semana 13 de experimentación se realizó la vacunación vía ocular de todas las aves con virus activo de Enfermedad de Newcastle (ENC). Se tomaron muestras de sangre los días 0, 7 y 14 post-vacunación a 15 aves por tratamiento, las cuales fueron elegidas aleatoriamente e identificadas para su seguimiento. Los sueros se almacenaron en refrigeración hasta su análisis. Las muestras fueron enviadas al laboratorio de Diagnóstico en enfermedades de las Aves del departamento de Medicina y Zootecnia de Aves de la FMVZ, donde se determinaron los títulos de anticuerpos séricos específicos (IgY) para el virus de ENC a través de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI).

Evaluación de la respuesta inmune celular

Durante la semana 14 de experimentación fueron seleccionadas aleatoriamente e identificadas 48 gallinas (12 gallinas/tratamiento), se realizó una prueba de hipersensibilidad cutánea por basófilos (HCB) conforme al procedimiento descrito en estudios previos (Corrier y DeLoach, 1990). Brevemente, se efectuó una medición inicial para determinar el grosor de la membrana interdigital entre la segunda y tercera falange de ambas patas con un vernier digital. En la membrana interdigital de la pata izquierda se inoculó intradérmicamente una solución con fitohemaglutinina (0.1mg/0.1mL). La membrana interdigital de la pata derecha fue inoculada con SSF estéril (0.1mL) y sirvió como control. 24 horas después se realizó una nueva medición en los sitios de inoculación. La respuesta a la HCB fue evaluada mediante el incremento en el grosor de la membrana interdigital y calculada como la diferencia entre el grosor de la pata izquierda post-inoculación y el grosor de la pata izquierda pre-inoculación.

Finalizada la semana 14 del experimento se colectaron muestras de sangre completa en tubos con EDTA (5 muestras/tratamiento) para determinación de conteos de leucocitos totales y por línea celular, hematocrito, eritrocitos, trombocitos y sólidos totales. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Hematología del departamento de Patología de la FMVZ.

Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos de las variables evaluadas fueron analizados para verificar el cumplimiento de los supuestos de normalidad de los residuos y de homogeneidad de varianzas, fijando un nivel de significancia de 5% para ambas pruebas (Kuehl, 2001). Con el fin de cumplir estos supuestos para el análisis de los datos con porcentajes se realizó una transformación angular (mediante el arco cuyo seno es la raíz cuadrada de la proporción), mientras que los títulos de anticuerpos fueron transformados a logaritmo base 2.

Las variables productivas, de calidad de huevo, resistencia de la tibia a la fractura, niveles de IgA en lavados intestinales y respuesta a HCB fueron analizados mediante un análisis de varianza de un factor para un Diseño Completamente Aleatorizado con el siguiente modelo:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$
$$1 \leq i \leq 4 \quad 1 \leq j \leq 10$$

Donde:

y_{ij} = Variable respuesta.

μ = Media general.

τ_i = Efecto del i-ésimo tratamiento.

ε_{ij} = Error Experimental Aleatorio.

El análisis de los títulos de anticuerpos séricos de la prueba de HI y de la prueba de vida de anaquel se realizó mediante un diseño con mediciones repetidas. Para estas variables, además de las pruebas de distribución normal y de homogeneidad de varianzas, fue realizada la comprobación del supuesto de esfericidad mediante la prueba de Mauchly con un nivel de significancia de 5% (Kuehl, 2001). Se utilizó un análisis de varianza univariado a través de un arreglo de parcelas divididas para un diseño completamente al azar, donde la parcela grande correspondió al tratamiento y la parcela chica al tiempo. Se recurrió al análisis de varianza multivariado en el caso del incumplimiento del supuesto de esfericidad.

El modelo empleado correspondió al siguiente:

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + \delta_{ik} + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$
$$1 \leq i \leq 4 \quad 1 \leq j \leq 3 \quad 1 \leq k \leq 10$$

Donde:

y_{ij} = Variable respuesta.

μ = Media general.

α_i = Efecto del i-ésimo tratamiento.

δ_{ik} = Error Experimental Aleatorio dentro de tratamientos.

β_j = Efecto del j-ésimo tiempo.

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Interacción entre tratamiento y tiempo.

ε_{ij} = Error Experimental Aleatorio en las mediciones repetidas.

Las variables donde existió diferencia estadística significativa se sometieron a un análisis de contrastes ortogonales para la comparación de medias de las relaciones:

- Contraste 1 (Fuente): T1 (MTI) vs T2, T3, T4 (MTO)
- Contraste 2 (Elemento Orgánico): T4 (CMA) vs T2, T3 (CAFQ)
- Contraste 3 (Reducción): T2 (100% CAFQ) vs T3 (70% CAFQ)

Se realizó un análisis de regresión para las unidades Haugh como función de los días de almacenamiento.

Las variables de hemograma se evaluaron con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ya que no cumplieron con los supuestos de normalidad y homocedasticidad.

Adicionalmente se calcularon los promedios generales de las variables productivas porcentaje de postura, peso de huevo, masa de huevo, consumo de alimento y peso del ave y se sometieron a una prueba de t para la comparación de la media general contra los valores establecidos por el manual de la estirpe (ISA, 2015), esto con el fin de conocer si las dietas cumplieron con las recomendaciones nutricionales.

La base de datos fue elaborada en el programa Microsoft® Excel® 2013 y se utilizaron los programas *Statistical Package for Social Sciences* versión 20 de IBM® y JMP™ *Design of Experiments*, versión 8.0 (2008) para el análisis estadístico de los mismos.

RESULTADOS

VARIABLES PRODUCTIVAS

El desempeño productivo acumulado de las aves durante 12 semanas de experimentación se muestra en el Cuadro 8. No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos para porcentaje de postura ($p=0.293$), el tratamiento 1 (T1) presentó una producción numérica mayor (93.7%), que los tratamientos 3 (T3), 2 (T2) y 4 (T4) con 93.5%, 92.4% y 91.7% de postura respectivamente.

El peso de huevo de los tratamientos fue similar estadísticamente ($p=0.692$), el tratamiento adicionado con MTI y CMA (T4), mostró el mejor peso numéricamente (63.3g), mientras que el que se alimentó con una dieta reducida en 30% de CAFQ (T3) fue inferior a este (63.0g) pero ligeramente superior a los suplementados con 100% de MTI (T1) y 100% de CAFQ (T2) con 62.9g cada uno.

Respecto al consumo de alimento el T2 manifestó la menor ingesta de alimento (108.7g), el T1 y T3 presentaron consumos intermedios (109.1 y 109.2g respectivamente) y el T4 obtuvo el mayor consumo (109.5g), sin embargo fueron iguales estadísticamente ($p=0.236$).

No se hallaron diferencias estadísticas significativas para masa de huevo ($p=0.467$), las medias de T1 y T3 correspondieron a 58.9g, siendo los de mayor rendimiento numérico en comparación con T2 y T4 con 58.1g cada uno.

El análisis estadístico no reveló tampoco diferencias entre las medias para índice de conversión ($p=0.393$), el tratamiento 1 obtuvo el índice más bajo (1.85), continuando con los tratamientos 3 (1.86), 2 (1.87) y 4 (1.89).

El peso de las aves promedio fue uniforme, no hubieron diferencias estadísticas significativas entre las medias de los tratamientos ($p=0.762$), el grupo con el menor peso fue el adicionado con MTI (T1-1703g), seguido por los suplementados con CAFQ (T2-1707g y T3-1713g) y el adicionado con MTI y CMA (T4-1715g).

Los resultados de la prueba de t para la media general de porcentaje de postura, peso de huevo, masa de huevo, consumo de alimento, peso del ave y conversión alimenticia contra los valores

de referencia de la estirpe se observan en el Cuadro 9. El promedio general de postura fue significativamente mayor (92.8% vs 83.4%; $p < 0.01$). El peso del huevo fue 1 gramo menor al de referencia (63g vs 64g; $p < 0.01$). La masa de huevo general fue de 58.5g siendo 5.1 gramos superior a los 53.4g reportados en la guía de la estirpe ($p < 0.01$). El consumo de alimento en promedio fue 0.9 gramos menor al del manual (109.1g vs 110g; $p < 0.01$). La conversión alimenticia fue menor en 0.19 unidades con respecto al manual (1.87 vs 2.06; $p < 0.01$). Por último el peso de las aves fue mayor al recomendado para el periodo de experimentación en 18.6 gramos (1709.4g vs 1691g; $p < 0.01$).

En el Cuadro 10 se observa que los porcentajes de huevo sucio promedio fueron similares ($p = 0.571$), los tratamientos 2 y 4 obtuvieron un porcentaje inferior (0.8%) a los tratamientos 1 y 3 (1.4%). Para huevo roto y fáfara los menores porcentajes fueron obtenidos por T2, T1 y T4 con 2.3%, 2.4% y 2.5% respectivamente, en tanto T3 obtuvo el mayor promedio numérico (3.2%), sin embargo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p = 0.570$).

Calidad de huevo

El Cuadro 10 muestra los resultados de las variables de calidad de huevo. No se encontraron diferencias estadísticas significativas para unidades Haugh ($p = 0.419$), color de la yema ($p = 0.059$) y grosor del cascarón ($p = 0.658$). Las unidades Haugh promedio fueron 88.2 (T1), 88.6 (T2), 88.1 (T3) y 87.5 (T4). En cuanto a color de yema los tratamientos 1, 3 y 4 presentaron un valor promedio de 11 en la escala colorimétrica del abanico de DSM, mientras que el tratamiento 2 obtuvo 10.8. El tratamiento adicionado con 100% de CAFQ (T2) tuvo un grosor de cascarón promedio de $337\mu\text{m}$ que fue semejante a los grupos con reducción (T3) y adicionado sólo con MTI (T1) con $336\mu\text{m}$ cada uno, el tratamiento suplementado con MTI y CMA (T4) presentó el menor valor numérico con $333\mu\text{m}$.

El cuadro 11 muestra los resultados de la prueba de resistencia del cascarón a la fractura. El T1 ($3048\text{g}/\text{cm}^2$) fue inferior numéricamente en comparación con T2, T3 y T4 ($3158\text{g}/\text{cm}^2$, $3231\text{g}/\text{cm}^2$ y $3210\text{g}/\text{cm}^2$). El análisis de contrastes ortogonales muestra una diferencia en el primer contraste ($p = 0.044$) sin embargo al no encontrarse diferencias significativas en el ANDEVA ($p = 0.185$) estos resultados carecen de significancia estadística.

Resistencia de la Tibia a la Fractura

Las medias para la prueba de resistencia de la tibia a la fractura se pueden apreciar en el Cuadro 11 y corresponden a 12250g/cm², 13370g/cm², 12783g/cm² y 11966g/cm² para los tratamientos 1, 2, 3 y 4 respectivamente. No se encontraron diferencias estadísticas significativas (p=0.781).

Vida de anaquel

Los resultados de la pérdida de calidad por almacenamiento se muestran en el Cuadro 12. No se encontró efecto de interacción (Tratamiento x Tiempo) para el almacenamiento del huevo en refrigeración (p=0.250) ni a temperatura ambiente (p=0.216). Tampoco se encontró significancia del efecto principal de tratamiento independientemente de su forma de almacenamiento (refrigeración p=0.117 y temperatura ambiente p=0.138). Por otra parte, los días de almacenamiento si tuvieron efecto sobre la calidad de huevo para ambos grupos (p<0.0001). La medición basal fue la misma para las dos formas de almacenamiento (89.49 unidades), se puede observar que desde los 7 días de almacenamiento el huevo refrigerado tuvo una menor pérdida con respecto al huevo a temperatura ambiente (81.40 vs 69.23) y que al finalizar los 14 días esta diferencia fue aún más marcada (75.48 vs 60.90).

En las Figuras 8 y 9 se observan las curvas de regresión de la pérdida de unidades Haugh (UH) por efecto del tiempo de almacenamiento en refrigeración y temperatura ambiente respectivamente. La función de la regresión cuadrática para almacenamiento en refrigeración fue la siguiente: $UH=88.40265-1.0000741*\text{días de almacenamiento}+0.0221162*(\text{días de almacenamiento}-7)^2$, con una $R^2=0.8832$ y una significancia $p<0.0001$. Para el caso de almacenamiento en temperatura ambiente la ecuación es: $UH=83.525303-2.041757*\text{días de almacenamiento}+0.1216538*(\text{días de almacenamiento}-7)^2$, $R^2=0.9423$ y $p<0.0001$.

Respuesta Inmune

El análisis estadístico de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación no mostró evidencias estadísticas significativas para el efecto de la interacción (Tratamiento x Tiempo) (p=0.339), ni para los efectos principales de tiempo (p=0.080) y tratamiento (p=0.381), los resultados se muestran en el Cuadro 13. El logaritmo base 2 de los títulos de anticuerpos séricos fueron semejantes estadísticamente entre los tratamientos antes de la vacunación contra ENC (9.28) y después de 7 (9.42) y 14 (8.97) días post-vacunación.

En el Cuadro 14 se pueden ver los resultados de la prueba de hipersensibilidad cutánea por basófilos HCB) y la cuantificación de IgA secretora en contenido intestinal calculada mediante la prueba de ELISA. No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las medias de los tratamientos para ninguna de las variables ($p=0.081$ y $p=0.829$). El incremento en el grosor de la piel de la membrana interdigital fue de 0.77mm, 0.87mm, 0.90mm y 0.59mm para T1, T2, T3 y T4, respectivamente. Los promedios de IgA secretora fueron muy semejantes entre los tratamientos (T1-12595ng/ml, T2-12684ng/ml, T3-12729ng/ml y T4-12728ng/ml).

Los resultados de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para las variables del hemograma, se pueden apreciar en el Cuadro 15. No se hallaron diferencias estadísticas significativas para ninguna de las variables evaluadas ($p > 0.05$). El hematocrito fue menor para el T4 (0.288 L/L), seguido por el T3 (0.3L/L), T1 (0.304L/L) y T2 (0.308L/L). Los conteos celulares promedio de los tratamientos 1 a 4 por línea celular fueron los siguientes: eritrocitos ($2.48 \times 10^{12}/L$, $2.54 \times 10^{12}/L$, $2.72 \times 10^{12}/L$ y $2.58 \times 10^{12}/L$), leucocitos ($3.98 \times 10^9/L$, $2.48 \times 10^9/L$, $3.96 \times 10^9/L$ y $3.74 \times 10^9/L$), Heterófilos ($0.83 \times 10^9/L$, $0.55 \times 10^9/L$, $0.94 \times 10^9/L$ y $0.92 \times 10^9/L$), linfocitos ($2.95 \times 10^9/L$, $1.50 \times 10^9/L$, $2.49 \times 10^9/L$ y $2.15 \times 10^9/L$), monocitos ($0.54 \times 10^9/L$, $0.24 \times 10^9/L$, $0.37 \times 10^9/L$ y $0.34 \times 10^9/L$), basófilos ($0.12 \times 10^9/L$, $0.09 \times 10^9/L$, $0.10 \times 10^9/L$ y $0.29 \times 10^9/L$) y eosinófilos ($0.14 \times 10^9/L$, $0.10 \times 10^9/L$, $0.06 \times 10^9/L$ y $0.04 \times 10^9/L$); mientras que para el índice Heterófilo:Linfocito las medias obtenidas fueron las siguientes 0.34, 0.47, 0.46 y 0.40.

DISCUSIÓN

Variables productivas

El presente estudio reveló que la inclusión de complejos metal aminoácidos (CMA) *on top*, la sustitución de MTI por Carbo-Amino-Fosfo-Quelatos (CAFQ) y la reducción de estos últimos en 30%, no mejoraron los parámetros productivos en comparación con una dieta adicionada sólo con MTI. Algunos autores sugieren que la inconsistencia en la literatura con respecto al uso de MTO en gallinas en postura es debida a características propias de cada prueba: la concentración de MT en la DB, la edad y el fin zootécnico del ave, así como las fuentes y formas de suplementación de los MT influyen en su biodisponibilidad y metabolización (Fernandes et al., 2008; Maciel et al., 2010; Saripinar-Aksu et al., 2012).

Los resultados obtenidos concuerdan con Sechinato et al (2006) quienes no encontraron efecto de los CAFQ sobre consumo de alimento, porcentaje de postura, masa de huevo y conversión alimenticia empleando gallinas Isa Babcock B300 de 48-60 semanas de edad, ellos argumentan que las dietas fueron adecuadas para maximizar los parámetros productivos y que por ende los MTO no tuvieron un efecto adicional, lo que concuerda con lo dicho por Payne et al (2005) quienes reportan que la respuesta a la suplementación de MT depende de su concentración en la dieta basal (DB). Es importante considerar que los ingredientes utilizados en la dieta basal poseen un contenido de MT muy variado influenciado por el lugar de origen de la materia prima y las características de la planta, su cultivo y los manejos de fertilización a los que fue sometida (Suttle, 2010). El análisis calculado de la DB del presente estudio reveló el siguiente perfil de minerales: 120ppm de hierro, 23ppm de cinc, 12ppm de cobre, 53ppm de manganeso, 0.15ppm de selenio y 0.15ppm de yodo; dado que las necesidades de MT para gallinas en postura blancas establecidas por el NRC (1994) son de Fe 38ppm, Zn 29ppm, Cu 4ppm, Mn 17ppm, Se 0.05ppm y de I 0.029ppm (Cuadro 1); se sugiere que la DB por sí misma cubrió las necesidades de Fe, Cu, Mn y Se, fue marginal en Zn y deficiente en I; siendo por ende difícil detectar algún beneficio adicional independientemente de la presentación de los minerales.

Otros estudios (Lim y Paik, 2003; Fernandes et al., 2008; Attia et al., 2010; Stefanello et al., 2014; Manangi et al., 2015) tampoco obtuvieron diferencias significativas para porcentaje de postura, peso de huevo, masa de huevo, consumo de alimento y conversión alimenticia; a excepción de

Cornescu et al. (2014) y Maciel et al. (2010) quienes observaron mejoras sobre porcentaje de postura y peso de huevo asociadas a un efecto directo sobre la formación del huevo.

En cuanto al peso del ave el uso de MTO no influyó sobre esta variable tal como lo reportan Cornescu et al. (2014), pero difiere con el estudio de Manangi et al. (2015) con gallinas Hy-Line de 23-80 semanas de edad donde encontraron una diferencia de 50g entre las aves alimentadas con minerales inorgánicos y con quelatos metal hidroxianálogo de metionina (QMHAM) de Zn, Cu y Mn. Dichos autores no brindan ninguna explicación para este efecto.

La mayoría de los estudios que demuestran los beneficios de los MTO sobre los parámetros productivos en cuanto a biodisponibilidad son realizados en pollo de engorda de menos de 7 semanas de edad (Cuadro 5), en contraste, las aves utilizadas en el presente experimento fueron de 60 a 72 semanas de edad. Se sabe que la edad influye sobre las necesidades de minerales, a mayor edad menores son las necesidades (Suttle, 2010). El aporte para crecimiento en el pollo de engorda es cubierto casi exclusivamente por la dieta por lo que el efecto de la suplementación de MTO es más evidente, a diferencia de la gallina en postura que además de cubrir sus necesidades por la dieta es capaz de hacer uso de sus reservas corporales para satisfacerlas (Xiao et al., 2015). Estos autores recomiendan evaluar parámetros más sensitivos para discernir la respuesta a la adición de MTO como concentraciones de minerales en órganos (hueso, hígado, corazón), actividad enzimática o concentración de RNAm.

Por otra parte el uso de una fase de agotamiento de las reservas corporales previa al inicio del experimento, ha sido una práctica utilizada por algunos investigadores (Xiao et al., 2014, 2015) para demostrar el efecto positivo de los MTO. Este acercamiento busca simular una deficiencia marginal a través de la suplementación de dietas carentes de MT y la posterior adición del mineral a probar de manera individual. Aunque el efecto del MT sobre alguna ruta metabólica o parámetro productivo es evidenciado, los resultados de estos estudios deben ser tomados con prudencia ya que son realizados bajo condiciones experimentales muy controladas que no son del todo representativas de las condiciones comerciales, en las que las dietas para aves son adicionadas con MT conforme a recomendaciones de algunos autores o casas genéticas y que en su mayoría exceden notablemente las necesidades establecidas por el NRC (Cuadros 1 y 3).

Los problemas de cascarón tienden a presentarse en aves maduras y se han relacionado con el incremento en el tamaño y disminución de la calidad del cascarón (Shafey et al., 2015; Xiao et al., 2015). Asimismo se sabe que la actividad de la enzima 25-hidroxi-colecalciferol-1-hidroxilasa disminuye y por tanto disminuye también la absorción del calcio (Joyner et al., 1987; Xiao et al., 2014). El papel de los MT en la formación del cascarón se ha asociado con la anhidrasa carbónica (Salim et al., 2008; Tsai et al., 2016), la lisil oxidasa (Lim y Paik, 2003) y algunas glucosiltransferasas (Yildiz et al., 2011; Xiao et al., 2014) que están involucradas en el proceso de síntesis de las matrices orgánica e inorgánica del cascarón. La suplementación de MTO no disminuyó el porcentaje de huevo roto y en fáfara en comparación con MTI, lo que está en concordancia con lo reportado por Stefanello et al. (2014) y Manangi et al. (2015) quienes utilizaron proteínatos y QMHAM como fuentes de MTO. Otros estudios (Lim y Paik, 2003; Maciel et al., 2010; Gheisari et al., 2011) han mostrado una reducción del huevo roto con la inclusión de MTO, asociando dicho efecto a cambios en la ultraestructura del cascarón.

Los resultados de la comparación entre las medias de porcentaje de postura, peso de huevo, masa de huevo, consumo de alimento, conversión alimenticia y peso del ave sugieren que las dietas satisficieron las necesidades de MT de la estirpe durante el periodo de estudio (Cuadro 9). En general los parámetros fueron superiores a los de referencia, salvo el caso del peso de huevo que fue ligeramente inferior (63g vs 64g).

Calidad de Huevo

Los resultados del análisis de varianza para resistencia a la fractura y grosor del cascarón no mostraron diferencias estadísticas significativas, aunque para el caso de resistencia al realizar el análisis de contrastes ortogonales, el contraste de fuente (MTI vs MTO) resultó significativo ($p=0.044$), lo cual sugiere un efecto positivo de los MTO sobre esta variable concordando con los estudios realizados por Xiao et al. (2015) con complejos Mn-Aminoácidos que demostraron beneficios de los MTO en gallinas Hy-Line Brown de 55 a 62 semanas de edad, no obstante concuerdan con respecto a la ausencia de efecto sobre grosor de cascarón. Cabe señalar que para el caso de nuestra investigación, este efecto benéfico es sólo una tendencia numérica y es necesaria más investigación para confirmar una verdadera significancia estadística. Algunos autores sugieren que el incremento en la resistencia es debido a la presencia de MT en la fase inicial de la formación del cascarón que promueve la fusión de la capa mamilar e influye sobre

la morfología de los cristales de calcio (Mabe et al., 2003). Otras investigaciones no reportaron diferencias estadísticas en ninguna de estas variables utilizando diferentes fuentes orgánicas (Lim y Paik, 2003; Maciel et al., 2010; Gheisari et al., 2011; Cornescu et al., 2014; Stefanello et al., 2014; Manangi et al., 2015). Dale y Strong (1998), mencionan que los niveles de MT en la dieta basal enmascararon los efectos de la adición de MTO sobre la calidad de cascarón.

La unidad Haugh (UH) es un parámetro de calidad interna de huevo que mide su frescura y está en función del peso del huevo y la altura de su albúmina. Es afectado por la edad del ave, la densidad de alojamiento, así como por el periodo y las condiciones ambientales de almacenamiento (Menezes et al., 2012). En México el huevo comercializado puede ser clasificado conforme a las UH como: México Extra (>70), México 1 (61-70), México 2 (31-60) y fuera de clasificación (<30) (NMX-FF-079, 2004). En esta investigación los promedios de todos los tratamientos se encontraron dentro de la clasificación México Extra y no presentaron diferencias significativas con respecto a la fuente de MT, esto concuerda con lo reportado por Stefanello et al. (2014) y Lim y Paik (2003) pero difiere de lo encontrado por Gheisari et al. (2011) quienes si hallaron mejoras asociadas a un incremento en la calidad de cascarón.

Vida de Anaquel

En México el huevo es comercializado principalmente a granel (82%), mientras que la distribución en empaques cerrados y a la industria es menor (14% y 4% respectivamente) (Alonso, 2016). Esto indica que la mayoría del huevo que es vendido se conserva a temperatura ambiente y permanece así hasta que es adquirido por el comprador final quien lo consumirá al momento o continuará con su almacenamiento. Durante este periodo el huevo disminuirá su calidad interna ya que una vez ovipositado perderá agua y CO₂ a través de los poros, incrementándose el pH de la albúmina y provocando que la ovomucina y la lisozima se disocien, dichas proteínas están asociadas a la viscosidad de la albúmina. En conjunto estos efectos se verán reflejados en menor altura de la albúmina, pérdida de peso del huevo y por ende menos UH (Fernandes et al., 2008). Entre los factores que repercuten sobre la pérdida de UH están la edad del ave (mayor porosidad y adelgazamiento del cascarón al final del ciclo), el tiempo de almacenamiento y las condiciones ambientales (altas temperaturas y baja humedad relativa) (Joyner et al., 1987; Xiao et al., 2014; Shafey et al., 2015). Los resultados de la prueba de vida de anaquel mostraron que la adición de MTO (CAFQ o CMA) en comparación con el grupo con

MTI no afectó la pérdida de UH durante el almacenamiento en refrigeración o a temperatura ambiente, esto se asocia a la ausencia de diferencias en las características de calidad de cascarón. Menezes et al. (2012) estudiaron el efecto de diferentes densidades de alojamiento (625, 500, 416.6 y 357.14cm²/ave), temperaturas de conservación (8°C y 25°C), tiempos de almacenamiento (7, 14 y 21 días) y edades de las aves (35, 40, 45 y 50 semanas de edad) sobre la pérdida de calidad interna del huevo en gallinas Dekalb White, concluyendo que la refrigeración es un método efectivo de conservación que aminora la pérdida de UH y que los periodos largos de almacenamiento disminuyen la calidad. Nuestro estudio corrobora estos hallazgos en aves de 66 semanas de edad con densidad de alojamiento de 600cm²/ave, sin embargo los valores de las UH en refrigeración y a temperatura ambiente fueron menores que los obtenidos por dichos autores tras 7 (refrigeración, 92.24 vs 81.4; ambiente, 78.70 vs 69.23.) y 14 (refrigeración, 92.05 vs 75.48; ambiente, 69.47 vs 60.9) días de almacenamiento.

En la presente investigación se utilizó un modelo de regresión cuadrático para calcular el efecto de los días de almacenamiento sobre las UH, esto se puede justificar dada la tendencia de los datos que se ajustó mejor al modelo cuadrático que al lineal. Resultados similares fueron obtenidos por Fernandes et al (2008) con huevo procedente de gallinas de 73 a 85 semanas de edad utilizando 5 tiempos de medición (1, 3, 6, 9 y 12 días de almacenamiento) a diferencia de los 3 usados en esta prueba. En el artículo no se brindan detalles de las características de la prueba de almacenamiento sólo se observa que la reducción de las UH es más acentuada (d1-89.3, -d3-70.2, d6-61.8, d9-49.3 y d12-42.7) que la obtenida en nuestro ensayo (d0-89.49; refrigeración: d7-81.4 y d14-75.48; temperatura ambiente: d7-69.23 y d14-60.9).

Una de las características más conocidas de los MTO es su mayor biodisponibilidad respecto a los MTI, lo que sugiere que una reducción en su inclusión no debería afectar tanto el desempeño productivo de los animales como las características de calidad de sus productos. Lo anterior es confirmado en esta investigación al no encontrarse diferencias entre el tratamiento reducido en 30% de CAFQ y los suplementados con dosis normales, confirmando lo reportado por Gheisari et al (2011).

Se sabe que el exceso de MT no mejora el desempeño productivo de las aves y que no obstante puede generar antagonismos o toxicidad (Suttle, 2010; López, 2013), aunque esta última es

menos frecuente dados los amplios márgenes de seguridad que presentan la mayoría de los MT (Cuadro 1). La homeostasis de los MT es regulada por el control en su absorción y excreción siendo los excesos excretados vía fecal y urinaria (Windisch, 2002). Dichos excesos representan un riesgo potencial para el medio ambiente al acumularse en los mantos acuíferos, suelos y plantas que son fertilizados con heces, por tal motivo en la actualidad el uso de MT por encima de las recomendaciones de inclusión ha sido criticado (Brugger y Windisch, 2015). En el presente estudio la adición *on top* de CMA en una dieta tipo comercial que incluía sales inorgánicas (T4) tal como lo recomiendan algunos productores no mostró beneficio alguno sobre el desempeño productivo de gallinas en postura.

Resistencia de la Tibia a la Fractura

Esta variable fue evaluada al finalizar la doceava semana de experimentación (72 semanas de edad). Al igual que los resultados derivados de la investigación de Manangi et al. (2015) con aves de 80 semanas de edad, la sustitución de MTI por MTO no tuvo efecto significativo sobre el hueso de la tibia, ellos postulan que este tejido es menos sensitivo que el cascarón con respecto a la biodisponibilidad. En un estudio conducido por Drinić et al. (2016) en pollo de engorda se demostró que la DB aportó suficientes MT para no producir efectos negativos sobre la resistencia a la fractura de las tibias, lo que concuerda con lo sugerido en la presente investigación.

Respuesta Inmune

La eficacia de los MT sobre la respuesta inmune radica principalmente en las funciones del cinc (Park et al., 2004; Sato et al., 2012; Liao et al., 2013) y el selenio (Cardoso et al., 2015). Uno de los objetivos de este experimento fue evaluar el impacto de los CAFQ y los CMA sobre la respuesta inmune humoral, no obstante su inclusión no mostró beneficios sobre los títulos de anticuerpos concordando con lo reportado en algunos estudios en gallina en postura (Lim y Paik, 2003; Manangi et al., 2015).

Otros ensayos en pollo de engorda han tenido resultados variables tras la utilización de MTO sobre los títulos de anticuerpos utilizando MTO. Feng et al. (2010) observó mejorías tras el uso Quelatos de Cinc-Glicina sobre los niveles de IgA e IgY, resultados similares fueron obtenidos por Moghaddam y Jahanian (2009) con cinc metionina sobre los títulos de IgY y por Boostani

et al. (2015) utilizando selenio metionina sobre IgM. Por otra parte Silva et al. (2010) reporta que el uso de selenio metionina disminuyó la producción de anticuerpos, ellos mencionan que el efecto de este mineral está más relacionado con la integridad de los tejidos y órganos y el mejoramiento del metabolismo. Se ha reportado que la deficiencia de cinc en animales jóvenes puede suprimir la producción de anticuerpos debido a un pobre desarrollo del tejido linfóide en la bolsa de Fabricio (Burns, 1983), en el presente estudio la ausencia de diferencias puede estar asociada a la edad de las aves y a la constante inmunización realizada como parte del manejo preventivo, igualmente se sugiere que todos los tratamientos cubrieron las necesidades de las aves y por ende los efectos de los MT no fueron evidentes.

Los resultados para respuesta inmune celular tampoco mostraron diferencias significativas. La inclusión de MTO no tuvo ningún efecto sobre los parámetros hematológicos (conteos de leucocitos, por línea celular y relación Heterófilo/Linfocito) lo que concuerda con lo que reportó Attia et al. (2010) utilizando proteínatos de manganeso en gallinas de 30 a 46 semanas y con Silva et al. (2010) quienes utilizaron pollos de engorda y levaduras como fuente de selenio. La relación Heterófilo/Linfocito es un parámetro que ha sido utilizado como indicador de estrés, estudios realizados con cinc metionina tampoco reportaron diferencias estadísticas en comparación con MTI (Moghaddam y Jahanian, 2009). En ese mismo estudio se evaluó la prueba de hipersensibilidad cutánea por basófilos encontrando diferencias estadísticas al comparar con un reemplazo total con MTI a diferencia de lo encontrado en nuestra investigación. Dichas diferencias fueron asociadas a funciones directas del cinc sobre la síntesis de ADN y división celular. En otra investigación realizada por Boostani et al. (2015) no se obtuvieron diferencias al comparar selenito de sodio y selenio-Metionina para la prueba con fitohemaglutinina.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales de este experimento se puede concluir:

- La sustitución de MTO por MTI en dietas base sorgo-pasta de soya, no afectó los parámetros productivos, calidad del huevo, vida de anaquel, resistencia de las tibias a la fractura y respuesta inmune de gallinas en postura Bovans White de 60 a 72 semanas de edad, sin embargo se observó una tendencia a mejorar la resistencia a la fractura del cascarón que se recomienda sea confirmada en futuras investigaciones.
- La inclusión de Carbo-Amino-Fosfo-Quelatos como fuente de MTO en dietas base sorgo-pasta de soya no difirió en los parámetros productivos, calidad de huevo, vida de anaquel, resistencia de las tibias a la fractura y respuesta inmune de gallinas en postura Bovans White de 60 a 72 semanas de edad en comparación con una dieta tipo comercial adicionada *on top* con MTO en forma de Complejos Metal Aminoácidos. Esta última dieta no mostró beneficio adicional alguno sobre las variables evaluadas en el presente estudio.
- La reducción en 30% de las recomendaciones de inclusión de CAFQ como fuente de MTO en dietas base sorgo-pasta de soya no produjo ninguna afectación sobre los parámetros productivos, calidad de huevo, vida de anaquel, resistencia de las tibias a la fractura y respuesta inmune de gallinas en postura Bovans White de 60 a 72 semanas de edad. Esto implica la posibilidad de disminuir las inclusiones de minerales traza en dietas prácticas con la utilización de fuentes orgánicas de mayor biodisponibilidad que reducen su desperdicio y consecuentemente aminoran el impacto medio ambiental ligado al uso de sales inorgánicas.
- Se sugiere el uso de la refrigeración como medio de almacenamiento para prolongar la conservación de las características de calidad interna del huevo.

REFERENCIAS

1. AAFCO (2008) *Official Publication of the Association of American Feed Control Officials*. Krebs, S. (ed.). Oxford: Association of American Feed Control Officials.
2. Ahmad, R., Zargar, S. M., Mahajan, R., Farhat, S. y Nazir, M. (2015) "Role of Iron and Zinc in Animals and Crop Plants Understanding the Role of Iron and Zinc in Animals and Crop Plants from Genomics Perspective", 9(APRIL) pp. 182–196.
3. Alonso, F. (2016) "Avicultura en México, entorno (comercio internacional) y perspectivas". *En 9o Congreso Internacional AVEM*. Juriquilla, Querétaro.
4. Ammerman, C., Henry, P. y Miles, R. (1998) "Bioavailability of organic forms of the microminerals". *En Presented at the 9th Florida Ruminant Nutrition Symposium*, pp. 33–49.
5. Andreini, C., Banci, L., Bertini, I. y Rosato, A. (2006) "Zinc through the three domains of life". *Journal of Proteome Research*, 5(11) pp. 3173–3178.
6. Aoyagi, S. y Baker, D. (1993) "Nutritional evaluation of copper-lysine and zinc-lysine complexes for chicks". *Poultry Science*, 72(1) pp. 165–171.
7. Arredondo, M., Muñoz, P., Mura, C. y Nùñez, M. (2003) "DMT1, a physiologically relevant apical Cu¹⁺ transporter of intestinal cells." *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 284(6) pp. C1525–C1530.
8. Ashmead, H. (2012) *Amino acid chelation in human and animal nutrition*. Boca Raton, Florida: Taylor & Francis.
9. Attia, Y., Qota, E., Bovera, F., Tag El-Din, A. y Mansour, S. (2010) "Effect of amount and source of manganese and/or phytase supplementation on productive and reproductive performance and some physiological traits of dual purpose cross-bred hens in the tropics." *British Poultry Science*, 51(2) pp. 235–245.
10. Avigen (2014) *Broiler Ross 308: Especificaciones de Nutrición*. [En línea] [Consultado el 30a de agosto de 2016]
http://es.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Spanish_TechDocs/Ross308BroilerNutritionSpecs2014-ES.pdf.
11. Bach, J., Bardenne, M., Pleau, J. y Rosa, J. (1977) "Biochemical characterisation of a serum thymic factor". *Nature*, 266(5597) pp. 55–57.
12. Bai, S., Lu, L., Wang, R., Xi, L., Zhang, L. y Luo, X. (2012) "Manganese source affects manganese transport and gene expression of divalent metal transporter 1 in the small intestine of broilers." *The British journal of nutrition*, 108(2) pp. 267–76.
13. Bao, Y., Choct, M., Iji, P. y Bruerton, K. (2007) "Effect of organically complexed copper, iron, manganese, and zinc on broiler performance, mineral excretion, and accumulation in tissues". *Journal of Applied Poultry Research*, 16(3) pp. 448–455.
14. Van den Berghe, P. y Klomp, L. (2009) "New developments in the regulation of intestinal copper absorption". *Nutr Rev*, 67(11) pp. 658–672.
15. Besold, A. N., Culbertson, E. M. y Culotta, V. C. (2016) "The Yin and Yang of copper during infection". *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 21(2) pp. 137–144.
16. Boostani, A., Sadeghi, A., Mousavi, S., Chamani, M. y Kashan, N. (2015) "Effects of organic, inorganic, and nano-Se on growth performance, antioxidant capacity, cellular and humoral immune responses in broiler chickens exposed to oxidative stress". *Livestock Science*, 178 pp. 330–336.
17. Bovell-Benjamin, A. C., Viteri, F. E. y Allen, L. H. (2000) "Iron absorption from ferrous bisglycinate and ferric trisglycinate in whole maize is regulated by iron status". *American Journal of Clinical Nutrition*, 71(6) pp. 1563–1569.
18. Brasselagnel, C., Karim, Z., Letteron, P., Bekri, S., Bado, A. y Beaumont, C. (2011) "Intestinal

- DMT1 cotransporter is down-regulated by hepcidin via proteasome internalization and degradation”. *Gastroenterology*. Elsevier Inc., 140(4) pp. 1261–1271.
19. Bravo, M. E., Espinoza, A., Blum, S. C. y Behrens, N. B. (2015) “Metalochaperonas: Escoltas personales en el tráfico intracelular de iones metálicos”. *Educacion Química*, 26(1) pp. 26–37.
 20. Briens, M., Mercier, Y., Rouffineau, F., Mercierand, F. y Geraert, P. (2014) “2-Hydroxy-4-methylselenobutanoic acid induces additional tissue selenium enrichment in broiler chickens compared with other selenium sources”. *Poultry science*, 93(1) pp. 85–93.
 21. Briens, M., Mercier, Y., Rouffineau, F., Vacchina, V. y Geraert, P. (2013) “Comparative study of a new organic selenium source v. seleno-yeast and mineral selenium sources on muscle selenium enrichment and selenium digestibility in broiler chickens”. *British Journal of Nutrition*, 110(4) pp. 617–624.
 22. Brooks, M., Grimes, J., Lloyd, K., Valdez, F. y Spears, J. (2012) “Relative bioavailability in chicks of manganese from manganese propionate”. *Journal of Applied Poultry Research*, 21(1) pp. 126–130.
 23. Brooks, M., Grimes, J., Lloyd, K., Verissimo, S. y Spears, J. (2013) “Bioavailability in chicks of zinc from zinc propionate”. *Journal of Applied Poultry Research*, 22(2) pp. 153–159.
 24. Brugger, D. y Windisch, W. M. (2015) “Environmental responsibilities of livestock feeding using trace mineral supplements”. *Animal Nutrition*. Elsevier, 1(3) pp. 113–118.
 25. Burns, R. (1983) “Antibody production suppressed in the domestic fowl (*Gallus domesticus*) by zinc deficiency”. *Avian Pathology*, 12(1) pp. 141–146.
 26. Cao, C., Thomas, C. E., Insogna, K. L. y Brien, K. O. O. (2014) “Duodenal Absorption and Tissue Utilization of Dietary Heme and IMonheme Iron Differ in Rats”. *The Journal of nutrition*, 144(C) pp. 1710–1717.
 27. Cao, J., Henry, P., Ammerman, C., Miles, R. y Littell, R. (2000) “Relative bioavailability of basic zinc sulfate and basic zinc chloride for chicks”. *Journal of Applied Poultry Research*, 9(4) pp. 513–517.
 28. Cao, J., Luo, X., Henry, P., Ammerman, C., Littell, R. y Miles, R. (1996) “Effect of dietary iron concentration, age, and length of iron feeding on feed intake and tissue iron concentration of broiler chicks for use as a bioassay of supplemental iron sources.” *Poultry science*, 75(4) pp. 495–504.
 29. Cardoso, B. R., Roberts, B. R., Bush, A. I. y Hare, D. J. (2015) “Selenium, selenoproteins and neurodegenerative diseases”. *Metallomics*. Royal Society of Chemistry, 7(8) pp. 1213–1228.
 30. Case, C. y Carlson, M. (2002) “Effect of feeding organic and inorganic sources of additional zinc on growth performance and zinc balance in nursery pigs.” *Journal of Animal Science*, 80(7) pp. 1917–1924.
 31. Chen, P., Chakraborty, S., Mukhopadhyay, S., Lee, E., Paoliello, M. M., Bowman, A. B. y Aschner, M. (2015) “Manganese homeostasis in the nervous system”. *Journal of Neurochemistry*, 134(4) pp. 601–610.
 32. Cobb-Vantress (2012) *Broiler Performance & Nutrition Supplement Cobb 500*. [En línea] [Consultado el 30a de agosto de 2016] http://www.cobb-vantress.com/docs/default-source/cobb-500-guides/Cobb500_Broiler_Performance_And_Nutrition_Supplement.pdf.
 33. Cornescu, G., Panaite, T., Untea, A. y Criste, R. (2014) “Study concerning the effects of using organic trace mineral supplements (Mn and Zn) on egg quality”. *Archiva Zootechnica*, 17(2) pp. 77–83.
 34. Corrier, D. y DeLoach, J. (1990) “Evaluation of cell-mediated, cutaneous basophil hypersensitivity in young chickens by an interdigital skin test”. *Poultry Science*, 69(3) pp. 403–408.
 35. Costa E Silva, L. F., De Campos Valadares Filho, S., Engle, T. E., Rotta, P. P., Marcondes, M. I., Silva, F. A. S., Martins, E. C. y Tokunaga, A. T. (2015) “Macrominerals and trace element requirements for beef cattle”. *PLoS ONE*, 10(12) pp. 1–21.

36. Cuca, M., Ávila, E. y Pro, A. (2009) *Alimentación de las Aves*. Texcoco, Edo. Mex.: Universidad Autónoma de Chapingo.
37. Dale, N. y Strong, C. (1998) “Inability to Demonstrate an Effect of Eggshell #49 on Shell Quality in Older Laying Hens”. *Journal of Applied Poultry Research*, 7(2) pp. 219–224.
38. Drinić, M., Kralj, A. y Važić, B. (2016) “Effects of removing vitamins and trace minerals from finisher diets on production parameters , tibia strength and ash content in chicken bones”. *Animal Science Papers and Reports*, 34(3) pp. 279–292.
39. Echeverría, M., Henry, P., Ammerman, C., Rao, P. y Miles, R. (1988) “Estimation of the relative bioavailability of inorganic selenium sources for poultry. 2. Tissue uptake of selenium from high dietary selenium concentrations”. *Poultry Science*, 67(11) pp. 1585–1592.
40. EFSA FEEDAP (2006) “Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the safety and efficacy of the product Sel-Plex®2000 as a feed additive according to Regulation (EC) No 1831/2003”. *EFSA Journal*, 4(5) p. 40pp.
41. EFSA FEEDAP (2013) “Scientific Opinion on safety and efficacy of hydroxy-analogue of selenomethionine as feed additive for all species”. *EFSA Journal*, 11(1) pp. 1–30.
42. EFSA FEEDAP (2014) “Scientific Opinion on the re-evaluation of propionic acid (E 280), sodium propionate (E 281), calcium propionate (E 282) and potassium propionate (E 283) as food additives”. *EFSA Journal*, 12(7) p. 3779.
43. EFSA FEEDAP (2015) “Scientific Opinion on the safety and efficacy of iron compounds (E1) as feed additives for all animal species: ferrous carbonate based on a dossier submitted”. *EFSA Journal*, 13(5) p. 4109.
44. Fairweather-Tait, S. J., Collings, R. y Hurst, R. (2010) “Selenium bioavailability : current knowledge and future research”. *Am J Clin Nutr*, 91(2) p. 1484S–91S.
45. FEDNA (2016) *Fuentes de Microminerales*. Tablas de Ingredientes para piensos. [En línea] [Consultado el 12a de septiembre de 2016] http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_pensos/fuentes-de-microminerales.
46. Feng, J., Ma, W., Niu, H., Wu, X. y Wang, Y. (2010) “Effects of zinc glycine chelate on growth, hematological, and immunological characteristics in broilers”. *Biological Trace Element Research*, 133(2) pp. 203–211.
47. Fernandes, J., Murakami, A., Sakamoto, M., Souza, L., Malaguido, A. y Martins, E. (2008) “Effects of organic mineral dietary supplementation on production performance and egg quality of white layers”. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 10(1) pp. 59–66.
48. Fernández, D., Boix, E., Pallarès, I., Avilés, F. X. y Vendrell, J. (2011) “Structural and Functional Analysis of the Complex between Citrate and the Zinc Peptidase Carboxypeptidase A.” *Enzyme research*, 2011 p. 128676.
49. Fujimura, T., Matsui, T. y Funaba, M. (2012) “Regulatory responses to excess zinc ingestion in growing rats.” *British Journal of Nutrition*, 107(11) pp. 1655–1663.
50. Gheisari, A., Sanei, A., Samie, A., Gheisari, M. y Toghiani, M. (2011) “Effect of diets supplemented with different levels of manganese, zinc, and copper from their organic or inorganic sources on egg production and quality characteristics in laying hens”. *Biological Trace Element Research*, 142(3) pp. 557–571.
51. Groote, G. de, Lippens, M., Jongbloed, A. y Meschy, F. (2002) *Study on the bioavailability of major and trace minerals*. Brussels, Belgium.
52. Guo, R., Henry, P., Holwerda, R., Cao, J., Littell, R., Miles, R. y Ammerman, C. (2001) “Chemical characteristics and relative bioavailability of supplemental organic zinc sources for poultry and ruminants 1,2”. *Journal of Animal Science*, 79(5) pp. 1132–1141.
53. Haddad, J. J. (2009) “Thymulin and zinc (Zn²⁺)-mediated inhibition of endotoxin-induced production of proinflammatory cytokines and NF-KB nuclear translocation and activation in the alveolar epithelium: Unraveling the molecular immunomodulatory, anti-inflammatory effect of thy”. *Molecular Immunology*, 47(2–3) pp. 205–214.

54. Horning, K. J., Caito, S. W., Tipps, K. G., Bowman, A. B. y Aschner, M. (2015) “Manganese Is Essential for Neuronal Health.” *Annual review of nutrition*, 35 pp. 71–108.
55. Hu, X., Sheikahmadi, A., Li, X., Wang, Y., Jiao, H., Lin, H., Zhang, B. y Song, Z. (2016) “Effect of Zinc on Appetite Regulatory Peptides in the Hypothalamus of Salmonella-Challenged Broiler Chickens”. *Biological Trace Element Research*. Biological Trace Element Research, 172(1) pp. 228–233.
56. Huang, D., Hu, Q., Fang, S. y Feng, J. (2016) “Dosage Effect of Zinc Glycine Chelate on Zinc Metabolism and Gene Expression of Zinc Transporter in Intestinal Segments on Rat”. *Biological Trace Element Research*. Biological Trace Element Research, 171(2) pp. 363–370.
57. Huang, Y., Lu, L., Li, S., Luo, X. y Liu, B. (2009) “Relative bioavailabilities of organic zinc sources with different chelation strengths for broilers fed a conventional corn-soybean meal diet”. *Journal of Animal Science*, 87(6) pp. 2038–2046.
58. Huang, Y., Lu, L., Xie, J., Li, S., Li, X., Liu, S., Zhang, L., Xi, L. y Luo, X. (2013) “Relative bioavailabilities of organic zinc sources with different chelation strengths for broilers fed diets with low or high phytate content”. *Animal Feed Science and Technology*, 179(1–4) pp. 144–148.
59. Hy-Line (2016) *Guía de Manejo: Ponedoras Comerciales W-36*. [En línea] [Consultado el 30 de agosto de 2016] http://www.hyline.com/userdocs/pages/36_COM_SPN_Interactive.pdf.
60. INEGI (2014) *Anuario estadístico y geográfico del Distrito Federal*. Ciudad de México: INEGI.
61. ISA (2015) *Bovans White Commercial Management Guide*. The Netherlands-EU: Institut de Sélection Animale BV.
62. IUPAC (2014) *Compendium of Chemical Terminology - Gold Book*. Chemistry, I. U. of P. and A. (ed.). 2.3.3.
63. Jenkitkasemwong, S., Wang, C. Y., MacKenzie, B. y Knutson, M. D. (2012) “Physiologic implications of metal-ion transport by ZIP14 and ZIP8”. *BioMetals*, 25(4) pp. 643–655.
64. Jia, Y., Jiang, M., Sun, J., Shi, R. y Liu, D. (2015) “Studies on Different Iron Source Absorption by in Situ Ligated Intestinal Loops of Broilers”. *Biological Trace Element Research*, 163(1–2) pp. 154–161.
65. Jiang, L., Garrick, M. D., Garrick, L. M., Zhao, L. y Collins, J. F. (2013) “Divalent metal transporter 1 (Dmt1) mediates copper transport in the duodenum of iron-deficient rats and when overexpressed in iron-deprived HEK-293 cells.” *The Journal of nutrition*, 143(12) pp. 1927–33.
66. Jilali, M., Briens, M., Rouffineau, F., Mercierand, F., Geraert, P. y Mercier, Y. (2013) “Effect of 2-hydroxy-4-methylselenobutanoic acid as a dietary selenium supplement to improve the selenium concentration of table eggs”. *Journal of Animal Science*, 91(4) pp. 1745–1752.
67. Joyner, C., Peddie, M. y Taylor, T. (1987) “The effect of age on egg production in the domestic hen”. *General and Comparative Endocrinology*, 65(3) pp. 331–336.
68. Kanteev, M., Goldfeder, M., Chojnacki, M., Adir, N. y Fishman, A. (2013) “The mechanism of copper uptake by tyrosinase from *Bacillus megaterium*”. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 18(8) pp. 895–903.
69. Kawamata, K., Hayashi, H. y Suzuki, Y. (2007) “Propionate absorption associated with bicarbonate secretion in vitro in the mouse cecum”. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 454(2) pp. 253–262.
70. Kim, J. W. y Kil, D. Y. (2015) “Determination of relative bioavailability of copper in tribasic copper chloride to copper in copper sulfate for broiler chickens based on liver and feather copper concentrations”. *Animal Feed Science and Technology*. Elsevier B.V., 210(Dec) pp. 138–143.
71. Kostogryś, R., Pisulewski, P., Pecio, A. y Filipiak-Florkiewicz, A. (2010) “Goitrogenic effects of allylthiocyanate, nitrate and nitrite in rats and alleviating properties of iodine and selenium supplements.” *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 60(2) pp. 165–173.
72. Kuehl, R. O. (2001) *Diseños de Experimentos*. 2a ed., México: Thomson Learning.
73. Kwiecien, M., Samolinska, W. y Bujanowicz-Haras, B. (2015) “Effects of iron-glycine chelate

- on growth, carcass characteristic, liver mineral concentrations and haematological and biochemical blood parameters in broilers”. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 99(6) pp. 1184–1196.
74. Lazarus, J. H. (2015) “The importance of iodine in public health.” *Environmental geochemistry and health*, 37(4) pp. 605–18.
 75. Ledoux, D., Henry, P., Ammerman, C., Rao, P. y Miles, R. (1991) “Estimation of the relative bioavailability of inorganic copper sources for chicks using tissue uptake of copper.” *Journal of Animal Science*, 69(1) pp. 215–222.
 76. Leeson, S. (2005) “Trace mineral requirements of poultry - validity of NRC recommendations.” *En Tucker, J. T.-P. L. (ed.) Re-defining Mineral Nutrition*. Nottingham: Nottingham University Press, pp. 107–117.
 77. Leeson, S. (2009) “Copper metabolism and dietary needs”. *World’s Poultry Science Journal*, 65(3) pp. 353–366.
 78. Leeson, S. y Summers, J. (2005) *Comercial poultry nutrition*. 3th ed., Guelph, Ontario: Nottingham University Press.
 79. Li, L., Li, P., Chen, Y., Wen, C., Zhuang, S. y Zhou, Y. (2015) “Zinc-bearing zeolite clinoptilolite improves tissue zinc accumulation in laying hens by enhancing zinc transporter gene mRNA abundance”. *Animal Science Journal*, 86(8) pp. 782–789.
 80. Li, S., Luo, X., Liu, B., Crenshaw, T., Kuang, X., Shao, G. y Yu, S. (2004) “Use of chemical characteristics to predict the relative bioavailability of supplemental organic manganese sources for broilers.” *Journal of Animal Science*, 82(8) pp. 2352–2363.
 81. Li, S., Luo, X., Lu, L., Crenshaw, T., Bu, Y., Liu, B., Kuang, X., Shao, G. y Yu, S. (2005) “Bioavailability of organic manganese sources in broilers fed high dietary calcium”. *Animal Feed Science and Technology*, 123–124(PART 2) pp. 703–715.
 82. Liao, X., Li, A., Lu, L., Liu, S., Li, S., Zhang, L., Wang, G. y Luo, X. (2013) “Optimal dietary zinc levels of broiler chicks fed a corn – soybean meal diet from 22 to 42 days of age”. *Animal Production Science*, 53(5) pp. 388–394.
 83. Liao, Z., Guan, W., Chen, F., Hou, D., Wang, C., Lv, Y., Qiao, H., Chen, J. y Han, J. (2014) “Ferrous bisglycinate increased iron transportation through DMT1 and PepT1 in pig intestinal epithelial cells compared with ferrous sulphate”. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 23(2) pp. 153–159.
 84. Lim, H. y Paik, I. (2003) “Effects of supplementary mineral methionine chelates (Zn, Cu, Mn) on the performance and eggshell quality of laying hens”. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 16(12) pp. 1804–1808.
 85. Lin, C., Zhang, Z., Wang, T., Chen, C. y James Kang, Y. (2015) “Copper uptake by DMT1: a compensatory mechanism for CTR1 deficiency in human umbilical vein endothelial cells.” *Metallomics : integrated biometal science*. Royal Society of Chemistry, 7(8) pp. 1285–9.
 86. Littell, R., Henry, P., Lewis, A. y Ammerman, C. (1997) “Estimation of Relative Bioavailability of Nutrients Using SAS Procedures”. *Journal of Animal Science*, 75(10) pp. 2672–2683.
 87. Liu, N., Lo, L., Askary, S., Jones, L., Kidane, T., Nguyen, T., Goforth, J., Chu, Y., Vivas, E., Tsai, M., Westbrook, T. y Linder, M. (2007) “Transcuprein is a macroglobulin regulated by copper and iron availability”. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(9) pp. 597–608.
 88. Liu, R., Jin, C., Wang, Z., Wang, Z., Wang, J. y Wang, L. (2015) “Effects of manganese deficiency on the microstructure of proximal tibia and OPG/RANKL gene expression in chicks”. *Veterinary Research Communications*, 39(1) pp. 31–37.
 89. Liu, S., Lu, L., Li, S., Xie, J., Zhang, L., Wang, R. y Luo, X. (2012) “Copper in organic proteinate or inorganic sulfate form is equally bioavailable for broiler chicks fed a conventional corn-soybean meal diet”. *Biological Trace Element Research*, 147(1–3) pp. 142–148.
 90. López, C. (2013) “Nutrición de minerales traza orgánicos en pollos de engorde y reproductoras”. *En Congreso Científico de Avicultura, Simposio WPSA-AECA*. Lleida, España.

91. Lowe, J. A. y Wiseman, J. (1998) “A Comparison of the Bioavailability of Three Dietary Zinc Sources Using Four Different Physiologic Parameters in Dogs”. *The Journal of nutrition*, 128 pp. 2809–2811.
92. Ma, W., Wu, J., Zhuo, Z., Sun, H., Yue, M. y Feng, J. (2013) “Comparison of absorption characteristics of iron glycine chelate and ferrous sulfate in caco-2 cells”. *International Journal of Agriculture and Biology*, 15(2) pp. 372–376.
93. Ma, X., Liu, S., Lu, L., Li, S., Xie, J., Zhang, L., Zhang, J. y Luo, X. (2014) “Relative bioavailability of iron proteinate for broilers fed a casein-dextrose diet”. *Poultry Science*, 93(3) pp. 556–563.
94. Mabe, I., Rapp, C., Bain, M. y Nys, Y. (2003) “Supplementation of a corn-soybean meal diet with manganese, copper, and zinc from organic or inorganic sources improves eggshell quality in aged laying hens.” *Poultry science*, 82(12) pp. 1903–1913.
95. Maciel, M., Saraiva, E., Aguilar, E., Ribeiro, P., Passos, D. y Silva, J. (2010) “Effect of using organic microminerals on performance and external quality of eggs of commercial laying hens at the end of laying”. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39(2) pp. 344–348.
96. Manangi, M., Vazquez-Añon, M., Richards, J., Carter, S. y Knight, C. (2015) “The impact of feeding supplemental chelated trace minerals on shell quality, tibia breaking strength, and immune response in laying hens”. *Journal of Applied Poultry Research*, 24(3) pp. 316–326.
97. Mañón, A. (2015) *Interaction of Dietary Supplements of Organic Trace Minerals and Phytase on Growth Performance and Mineral Metabolism of Replacement Pullets*. University of Kentucky.
98. Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F. y Margis-Pinheiro, M. (2008) “Glutathione peroxidase family - An evolutionary overview”. *FEBS Journal*, 275(15) pp. 3959–3970.
99. Martín-Venegas, R., Brufau, M., Mercier, Y., Geraert, P. y Ferrer, R. (2011) “Intestinal cell conversion of DL-2-hydroxy-(4-methylthio)butanoic acid in vitro: dietary up-regulation by this methionine precursor.” *The British Journal Of Nutrition*, 106(3) pp. 350–6.
100. Martin, L., Lodemann, U., Bondzio, A., Gefeller, E., Vahjen, W., Aschenbach, J. R., Zentek, J. y Pieper, R. (2013) “A high amount of dietary zinc changes the expression of zinc transporters and metallothionein in jejunal epithelial cells in vitro and in vivo but does not prevent zinc accumulation in jejunal tissue of piglets.” *Journal of Nutrition*, 143(8) pp. 1205–1210.
101. Martínez, I. Y., López Coello, C., Ávila, E. y Gómez, R. (2013) *Evaluación Del Efecto De Una Fitasa Y Ácido Láctico En Dieta A Base De Sorgo Y Pasta De Soya Sobre La Utilización De Fósforo, Calcio Y Zinc En Gallina De Postura*. U.N.A.M.
102. Mazariegos, D., Pizarro, F., Olivares, M., Nuñez, M. y Arredondo, M. (2004) “The Mechanisms for Regulating Absorption of Fe Bis-Glycine Chelate and Fe-Ascorbate in Caco-2 Cells are Similar”. *Journal of Nutrition*, 134(2) pp. 395–398.
103. Menezes, P., Lima, E., Medeiros, J., Oliveira, W. y Evencio-Neto, J. (2012) “Egg quality of laying hens in different conditions of storage, ages and housing densities”. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41(9) pp. 2064–2069.
104. Michalaki, M., Volonakis, S., Mamali, I., Kalfarentzos, F., Vagenakis, A. y Markou, K. (2014) “Dietary Iodine Absorption is not Influenced by Malabsorptive Bariatric Surgery”. *Obesity Surgery*, 24(11) pp. 1921–1925.
105. Mirrahimi, F., Salahinejad, M. y Ghasemi, J. B. (2016) “QSPR approaches to elucidate the stability constants between β -cyclodextrin and some organic compounds: Docking based 3D conformer”. *Journal of Molecular Liquids*. Elsevier B.V., 219 pp. 1036–1043.
106. Moghaddam, H. y Jahanian, R. (2009) “Immunological responses of broiler chicks can be modulated by Dietary supplementation of zinc-methionine in place of inorganic zinc sources”. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 22(3) pp. 396–403.
107. Molokwu, C. O. y Li, Y. V (2006) “Zinc Homeostasis and Bone Density”. *Ohio Research and Clinical Review*, 15(FALL) pp. 6–16.
108. Musumeci, M., Maccari, S., Massimi, A., Stati, T., Sestili, P., Corritore, E., Pastorelli, A.,

- Stacchini, P., Marano, G. y Catalano, L. (2014) "Iron excretion in iron dextran-overloaded mice". *Blood Transfusion*, 12(4) pp. 485–490.
109. Narayan, V., Kudva, A. K. y Prabhu, K. S. (2015) "Reduction of Tetrathionate by Mammalian Thioredoxin Reductase". *Biochemistry*, 54(33) pp. 5121–5124.
110. Nelson, K. T. y Prohaska, J. R. (2009) "Copper deficiency in rodents alters dopamine beta-mono-oxygenase activity, mRNA and protein level." *The British journal of nutrition*, 102(1) pp. 18–28.
111. Nicola, J. P., Carrasco, N. y Masini-Repiso, A. M. (2015) *Dietary I- Absorption: Expression and Regulation of the Na⁺/I- Symporter in the Intestine. Vitamins and Hormones*. 1a ed., Elsevier Inc.
112. NMX-FF-079 (2004) *Norma Mexicana. [19 oct 2004]. NMX-FF-079-SCFI-2004. Productos avícolas - Huevo fresco de gallina - especificaciones y métodos de prueba*. México: DOF-Segob.
113. NRC (1994) *Nutrient Requirements of Poultry*. 9th ed., Washington, DC. USA: National Academy of Science.
114. Ohgami, R. S., Campagna, D. R., McDonald, A. y Fleming, M. D. (2006) "The Steap proteins are metalloreductases". *Blood*, 108(4) pp. 1388–1394.
115. Orozco, A., Valverde, R. C., Olvera, A. y García, G. C. (2012) "Iodothyronine deiodinases: A functional and evolutionary perspective". *Journal of Endocrinology*, 215(2) pp. 207–219.
116. Park, S., Birkhold, S., Kubena, L., Nisbet, D. y Ricke, S. (2004) "Review on the role of dietary zinc in poultry nutrition, immunity, and reproduction." *Biological trace element research*, 101(2) pp. 147–63.
117. Payne, R., Lavergne, T. y Southern, L. (2005) "Effect of inorganic versus organic selenium on hen production and egg selenium concentration." *Poultry Science*, 84(2) pp. 232–7.
118. Pechin, G. (2012) "Absorción, metabolismo y homeostasis del zinc en los animales y el hombre". *Ciencia Veterinaria*, 14(1515–1883) pp. 93–125.
119. Pizarro, F., Olivares, M., Hertrampf, E., Mazariegos, D., Arredondo, M., Letelier, A. y Gidi, V. (2002) "Iron bis-glycine chelate competes for the nonheme-iron absorption pathway". *American Journal of Clinical Nutrition*, 76(3) pp. 577–581.
120. Platel, K. y Srinivasan, K. (2015) "Bioavailability of Micronutrients from Plant Foods: An Update". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 8398(May) pp. 00–00.
121. Prasad, A. S. (2008) "Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc". *Experimental Gerontology*, 43(5) pp. 370–377.
122. Przybyszewska, J. y Zekanowska, E. (2014) "The role of hepcidin, ferroportin, HCP1, and DMT1 protein in iron absorption in the human digestive tract". *Przegląd Gastroenterologiczny*, 9(4) pp. 208–213.
123. Ramos, D., Mar, D., Ishida, M., Vargas, R., Gaite, M., Montgomery, A. y Linder, M. (2016) "Mechanism of copper uptake from blood plasma ceruloplasmin by mammalian cells". *PLoS ONE*, 11(3) pp. 1–24.
124. Rayman, M. P., Infante, H. G. y Sargent, M. (2008) "Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation." *The British journal of nutrition*, 100(2) pp. 238–253.
125. Reggiani, P. C., Morel, G. R., Cónsole, G. M., Barbeito, C. G., Rodriguez, S. S., Brown, O. A., Bellini, M. J., Pléau, J. M., Dardenne, M. y Goya, R. G. (2009) "The thymus-neuroendocrine axis: Physiology, molecular biology, and therapeutic potential of the thymic peptide thymulin". *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1153 pp. 98–106.
126. Richards, J., Zhao, J., Harreil, R., Atwell, C. y Dibner, J. (2010) "Trace mineral nutrition in poultry and swine". *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(11) pp. 1527–1534.
127. Rimbach, G., Pallauf, J., Moehring, J., Kraemer, K. y Minihane, A. M. (2008) "Effect of dietary phytate and microbial phytase on mineral and trace element bioavailability - A literature review". *Current topics in nutraceutical research*, 6(3) pp. 131–144.
128. Roman, M., Jitaru, P. y Barbante, C. (2014) "Selenium biochemistry and its role for human health." *Metallomics : Integrated Biometal Science*, 6(1) pp. 25–54.

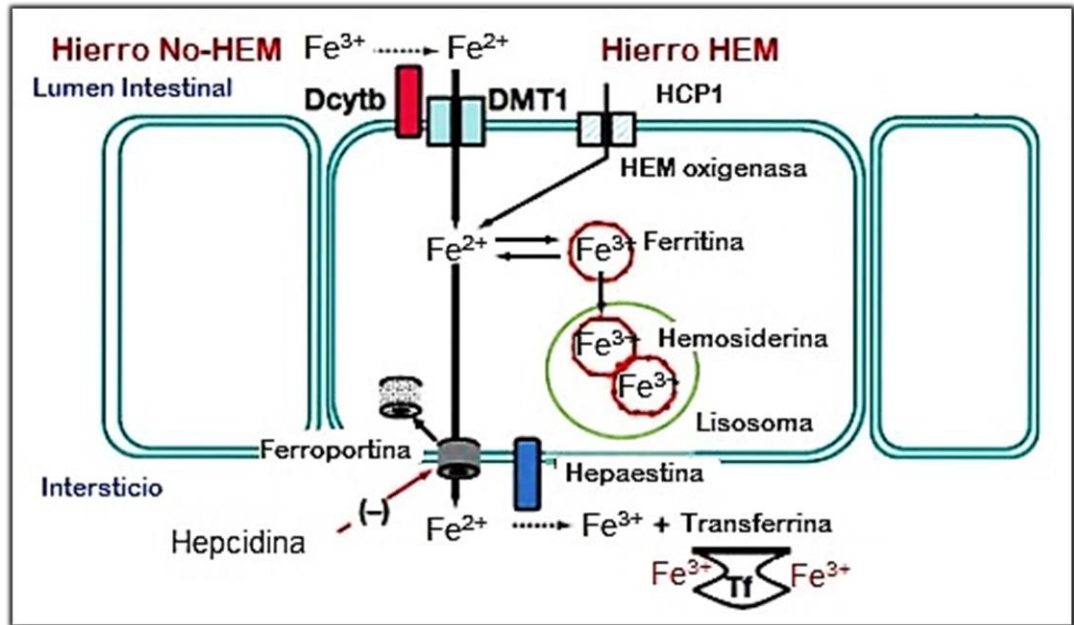
129. Rosborg, I. (2015) "Interactions Between Different Elements – The Need for Mineral Balance?" *En Drinking Water Minerals & Mineral Balance*. Springer International Publishing Switzerland, p. 125.
130. Rostagno, H. S., Albino, L., Donzele, J., Gómez, P., de Oliveira, R., Lopes, D., Ferreira, A. y de T. Barreto, S. (2011) *Tablas Brasileñas para Aves y Cerdos. Composición de alimentos y requerimientos nutricionales*. 3a ed., Brazil: Universidad Federal de Viscosa.
131. Saad, M., Gertner, L., Bona, T. y Santin, E. (2009) "Selenium influence in the poultry immune response--review." *Recent Patents On Food, Nutrition & Agriculture*, 1(3) pp. 243–247.
132. Sahraei, M., Janmmohamadi, H., Taghizadeh, A., Ali Moghadam, G. y Abbas Rafat, S. (2013) "Estimation of the Relative Bioavailability of Several Zinc Sources for Broilers Fed a Conventional Corn-Soybean Meal Diet". *The Journal of Poultry Science*, 50(1) pp. 53–59.
133. Salim, H., Jo, C. y Lee, B. (2008) "Zinc in broiler feeding and nutrition". *Avian Biology Research*, 1(1) pp. 5–18.
134. Salyer, G., Galyean, M., Defoor, P., Nunnery, G., Parsons, C. y Rivera, J. (2004) "Effects of copper and zinc source on performance and humoral immune response of newly received, lightweight beef heifers." *Journal of Animal Science*, 82(8) pp. 2467–2473.
135. Santiago, P. (2012) "Ferrous versus ferric oral iron formulations for the treatment of iron deficiency: a clinical overview". *ScientificWorldJournal*, 2012 p. 846824.
136. Saripinar-Aksu, D., Aksu, T. y Önel, S. (2012) "Does Inclusion at Low Levels of Organically Complexed Minerals Versus Inorganic Forms Create a Weakness in Performance or Antioxidant Defense System in Broiler Diets?" *International Journal of Poultry Science*, 11(10) pp. 666–672.
137. Sato, C., Listar, V. G. y Bonamin, L. V. (2012) "Development of broiler chickens after treatment with thymulin 5cH: A zoo technical approach". *Homeopathy*, 101(1) pp. 68–73.
138. Schrauzer, G. (2006) "Selenium yeast: Composition, quality, analysis, and safety". *Pure and Applied Chemistry*, 78(1) pp. 105–109.
139. Sechinato, A., Albuquerque, R. y Nakada, S. (2006) "Efeito da suplementação dietética com micro minerais orgânicos na produção de galinhas poedeiras". *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 43(2) pp. 159–166.
140. Seo, Y. y Wessling-Resnick, M. (2015) "Ferroportin deficiency impairs manganese metabolism in flatiron mice". *The FASEB Journal*, 29(7) pp. 2726–2733.
141. Shafey, T., Hussein, E., Mahmoud, A. y Al-batshan, H. (2015) "Managing Collinearity in Modeling the Effect of Age in the Prediction of Egg Components of Laying Hens Using Stepwise and Ridge Regression Analysis". *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 17(4) pp. 473–482.
142. Shawki, A., Anthony, S. R., Nose, Y., Engevik, M. A., Niespodzany, E. J., Barrientos, T., Ohrvik, H., Worrell, R. T., Thiele, D. J. y Mackenzie, B. (2015) "Intestinal DMT1 is critical for iron absorption in the mouse but is not required for the absorption of copper or manganese." *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, (22) p. ajpgi.00160.2015.
143. Silva, I. da, Ribeiro, A., Canal, C., Trevizan, L., Macagnan, M., Golcaves, T., Hlavac, N., Almeida, L. de y Pereira, R. (2010) "The impact of organic and inorganic selenium on the immune system of growing broilers submitted to immune stimulation and heat stress". *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 12(4) pp. 247–254.
144. Solomon, E. I., Heppner, D. E., Johnston, E. M., Ginsbach, J. W., Cirera, J., Qayyum, M., Kieber-Emmons, M. T., Kjaergaard, C. H., Hadt, R. G. y Tian, L. (2014) "Copper active sites in biology". *Chemical Reviews*, 114(7) pp. 3659–3853.
145. Sousa, S. F., Lopes, A. B., Fernandes, P. A. y Ramos, M. J. (2009) "The Zinc proteome: a tale of stability and functionality." *Dalton transactions (Cambridge, England: 2003)*, 38(38) pp. 7946–7956.
146. Star, L., Klis, J. Van Der, Rapp, C. y Ward, T. (2012) "Bioavailability of organic and inorganic zinc sources in male broilers". *Poultry Science*, 91(12) pp. 3115–3120.

147. Stefanello, C., Santos, T., Murakami, A., Martins, E. y Carneiro, T. (2014) “Productive performance, eggshell quality, and eggshell ultrastructure of laying hens fed diets supplemented with organic trace minerals”. *Poultry Science*, 93(1) pp. 104–113.
148. Sumaiya, S., Nayak, S., Baghel, R., Nayak, A., Malapure, C. y Kumar, R. (2016) “Effect of dietary iodine on production of iodine enriched eggs”. *Veterinary World*, 9(6) pp. 554–558.
149. Sun, Q., Guo, Y., Li, J., Zhang, T. y Wen, J. (2012) “Effects of Methionine Hydroxy Analog Chelated Cu/Mn/Zn on Laying Performance, Egg Quality, Enzyme Activity and Mineral Retention of Laying Hens”. *Journal of Poultry Science*, 49(1) pp. 20–25.
150. Suo, H., Lu, L., Zhang, L., Zhang, X., Li, H., Lu, Y. y Luo, X. (2015) “Relative Bioavailability of Zinc-Methionine Chelate for Broilers Fed a Conventional Corn–Soybean Meal Diet”. *Biological Trace Element Research*, 165(2) pp. 206–213.
151. Surai, P. y Fisinin, V. (2014) “Selenium in poultry breeder nutrition: An update”. *Animal Feed Science and Technology*. Elsevier B.V., 191 pp. 1–15.
152. Suttle, N. F. (2010) *Mineral Nutrition in Livestock*. 4th ed., Wallingford: CABI.
153. Suzuki, H., Asakawa, A., Li, J., Tsai, M., Amitani, H., Ohinata, K., Komai, M. y Inui, A. (2011) “Zinc as an appetite stimulator - the possible role of zinc in the progression of diseases such as cachexia and sarcopenia”. *Recent Patents On Food, Nutrition & Agriculture*, pp. 226–231.
154. Svihus, B. (2014) “Function of the digestive system”. *Journal of Applied Poultry Research*, 23(2) pp. 306–314.
155. Światkiewicz, S., Arczewska-Włosek, A. y Józefiak, D. (2014) “The efficacy of organic minerals in poultry nutrition: review and implications of recent studies”. *World's Poultry Science Journal*, 70(September) pp. 475–486.
156. Światkiewicz, S. y Koreleski, J. (2008) “The effect of zinc and manganese source in the diet for laying hens on eggshell and bones quality”. *Veterinarni Medicina*, 53(10) pp. 555–563.
157. Światkiewicz, S., Koreleski, J. y Zhong, D. (2001) “The bioavailability of zinc from inorganic and organic sources in broiler chickens as affected by addition of phytase”. *Journal Animal Feed Science*, 10 pp. 317–328.
158. Tako, E., Rutzke, M. y Glahn, R. (2010) “Using the domestic chicken (*Gallus gallus*) as an in vivo model for iron bioavailability.” *Poultry Science*, 89(3) pp. 514–521.
159. TORTUGA® (2016) “Quelatos”.
160. Tsai, Y., Mao, S., Li, M., Huang, J. y Lien, T. (2016) “Effects of nanosize zinc oxide on zinc retention, eggshell quality, immune response and serum parameters of aged laying hens”. *Animal Feed Science and Technology*, 213 pp. 99–107.
161. Velada, I., Capela-Silva, F., Reis, F., Pires, E., Egas, C., Rodrigues-Santos, P. y Barros, M. (2011) “Expression of Genes Encoding Extracellular Matrix Macromolecules and Metalloproteinases in Avian Tibial Dyschondroplasia”. *Journal of Comparative Pathology*. Elsevier Ltd, 145(2–3) pp. 174–186.
162. Vitti, P. (2010) “Organic trace minerals reduce the issue of over-feeding minerals to meet requirements”. *Canadian Poultry Magazine*, pp. 14–15.
163. Wang, F., Lu, L., Li, S., Liu, S., Zhang, L., Yao, J. y Luo, X. (2012) “Relative bioavailability of manganese proteinate for broilers fed a conventional corn-soybean meal diet”. *Biological Trace Element Research*, 146(2) pp. 181–186.
164. Wang, X. y Zhou, B. (2010) “Dietary zinc absorption: A play of zips and znts in the gut”. *IUBMB Life*, 62(3) pp. 176–182.
165. Wang, Z., Cerrate, S., Coto, C., Yan, F. y Waldroup, P. (2007) “Evaluation of Mintrex® Copper as a Source of Copper in Broiler Diets”. *International Journal of Poultry Science*, 6(5) pp. 308–313.
166. Wedekind, K. (1990) “Zinc bioavailability in feed-grade sources of zinc”. *Journal of Animal Science*, 68(3) pp. 684–689.
167. Wedekind, K., Hortin, A. y Baker, D. (1992) “Methodology for assessing zinc bioavailability:

- efficacy estimates for zinc methionine, zinc sulphate and zinc oxide.” *Journal of Animal Science*, 70(1) pp. 178–187.
168. Windisch, W. (2002) “Interaction of chemical species with biological regulation of the metabolism of essential trace elements.” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372(3) pp. 421–5.
169. Winter, W., Bazydło, L. y Harris, N. (2014) “The Molecular Biology of Human Iron Metabolism”. *Laboratory Medicine*, 45(2) pp. 92–102.
170. Wojciak, R. W. (2013) “Can short term free-will starvation escalate the zinc deficiency? zinc status in animal models and human anorexia”. *Trace Elements and Electrolytes*, 30(2) pp. 74–77.
171. Wong-Valle, J., Ammerman, C., Henry, P., Rao, P. y Miles, R. (1989) “Bioavailability of manganese from feed grade manganese oxides for broiler chicks”. *Poultry Science*, 68(10) pp. 1368–1373.
172. Xiao, J., Wu, S., Zhang, H., Yue, H., Wang, J., Ji, F. y Qi, G. (2015) “Bioefficacy comparison of organic manganese with inorganic manganese for eggshell quality in Hy-Line Brown laying hens”. *Poultry Science*, 94(8) pp. 1871–1878.
173. Xiao, J., Zhang, Y., Wu, S., Zhang, H., Yue, H. y Qi, G. (2014) “Manganese supplementation enhances the synthesis of glycosaminoglycan in eggshell membrane: A strategy to improve eggshell quality in laying hens”. *Poultry Science*, 93(2) pp. 380–388.
174. Yan, F. y Waldroup, P. (2006) “Evaluation of Mintrex® manganese as a source of manganese for young broilers”. *International Journal of Poultry Science*, 5(8) pp. 708–713.
175. Yenice, E., Mizrak, C., Gültekin, M., Atik, Z. y Tunca, M. (2015) “Effects of Organic and Inorganic Forms of Manganese, Zinc, Copper, and Chromium on Bioavailability of These Minerals and Calcium in Late-Phase Laying Hens”. *Biological Trace Element Research*, 167(2) pp. 300–307.
176. Yildiz, A., Cufadar, Y. y Olgun, O. (2011) “Effects of dietary organic and inorganic manganese supplementation on performance, egg quality and bone mineralisation” pp. 482–488.
177. Yu, Y., Lu, L., Luo, X. y Liu, B. (2002) “Kinetics of Zinc Absorption by In Situ Ligated Intestinal Loops of Broilers Involved in Zinc Transporters 1”. *October* pp. 1146–1155.
178. Yue, M., Fang, S., Zhuo, Z., Li, D. y Feng, J. (2015) “Zinc glycine chelate absorption characteristics in sprague dawley rat”. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 99(3) pp. 457–464.
179. Zastrow, M. L. y Pecoraro, V. L. (2014) “Designing hydrolytic zinc metalloenzymes”. *Biochemistry*, 53(6) pp. 957–978.
180. Zhang, L., Lu, L., Zhang, L. y Luo, X. (2016) “The chemical characteristics of organic iron sources and their relative bioavailabilities for broilers fed a conventional corn – soybean meal diet.” *Journal of Animal Science*, 94(6) pp. 2378–2396.
181. Zhao, J., Shirley, R., Vazquez-Añon, M., Dibner, J., Richards, J., Fisher, P., Hampton, T., Christensen, K., Allard, J. y Giesen, A. (2010) “Effects of chelated trace minerals on growth performance, breast meat yield, and footpad health in commercial meat broilers”. *Journal of Applied Poultry Research*, 19(4) pp. 365–372.
182. Zhu, Y., Lu, L., Li, W., Zhang, L., Ji, C., Lin, X., Liu, H., Odle, J. y Luo, X. (2015) “Effect of dietary manganese on antioxidant status and expression levels of heat-shock proteins and factors in tissues of laying broiler breeders under normal and high environmental temperatures”. *British Journal of Nutrition*, 114(12) pp. 1965–1974.

FIGURAS

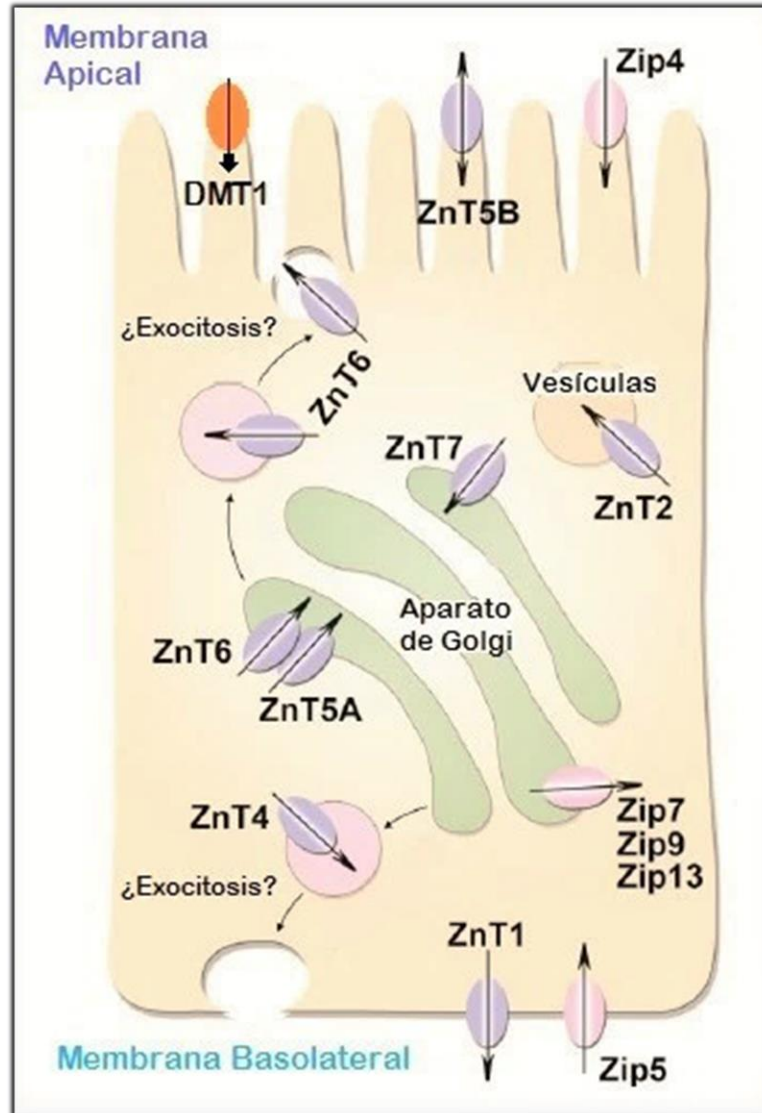
Figura 1. Mecanismo de Absorción del Hierro.



Fuente: Adaptado de Winter et al. 2014.

Abreviaciones: DcytB, Citocromo B Duodenal; DMT1, transportador de iones metálicos divalentes 1; HCP1, proteína acarreadora de HEME 1; Tf, transferrina.

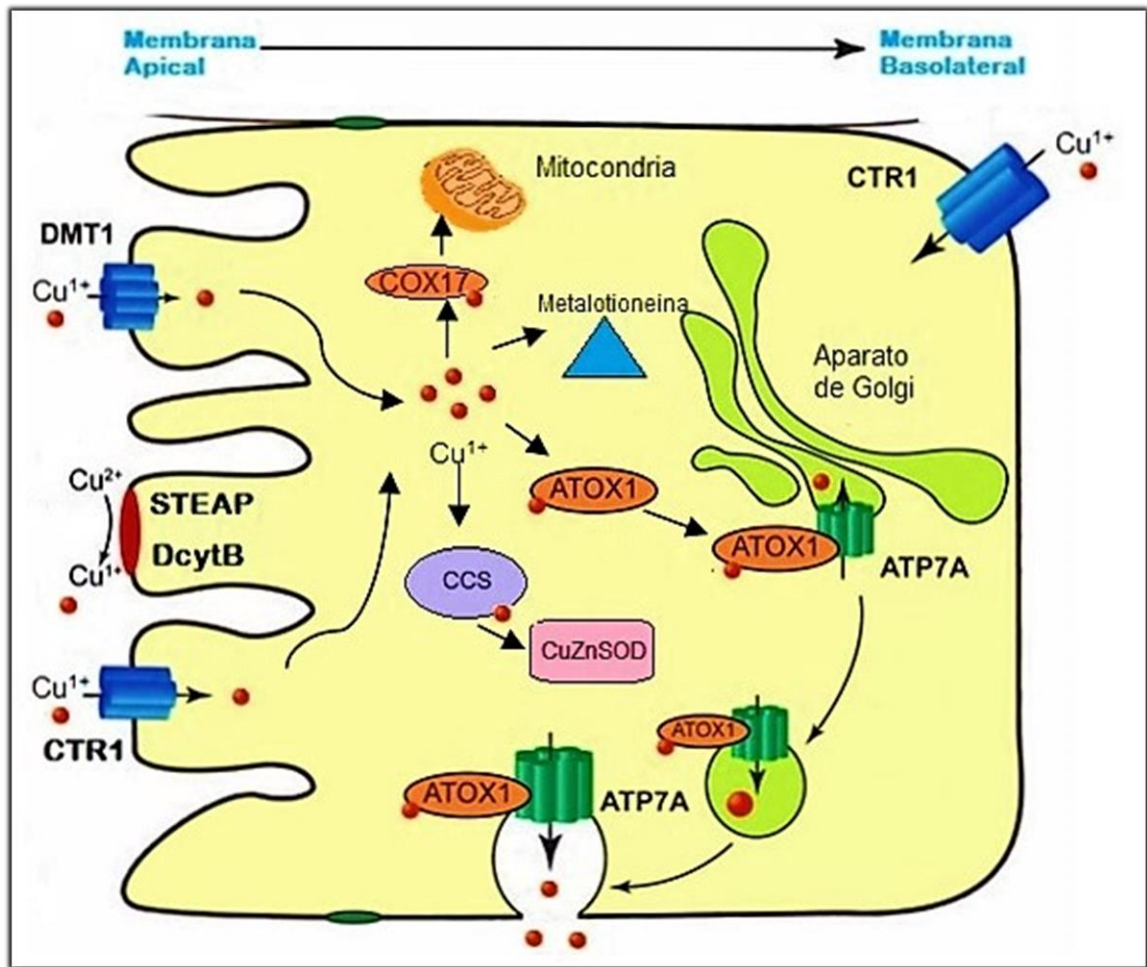
Figura 2. Mecanismo de Absorción del Cinc.



Fuente: Adaptado de Wang & Zhou 2010.

Abreviaciones: DMT1, transportador de iones metálicos divalentes 1; Zip, Proteína tipo ZRT-,IRT-; ZnT, transportador de Cinc.

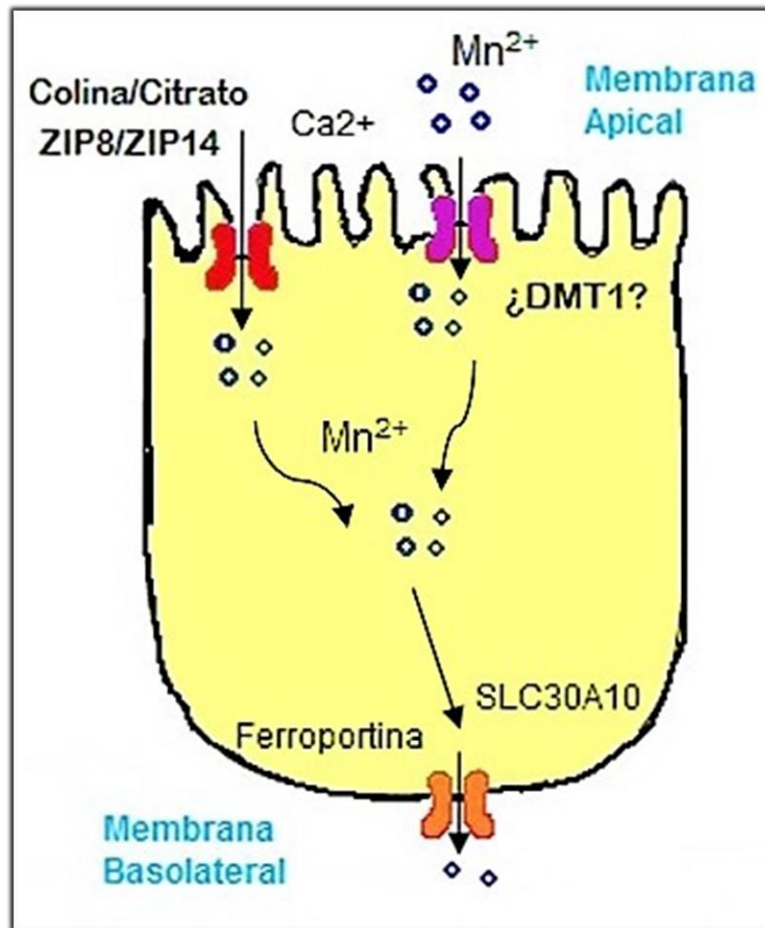
Figura 3. Mecanismo de Absorción del Cobre.



Fuente: Adaptado de van den Berghe & Klomp 2009.

Abreviaciones: ATOX1, chaperona ATOX1; ATP7A, ATPasa 7A; CCS, chaperona de cobre para CuZnSOD; COX17, chaperona de citocromo C oxidasa; CTR1, transportador de cobre de alta afinidad 1; CuZnSOD, Superóxido Dismutasa Cu-Zn; DcytB, Citocromo B Duodenal; DMT1, transportador de iones metálicos divalentes 1; STEAP, proteínas STEAP.

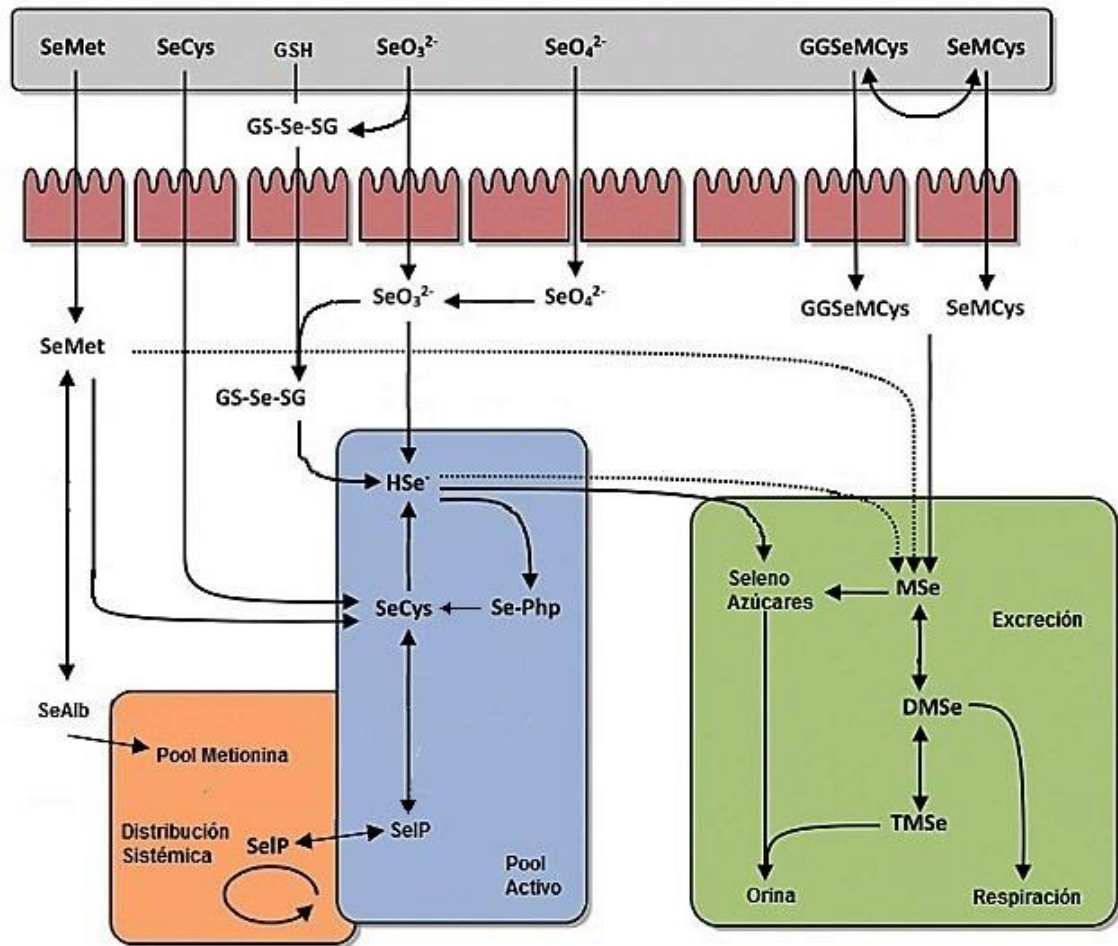
Figura 4. Mecanismo de Absorción del Manganeso.



Fuente: Elaboración propia.

Abreviaciones: DMT1, transportador de iones metálicos divalentes 1; ZIP, Proteína tipo ZRT-, IRT-; SLC30A10, Familia de Portadores de Solutos 30 Miembro 10.

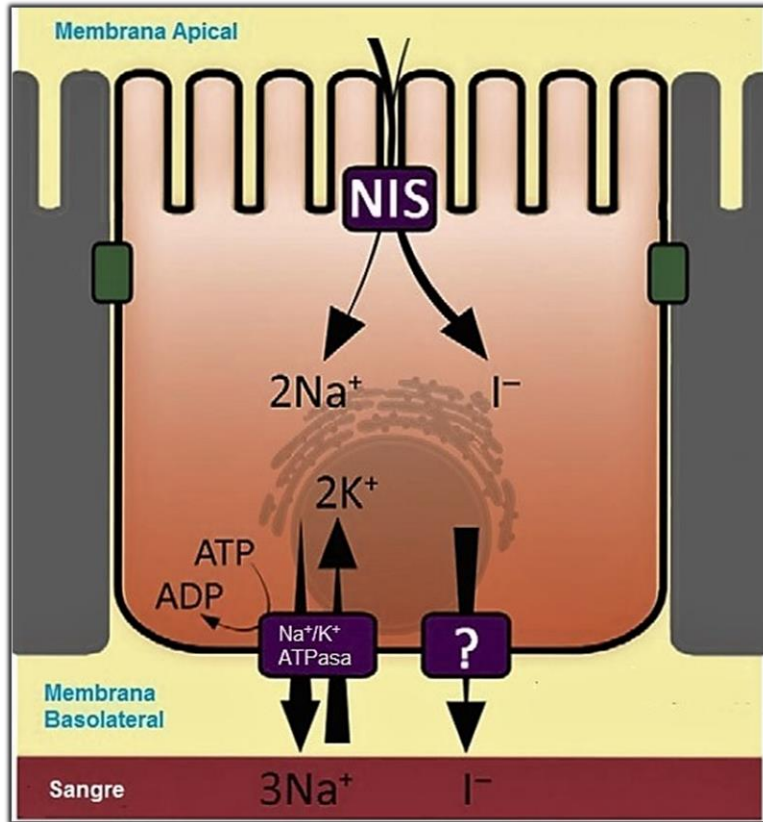
Figura 5. Mecanismo de Absorción del Selenio.



Fuente: Adaptado de Roman et al., 2014.

Abreviaciones: DMSe, dimetilselenuro; GGSeMCys γ -glutamyl-Se-metil-selenocisteína; GS-Se-SG selenodiglutatión; GSH glutatión reducido; HSe-seleniuro de hidrógeno; MSe, metilselenuro; SeAlb, albúmina, SeCys, selenio-cisteína o selenocisteína; SeMCys, Se-metil-selenocisteína; SeMet, selenio-metionina o selenometionina; SeO_3^{2-} , selenito; SeO_4^{2-} , selenato; SeP, selenoproteínas; SePhp, selenofosfato; TMsE, trimetilselenuro.

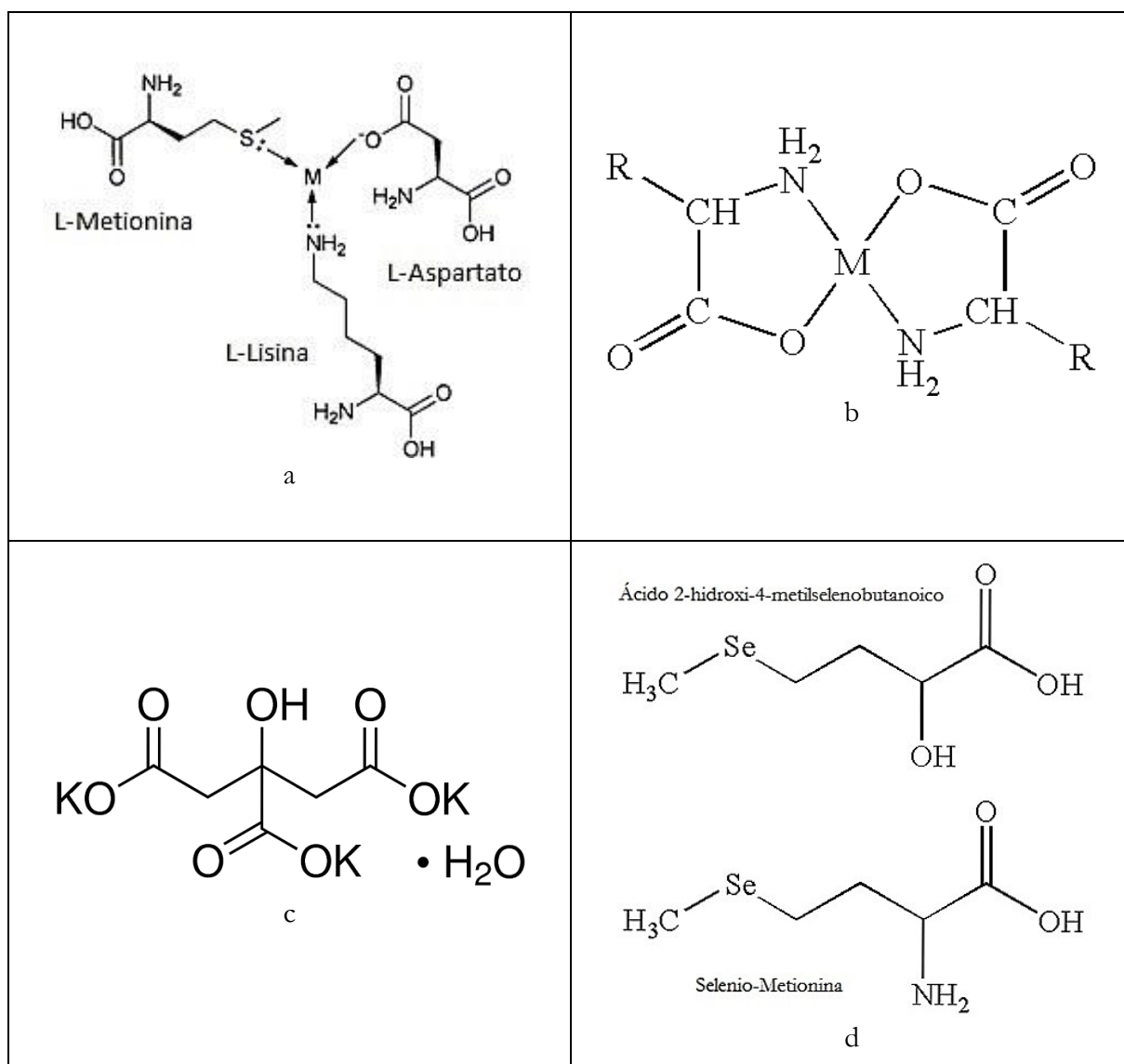
Figura 6. Mecanismo de Absorción del Yodo.



Fuente: Adaptado de Nicola, et al., 2015.

Abreviaciones: NIS, cotransportador de Na^+/I^- .

Figura 7. Estructura química de los complejos metálicos, quelatos, sales metálicas y fuentes orgánicas de selenio.



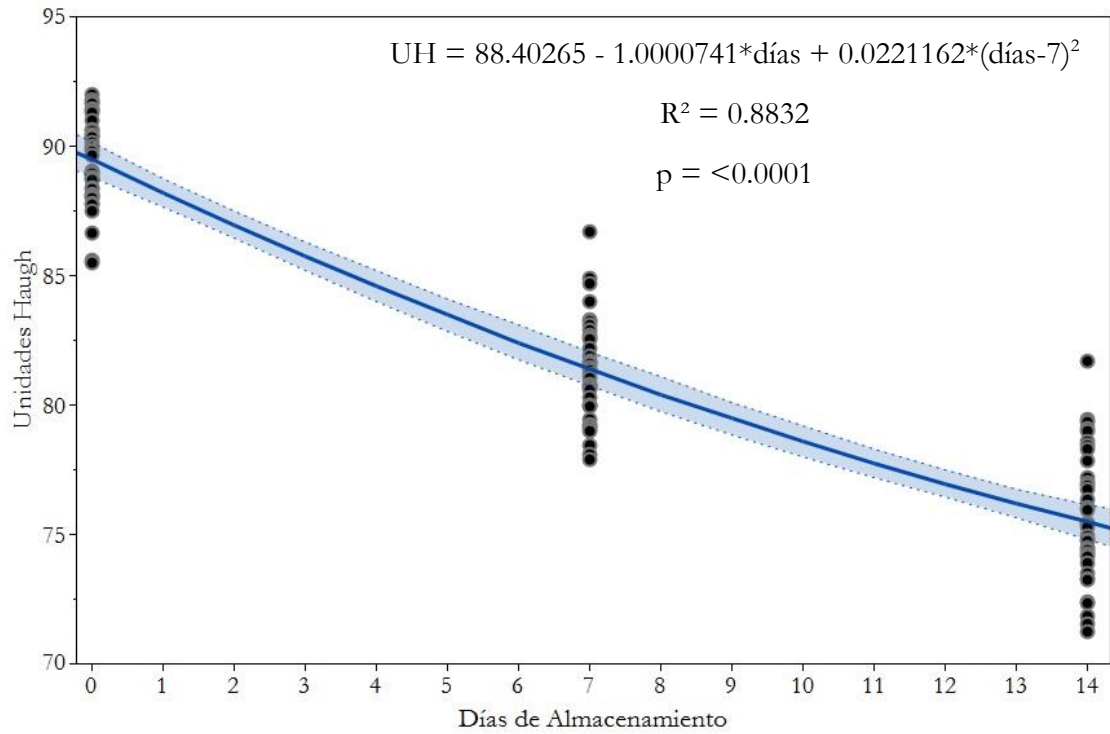
a) Complejo metálico con aminoácidos, el metal se enlaza a un solo grupo funcional en la parte terminal de cada aminoácido por lo que no es posible la generación de un anillo heterocíclico (Fuente: Adaptado de <http://pubs.rsc.org/services/images/RSCpubs.ePlatform.Service.FreeContent.ImageService.svc/ImageService/ArticleImage/2011/CY/c0cy00088d/c0cy00088d-2.gif>).

b) Quelato metal aminoácido, se observa la formación de dos anillos entre el metal y dos grupos funcionales de cada ligando (Fuente: <https://www.google.com/patents/US7375243>).

c) Citrato de potasio tribásico monohidratado, el potasio (metal alcalino) se enlaza con un solo grupo funcional del citrato a través de enlaces iónicos, no es posible el establecimiento de un anillo heterocíclico (Fuente: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c3029?lang=es®ion=MX>).

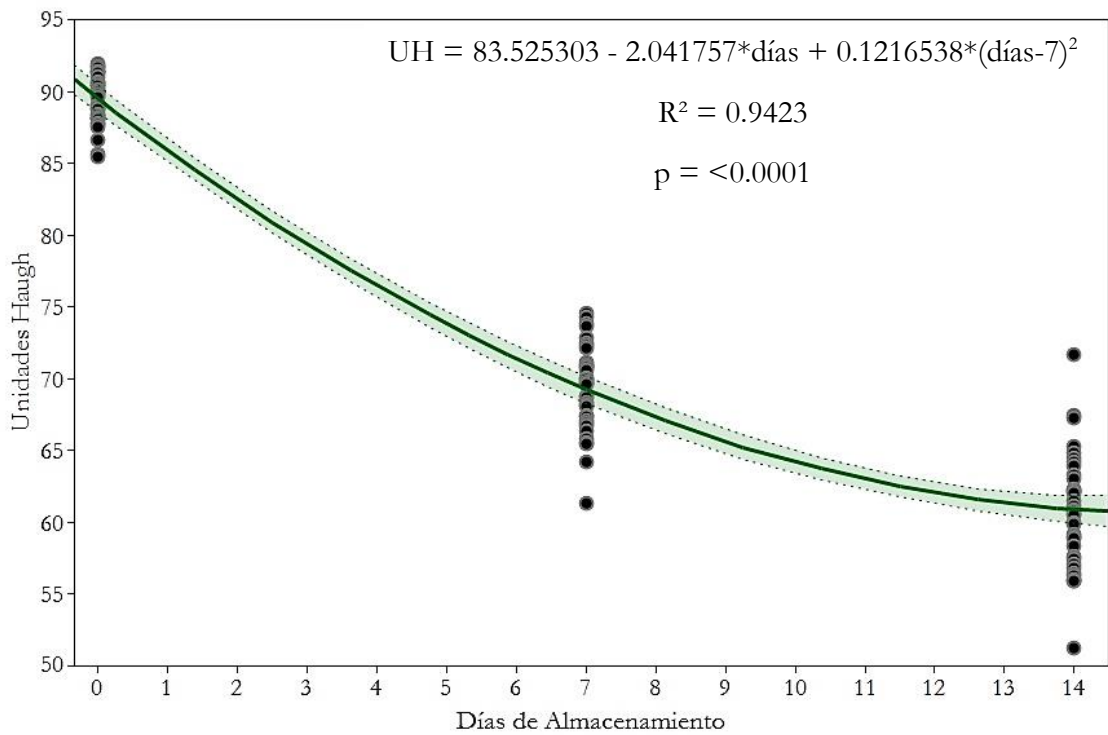
d) Fuentes orgánicas de selenio, SeMet y HMSeBA (Fuente: Adaptado de <https://patentimages.storage.googleapis.com/US7381416B2/US07381416-20080603-C00002.png>).

Figura 8. Unidades Haugh como función del periodo de almacenamiento en refrigeración (4°C).



Parámetros	Estimador	EE	p
Intercepto	88.40265	0.409373	<0.0001
días	-1.0000741	0.033765	<0.0001
días-7	0.0221162	0.008355	0.0092

Figura 9. Unidades Haugh como función del periodo de almacenamiento a temperatura ambiente.



Parámetros	Estimador	EE	p
Intercepto	83.525303	0.582121	<0.0001
días	-2.041757	0.048013	<0.0001
días-7	0.1216538	0.01188	<0.0001

CUADROS

Cuadro 1. Necesidades y Toxicidad de MT para pollo de engorda y gallina en postura de acuerdo al National Research Council (1994).

Mineral (ppm)	Pollo de Engorda ^a	Gallina en Postura ^b	Toxicidad ^c
<i>Hierro</i>	80	80, 60, 38	1000 - 4500
<i>Cinc</i>	40	40, 35, 29	800 - 4000
<i>Cobre</i>	8	5, 4, 4	200 - 806
<i>Manganeso</i>	60	60, 30, 17	2000 - 4800
<i>Selenio</i>	0.15	0.15, 0.14, 0.05	5 - 20
<i>Yodo</i>	0.35	0.35, 0.35, 0.29	300 - 625

a Los valores corresponden a las semanas 0-8 de edad.

b Los valores corresponden a las semanas 0-6, 6-18 y postura (100g alimento ave-día⁻¹).

c Se presentan los valores mínimos y máximos reportados en las fuentes consultadas (NRC, 1994; Suttle, 2010).

Cuadro 2. Recomendaciones de inclusión en dietas prácticas de MT para pollo de engorda.

Mineral (ppm)	Leeson y Summers ^a (2005)	Rostagno et al ^b (2011)	Aviagen ^a (2014)	Cobb-Vantress ^a (2012)
<i>Hierro</i>	20	62.5, 55, 50, 37.5, 32.5	20	40
<i>Cinc</i>	70	81.3, 71.5, 65, 48.8, 42.3	110	100
<i>Cobre</i>	8	12.5, 11, 10, 7.5, 6.5	16	15
<i>Manganeso</i>	70	88, 77, 70, 53, 46	120	100
<i>Selenio</i>	0.3	0.375, 0.33, 0.3, 0.225, 0.195	0.3	0.35
<i>Yodo</i>	0.5	1.25, 1.1, 1, 0.75, 0.65	1.25	1

a Los valores corresponden a las semanas 0-8 de edad.

b Los valores corresponden a las fases: Preinicio (1-7d), Inicio (8-21d), Crecimiento I (22-33d), Crecimiento II (34-42d) y Finalizador (43-49d).

Cuadro 3. Recomendaciones de inclusión en dietas prácticas de MT para gallinas en postura blancas.

Mineral (ppm)	Leeson y Summers ^a (2005)	Rostagno et al ^b (2011)	Hy-Line ^a (2016)	ISA ^c (2015)
<i>Hierro</i>	30, 30	55, 50, 55	30, 40	80
<i>Cinc</i>	60, 50	71.5, 65, 72	85, 80	80
<i>Cobre</i>	6, 5	11, 10, 11	15, 8	10
<i>Manganeso</i>	60, 60	77, 70, 77	90, 90	85
<i>Selenio</i>	0.3, 0.3	0.33, 0.3, 0.33	0.25, 0.22	0.3
<i>Yodo</i>	0.5, 1	1.1, 1, 1.1	1.5, 1.2	1

a Los valores corresponden a las fases Crianza y Postura.

b Los valores corresponden a las fases Inicio, Crianza y Postura.

c Los valores son los mismos en todas las fases.

Cuadro 4. Principales fuentes de MTI utilizadas en avicultura y su Biodisponibilidad Relativa.

Mineral	Fuente	Fórmula	Elemento ^a (%)	BR ^b (%)	Referencias
<i>Fe</i>	Sulfato de hierro (II) heptahidratado*	FeSO ₄ ·7H ₂ O	20	100	Cao et al. (1996) EFSA FEEDAP (2015; 2016)
	Sulfato de hierro (II) monohidratado	FeSO ₄ ·H ₂ O	30	91-100	
	Carbonato de hierro (II)	FeCO ₃	43	15-95	
	Cloruro de hierro (III) hexahidratado	FeCl ₃ ·6H ₂ O	20.7	78	
	Óxido de hierro (III)	Fe ₂ O ₃	60-70	<10	
<i>Zn</i>	Sulfato de cinc heptahidratado*	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22	100	Wedekind et al. (1990) Cao et al. (2000) Groote et al. (2002)
	Sulfato de cinc monohidratado	ZnSO ₄ ·H ₂ O	35	87	
	Cloruro de cinc tetrabásico monohidratado	Zn ₅ (OH) ₈ Cl ₂ ·H ₂ O	54.8	107	
	Óxido de cinc	ZnO	73	22-97	
	Carbonato de cinc	ZnCO ₃	52	93	
<i>Cu</i>	Acetato de cobre (II)	Cu(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	100	103	Ledoux et al. (1991) Kim y Kil (2015)
	Sulfato de cobre (II) pentahidratado*	CuSO ₄ ·5H ₂ O	25	100	
	Sulfato de cobre (II) monohidratado	CuSO ₄ ·H ₂ O	34.5	100	
	Carbonato de cobre (II)	CuCO ₃ ·Cu(OH) ₂	53	62.5	
	Óxido de cobre (II)	CuO	75	0	
	Cloruro de cobre (II) tribásico	Cu ₂ (OH) ₃ Cl	58	88.5-103	
<i>Mn</i>	Óxido de manganeso (II)	MnO	52-62	75-85	Wong-Valle et al. (1989) Groote et al. (2002)
	Sulfato de manganeso (II) monohidratado*	MnSO ₄ ·H ₂ O	31	100	
	Carbonato de manganeso (II)	MnCO ₃	47	55-66	
	Cloruro de manganeso (II) tetrahidratado	MnCl ₂ ·4H ₂ O	27.5	97	
<i>Se</i>	Selenito de Sodio*	Na ₂ SeO ₃	45	100	Echeverría et al. (1988)
	Selenato de Sodio	Na ₂ SeO ₄	42	74-109	
	Selenito de Calcio	CaSeO ₃	<47.3	96	
<i>I</i>	Yodato de calcio anhidro	Ca(IO ₃) ₂	62	ND ^c	Ammerman et al. (1998) FEDNA (2016)
	Yoduro de cobre	CuI ₂	66		
	Yodato de potasio	KIO ₃	59		
	Yoduro de potasio	KI	69-76		
	Yoduro de sodio	NaI	84.5-		

Elaboración Propia, se muestran en negritas las fuentes más utilizadas.

* Estándar; ^a Fuente: Rostagno et al, 2011; ^b Biodisponibilidad Relativa en aves; ^c Todas las fuentes tienen buena biodisponibilidad.

Cuadro 5. Principales fuentes de MTO utilizadas en avicultura y su Biodisponibilidad Relativa.

Mineral	Biodisponibilidad Relativa (%) ^a			
	Quelato Metal Aminoácido	Proteinato Metálico	Complejo Metal Aminoácido	Propionato Metálico
<i>Hierro</i>	Fe-Metionina: 86 (Cao et al., 1996), 105 (Zhang et al., 2016)	106 (Ma et al., 2014) 107, 113 (Zhang et al., 2016)	-	-
<i>Cinc</i>	Zn-Metionina: 108 (Suo et al., 2015) 131 (Groote et al., 2002) Zn-Lisina 106 (Aoyagi y Baker, 1993)	166 (Sahraei et al., 2013) 81, 134 (Huang et al., 2013) 91, 111 (Huang et al., 2009)	164 (Star et al., 2012) 206 (Wedekind et al., 1992) 103 (Huang et al., 2013) 102 (Huang et al., 2009) 127 (Światkiewicz et al., 2001)	117 (Brooks et al., 2013)
<i>Cobre</i>	HMTBA-Cu ^b : 110 (Wang et al., 2007) Cu-Metionina: 91 (Groote et al., 2002) Cu-Lisina: 118 (Guo et al., 2001) 100 (Groote et al., 2002)	79 (Liu et al., 2012) 108 (Guo et al., 2001)	122 (Guo et al., 2001)	-
<i>Manganeso</i>	HMTBA-Mn ^b : 116 (Yan y Waldroup, 2006) Mn-Metionina: 100 (Li et al., 2004) 112 (Li et al., 2005)	95 (Wang et al., 2012) 101, 117 (Groote et al., 2002)	115 (Li et al., 2004) 125 (Li et al., 2005)	139 (Brooks et al., 2012)
<i>Selenio</i> ^c	SeMet: 78 (Groote et al., 2002)	SeCys: 110 (Ammerman et al., 1998)	HMSeBA ^d : 139 ^e (Briens et al., 2013) 148, 163 ^e (Briens et al., 2014)	-
<i>Yodo</i>			-	

a Con respecto al estándar

b Ácido 2-hidroxi-4-metiltiobutanoico o hidroxianálogo de metionina

c Las fuentes orgánicas de selenio no son clasificadas como complejos o quelatos

d Ácido 2-hidroxi-4-metilselenobutanoico

e Con respecto a SeMet

Cuadro 6. Composición y análisis calculado de la dieta basal para gallinas en postura Bovans Blancas de 60 semanas de edad.

Ingrediente	Peso
Sorgo	642.057
Pasta de Soya	228.564
Carbonato de Calcio	109.167
Aceite Vegetal	5.000
Sal	4.130
Adsorbente de Micotoxinas	3.000
DL-Metionina 84%	2.575
Ortofosfato 16-21	1.883
L-Lisina HCl	1.135
PREMEZCLA*	1.000
Larvadex aditivo	0.500
Cloruro de Colina 60%	0.500
Bacitracina 10%	0.300
Antioxidante	0.150
Fitasa - Ronozyme HiPhos M [®]	0.024
L-Treonina	0.015
TOTAL	1000.000
Nutriente	Análisis Calculado
Energía Metabolizable	2800 Kcal/Kg
Proteína Cruda	17.40%
Met + Cis Digestible	0.66%
Lisina Digestible	0.77%
Calcio Total	4.30%
Fósforo Disponible	0.32%
Hierro Total	120ppm
Cinc Total	23ppm
Cobre Total	12ppm
Manganeso Total	53ppm
Selenio Total	0.15ppm
Yodo Total	0.15ppm

*Premezclas de vitaminas, minerales y aditivos, diferentes entre tratamientos, descritas en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Composición de las premezclas utilizadas en las dietas para gallinas en postura Bovans Blancas de 60 semanas de edad.

Ingrediente	Premezcla (ppm)			
	1	2	3	4
Minerales Inorgánicos*	400	-	-	400
Minerales Orgánicos**	-	1000	700	-
Fitasa [§]	24	24	24	24
Pigmentante amarillo [♦]	30	30	30	30
Pigmentante rojo [♦]	25	25	25	25
Cinc Orgánico [¥]	-	-	-	40
Manganeso Orgánico [¥]	-	-	-	28
Cobre Orgánico [¥]	-	-	-	10
Premezcla de Vitaminas***	500	500	500	500
Selenio Orgánico [¥]	-	-	-	0.125
Vehículo CBP/Dosis	1000	2000	1500	2000

*Premezcla de minerales inorgánicos que proporciona: 70ppm de cinc, 70ppm de manganeso, 45ppm de hierro, 10ppm de cobre, 1ppm de iodo y 0.25ppm de selenio.

**Premezcla de minerales orgánicos en forma Carbo-Amino-Fosfoquelato que proporciona: 43.74ppm de cinc, 56.37ppm de magnesio, 43.74ppm de hierro, 8.61ppm de cobre, 0.34ppm de selenio y 1ppm de iodo.

***Premezcla de vitaminas que por tonelada de alimento proporciona: 13000000 UI de vitamina A, 2000000 UI de vitamina D3, 62.5mg de vitamina E, 50000mg de vitamina K3, 3000mg de vitamina B1, 3000mg de vitamina B2, 10000mg de vitamina B6, 10000mg de vitamina B12, 20mg de niacina, 60000mg de ácido pantoténico, 15000mg de ácido fólico, 2000mg de biotina.

[§]Ronozyme HiPhos M®.

[♦]Carophyll® amarillo (10% de Apoéster), Carophyll® rojo (10% de Cantaxantina)

[¥]Availa-Zn 100® (10% Cinc), Availa-Mn 80® (8% Manganeso), Availa-Cu 100® (10% Cu), Sel-Plex® (0.2% Selenio).

Cuadro 8. Resultados de los parámetros productivos de gallinas Bovans Blancas obtenidos de la semana 60 a 72 de edad.

Tratamiento	Postura	Peso de Huevo	Consumo de Alimento	Masa de huevo	Índice de Conversión	Peso del Ave
	(%)	(g)	ave/día (g)	ave/día (g)	(Kg: Kg)	(g)
T1 (100MTI)	93.7	62.9	109.1	58.9	1.855	1703
T2 (100CAFQ)	92.4	62.9	108.7	58.1	1.875	1707
T3 (70CAFQ)	93.5	63.0	109.2	58.9	1.857	1713
T4 (MTI+CMA)	91.7	63.3	109.5	58.1	1.890	1715
p	0.293	0.692	0.236	0.467	0.393	0.762
EEM	-	0.16	0.15	0.25	0.008	4.62

La ausencia de literales en los valores promedio indica que no existe diferencia estadística significativa ($p > 0.05$).

EEM = Error Estándar de la Media.

Cuadro 9. Resultados de la prueba de t para la comparación de la media general de algunas variables productivas contra los valores establecidos por el Manual de gallinas Bovans Blancas de 60 a 72 semanas de edad.

Variable	Promedio General ^a	Manual ^b	p
Porcentaje de Postura (%)	92.8±2.59	83.4	Prob>t = **
Peso de huevo (g)	63.0±0.99	64.0	Prob<t = **
Masa de huevo ave/día (g)	58.5±1.59	53.4	Prob>t = **
Consumo de Alimento ave/día (g)	109.1±0.95	110	Prob<t = **
Conversión Alimenticia ave/día (Kg:Kg)	1.87±0.05	2.06	Prob<t = **
Peso del Ave (g)	1709.4±28.5	1691	Prob>t = **

a Promedio General obtenida durante 12 semanas de experimentación más menos su desviación estándar.

b Promedio de las semanas 60 a 72 de edad.

*p<0.05

**p<0.01

Cuadro 10. Resultados de huevo sucio, roto-fárfara, y calidad de huevo de gallinas Bovans Blancas obtenidos de la semana 60 a 72 de edad.

Tratamiento	Huevo Sucio (%)	Huevo Roto-Fárfara (%)	Unidades Haugh	Color de yema	Grosor de cascarón (μm)
T1 - 100MTI	1.4	2.4	88.2	11.0	336
T2 - 100CAFQ	0.8	2.3	88.6	10.8	337
T3 - 70CAFQ	1.4	3.2	88.1	11.0	336
T4 - MTI+CMA	0.8	2.5	87.5	11.0	333
p	0.571	0.570	0.419	0.059	0.658
EEM	-	-	0.22	0.03	1.14

La ausencia de literales en los valores promedio indica que no existe diferencia estadística significativa ($p>0.05$).
EEM = Error Estándar de la Media.

Cuadro 11. Resultados de resistencia del cascarón y de la tibia a la fractura de gallinas Bovans Blancas obtenidos de las semanas 60 a 72 de edad.

Tratamiento	Resistencia del cascarón	Resistencia de la Tibia
	(g/cm ²)	(g/cm ²)
T1 - 100MTI	3048	12250
T2 - 100CAFQ	3158	13370
T3 - 70CAFQ	3231	12783
T4 - MTI+CMA	3210	11966
p	0.185	0.781
EEM	31.4	512
Contraste 1		
T1 vs	3048	12250
T2,T3,T4	3200	12706
Contraste 2		
T4 vs	3210	11966
T2,T3	3195	13076
Contraste 3		
T2 vs	3158	13370
T3	3231	12783
P		
Contraste 1	0.044	0.700
Contraste 2	0.843	0.393
Contraste 3	0.418	0.684

La ausencia de literales en los valores promedio indica que no existe diferencia estadística ($p > 0.05$).
EEM = Error Estándar de la Media.

Cuadro 12. Efecto del tratamiento, tiempo y su interacción sobre la vida de anaquel del huevo bajo dos temperaturas de almacenamiento.

Unidades Haugh	Días de Almacenamiento			P		
	0	7	14	Tratamiento	Tiempo	Tratamiento x Tiempo
Refrigeración	89.49a	81.40b	75.48c	0.117	<0.0001	0.250
Temperatura Ambiente	89.49a	69.23b	60.90c	0.138	<0.0001	0.216

Valores promedio con letras diferentes presentan diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$).

Cuadro 13. Efecto del tratamiento, tiempo y su interacción sobre los títulos de anticuerpos IgY contra la ENC mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación.

Log2	Días Post-Vacunación			P		
	0	7	14	Tratamiento	Tiempo	Tratamiento x Tiempo
Títulos de anticuerpos séricos	9.28	9.42	8.97	0.381	0.080	0.339

La ausencia de literales en los valores promedio indica que no existe diferencia estadística significativa ($p > 0.05$).

Cuadro 14. Resultados de la prueba de hipersensibilidad cutánea por basófilos (HCB) y cantidad de IgA en contenido intestinales obtenida mediante la prueba de ELISA.

Tratamiento	Prueba HCB*	IgA en contenido intestinal
	(mm)	(ng/ml)
T1 - 100MTI	0.77	12595
T2 - 100CAFQ	0.87	12684
T3 - 70CAFQ	0.90	12729
T4 - MTI+CMA	0.59	12728
p	0.081	0.829
EEM	0.091	57.9

*Incremento en el grosor de la piel de la membrana interdigital de la pata izquierda (24 horas post-inoculación). La ausencia de literales en los valores promedio indica que no existe diferencia estadística significativa ($p>0.05$). EEM = Error Estándar de la Media.

Cuadro 15. Resultados obtenidos en el hemograma de gallinas en postura Bovans Blancas de 76 Semanas de edad.

Tratamiento	Ht (L/L)	Eritro (10¹²/L)	Leuco (10⁹/L)	Hete (10⁹/L)	Linfo (10⁹/L)	Mono (10⁹/L)	Baso (10⁹/L)	Eosin (10⁹/L)	Rel. H/L
T1 - 100MTI	0.304	2.48	3.98	0.83	2.95	0.54	0.12	0.14	0.34
T2 - 100CAFQ	0.308	2.54	2.48	0.55	1.50	0.24	0.09	0.10	0.47
T3 - 70CAFQ	0.300	2.72	3.96	0.94	2.49	0.37	0.10	0.06	0.46
T4 - MTI+CMA	0.288	2.58	3.74	0.92	2.15	0.34	0.29	0.04	0.40
p	0.352	0.491	0.546	0.519	0.256	0.469	0.841	0.271	0.787

Ht: Hematocrito; Eritro: Eritrocitos; Leuco: Leucocitos; Hete: Heterófilos; Linfo: Linfocitos; Mono: Monocitos; Baso: Basófilos; Eosin: Eosinófilos; Rel. H/L: Relación Heterófilo/Linfocito.

La ausencia de literales indica que no existe diferencia estadística entre las medias de los rangos de los tratamientos ($p > 0.05$).