



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS**

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

RESPUESTA AL EJERCICIO Y A LA SUPLEMENTACIÓN DE VITAMINAS E Y C EN LA DIETA, EN LA SALUD DE LAS PATAS Y CALIDAD DE LA CANAL DE POLLOS DE ENGORDA

JOSÉ MANUEL SÁNCHEZ SÁNCHEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

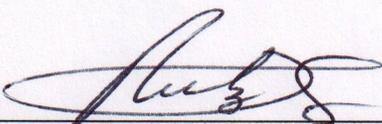
2014

La presente tesis titulada: **Respuesta al ejercicio y a la suplementación de vitaminas E y C en la dieta, en la salud de las patas y calidad de la canal de pollos de engorda**, realizada por el alumno: **José Manuel Sánchez Sánchez** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

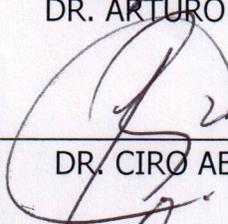
MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

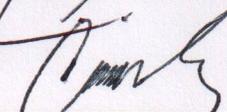
CONSEJERO


DR. ARTURO PRO MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS


DR. CIRO ABEL RUÍZ FERIA

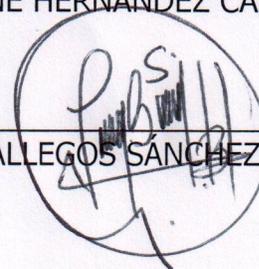
ASESOR


DR. CARLOS NARCISO GAYTÁN

ASESOR


DRA. ALEIDA SELENE HERNÁNDEZ CÁZARES

ASESOR


DR. JAIME GALLEGOS SÁNCHEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Noviembre de 2014

RESPUESTA AL EJERCICIO Y A LA SUPLEMENTACIÓN DE VITAMINAS E Y C EN LA DIETA, EN LA SALUD DE LAS PATAS Y CALIDAD DE LA CANAL DE POLLOS DE ENGORDA

J. M. Sánchez-Sánchez¹, M.C.

¹ Colegio de Postgraduados, 2014.

Los problemas de locomoción son comunes en pollos de engorda, pero las causas no son claras. Se evaluó la suplementación de vitaminas E (VE) y C (VC) en la dieta y el efecto del ejercicio (sin y con inducción a caminar SCAM y cCAM) en la resistencia de la tibia y del tendón *gastrocnemius*, peso vivo, rendimiento y calidad de la canal de pollos de engorda. Pollitos de un d de edad (Cobb 500; n = 672) fueron asignados aleatoriamente a uno de los ocho tratamientos: dos concentraciones de VE 40 u 80 mg/kg de dieta, dos de VC 0 o 1000 mg/kg de dieta y dos niveles de ejercicio. El arreglo de los tratamientos fue un factorial 2x2x2, cada uno con cuatro repeticiones (21 pollitos/repetición). La dieta basal (maíz-pasta de soya) fue formulada para cubrir los requerimientos nutricionales establecidos por Cobb-Vantress (2012). A los 7 d, 40 aves/tratamiento fueron identificadas individualmente, y se indujeron a caminar (cCAM) a través de un corredor de 30.5 m una vez al día hasta el final del experimento; el resto de las aves no se indujo a caminar (sCAM). A los d 21, 35 y 42 se midieron: latencia a postrarse (LAP), resistencia de la tibia (RTi) en N y del tendón *gastrocnemius* (RTe), necrosis (NCF) y epifisiolisis (ECF) en la cabeza del fémur, y contenido de cenizas en la tibia (CCt). El peso vivo (PV) se registró semanalmente. Al d 28 se realizó un muestreo sanguíneo para determinar las concentraciones séricas de Malondialdehído (MDA). A los 41 d se midió la asimetría fluctuante relativa (AFl) y al d 42 se mataron 10 pollos/tratamiento para medir el rendimiento y calidad de la canal. Las aves cCAM mostraron mayor RTi (a los d 21 y 42) y CCt (al d 42). La suplementación con VE (40 mg) mejoró la RTe en aves suplementadas con VC (interacción VE x VC). La VC mejoró la RTe, pero sólo en las aves no inducidas a caminar (interacción sCAM x VC). La suplementación de 80 mg de VE en las aves que consumieron 1000 mg de VC (T4) mejoraron LAP (interacción VE x VC). Contrariamente, la edad redujo el tiempo que las aves permanecieron paradas. La AFl del tarso (longitud) disminuyó en aves suplementadas con 80 mg de VE comparada con las aves alimentadas con 40 mg de VE; mientras que la AFl de la anchura fue mayor en aves que consumieron 80 mg de VE y sin inducción a caminar (interacción sCAM x VE). Las lesiones de la cabeza femoral no fueron afectadas por la dieta o la inducción caminar,

pero se incrementaron con la edad. La VC disminuyó MDA en las aves cCAM (interacción cCAM x VC) e incrementó con sCAM. La VE (80 mg) mejoró el PV ($P \leq 0.05$) a los 14, 28, 35 y 42 d; la VC mejoró el peso de las aves a los 28 d de edad, respecto a las que no fueron suplementadas. Se encontró rendimiento mayor de la canal fría cuando los pollos fueron suplementados con 1000 mg de vitamina C y cCAM, respecto a los no suplementados con esta vitamina y cCAM (interacción cCAM x VC). No hubo diferencias ($P > 0.05$) entre el nivel de suplementación o ejercicio en el rendimiento de la canal caliente, rendimiento de los cortes o grasa abdominal. En aves cCAM disminuyó el índice de amarillo tanto en pechuga como en muslo y aumentó el índice de rojo en muslo. El consumo de 80 mg de vitamina E mejoró el índice de rojo en pechuga.

Palabras clave: vitamina E, vitamina C, ejercicio, tibia, tendón, latencia a postrarse

RESPONSE TO EXERCISE AND SUPPLEMENTATION OF VITAMINS E AND C IN THE DIET, ON LEGS HEALTH AND CARCASS QUALITY OF BROILERS

J. M. Sánchez-Sánchez¹, M.C.
¹ Colegio de Postgraduados, 2014.

Locomotion problems are common in broilers, but causes are unclear. Vitamin supplementation E (VE) and C (VC) in the diet and exercise (with “cCAM” and without “sCAM” induction walking) on tibia and *gastrocnemius* tendon strength, live weight, quality and carcass yield in broilers was evaluated. One-d-old chicks (Cobb 500; n=672) were randomly assigned to one of eight treatments: two concentrations of VE (40 or 80 mg/kg of diet) or VC (0 or 1000 mg/kg of diet) and two levels of exercise; 2x2x2 factorial arrangement with 4 replicates/treatment (21 chicks/replicate). A basal diet (corn-soybean meal) was formulated to meet the nutritional requirements established by Cobb-Vantress (2012). At d 7, 40 birds/treatment were individually identified, and were induced to walk (cCAM) through a corridor of 30.5 m once daily until the end of the experiment; the other birds were not induced to walk (sCAM). At 21, 35 y 42 d was evaluated: latency to lie (LAP), tibia (RTi) and *gastrocnemius* tendon strength (RTe; N), necrosis (NCF) and epiphysiolysis (ECF) femoral and ash content of tibia (CCt). Live weight (PV) was recorded weekly. At 28 d, blood samples were taken to determine malondialdehyde concentrations (MDA). At 41 d, fluctuating asymmetry relative (AFI) was measured, and at 42 d 10 chicks/treatment were slaughtered to measure quality and carcass yield. Birds in the cCAM group showed higher RTi (at 21 and 42 d) and CCt (d 42). VE supplementation (40 mg) improved RTe in birds supplemented with VC (VC x VE interaction). VC improved FTe only in birds sCAM (sCAM x VC interaction). Supplementation of 80 mg of VE in birds that consumed 1000 mg of VC (T4) improved LAP (VE x VC interaction). On the other hand, age reduced stand up time of birds. The AFI of tarsus (length) decreased in birds supplemented with 80 mg of VE compared with birds fed with 40 mg of VE, while the AFI of the width was greater in birds that consumed 80 mg of VE without induction walking (sCAM x VE interaction). The lesions of the femoral head were not affected by diet or exercise, but increased with age. VC increased MDA concentrations, in birds with cCAM (cCAM x VC interaction), but decreased with sCAM. VE supplementation (80 mg) improved PV ($P \leq 0.05$) at 14, 28, 35 and 42 d; VC supplementation improved PV of birds at 28 d compared to those who were not supplemented. It was found that birds supplemented with 1000 mg of VC and cCAM showed higher cold carcass yield compared

to those non-supplemented with this vitamin (cCAM x VC interaction). There were no differences ($P > 0.05$) among supplementation of vitamins or exercise level on hot carcass yield, yield cuts or abdominal fat. Birds in the cCAM group decreased breast and leg yellowness and increased thigh redness. The intake of 80 mg of vitamin E improved breast redness.

Key Words: vitamin E, vitamin C, exercise, tibia, tendon, latency to lie

DEDICATORIA

A mis hijos y esposa:

A mis hijos Jesús Daniel Sánchez Díaz y Ronald Manuel Sánchez Díaz, porque son el regalo más hermoso que Dios me ha obsequiado, porque son los cimientos de mi inspiración y motivación en los proyectos que emprendo. A Guadalupe Velázquez Cortés, por los momentos compartidos, por el apoyo incondicional que me has brindado y por ser mi compañera.

A mis padres:

Francisca Sánchez Hernández y Manuel Sánchez Hernández por construir los cimientos de su obra, por las enseñanzas recibidas, por creer siempre en mí y por su apoyo sin condiciones. ¡Los Amo!

A mis hermanos:

Ana Rosario Sánchez Sánchez y Gabriel Sánchez Sánchez, por todo lo vivido juntos, por ser hermanos ejemplares y por el cariño compartido en el seno de la familia.

A mis primos:

Jorge Reyes Sánchez, Ricardo Hernández Sánchez y Valentín Reyes Sánchez, a quienes agradezco su amistad, apoyo, muestras de aliento y momentos compartidos.

A mis tío (a) s:

Antonio, Benita, Constantina, Eugenia, Fernando, Julio, María Luisa, Marciana, Mercedes y Rufina Sánchez Hernández, por sus consejos y vida en familia.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por dar las condiciones para continuar con mi plan de vida, realizar estudios de Postgrado.

Al Colegio de Postgraduados por brindarme la oportunidad de estudiar la Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico que me proporcionó durante los estudios de Maestría.

A la Universidad de Texas A&M por darme la oportunidad de realizar una estancia de investigación en su Departamento de Ciencias Avícolas.

Al Dr. Arturo Pro Martínez por la asesoría brindada para realizar esta tesis, por su apoyo, consejos y motivación, adentro y afuera de las aulas del Colegio de Postgraduados.

Al Dr. Ciro Abel Ruíz Feria por haberme guiado en la realización del trabajo de campo de la investigación presente.

Al Dr. Humberto Vaquera Huerta por su apoyo en el análisis estadístico de esta investigación

A la Dra. Aleida Selene Hernández Cázares y al Dr. Jaime Bautista Ortega por sus comentarios y sugerencias para el mejoramiento de esta tesis.

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Importancia del problema de patas en la producción de pollos de engorda.....	3
2.2. Relación entre ejercicio, salud de las patas y canal.....	4
2.2.1. Ejercicio y salud de las patas.....	4
2.2.2. Ejercicio y canal.....	4
2.3. Uso de antioxidantes en la alimentación animal.....	6
2.3.1. Vitamina E.....	6
2.3.1.1. Estructura química y propiedades.....	6
2.3.1.2. Absorción y metabolismo.....	6
2.3.1.3. Propiedades antioxidantes.....	8
2.3.1.4. Requerimientos y suplementación.....	8
2.3.2. Vitamina C.....	9
2.3.2.1. Estructura química y propiedades.....	9
2.3.2.2. Absorción y metabolismo.....	9
2.3.2.3. Propiedades antioxidantes.....	10
2.3.2.4. Requerimientos y suplementación.....	11
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	12
3.1 Hipótesis.....	12
3.2 Objetivo general.....	12

4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
4.1. Animales y diseño experimental.....	13
4.2. Ejercicio.....	13
4.3. Resistencia y contenido de cenizas de la tibia.....	13
4.4. Resistencia del tendón <i>gastrocnemius</i>	14
4.5. Latencia a postrarse.....	14
4.6. Asimetría fluctuante relativa.....	15
4.7. Necrosis y epifisiolisis.....	15
4.8. Sustancias reactivas a ácido tiobarbitúrico.....	15
4.9. Peso vivo, rendimiento y color de la canal.....	15
4.10. Análisis estadístico.....	16
5. RESULTADOS.....	18
6. DISCUSIÓN.....	28
7. CONCLUSIONES.....	38
8. LITERATURA CITADA.....	39

ÍNDICE DE CUADROS

Página

Cuadro 1. Medias de mínimos cuadrados para resistencia de la tibia (N) y contenido de cenizas (%) de pollos en engorda a edades diferentes (d), suplementados con vitaminas E (40 u 80 mg/ kg) y C (0 o 1000 mg/kg) en la dieta y sin o con inducción a caminar.....	18
Cuadro 2. Latencia a postrarse de pollos de engorda (s) suplementados con vitaminas E (40 u 80 mg/kg) y C (0 o 1000 mg/kg) y a edades diferentes (d).....	20
Cuadro 3. Medias de mínimos cuadrados para asimetría fluctuante relativa (mm) en varias características morfológicas de pollos de engorda a los 42 d de edad, suplementados con dos concentraciones de vitaminas E (40 u 80 mg/ kg) y C (0 o 1000 mg/kg) y sin y con inducción a caminar (n=476).....	22
Cuadro 4. Número de pollos con necrosis o epifisiolisis de la cabeza del fémur del total de observaciones a los 21 y 35 d de edad.....	23
Cuadro 5. Medias de mínimos cuadrados para peso vivo (g) de pollos de engorda a edades diferentes, suplementados con dos concentraciones de vitaminas E (40 u 80 mg/ kg) y C (0 ó 1000 mg/kg) en la dieta, y sin y con inducción a caminar.....	25
Cuadro 6. Efecto de la suplementación de las vitaminas E (40 u 80 mg/kg de dieta) y C (0 o 1000 mg/kg de dieta), sin y con inducción a caminar en el rendimiento (%) de la canal caliente (RCC), canal fría (RCF), pechuga (RPG), muslos (RM), alas (RA) y porcentaje de grasa abdominal (PGA) en pollos de 42 d de edad.	26
Cuadro 7. Suplementación de vitaminas E (40 u 80 mg/ kg de dieta) y C (0 o 1000 mg/kg de dieta) sin y con inducción a caminar en el color de la pechuga y muslo de pollos de engorda.....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Resistencia del tendón <i>gastrocnemius</i> (N) de pollos de engorda a los 42 d de edad, suplementados con dos concentraciones de vitaminas E y C.....	19
Figura 2. Resistencia del tendón <i>gastrocnemius</i> (N) de pollos de engorda a los 42 d de edad suplementados con dos concentraciones de vitamina C, y sin o con inducción a caminar.....	19
Figura 3. Curva de supervivencia de probabilidad acumulada de latencia a postrarse de pollos de engorda (Cobb 500) suplementados con dos concentraciones de vitaminas E y C.	21
Figura 4. Curva de supervivencia de probabilidad acumulada de latencia a postrarse de pollos de engorda (Cobb 500) a los 21, 35 y 42 d de edad.....	21
Figura 5. Asimetría fluctuante relativa del ancho de tarso (mm) en pollos de engorda a los 42 d de edad, suplementados con dos concentraciones de vitamina E, sin y con inducción a caminar	23
Figura 6. . Contenido de Malondialdehído (MDA, $\mu\text{M}/\text{mL}$) en suero sanguíneo de pollos de 28 d de edad, sin y con suplementación de vitamina C en la dieta y sin y con inducción a caminar	24
Figura 7. Rendimiento de la canal fría de pollos de 42 d de edad, suplementados con vitamina C en la dieta (0 o 1000 mg / kg) sin y con inducción a caminar.....	26

1. INTRODUCCIÓN

La selección genética de los pollos en engorda está basada en ganancias de peso altas; sin embargo, una ganancia de peso alta en pollos imponen fuerte estrés sobre el sistema esquelético, lo que afecta la habilidad para caminar (Talaty *et al.*, 2010). Se supone que las causas principales de los trastornos de patas son la selección genética y las prácticas de manejo, aunque los mecanismos que causan los problemas de patas, aún no son entendidos completamente (Reitter y Bessei, 1998). Hay varios métodos para reducir la presencia de problemas de patas; por ejemplo se ha evidenciado que la reducción en la ganancia de peso durante el periodo de iniciación reduce la presencia de problemas de patas (Bizeray *et al.*, 2002b). Otra forma de mejorar la condición de las patas es incrementando la actividad locomotora de las aves, lo cual mejora el aparato musculo esquelético y por lo tanto reduce la presencia de anomalías en patas (Bizeray *et al.*, 2002b). Reiter y Bessei (1998) demostraron que el ejercicio en una rueda para andar incrementa la densidad del hueso y reduce deformaciones en éste. Factores como: incrementar la distancia entre comederos y bebederos (Reiter y Bessei, 1998), el uso de luz de intensidad alta (Newberry *et al.*, 1988) o implementar un régimen de luz intermitente (Buyse *et al.*, 1996) se sabe que mejoran las condiciones de las patas de los pollos de engorda. Esos efectos benéficos se explican como una consecuencia de un aumento en la actividad de las aves, lo que se refleja en mejor funcionamiento del musculo esquelético.

Los problemas del esqueleto en los pollos en engorda también se han asociado con niveles inadecuados de vitaminas C y E en la dieta. Yildiz *et al.* (2009) sugirieron que la suplementación con 200 mg de ácido ascórbico/L agua en pollos de seis semanas de edad puede prevenir eficientemente los problemas de patas e incrementar la fortaleza del hueso. Se ha observado que la adición de ácido ascórbico a la dieta incrementa 1,25-dihidroxitamina D3 en suero, posiblemente como resultado de un incremento en la actividad de la enzima 1 α -hidroxilasa (Cantatore *et al.*, 1991). Esto sugiere que el ácido ascórbico puede actuar de manera aditiva o sinérgica con 1,25-dihidroxitamina D3, lo cual puede ser explicado por un aumento en el número de receptores de la vitamina D en el condrocito de los pollos (Farquharson *et al.*, 1998). Summers *et al.* (1984) reportaron que la deficiencia de vitamina E provoca un incremento en la incidencia de anomalías de patas, especialmente en la desviación media o lateral de la tibia

distal o del metatarsus proximal. Xu *et al.* (1995), reportaron que la vitamina E mantiene el crecimiento normal del hueso en pollos jóvenes y protege al cartílago contra la peroxidación lipídica celular; además restaura parcialmente la síntesis de colágeno en cultivos primarios de condrocitos epifisiales de las aves (Watkins *et al.*, 1996). Esto es importante debido a que la actividad de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa es baja en la región mineralizada del cartílago en crecimiento (Matsumoto *et al.*, 1991) y la resorción osteoclástica del hueso se puede incrementar por los radicales libres (Garret *et al.*, 1990). Sin embargo, concentraciones elevadas de vitamina E en la dieta afectan negativamente la utilización de la vitamina D₃ en pollos alimentados con dietas deficientes en calcio o deficientes en vitamina D (March *et al.*, 1973; Murphy *et al.*, 1981; Aburto y Briton, 1998), aunque niveles de vitamina E en la dieta de 150 UI/kg no exacerba la deficiencia de colecalciferol en pollos de engorda jóvenes (Bartov, 1998).

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia del problema de patas en la producción de pollos de engorda

Las enfermedades de las patas es un problema económico y de bienestar en la industria del pollo de engorda. Es un problema de bienestar debido a que causa cojeras que deterioran la habilidad para caminar o se fracturan los huesos de los animales, lo cual limita su transporte y alimentación. Los problemas de patas provocan también pérdidas económicas, pudiendo ser una de las enfermedades más costosas, debido a una disminución en la eficiencia productiva, aumento en el número de aves sacrificadas y mortalidad. La prevalencia promedio de estos problemas está entre 1-3%, aunque casi todos los lotes de aves tienen 1% de individuos con este problema que ocasionan su eliminación (Oviedo-Rondon, 2009). Al menos el 30% de las aves en todos los lotes presentan modificaciones en su caminar normal. Se ha estimado que las pérdidas económicas por anomalías en las patas representa entre el 0.10-0.30 de las pérdidas totales (Julian, 1995).

Además, las aves con problemas de patas pasan más tiempo postradas, lo que provoca ampollas y úlceras, lo que conlleva una disminución en el valor de la canal en la planta de procesamiento (Ruiz-Feria *et al.*, 2014). La asimetría de las porciones de las canales causa problemas en las líneas de sacrificio y de deshuese automático, requiriendo intervención manual y recortes de las canales. La fragilidad y porosidad de los huesos en la epífisis de la tibia y el femur causan coloración rojiza de la carne o ennegrecimiento del hueso durante la cocción y esta decoloración se extiende a la carne adyacente (Oviedo-Rondon, 2009). Las decoloraciones de los productos avícolas totalmente cocidos pueden causar hasta el 11% de rechazo (Smith y Northcutt, 2003). Los problemas locomotores pueden aumentar los costos de producción cuando se hacen cambios nutricionales a la dieta con la intención de disminuirlos o cuando se hacen restricciones al crecimiento que puede ocasionar otros problemas de salud.

2.2. Relación entre ejercicio, salud de patas y canal

2.2.1. Ejercicio y salud de las patas

Las causas de debilidad de piernas y locomoción mala son multifactoriales, las cuales incluyen: deformidad ósea angular, discondroplasia tibial, necrosis de la cabeza femoral, sinovitis, artritis, osteomielitis, pododermatitis plantar y del corvejón, tenosinovitis, perosis, dedos torcidos, espondilolistesis, escoliosis, osteomalacia, deficiencias nutricionales, polineuritis, encefalomiелitis, enfermedades como Newcastle y Marek, tasa alta de crecimiento, metabolismo de aminoácidos y predisposiciones genéticas (FAWC, 1992). Aunque se sabe que los factores principales que provocan estos problemas son las tasas altas de crecimiento y el sedentarismo.

Se ha usado varios métodos para reducir el problema de patas, entre ellos un incremento en la actividad. Los medios a través de los cuales se puede incrementar la actividad incluyen uso de luz intermitente e intensidad alta, densidades de población bajas, incrementar la distancia entre comederos y bebederos, incrementar la ventilación y mejorar la circulación del aire. Por lo tanto ajustes en la complejidad ambiental son una solución a corto plazo para reducir la incidencia de los problemas de patas.

2.2.2. Ejercicio y la canal

El músculo esquelético tiene propiedades únicas ya que es altamente susceptible a cambios adaptativos. Esta plasticidad se manifiesta en cambios inducidos por el ejercicio o actividad modificada (Staron y Hikita, 2000). El crecimiento del músculo inducido por la actividad se acompaña de cambios en el número y tamaño de fibras en el músculo. Para cambiar los porcentajes del tipo de fibra en un músculo se debe dar ejercicio de alta intensidad por un tiempo largo (Dingboom y Weijs, 2004). El ejercicio de resistencia incrementa la capacidad oxidativa de todos los tipos de fibras, estimula la conversión de las fibras IIB o IID a IIA e incrementa el área de la sección transversal de las fibras tipo I (Dingboom y Weijs, 2004).

Durante el ejercicio la síntesis de proteína muscular se suprime, ocurriendo solo la síntesis de proteínas en el hígado hasta cierto punto, ya que algunas proteínas en el músculo se mantienen sin cambios e incluso incrementan. También puede incrementarse la ruptura de proteínas de otros tejidos, aunque no hay pruebas convincentes de la proteólisis de proteínas contráctiles en el músculo activo. El resultado de estos procesos es un incremento en el número de aminoácidos libres disponibles. Estos aminoácidos libres se usan principalmente para cubrir los requerimientos de energía de la actividad muscular, a través de la oxidación de aminoácidos de cadena ramificada y el uso de alanina en la gluconeogénesis. Durante el ejercicio la producción de alanina se incrementa en los músculos activos. La alanina es sintetizada principalmente en el tejido muscular mediante la combinación de piruvato y un grupo amino. El piruvato se forma como resultado de la glucogenólisis y glicólisis. Los grupos aminos necesarios para la síntesis de alanina son liberados en la oxidación de los aminoácidos de cadena ramificada. La alanina es un sustrato esencial para la gluconeogénesis en el hígado. Después de la desaminación de la alanina en el hígado, los grupos aminos liberados se emplean en la ureogénesis. La estructura de carbono restante proporciona el material necesario para la síntesis de glucosa. La síntesis de la alanina, así como su metabolismo en el hígado, es catalizada por el enzima alanina-aminotransferasa. El cortisol es un inductor de la síntesis de alanina-aminotransferasa, mientras que la insulina inhibe la enzima. En la recuperación después del ejercicio se intensifica el uso de aminoácidos para la síntesis de proteínas, lo que coincide con una tasa alta de degradación de proteína, constituyéndose un incremento en la tasa de recambio proteico. En este estado de recuperación se incrementa la producción de 3-metilhistidina, lo que resulta en un incremento en su desecho a través de la orina después del ejercicio. Inmediatamente después del ejercicio el nivel del aminoácido 3-metilhistidina se eleva en el intestino por un tiempo corto, pero sin que esto provoque un incremento en la excreción de 3-metilhistidina, como señal de un incremento en el recambio de proteínas contráctiles, ayudando a restablecer una función contráctil buena (Virus, 1987).

2.3. Uso de antioxidantes en la alimentación animal

2.3.1. Vitamina E

2.3.1.1. Estructura química y propiedades

La vitamina E está conformada por 8 compuestos naturales liposolubles estrechamente relacionados. La familia está formado por 2 subgrupos: tocoferoles (saturados) y tocotrienoles. Dentro de cada subgrupo hay cuatro isoformas individuales (α , β , γ y δ). Aunque el γ -tocoferol es la isoforma más abundante en la dieta, α -tocoferol es el antioxidante más potente y el biológicamente más disponible, debido a su captación hepática preferencial y a la secreción posterior en el plasma para el transporte a tejidos periféricos. Hay ocho estereoisómeros diferentes del tocoferol. De manera natural el α -tocoferol tiene la configuración R en las tres posiciones (2, 4 y 8) en el anillo cromanol y se denomina RRR-atocoferol (Finno y Valverg, 2012).

2.3.1.2. Absorción y metabolismo

La vitamina E se absorbe en el intestino delgado superior por difusión pasiva no saturable, en presencia de las sales biliares y el jugo pancreático. El sitio principal de absorción es el intestino delgado medio. Las formas esterificadas de la vitamina E se hidrolizan por una esterasa de la mucosa duodenal; las formas absorbidas predominantes son alcoholes libres. No hay diferencias apreciables en la eficiencia de absorción de las formas alcohol libre y éster de acetato o en la absorción de vitámeros de tocoferol y tocotrienol. La absorción entérica de la vitamina E es dependiente de la absorción adecuada de lípidos. El proceso requiere la presencia de grasa en el lumen del intestino así como la secreción de esterazas pancreáticas para la liberación de los ácidos grasos de los triglicéridos en la dieta; y de ácidos biliares para la formación de micelas y esterazas para la escisión hidrolítica de los ésteres de tocoferilo cuando se consumen esas formas. La vitamina E absorbida, así como otras sustancias hidrofóbicas entran a la circulación linfática en asociación con la quilomicra rica en triglicéridos. Dentro de los enterocitos la vitamina E se combina con otros lípidos y apolipoproteínas para formar quilomicras y lipoproteínas de baja densidad. Los quilomicrones en las aves son liberados en la circulación portal.

La vitamina E es transferida rápidamente de la quilomicra a las lipoproteínas plasmáticas a la cual se liga de manera no específica, después de lo cual es captada por el hígado y es incorporada a las proteínas de muy baja densidad (VLDL) secretadas por el hígado. Aunque la mayoría de los residuos de VLDL con un alto contenido de triglicéridos son regresados al hígado, algunos son convertidos a lipoproteínas de baja densidad (LDL). Durante el proceso la vitamina E también se transfiere espontáneamente a lipoproteínas que contienen apolipoproteína B como son las VLDL, LDL y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Por lo que los tocoferoles en el plasma se encuentran distribuidos en estas tres clases de lipoproteínas, siendo las más abundantes las LDL y HDL.

El consumo de vitamina E celular difiere de acuerdo al tipo de célula y se da por mecanismos de transferencia de lípidos entre las lipoproteínas y las células. Mientras que en el transporte intracelular del α -vitámero involucra dos proteínas ligadoras de tocoferol. Por un lado la α -proteína de transferencia de tocoferol (α -TTP), que facilita la transferencia del α -tocoferol entre microsomas y mitocondria. El otro grupo de proteínas que participan en el transporte intracelular de tocoferol son las proteínas asociadas al tocoferol (TAPs).

La vitamina E se localiza principalmente en membranas de la célula. Tales tejidos tienen dos reservas de vitamina: una lábil que cambia rápidamente y una fija que cambia lentamente. Las reservas lábiles se encuentran en tejidos donde el contenido de tocoferol se reduce rápidamente bajo condiciones de escasez de vitamina E. Por el contrario, las reservas fijas de vitamina E se encuentran en tejidos donde la movilización es lenta.

La mayoría de los tocoferoles que son absorbidos y retenidos son transportados sin cambios a los tejidos, donde son metabolizados, ya sea por la oxidación del anillo cromanol o de la cadena lateral fitilo, fosforilación o nitración.

2.3.1.3. Propiedades antioxidantes

La vitamina E mantiene la integridad de la membrana en todas las células del cuerpo. Su función antioxidante involucra la reducción de radicales libres, por lo tanto protege contra el daño de tales especies oxidativas altamente reactivas. Debido a la reactividad del hidrógeno fenólico en el C6 de su grupo hidroxilo y la habilidad para estabilizar un electrón impar por el sistema de anillo cromanol, la vitamina E tiene actividad antioxidante capaz de finalizar reacciones en cadena entre ácido grasos polinsaturados (PUFAs) en las membranas donde se encuentran. Esto involucra el traspaso del hidrógeno fenólico a un radical graso libre acilo, para prevenir el ataque de esas especies sobre los otros PUFAs. Las propiedades antioxidantes de los vitámeros E por lo tanto están relacionadas a la habilidad de emigrar de su hidrógeno fenólico.

Los tocoferoles y tocotrienoles son convertidos de sus formas alcohol a radical tocoferoxilo. El radical tocoferoxilo es suficientemente estable y reacciona con un segundo radical peroxilo para formar productos no radicales e inactivos como el tocoferilquinona. Debido a que el α -tocoferol puede competir más rápido por los radicales peroxilo que los PUFAs, cantidades pequeñas de la vitamina son capaces de efectuar la protección antioxidante de cantidades relativamente grandes de éste último

El α -tocoferol puede promover la peroxidación lipídica en LDLs en ausencia de ácido ascórbico o coenzima Q₁₀, lo que reduce el radical α -tocoferilo, sugiriendo que la vitamina puede ser prooxidativa bajo algunas condiciones.

2.3.1.4. Requerimientos y suplementación

Una UI de vitamina E es la actividad de 1 mg de acetato de DL- α -tocoferilo, , 0.735 mg acetato de D- α -tocoferilo, 0.671mg D- α -tocoferol, o 0.909 mg DL- α -tocoferol. Los requerimientos de vitamina E en la dieta es variable y depende de la concentración y tipo de grasa en la dieta, concentración de selenio y la presencia de antioxidantes y antioxidantes. Para pollo de engorda, el NRC (1994) recomienda 10 mg de vitamina E/ kg M.S. en todas las etapas de producción, aunque los requerimientos pueden ser mayores para prevenir enfermedades como la encefalomalacia (Singsen *et al.*, 1955) o mejorar el sistema inmune (Colnago *et al.*, 1984)

2.3.2. Vitamina C

2.3.2.1. Estructura química y propiedades

El término vitamina C incluye a los componentes que exhiben cuantitativamente la actividad biológica del ácido ascórbico. El ácido ascórbico (*2,3-didehidro-l-threo-hexano-1,4-lactona*) es una α lactona de seis carbonos que muestra un anillo lactona de 5 miembros y un grupo endiol bifuncional con un grupo carbonilo adyacente. Es un derivado del ácido hexurónico y se corresponde con una forma oxidada de la glucosa. El ácido ascórbico es un ácido dibásico debido a que ambos grupos hidroxilo enólicos pueden disociarse. Es un agente reductante fuerte, que se oxida a ácido dehidroascórbico al ceder hidrógeno, vía el radical intermedio ácido monodehidroascórbico. Las tres formas (ascórbico, ácido monodehidroascórbico y ácido dehidroascórbico) componen un sistema redox reversible y por lo tanto supresores de radicales libres. Reduce el ion férrico (Fe^{3+}) a ferroso (Fe^{2+}) y el radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y es oxidado a ácido monodehidroascórbico en el proceso. El ácido dehidroascórbico no se ioniza en ambientes de acidez débil o pH neutro, por lo tanto es relativamente hidrofóbico y tiene mayor capacidad de penetración en las membranas que el ácido ascórbico. En solución acuosa el ácido dehidroascórbico es inestable y se degrada por apertura de su anillo hidrolítico para producir 2,3 ácido dioxo-l gulónico.

2.3.2.2. Absorción y metabolismo

Los pollos sintetizan ácido ascórbico a partir de glucosa vía la ruta ácido glucorónico, y absorben el ácido ascórbico por difusión pasiva en el intestino delgado. Aunque se desconoce la forma en que el ácido ascórbico se transporta de las células epiteliales del intestino al plasma, se ha sugerido que se difunde a través de los canales aniónicos sensibles al volumen en la membrana. La vitamina C se transporta en el plasma en la forma reducida que es el ácido ascórbico. También se presentan cantidades pequeñas de ácido dehidroascórbico, formado de la oxidación del ácido ascórbico por oxidantes difusibles de origen celular.

La difusión simple del ácido ascórbico y dehidroascórbico a las células es insignificante, debido a la carga de ácido ascórbico, el cual se ioniza en condiciones fisiológicas y a las características de división aceite: agua del ácido dehidroascórbico que lo excluye de las bicapas lipídicas. No

obstante las concentraciones de ácido ascórbico en las células son 5 a 100 veces más de los encontrados en el plasma. Los mecanismos de captación de vitamina C celular incluyen: captación de ácido ascórbico por transportadores de vitamina C dependientes de sodio y transporte de ácido dehidroascórbico por transportadores de glucosa.

El ácido ascórbico es oxidado en vivo por dos pérdidas consecutivas de electrones individuales. La primera oxidación monovalente forma el radical ascorbilo libre; el radical ascorbilo se une al ácido ascórbico para formar ácido dehidroascórbico. La hidrólisis irreversible siguiente del ácido dehidroascórbico produce ácido 2,3-diceto-L-gulónico, el cual se descarboxila a CO_2 y fragmentos de cinco carbonos (xilosa, ácido xilónico, ácido lixonico o se oxida a ácido oxálico y fragmentos de cuatro carbonos. El ácido ascórbico también puede oxidarse por reaccionar con tocoferoxilo o radicales de urato.

Se piensa que el ascorbato pasa sin cambios a través de los glomérulos y se reabsorbe de manera activa en los túbulos del riñón por un proceso saturable mediado por un transportador. Las células epiteliales de los tubos renales reabsorben el ácido dehidroascórbico después de que se filtra del plasma. El ácido ascórbico también se excreta en el jugo gástrico en niveles tres veces los del plasma.

2.3.2.3. Propiedades antioxidantes

Las funciones metabólicas de la vitamina C como ácido ascórbico se deben a sus propiedades reductoras en reacciones bioquímicas diversas. El ácido ascórbico es cofactor en al menos ocho enzimas. Tres participan en la síntesis de colágeno, dos en la síntesis de carnitina y las tres restantes en biosíntesis de catecolaminas, hormonas peptídicas y metabolismo de la tirosina; actúa como agente protector y como un radical ascorbilo en reacciones con iones metales de transición.

El ácido ascórbico actúa como antioxidante debido a su habilidad para reaccionar con radicales libres, experimentando la oxidación de un solo electrón, para producir radical ascorbilo. Por lo tanto, el ácido ascórbico puede reducir la toxicidad, el anión superóxido de especies reactivas al oxígeno ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y el radical oxidrilo (OH^{\cdot}), así como los oxi-radicales orgánicos (RO_2^{\cdot}) y nitrógeno

(NO₂). Una de las funciones del ácido ascórbico permite reducir al radical cromanoxil semiestable de las regiones hidrofóbicas de las células y por lo tanto regenerar la forma activa metabólicamente de la vitamina E.

La función antioxidante de la vitamina C inicia con una reacción de la terminación de la cadena de un radical de ascorbato con un radical peroxilo para producir un hidroperóxido y el radical ascorbilo, el cual reduce un segundo radical peroxilo y produce la vitamina en su forma oxidada, ácido dehidroascórbico. De esta forma, la exposición a radicales libres lleva al consumo de vitamina C.

En presencia de iones de metales oxidados, concentraciones altas de ácido ascórbico puede mostrar funciones prooxidantes, al menos en vitro. Por lo tanto, el ascorbato puede reaccionar con sales de cobre o hierro y formar peróxido de hidrógeno y especies reactivas al oxígeno, lo cual puede dañar ácidos nucleicos, proteínas y ácidos grasos poliinsaturados.

2.3.2.4. Requerimientos y suplementación

Debido a que los pollos de engorda tienen la habilidad de sintetizar ácido ascórbico, el NRC no ha establecido los requerimientos para esta vitamina.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

La inducción de los pollos a caminar (ejercicio) a partir del d 7 de edad, suplementados con vitaminas E y C mejoran la resistencia y contenido de cenizas de la tibia, resistencia del tendón *gastronemius*, latencia a postrarse, asimetría fluctuante, necrosis y epifisiolisis de la cabeza femoral, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, peso vivo, rendimiento de la canal y cortes, y color de la carne.

3.2. Objetivo general

Evaluar el efecto del ejercicio y la suplementación de vitaminas E y C en la dieta, en la resistencia y contenido de cenizas de la tibia, resistencia del tendón *gastronemius*, latencia a postrarse, asimetría fluctuante, necrosis y epifisiolisis de la cabeza femoral, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, peso vivo, rendimiento de la canal y cortes, y color de la carne.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Animales y diseño experimental.

La presente investigación se llevó a cabo en El Centro de Extensión, Enseñanza e Investigación en Ciencias Avícolas de la Universidad de Texas A&M. Se evaluaron 8 tratamientos: dos concentraciones de vitamina E (40 u 80 mg/kg de dieta) o vitamina C (0 ó 1000 mg/kg de dieta) y ejercicio con inducción a caminar (cCAM) y sin inducción a caminar (sCAM). Las dietas se prepararon a base de maíz- pasta de soya y fueron formuladas para cubrir o exceder todos los requerimientos de los nutrientes de los pollos (Cobb-Vantress, 2012). Cada tratamiento se ofreció a 4 unidades experimentales de 21 pollos (Cobb 500) de un d de edad, cada una. Los pollos fueron alojados en corrales del mismo tamaño (dimensiones: 1.74 m de largo x 0.61 m de ancho x 0.61 m de alto). A las aves se les ofreció agua y alimento “ad libitum”. Durante los primeros 14 días todos los grupos fueron alimentados con una dieta de iniciación en forma de migajas, posteriormente se les alimentó con una dieta peletizada. A las aves se les proporcionó un programa de iluminación de 24 horas de luz durante el primer día de edad y posteriormente se cambió a 16L:8O. La temperatura al inicio del estudio fue de 32°C, con reducción de 2°C cada semana hasta alcanzar los 20°C en la sexta semana de edad.

4.2. Ejercicio (cCAM y sCAM)

A partir del d 7 de edad, los pollos con cCAM (40 aves/tratamiento) recorrieron diariamente por la mañana 30.5 m a lo largo de un corredor adyacente a los corrales, hasta finalizar el experimento.

4.3. Resistencia y contenido de cenizas de la tibia (RTi y CCt)

A los 21, 35 y 42 d se seleccionaron al azar diez aves por tratamiento y se mataron por dislocación cervical. Se removieron las tibias derecha e izquierda y fueron etiquetadas y colocadas en una bolsa de plástico y almacenadas a 4° C, hasta el momento de realizar la evaluación. Para medir la resistencia, la tibia derecha sin hervir se descarnó y se colocó sobre la plataforma de un analizador de textura (Modelo TA-XT2i, Texture Technologies Corp., 18 Fairview Road, Scarsdale, New York 10583) y se rompió con una carga de 50 kg, registrándose la fuerza a la ruptura en Newtons (N). Para la determinación del contenido de cenizas, la tibia

izquierda fue hervida, descarnada completamente e introducida en una estufa a 105° C por 24 horas (peso inicial). Entonces, las muestras fueron colocadas en una mufla a 600° C durante 24 y enfriadas en un desecador antes de ser pesadas nuevamente (peso final). El contenido de cenizas en la tibia (CCt) se expresó como porcentaje del peso seco mediante la siguiente formula:

$$CCt=(PF/PI) \times 100$$

Donde:

CCt= Porcentaje de cenizas en tibia

PF= Peso final

PI= Peso inicial

4.4. Resistencia del tendón *gastrocnemius* (RTe)

Al d 42 a 10 aves/tratamiento se les removió cuidadosamente el tendón *gastrocnemius* de la pierna izquierda y las muestras fueron etiquetadas, congeladas y almacenadas a -20° C hasta la evaluación. Los tendones fueron descongelados en un refrigerador durante la noche. Las porciones proximal y distal del tendón fueron sumergidas en nitrógeno líquido, envueltas con papel lija y fijadas a una sonda de doble pinza montada en el analizador de textura (Modelo TA-XT2i, Texture Technologies Corp., 18 Fairview Road, Scarsdale, New York 10583). Las pinzas tensoron el tendón y se registró la fuerza máxima requerida para romperlo.

4.5. Latencia a postrase (LPA)

A los d 21, 35 y 42, 10 aves/tratamiento fueron expuestas a la prueba de latencia a postrarse, como se describe por Berg y Sanotra (2003). Esta prueba se basa en que el contacto corporal con el agua es una experiencia nueva y aversiva para los pollos de engorda. Los pollos fueron introducidos individualmente en un recipiente con agua a 30 mm de altura y 32° C, y evaluados sin contacto visual con otras aves. Se registró el tiempo transcurrido en segundos hasta el momento en que el ave se postró por completo, de acuerdo al principio de que cuando el ave tiene mejor salud de patas, permanecerá mayor tiempo de pie para evitar el contacto del cuerpo con el agua. Si el ave aún permanecía de pie después de 600 segundos, la prueba se suspendió.

4.6. Asimetría fluctuante relativa (AFI)

Al d 41 se midió la asimetría fluctuante de las patas derecha e izquierda de las aves como indicador de bienestar y estrés crónico (Moller y Swaddle, 1997), equivalente a la desviación media. Las características morfológicas que se midieron fueron: largo de los dedos medio derecho e izquierdo, largo y ancho de los tarsos derecho e izquierdo. Todas las mediciones se hicieron en milímetros en una sola sesión, utilizando un vernier digital. El valor de cada característica se definió como la media de ambas patas. Para calcular la asimetría fluctuante relativa se empleó la siguiente expresión: $[2|D-I|/(D+I)]$ D= pata derecha; I = pata izquierda, para todas las mediciones.

4.7. Necrosis y epifisiolisis (NCF y ECF)

A los d 21 y 35 se removi6 el f6mur derecho e izquierdo, y se realiz6 el diagn6stico de lesiones macrosc6picas en el extremo proximal del f6mur. Las categorías de diagn6stico utilizadas fueron: **ECF**= Epifisiolisis de la cabeza del f6mur, **NCF**= Necrosis de la cabeza del f6mur. El n6mero total de lesiones en la cabeza del f6mur se calcul6 por presencia o ausencia de alguna de las categorías.

4.8. Sustancias reactivas a 6cido tiobarbit6rico (TBARS)

Al d 28 de edad 10 aves por tratamiento se emplearon para evaluar las concentraciones s6ricas de Malondialdehido (MDA). Las muestras sanguíneas fueron colectadas de cada ave mediante venopunci6n en la vena braquial. Las muestras sanguíneas fueron centrifugadas a 2000 x g por 15 minutos a 4°C para separar la parte s6lida y líquida de la sangre. El suero fue almacenado en tubos de microcentrífuga (Eppendorf) y congelado a -80° C hasta la medici6n de Malodiandehido. El MDA en el suero se midi6 por espectrofotometría en t6rminos de TBARS. El TBARS se expres6 como micromoles por mililitro de suero.

4.9. Peso vivo, rendimiento y color de la canal (PVRCC)

Todas las aves fueron pesadas semanalmente hasta finalizar el estudio. Al d 42 de edad, se mataron 10 aves/tratamiento para evaluar el rendimiento y color de la canal. La canal, (sin plumas, cabeza, hígado, coraz6n, pulmones e intestinos). Posteriormente, se pes6 separadamente

la grasa abdominal, pechuga, muslos (2) y alas (2) y se reportaron como porcentaje del peso vivo corporal (Zhao *et al.*, 2009). Las canales se enfriaron en hielo por 1 h y se registró el peso de la canal fría. La grasa abdominal y de las vísceras fue removida de la canal y se pesó. En la pechuga y en el muslo derecho se midió el color de la carne. Las mediciones fueron realizadas con un colorímetro de reflectancia portátil CR-300 (Konica Minolta Sensing Americas, INC). Para medir el color de las muestras se usó el espacio de color denominado CIELAB (L*=luminosidad, a*=índice de rojo, b*=índice de amarillo) (CIE, 1986).

4.10. Análisis estadístico

La resistencia y contenido de cenizas de la tibia, resistencia del tendón *gastrocnemius*, asimetría fluctuante relativa, sustancias reactivas a ácido tiobarbitúrico, peso vivo, rendimiento de la canal caliente y fría, porcentaje de grasa abdominal, rendimiento de alas, muslos y pechuga fueron evaluados mediante un ANOVA de acuerdo a un diseño completamente el azar con un arreglo factorial de tratamientos 2x2x2 (Snedecor y Cochran, 1967). Antes del análisis, los valores de asimetría fluctuante se transformaron a raíz cuadrada de arco seno, sin embargo, las medias reportadas no se modificaron. Cuando se observaron valores significativos de F, la separación de medias consideró el procedimiento PDIFF para probar sus diferencias. Los análisis fueron realizados según el modelo estadístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \delta_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\delta)_{ik} + (\beta\delta)_{jk} + \varepsilon_{ijkl}$$

Dónde:

Y_{ijkl} = Variables de respuesta

μ = Media general

α_i = efecto del i-ésima concentración de vitamina E

β_j = efecto del j-ésima concentración de vitamina C

δ_k = efecto de la k-ésima inducción a caminar

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto de la interacción del i-ésima concentración de vitamina E y del j-ésima concentración de vitamina C.

$(\alpha\delta)_{ik}$ = Efecto de la interacción del i-ésima concentración de vitamina E y del k-ésima inducción a caminar

$(\beta\delta)_{jk}$ = Efecto de la interacción del j-ésima concentración de vitamina C y del k-ésima inducción a caminar

ε_{ijkl} = Error experimental. $\varepsilon_{ijkl} \sim NI(0, \sigma^2)$.

Los datos de la latencia a postrarse fueron analizados con el método estimación de curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (Kaplan y Meier, 1958), así como el método de comparación de curvas de Logrank y la regresión de Cox, utilizando los procedimientos Lifestest y Lifereg de acuerdo al modelo siguiente:

$$h(t, X_1, X_2, X_3, X_4) = h_0(t)e^{\beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 (X_1 * X_2)}$$

Dónde:

$h(t, x)$ = Latencia a postrarse al tiempo t dado las covariables x .

X_1 = Concentración de vitamina E

X_2 = Concentración de vitamina C

X_3 =Inducción a caminar

X_4 = Edad

Mientras que las mediciones de necrosis y la epifisiolisis del fémur proximal se analizaron con el modelo de regresión logística binaria siguiente:

$$P(Y = 1/X_i) = \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4}}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4}}$$

Dónde:

$P(Y=1/X_i)$ = La probabilidad de epifisiolisis

$1-P(Y=1/X_i)$ = La probabilidad de necrosis

X_1 = Concentración de vitamina E

X_2 = Concentración de vitamina C

X_3 = Inducción a caminar

X_4 = Edad

El color de la carne fue analizado usando un MANOVA (Análisis multivariado de varianzas). Todos los datos se analizaron con el paquete estadístico SAS 9.0 (2002).

5. RESULTADOS

Resistencia y contenido de cenizas de la tibia (RTi y CCt)

En el Cuadro 1 se muestra que el ejercicio mejoró RTi ($P \leq 0.05$) en los d 21 y 42, en favor de las aves cCAM comparado con el grupo sCAM. Las aves cCAM mostraron mayor CCt que el grupo sCAM al d 42. Las concentraciones diferentes de vitamina E y C, no produjeron diferencias ($P > 0.05$) en RTi o CCt en los d evaluados.

Cuadro 1. Medias de mínimos cuadrados para resistencia de la tibia (N) y contenido de cenizas (%) de pollos en engorda a edades diferentes (d), suplementados con vitaminas E (40 u 80 mg/kg) y C (0 o 1000 mg/kg) en la dieta y sin o con inducción a caminar¹.

	Resistencia de la tibia			Contenido de cenizas		
	21	35	42	21	35	42
Vitamina E						
40	129.91 ^a	280.76 ^a	404.99 ^a	48.82 ^a	46.62 ^a	43.38 ^a
80	123.75 ^a	265.50 ^a	399.32 ^a	49.23 ^a	45.98 ^a	45.75 ^a
EEM	3.52	8.73	10.49	1.03	0.52	1.12
P	0.22	0.22	0.70	0.77	0.38	0.14
Vitamina C						
0	131.24 ^a	268.04 ^a	399.52 ^a	49.25 ^a	45.98 ^a	45.65 ^a
1000	122.42 ^a	278.22 ^a	404.79 ^a	48.79 ^a	46.62 ^a	43.48 ^a
EEM	3.52	8.73	10.49	1.03	0.52	1.12
P	0.08	0.41	0.72	0.75	0.38	0.17
Ejercicio						
sCAM ²	120.02 ^b	272.61 ^a	385.05 ^b	50.09 ^a	46.33 ^a	42.84 ^b
cCAM ³	133.64 ^a	273.65 ^a	419.26 ^a	47.96 ^a	46.27 ^a	46.29 ^a
EEM	3.52	8.73	10.49	1.03	0.52	1.12
P	0.008	0.93	0.02	0.15	0.93	0.03

¹ Debido a que no se encontró efecto de las interacciones, solo se reportan las medias de los efectos principales.

² Sin inducción a caminar.

³ Con inducción a caminar (las aves caminaron 30.5 m lineales diariamente).

EEM.- Error estándar de la media.

P.- Probabilidad.

^{ab} Representa diferencias significativas entre tratamientos en cada columna ($P \leq 0.05$).

Resistencia del tendón *gastrocnemius* (R_{Te})

La VE (40 mg) x 1000 mg de VC mejoró la R_{Te} en comparación a las no suplementadas con VC (P=0.04, Figura 1). La suplementación con 1000 mg de VC x sCAM mejoró la R_{Te}, respecto a las aves sin VC x sCAM (P=0.004, Figura 2).

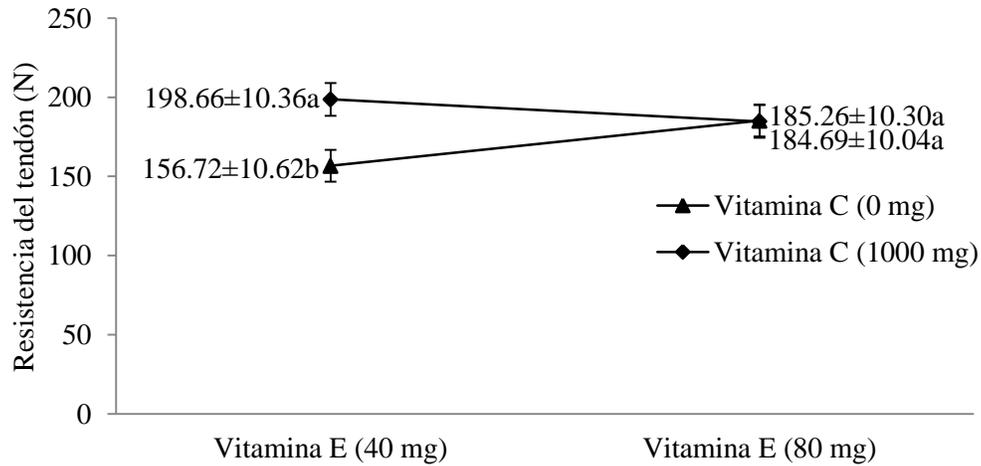


Figura 1. Resistencia del tendón *gastrocnemius* (N) de pollos de engorda a los 42 d de edad, suplementados con dos concentraciones de vitaminas E y C. Los valores reportados son medias de mínimos cuadrados ± EEM. ^{ab} Representa diferencias significativas a la misma concentración de vitamina E (P≤0.05).

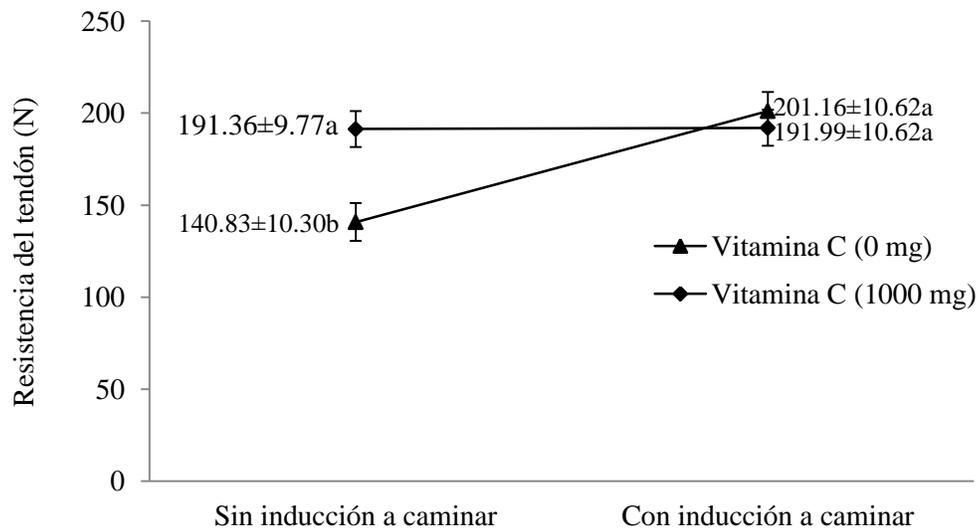


Figura 2. Resistencia del tendón *gastrocnemius* (N) de pollos de engorda a los 42 d de edad suplementados con dos concentraciones de vitamina C, y sin o con inducción a caminar. Los valores reportados son medias de mínimos cuadrados ± EEM. ^{ab} Representa diferencias significativas al mismo nivel de ejercicio (P≤0.05).

Latencia a postrase (LAP)

Los resultados de la regresión de Cox mostraron que la suplementación de 80 mg de VE mejoró LAP en aves que consumieron 1000 mg de VC, T4 (interacción VE x VC, $P \leq 0.05$, Cuadro 2 y Figura 3), respecto de los otros tratamientos; además, se observó que a mayor edad de las aves se disminuyó el tiempo que permanecen parados (Cuadro 2 y Figura 4). La inducción a caminar no afectó LAP (datos no mostrados). Se incluye, además, el número de aves postradas y no postradas al final del estudio.

Cuadro 2. Latencia a postrarse de pollos de engorda (s) suplementados con vitaminas E (40 u 80 mg/ kg) y C (0 o 1000 mg/kg) y a edades diferentes (d).

Trat	n	LPA	Número de aves	
			Postradas	No postradas
T1	32	115.88±16.20	31	1
T2	32	114.96±18.87	30	2
T3	32	88.79±10.18	31	1
T4	32	163.54±20.67	27	5
Edad				
21 d	80	216.56±19.98	66	14
35 d	96	94.49±12.35	95	1
42 d	80	65.42±6.45	80	0

T₁= 40 mg vitamina E+0 mg de vitamina C; T₂= 80 mg vitamina E+0 mg de vitamina C; T₃= 40 mg vitamina E+1000 mg de vitamina C; T₄= 80 mg vitamina E+1000 mg de vitamina C;

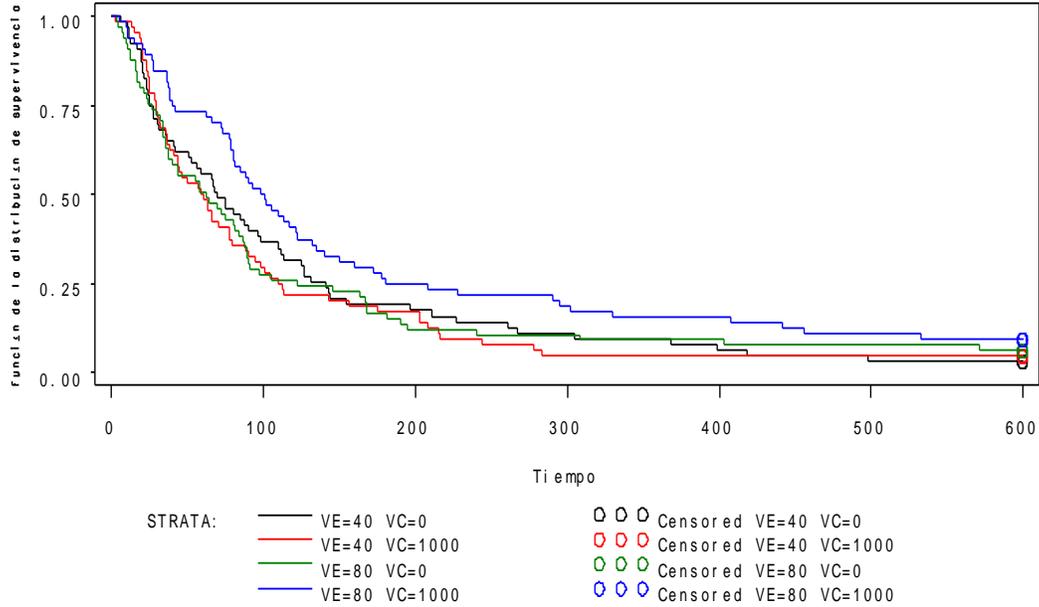


Figura 3. Curva de supervivencia de probabilidad acumulada de latencia a postrarse de pollos de engorda (Cobb 500) suplementados con dos concentraciones de vitaminas E y C.

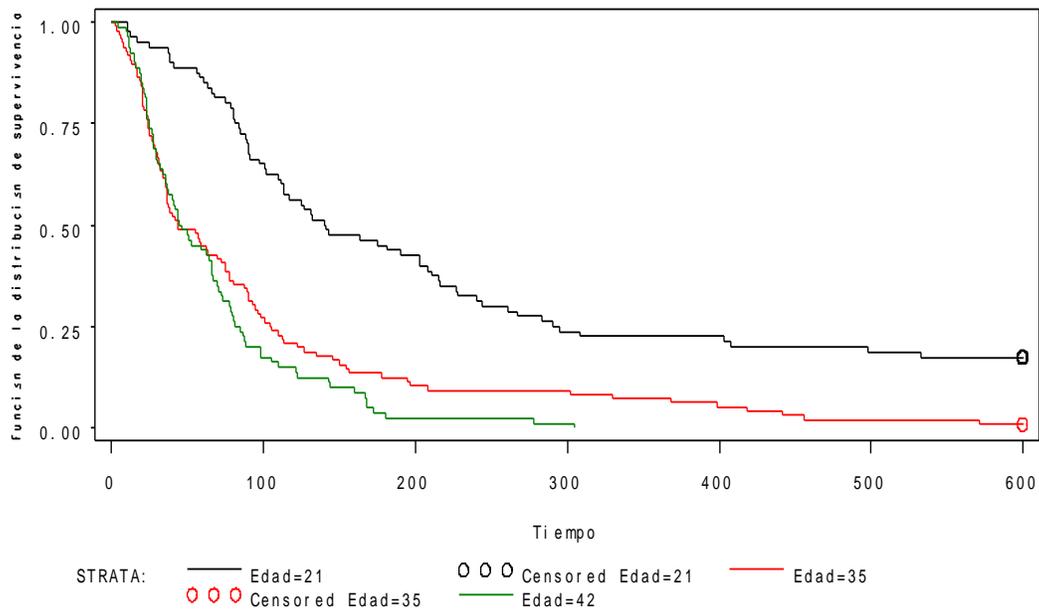


Figura 4. Curva de supervivencia de probabilidad acumulada de latencia a postrarse de pollos de engorda (Cobb 500) a los 21, 35 y 42 d de edad.

Asimetría fluctuante relativa (AFI)

En el Cuadro 3 se muestra que la asimetría del tarso (longitud) disminuyó en aves suplementadas con 80 mg de VE, comparada con aves alimentadas con 40 mg de VE; mientras que la asimetría de la anchura fue mayor en aves que consumieron 80 mg de VE y sCAM comparadas con las suplementadas con 40 mg de VE y sCAM (interacción VE x ejercicio, $P \leq 0.05$, Figura 5). No se encontró efecto de la vitamina C en las variables estudiadas y en el largo de dedo por los otros factores evaluados.

Cuadro 3. Medias de mínimos cuadrados para asimetría fluctuante relativa (mm) en varias características morfológicas de pollos de engorda a los 42 d de edad, suplementados con dos concentraciones de vitaminas E (40 u 80 mg/ kg) y C (0 o 1000 mg/kg) y sin y con inducción a caminar (n=476).

Efecto	Característica morfológica		
	Largo dedo	Largo tarso	Ancho tarso
Vitamina E			
40	0.0373 ^a	0.0522 ^a	0.0376 ^a
80	0.0340 ^a	0.0439 ^b	0.0423 ^a
Vitamina C			
0	0.0354 ^a	0.0478 ^a	0.0417 ^a
1000	0.0359 ^a	0.0484 ^a	0.0381 ^a
Ejercicio			
sCAM ¹	0.0339 ^a	0.0485 ^a	0.0385 ^a
cCAM ²	0.0376 ^a	0.0477 ^a	0.0414 ^a

¹ Sin inducción a caminar.

² Con inducción a caminar (las aves caminaron 30.5 m lineales diariamente).

^{ab} Indican diferencias significativas entre tratamientos en cada columna ($P \leq 0.05$).

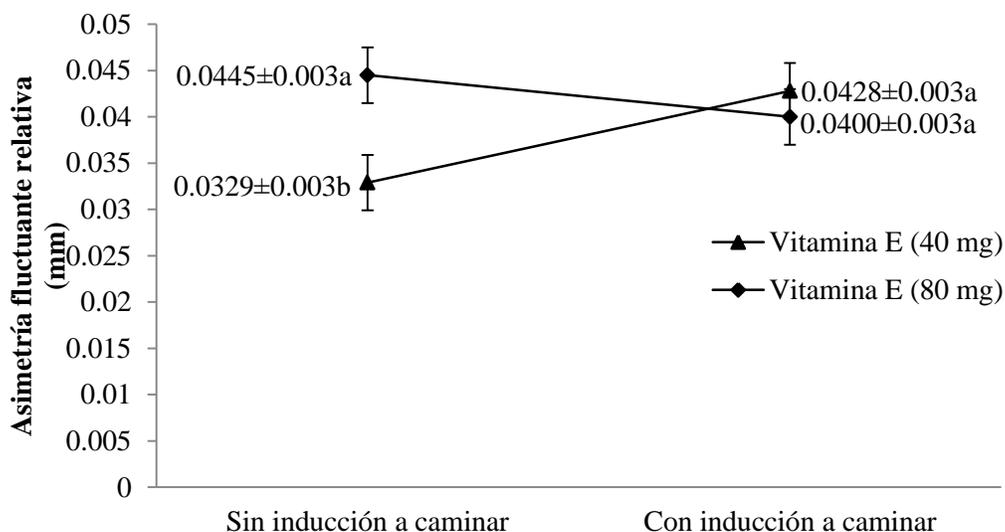


Figura 5. Asimetría fluctuante relativa del ancho de tarso (mm) en pollos de engorda a los 42 d de edad, suplementados con dos concentraciones de vitamina E, sin y con inducción a caminar. ^{ab} Representa diferencias significativas al mismo nivel de ejercicio ($P \leq 0.05$).

Necrosis y epifisiolisis (NCF y ECF)

En el Cuadro 4 se muestra que las aves de 35 d tuvieron mayor presencia de NCF y ECF, con respecto a las de 21 d de edad. No se encontraron diferencias en alguna de las categorías de diagnóstico por nivel de vitamina E, C o inducción a caminar (datos no mostrados).

Cuadro 4. Número de pollos con necrosis o epifisiolisis de la cabeza del fémur del total de observaciones a los 21 y 35 d de edad.

Variable	Edad		Total
	21 (n= 160)	35 (n= 192)	
Necrosis	50/160	86/192	352
Epifisiolisis	46/160	118/192	352

Sustancias reactivas a ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Se encontró una interacción entre ejercicio y vitamina C (Figura 7). Las aves sCAM exhibieron valores mayores en el contenido de Malondialdehído cuando consumieron 1000 mg de la VC, respecto a los no suplementados. Sin embargo, se encontró diferencias en MDA en pollos cCAM por nivel de vitamina C, mostrándose valores menores con 1000 mg al compararlos con el grupo sin suplementar. Las concentraciones diferentes de VE no afectaron los valores de TBARS ($P>0.05$).

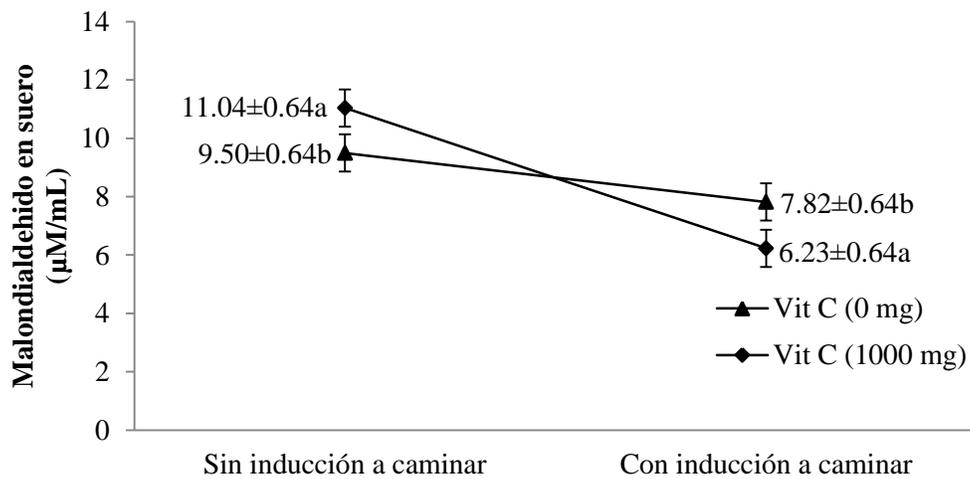


Figura 6. Contenido de Malondialdehído (MDA, $\mu\text{M}/\text{mL}$) en suero sanguíneo de pollos de 28 d de edad, sin y con suplementación de vitamina C en la dieta y sin y con inducción a caminar. Los valores reportados son medias de mínimos cuadrados \pm EEM. ^{ab} Representa diferencias significativas al mismo nivel de ejercicio ($P\leq 0.05$).

Peso vivo, rendimiento y color de la carne (PVRCC)

En el Cuadro 5 se observa que las aves del grupo que consumieron 40 mg de vitamina E pesaron menos ($P\leq 0.05$) que los pollos que recibieron 80 mg a los 14, 28, 35 y 42 d de edad. El peso de las aves que recibieron 1000 UI de vitamina C fue similar ($P>0.05$) a aquellos no suplementados en los d 7, 14, 21, 35 y 42. La suplementación con vitamina C mejoró el peso de los pollos a los 28 d de edad. No hubo diferencias ($P>0.05$) en peso por efecto de caminar los d 7, 21, 28, 35 y 42, excepto al d 14, donde las aves sCAM pesaron más que las aves cCAM.

Cuadro 5. Medias de mínimos cuadrados para peso vivo (g) de pollos de engorda a edades diferentes, suplementados con dos concentraciones de vitaminas E (40 u 80 mg/ kg) y C (0 ó 1000 mg/kg) en la dieta, y sin y con inducción a caminar¹.

	Edad					
	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	Día 35	Día 42
Vitamina E						
40	160.63 ^a	422.94 ^b	742.09 ^a	1321.65 ^b	1887.34 ^b	2486.02 ^b
80	162.97 ^a	453.92 ^a	755.58 ^a	1384.41 ^a	1966.20 ^a	2635.99 ^a
EEM	1.33	6.41	4.67	11.68	24.05	27.01
P	0.22	0.002	0.053	0.0009	0.0293	0.0006
Vitamina C						
0	161.07 ^a	441.70 ^a	745.40 ^a	1327.97 ^b	1898.77 ^a	2533.36 ^a
1000	162.52 ^a	435.16 ^a	752.26 ^a	1378.10 ^a	1954.77 ^a	2588.65 ^a
EEM	1.33	6.41	4.67	11.68	24.05	27.01
P	0.45	0.47	0.30	0.005	0.11	0.16
Ejercicio						
sCAM ²	161.80 ^a	451.39 ^a	747.03 ^a	1350.34 ^a	1952.59 ^a	2563.37 ^a
cCAM ³	161.80 ^a	425.48 ^b	750.63 ^a	1355.73 ^a	1900.96 ^a	2558.64 ^a
EEM	1.33	6.41	4.67	11.68	24.05	27.01
P	1.00	0.0087	0.59	0.74	0.14	0.90

¹ Debido a que no se encontró efecto de las interacciones, solo se reportan las medias de los efectos principales.

² Sin inducción a caminar.

³ Con inducción a caminar (las aves caminaron 30.5 m lineales diariamente).

EEM.- Error estándar de la media.

P.- Probabilidad.

^{ab} Representa diferencias significativas entre tratamientos en cada columna ($P \leq 0.05$).

El análisis de rendimiento de la canal fría mostró interacción entre ejercicio x VC (Figura 8). Las aves cCAM y suplementadas con 1000 mg de vitamina C mostraron un rendimiento de la canal fría mayor, respecto a las que no consumieron vitamina C y cCAM. Pollos suplementados con niveles distintos de vitamina E tuvieron el mismo rendimiento de la canal fría. No se encontró diferencias por efecto de las vitaminas E, C o ejercicio en los rendimientos de la canal caliente, pechuga, muslos, alas, pierna o grasa abdominal (Cuadro 6).

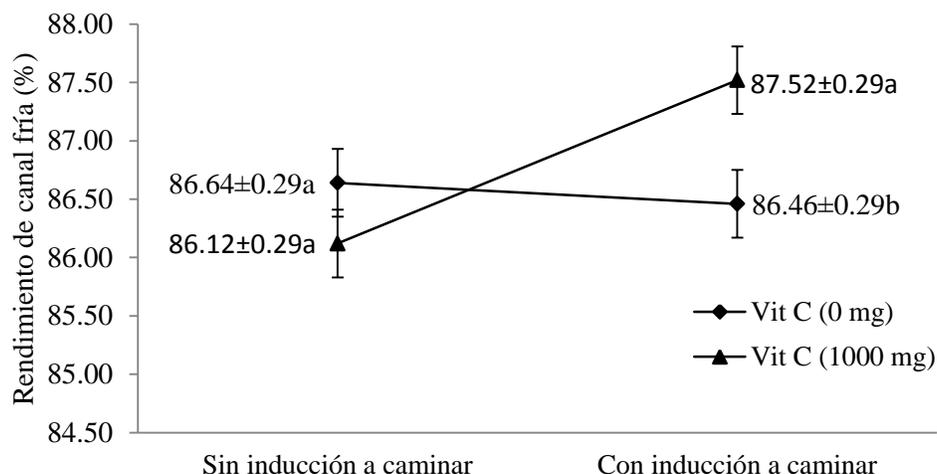


Figura 7. Rendimiento de la canal fría de pollos de 42 d de edad, suplementados con vitamina C en la dieta (0 o 1000 mg / kg) sin y con inducción a caminar. Los valores reportados son medias de mínimos cuadrados \pm EEM. ^{ab} Representa diferencias significativas al mismo nivel de ejercicio ($P \leq 0.05$).

Cuadro 6. Efecto de la suplementación de las vitaminas E (40 u 80 mg/kg de dieta) y C (0 ó 1000 mg/kg de dieta), sin y con inducción a caminar en el rendimiento (%) de la canal caliente (RCC), canal fría (RCF), pechuga (RPG), muslos (RM), alas (RA) y porcentaje de grasa abdominal (PGA) en pollos de 42 d de edad.

	RCC	RCF	RPG	RM	RA	PGA
Vitamina E						
40	84.4 ^a	86.69 ^a	24.64 ^a	12.60 ^a	8.41 ^a	1.73 ^a
80	84.6 ^a	86.68 ^a	25.46 ^a	12.98 ^a	8.25 ^a	1.69 ^a
Vitamina C						
0	84.44 ^a	86.55 ^a	24.83 ^a	12.64 ^a	8.40 ^a	1.72 ^a
1000	84.61 ^a	86.82 ^a	25.27 ^a	12.94 ^a	8.26 ^a	1.71 ^a
Ejercicio						
sCAM ¹	84.45 ^a	86.38 ^b	25.10 ^a	12.80 ^a	8.43 ^a	1.67 ^a
cCAM ²	84.60 ^a	86.99 ^a	25.00 ^a	12.78 ^a	8.23 ^a	1.75 ^a
EEM	0.17	0.20	0.42	0.15	0.08	0.06
P						
Vitamina E	0.32	0.99	0.17	0.08	0.21	0.69
Vitamina C	0.50	0.35	0.45	0.16	0.26	0.88
Ejercicio	0.55	0.04	0.86	0.91	0.10	0.35
Vitamina C x ejercicio		0.008				

¹ Sin inducción a caminar.

² Con inducción a caminar (las aves caminaron 30.5 m lineales diariamente).

EEM.- Error estándar de la media.

P.- Probabilidad.

^{ab} Representa diferencias significativas entre tratamientos en cada columna ($P \leq 0.05$).

En el Cuadro 7 se observa que las aves sCAM mostraron mayores índices de amarillo (b*) en pechuga y muslo, comparados con el grupo cCAM. Los índices de rojo (a*) en muslo, fueron mayores en los pollos cCAM respecto a los sCAM. Incrementar la vitamina E en la dieta afectó el índice de rojo en pechuga, favoreciendo al grupo que consumió 80 mg de vitamina de vitamina E, comparado con los pollos suplementados con 40 mg. La vitamina C no afectó las características del color; por lo que cambios en el nivel de suplementación de esta vitamina no están relacionados con modificaciones en la luminosidad y cromaticidad de la carne. Los tratamientos no afectaron la luminosidad de la carne.

Cuadro 7. Suplementación de vitaminas E (40 u 80 mg/ kg de dieta) y C (0 ó 1000 mg/kg de dieta) sin y con inducción a caminar en el color de la pechuga y muslo de pollos de engorda.

	muslo			pechuga		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
Vitamina E						
40	53.99±0.38a	4.44±0.21a	0.07±0.22a	58.19±0.46a	1.68±0.14b	0.20±0.25a
80	54.14±0.37a	4.40±0.21a	-0.01±0.22a	58.40±0.40a	2.26±0.13a	0.25±0.24a
Vitamina C						
0	54.36±0.38a	4.37±0.21a	-0.16±0.22a	58.12±0.46a	2.05±0.15a	0.16±0.25a
1000	53.79±0.37a	4.47±0.21a	0.22±0.21a	58.47±0.44a	1.92±0.14a	0.29±0.24a
Ejercicio						
sCAM ¹	53.96±0.37a	4.10±0.20b	0.34±0.21a	58.67±0.45a	1.81±0.14a	0.58±0.23a
cCAM ²	54.17±0.38a	4.76±0.20a	-0.29±0.21b	57.92±0.45a	2.16±0.14a	-0.13±0.24b

L*=luminosidad; a*=índice de rojo; b*índice de amarillo.

¹ Sin inducción a caminar.

² Con inducción a caminar (las aves caminaron 30.5 m lineales diariamente).

^{ab} Representa diferencias significativas entre tratamientos en cada columna P(<0.05).

Vitamina E (muslo): $\lambda=0.99$, F=0.07, P=0.97.

Vitamina E (pechuga): $\lambda=0.87$, F=3.60, P=0.01.

Vitamina C (muslo): $\lambda=0.95$, F=1.20, P=0.31.

Vitamina C (pechuga): $\lambda=0.99$, F=0.20, P=0.89).

Sin y con ejercicio (muslo): $\lambda=0.87$, F=3.66, P=0.01.

Sin y con ejercicio (pechuga): $\lambda=0.89$, F=2.81, P=0.04.

6. DISCUSIÓN

Resistencia y contenido de cenizas de la tibia (RTi y CCt)

El ejercicio mejoró RTi ($P \leq 0.05$) en los d 21 y 42, en favor de las aves cCAM comparado con el grupo sCAM. La arquitectura ósea y las propiedades biomecánicas del hueso cambian como respuesta a la carga mecánica y a la tensión muscular aplicada sobre ellos (Oviedo-Rondon, 2007). La acción de caminar resulta en una carga mecánica de los huesos del esqueleto apendicular (Shipov *et al.*, 2010). Se ha demostrado que aumentar la actividad de los pollos de engorda por un incremento en la complejidad ambiental (Bizeray *et al.*, 2002a) o ejercicio en una caminadora (Reiter y Bessei, 2009), influyen en el desarrollo del hueso. Se ha reportado que el uso de rampas y “juguetes” para incrementar la actividad de los pollos de engorda aumentó significativamente la resistencia de la tibia (Balog *et al.*, 1997). Contrariamente, el uso de barreras entre comederos y bebederos no mejoró las características mecánicas del hueso o su mineralización (Bizeray *et al.*, 2002a, Ruiz-Feria *et al.*, 2014). Estas prácticas tienen efectos en la masa, densidad, forma y tamaño del hueso que se refleja en una mejora considerable de la fortaleza mecánica, como respuesta a una adaptación del hueso a la presión que se impone sobre él mismo, por efecto de una carga dinámica (Turner y Robling, 2005). El contenido y la densidad mineral ósea están relacionados con la fortaleza del hueso (Turner y Robling, 2005); siendo el Ca y P los minerales principales que lo forman (Rath *et al.*, 2000), por lo que se ha usado el contenido de cenizas como un indicador de la fortaleza del hueso. Se ha reportado que incrementos moderados en el contenido mineral por efecto del ejercicio puede traducirse en cambios grandes en la fortaleza del hueso (Robling *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos sobre el contenido de cenizas en tibia son soportados por lo anteriormente expresado, ya que las aves de 42 d de edad en el grupo cCAM mostraron el contenido mayor de cenizas que las aves sCAM; lo cual puede ser debido a la respuesta del tejido del hueso a una carga dinámica provocada por el ejercicio. Las cargas dinámicas crean el movimiento del fluido en la red lacunar-canicular del hueso, el cual a su vez genera presión de deformación en las membranas de los osteocitos residentes, células de revestimiento óseo y osteoblastos (Turner y Robling, 2005). Por lo tanto, incrementar la tasa de carga a través del ejercicio (caminar) es una forma eficaz de promover la osteogénesis (Ruiz-Feria *et al.*, 2014). Otro de los factores que afectan el contenido de cenizas en el hueso es el nutricional, en particular las vitaminas E y C. Se ha sugerido que el uso de la

vitamina E puede tener alguna acción anabólica y por lo tanto mejora la estructura ósea que conduce a huesos más fuertes (Shuid *et al.*, 2010). Si la vitamina E tiene propiedades anabólicas, entonces mejora la microestructura del hueso por un aumento en las placas trabeculares intactas, en el ancho trabecular normal y en la conectividad de la trabécula (Riggs y Parffit, 2005); sin embargo, los resultados de este estudio no soportan esos hallazgos ya que las aves suplementadas con concentraciones diferentes de vitamina E, no mostraron diferencias en RTi o CCt. Estudios relacionados con el uso de altas concentraciones de VE en la resistencia de la tibia en pollos son escasos; sin embargo, Feresin *et al.* (2013) no encontraron diferencias en el contenido mineral del hueso de ratas hembras ovariectomizadas alimentadas con 300, 525 y 750 mg de vitamina E/kg de dieta a base de caseína semipurificada. Se ha demostrado que 500 mg de vitamina E/kg de dieta mejora la calidad e incrementa la matriz proteica del hueso en ratones viejos sin alterar la mineralización ósea (Arjmandi *et al.*, 2002). Mientras que el consumo de 90 UI de vitamina E/kg de dieta aumenta la tasa de aposición mineral de los huesos de la tibia y tarso de pollos (Xu *et al.*, 1995). En el estudio presente no se encontraron diferencias en la resistencia y contenido de cenizas de la tibia entre grupos suplementados con vitamina C, aun cuando se ha reportado un efecto benéfico del consumo de ésta en el contenido mineral del hueso (Franchini *et al.*, 1993; Orban *et al.*, 1993), densidad mineral ósea (Hall y Greendale, 1998; Morton *et al.*, 2001), fortaleza del hueso (Lohakare *et al.*, 2004), en la síntesis de procolágeno (Leeson y Summers, 2001) y de precolágeno, ya que influye la actividad de la enzima 25(OH)D₃-1-hidroxilasa, cuya función es la transformación de 25(OH)D₃ a 1,25(OH)₂D₃ (Lohakare *et al.*, 2005). En humanos la síntesis de 1,25(OH)₂D₃ se inhibe con concentraciones altas de vitamina C (1000 mg/día). Este efecto podría estar mediado por el Ca o por el efecto del ascorbato sobre la enzima 1- α -hidroxilasa (Cantatore, 1991), lo que explicaría la falta de efecto al consumo de vitamina C en la fortaleza y contenido de cenizas de la tibia del estudio presente. Debido a que las aves sintetizan su propia vitamina C en el riñón, la función de la suplementación de la vitamina no fue clara en la RTi y CCt.

Resistencia del tendón gastrocnemius (RTe)

La fortaleza del tendón *gastrocnemius* fue mayor con la interacción de los pollos suplementados con 1000 mg de vitamina C y sCAM, respecto a los no suplementados y sCAM. El tendón es responsable de transmitir fuerza del músculo al hueso y al hacerlo permite la locomoción y

mejora la estabilidad articular (Wang, 2006). Los tendones están formados de colágeno, proteoglicanos, glicoproteínas, agua y células, siendo el colágeno tipo I el componente más abundante del tendón. El tendón tiene una estructura jerárquica de unidades múltiples compuestas de moléculas de colágeno, fibrillas, haz de fibras, fascículos y unidades del tendón que corren paralelamente al eje longitudinal del tendón; este tipo de estructura proporciona la fuerza de tensión del tendón (Wang, 2006). El tendón cambia su metabolismo, así como sus propiedades mecánicas y estructurales en respuesta a fuerzas mecánicas. La capacidad del tendón para cambiar su estructura, en respuesta a una carga mecánica se atribuye a una adaptación mecánica del tejido (Wang, 2006). Se ha demostrado que incluso pocas alteraciones en la actividad física (ejercicio activo no forzado) incrementan la fortaleza del tendón calcáneo de pollos de 5 y 8 meses de edad (Nakagaki *et al.*, 2007). Benevides *et al.* (2004) encontraron que los tendones flexores digitales superficiales de pollos criados en corrales mostraron una mayor fortaleza a la tensión, soportando una mayor presión antes de su ruptura, que los tendones de pollos criados en jaulas. Foutz *et al.* (2007a) reportaron que un incremento en la actividad (caminar en una rueda de andar) no afectó la dureza, rigidez, comportamiento de relajación y resistencia a la ruptura del tendón *gastrocnemius* de pollos de 3-6 semanas de edad; mientras que la inmovilización de los pollos, (colocados en un arnés) redujo 10% la fortaleza estructural y 30% la dureza del tendón (Foutz *et al.*, 2007b). El ejercicio también provoca cambios bioquímicos en los tendones, eso incluye cambios en el contenido de colágena. Se ha reportado que los tendones flexores digitales superficiales de pollos de 60 días de edad criados en corrales mostraron concentraciones mayores de hidroxiprolina en las regiones proximal e intermedia, que los tendones de pollos criados en jaulas (Benevides *et al.*, 2004), pero no hubo efecto de la actividad en la cantidad de procolágena en el tendón *gastrocnemius* de pollos de engorda de 3-6 semanas de edad (Foutz *et al.*, 2007a). Nakagaki *et al.* (2007) observó un incremento en el contenido de glicaminoglicanos en las regiones de compresión del tendón calcáneo de pollos de 1,5 y 8 meses de edad criados en jaulas y un incremento progresivo de los cinco a los ocho meses en las aves en corral. Hanson *et al.* (1988) encontró que animales ejercitados con una rueda para andar por un periodo de 20-60 min/día durante 5 días provocó un incremento en la inmunoreactividad de IGF-I después de 3 a 5 días en el citoplasma de los fibroblastos del tendón y paratenon. Debido a que la inmunoreactividad de IGF-I de los fibroblastos del tendón calcáneo se correlacionan con la carga mecánica del tendón se ha propuesto que IGF-I puede tener

influencia trófica sobre las células del tendón y paratenon por medio de mecanismos autócrinos y parácrinos (Hanson *et al.*, 1988). El mecanismo por el cual las células detectan fuerzas mecánicas y las convierten en señales bioquímicas que finalmente llevan a adaptaciones fisiológicas del tejido o a cambios patológicos aun no es entendido completamente. Sin embargo el ejercicio también incrementa la generación de radicales libres de oxígeno y la peroxidación lipídica, lo cual puede resultar en daño a las células. El estrés oxidativo regula la síntesis de colágena y la actividad de las metaloproteinasas de la matriz de los fibroblastos (Siwik *et al.*, 2001). Algunos estudios han reportado que la suplementación de vitamina C reduce los síntomas del estrés oxidativo producido por el ejercicio (Kaminski y Boal, 1992; Jakeman y Maxwell, 1993). Se ha reportado que inyectar 150 mg de vitamina C acelera la curación del tendón de Aquiles en ratas, producto de una angiogénesis temprana y un incremento en la síntesis de colágeno tipo I (Ömeroğlu *et al.*, 2009). Por lo anterior, probablemente el efecto principal de la vitamina C en la fortaleza del tendón es sobre la producción de colágeno tipo I. No hay estudios realizados sobre el efecto mutuo de la vitamina C y el ejercicio sobre la fortaleza del tendón.

La vitamina E (40 mg) mejoró la resistencia del tendón, pero solo en aves suplementadas con 1000 mg de vitamina C, al compararlas con las no suplementadas (interacción VExVC). La forma en que la vitamina E afecta el tendón ha sido poco estudiada, pero se ha reportado que restaura parcialmente la síntesis de colágeno en cultivos primarios de condrocitos epifisiales de aves (Watkins *et al.*, 1996) e incrementa el contenido de hidroxiprolina hepática en conejos (Ömer *et al.*, 1989), además de promover la proliferación de fibroblastos y la secreción de fibrillas de colágeno nuevo (Gonzales-Santander *et al.*, 1996). Estudios en conejos indican un efecto positivo significativo del ácido ascórbico y α -tocoferol en las propiedades estructurales de la fibrillas del colágeno y la curación del tendón. Sin embargo la combinación de ambas vitaminas no mostraron un efecto sinérgico en la curación del tendón, incluso disminuyó el efecto de manera significativa (Sarrafzadeh *et al.*, 2010). Se ha observado que en animales alimentados con concentraciones de vitamina E marginalmente adecuadas, la suplementación de ácido ascórbico en dosis grandes parece promover la peroxidación lipídica (Cheng, 1989). Un incremento del nivel de suplementación de vitamina E contrarresta el efecto prooxidante de dosis altas de ácido ascórbico (Chen, 1989).

Latencia a postrarse (LAP)

La suplementación de 80 mg de vitamina E y 1000 mg de VC mejoró LAP en comparación con los demás tratamientos (interacción VE x VC). Las aves suplementadas con 40 mg de VE y que no consumieron VC mostraron mayor tiempo de LAP que el grupo suplementado con 40 mg de VE + 1000 mg de VC. Lo anterior nos sugiere que las concentraciones altas de VC combinadas con concentraciones moderadas de VE tienen un efecto negativo en la salud de las patas de los pollos. Estos resultados indican que la suplementación de 80 mg de VE/kg de dieta y concentraciones altas de vitamina C puede mejorar la salud de las patas en las aves.

Al d 42 no se observó pollos de pie en relación a los 21 y 35 d de edad (Figura 4). Una de las formas de medir la salud de las patas en aves es el método de latencia a postrarse, el cual específicamente mide la severidad de la cojera (Weeks *et al.*, 2002). Las causas posibles de la cojera en pollos de engorda son varias. La cojera en los genotipos de pollos de engorda actuales están ligados a varias anomalías en el esqueleto (Kestin *et al.*, 2001). Se ha reportado que la causa principal de la cojera en aves de edades diferentes (54 y 81 días), es el peso vivo (Kestin *et al.*, 2001). En efecto se ha visto una correlación positiva entre el grado de cojera y el peso vivo de 0.5 (Sorensen *et al.*, 1999; Su *et al.*, 1999). Se ha demostrado que fotoperiodos cortos (8 y 16 h) en pollos de engorda Ross afectan la habilidad para caminar y la presencia de discondroplasia tibial, pero estos efectos son principalmente resultado de un cambio en el peso corporal (Sorensen *et al.*, 1999). Su *et al.* (1999) concluyeron que la restricción alimenticia temprana redujo la debilidad de patas, y que esto se debió principalmente a una reducción en el peso corporal de las aves.

Asimetría fluctuante relativa (AFI)

La asimetría del largo de tarso disminuyó en aves suplementadas con 80 mg de VE, comparada con aves alimentadas con 40 mg de VE; mientras que la asimetría de la anchura fue mayor en aves que consumieron 80 mg de VE y sCAM comparadas con las suplementadas con 40 mg de VE y sCAM (interacción sCAM x VE). La vitamina E y el ácido ascórbico son nutrimentos que se usan para prevenir el estrés oxidativo de los animales (Whitehead y Keller, 2003, Combs, 2008). Contrario a los resultados de este estudio, se ha reportado que gallinas de 336 días de

edad alimentadas con 10 o 300 UI de vitamina E no mostraron diferencias en asimetrías relativas de largo y ancho del hueso de la tibia y tarso (Siegel *et al.*, 2001). Mientras que un aumento en la actividad de las aves mediante el uso de luces en movimiento y colocación al azar de trigo entero en la cama (Bizeray *et al.*, 2002a); uso de perchas (Ventura *et al.*, 2010); suministro de música clásica, uso de cuerdas de plástico de colores y colocación de granos de cebada en el piso (Dávila *et al.*, 2011) ha mostrado éxitos limitados en mejorar la asimetría fluctuante de las patas de las aves. En este estudio la VC no afectó las variables estudiadas. Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Prieto y Campo (2010) quienes no encontraron diferencias en la asimetría fluctuante de largo del dedo medio, largo de pata, ancho de ala, ancho de pata y asimetría combinada de pollos de 42 d de edad suplementados con 1000 mg de vitamina C y en condiciones de estrés calórico, y la asimetría de las aves en estrés calórico, pero no suplementadas con vitamina C.

Uno de los factores responsables del desarrollo asimétrico del hueso tarso-metatarso es su ganancia alta de peso y la prevalencia de este problema está influenciado por el peso corporal (Sanotra *et al.*, 2001). En efecto, los pollos suplementado con 80 mg de VE tuvieron un peso vivo mayor, al compararlas con las aves suplementadas con 40 mg de VE. Los procesos exactos a través de los cuales se produce el crecimiento asimétrico aún se desconocen (ver Polak, 2003).

Necrosis y epifisiolisis (NCF y ECF)

Aunque hay información limitada de los cambios en las características del hueso de los pollos de engorda, se ha observado que la densidad ósea y la resistencia del hueso en gallinas con osteoporosis y sin osteoporosis aumentó con la edad (McCoy *et al.*, 1996). Mientras que Danielsen *et al.* (1992) demostraron que en ratas machos la edad se relaciona con un incremento en la masa ósea, en el área de la sección transversal y en el espesor de la pared de la diáfisis femoral. Los análisis estructurales mostraron que esos cambios fueron resultado de la formación de hueso periosteal. Se sabe que los factores de riesgo principales asociados con alteración de la locomoción y la salud mala de las patas de los pollos de engorda están relacionados con la ganancia de peso (Knowles *et al.*, 2008). Kestin *et al.* (2001) encontraron que los pollos de 81 d de edad mostraron menor capacidad para caminar que los pollos de 54 d y reportaron que este efecto depende de la ganancia de peso y el peso vivo de las aves. Los resultados de este estudio

indicaron que las aves de 42 d de edad mostraron más casos de necrosis y de epifisiolisis femoral, en comparación a los grupos de 35 y 21 d de edad, lo que se debe probablemente al peso mayor de las aves de más edad en comparación con los animales jóvenes. Aunque se ha reportado que la suplementación con ácido ascórbico mejora la característica del hueso (Franchini *et al.*, 1993; Orban *et al.*, 1993; Hall y Greendale, 1998; Morton *et al.*, 2001; Lohakare *et al.*, 2004), en este estudio el consumo de vitamina C no tuvo efecto sobre la necrosis o la epifisiolisis del fémur. Estos Hallazgos son soportados por lo reportado por Yildiz *et al.* (2009) quienes no encontraron diferencias en la prevalencia de discondroplasia tibial en pollos de 42 d de edad suplementados con 0, 200 y 400 mg de vitamina C/litro de agua. Sin embargo, también se ha observado que la suplementación de 150 mg de ácido ascórbico/litro de agua mejoró el grosor cortical de la unión tibiotarsal y disminuyó la incidencia de discondroplasia tibial (Petek *et al.*, 2005). Lo anterior sugiere que aún no es clara la cantidad de vitamina C necesaria en la dieta para mejorar la salud de las patas en los pollos. Aunque se ha visto que pollos que consumen 90 UI de vitamina E/ kg de alimento mejoran la placa del crecimiento del cartílago de la epífisis y la zona inferior del condrocito hipertrófico, respecto a los que consumen 30 UI /kg de alimento (Xu *et al.*, 1995), en este estudio la vitamina E no afectó la prevalencia de las lesiones de la cabeza femoral, por lo que se requieren más estudios al respecto. No hubo diferencias en alguna de las categorías de diagnóstico por efecto del ejercicio.

Sustancias reactivas a ácido tiobarbutirico (TBARS)

La interacción entre el ejercicio y VC, mostró diferencias en MDA en aves cCAM por nivel de vitamina C, mostrándose valores menores con 1000 mg al compararlos con el grupo sin suplementar, lo que indica claramente el efecto antioxidante de la vitamina C. Sin embargo las aves sCAM exhibieron valores mayores en el contenido de Malondiadehido cuando consumieron 1000 mg de la VC, respecto a los no suplementados (interacción sCAM x VC). Este último efecto probablemente se debe a la acción pro-oxidante de la vitamina C. Aunque se sabe que la función pro-oxidante del ácido ascórbico requiere de la presencia iones metales de transición como el cobre y el hierro (Retsky *et al.*, 1993), esto es cuestionable, ya que la mayoría de los metales de transición existen de forma inactiva en las proteínas, incluyendo transferrina, lactoferrinas, proteínas hemo, ferritina o hemosiderina (Young y Woodside, 2001). Se ha indicado que bajo circunstancias normales, en individuos sanos el hierro ligado a la ferritina o

transferrina no está disponible para impulsar la producción de radicales hidroxilo (Guttridge *et al.*, 1994). Sin embargo, la transferrina libera su hierro en un pH ácido, particularmente en presencia de agentes quelatantes (Aruoma y Halliwell, 1987). Por lo anterior, los hallazgos de este estudio, quizá se deben a una disminución en los valores de pH corporal en las aves sCAM provocado por un factor estresante diferente al ejercicio que produjo la liberación de los iones metálicos secuestrados en las proteínas, permitiendo la acción pro-oxidante de la vitamina C.

Peso vivo, rendimiento y color de canal (PVRCC)

Se observó que el peso corporal fue mayor en los pollos suplementados con 80 mg de vitamina E en comparación con las aves que consumieron 40 mg. Estos resultados coinciden con los reportados por Abdulakalykova y Ruiz-Feria (2006), quienes encontraron que los pollos suplementados con 80 mg de vitamina E pesaron más que las aves alimentadas con 40 mg a las semanas 3, 4, 5 y 6 de edad; similarmente Chae *et al.*, (2006) reportaron que los pollos alimentados con 100 ó 200 mg de vitamina E /kg de dieta, mostraron mayor ganancia de peso que el grupo testigo. En contraste, otros investigadores no han encontrado efecto del consumo de vitamina E en el peso corporal (Coetzee y Hoffman, 2001; Niu *et al.*, 2009; Kuttapan *et al.*, 2012). Se ha observado que concentraciones altas de acetato de α - tocoferol (200 UI/kg de alimento) mejoran el peso y mitigan el estrés oxidativo provocado por una inyección de dexametasona en pollos de engorda (Gao *et al.*, 2010); por lo que se ha sugerido que el efecto favorable de las concentraciones altas de vitamina E en los pollos, se debe a que contrarresta el estrés oxidativo (Chae *et al.*, 2006). En el presente estudio se indujo a caminar la mitad de los pollos a partir del día 7 de edad, por lo que el estrés inducido por la actividad física pudo provocar un incremento en la peroxidación lipídica, por lo que se sugiere que la adición de 80 mg pudo incrementar la estabilidad oxidativa, lo que puede explicar las diferencias en el peso de los pollos entre las concentraciones de suplementación de vitamina E.

El peso de los pollos suplementados con vitamina C fue similar a los no suplementados, excepto al d 28. Estos resultados concuerdan con Pardue *et al.* (1985) quienes no encontraron diferencias en peso de pollos suplementados con 0, 250, 500 y 1000 ppm de vitamina C. Contrario a estos resultados, Lahakare *et al.* (2005) reportaron que pollos suplementados con 200 mg de vitamina C mostraron una mayor ganancia de peso que el grupo no suplementado. La razón de los

resultados en el estudio presentes no es clara, pero se sabe que la vitamina C está involucrada en el crecimiento ya que es cofactor en la síntesis de carnitina, promueve la síntesis de colágeno, transporta electrones en la célula y secuestra radicales libres (Combs, 2008); además, reduce el daño oxidativo de los aminoácidos (Carr y Frei, 1999) e interviene en el metabolismo del calcio y de la vitamina D (Lahakare *et al.*, 2005) y en el metabolismo de vitamina E (Combs, 2008). En este estudio, el ejercicio no afectó el peso vivo. Estos resultados concuerdan con los de Balog *et al.*, (1997) quienes reportaron que el uso de señuelos de pesca de metal brillantes para incrementar la actividad no tuvieron efecto significativo en el peso de los pollos; de manera similar otros investigadores han reportado que incrementar la actividad debido a programas de luz intermitentes o cambios en la complejidad del ambiente no afectan el peso de los pollos de engorda (Bizeray *et al.*, 2002a; Rahimi *et al.*, 2005). Por lo tanto, sugerimos que incrementar el ejercicio en pollos de engorda, como inducirlos a caminar 30.5 m diariamente, no aumentan los requerimientos de energía para afectar negativamente el peso vivo.

Las aves cCAM y suplementadas con 1000 mg de VC mostraron un rendimiento de la canal fría mayor, respecto a las que no consumieron VC y cCAM (interacción cCAM x VC). Se sabe que los músculos se hacen más grandes y fuertes durante el crecimiento y en respuesta al aumento de carga. Al respecto Kirkendall *et al.* (1998) reportaron que el entrenamiento de fondo en humanos puede mejorar la capacidad aeróbica de músculo y el entrenamiento de resistencia incrementa la masa muscular. Estudios en pollos jóvenes demuestran que el patrón de actividad influye en la diferenciación del tipo de fibra en los músculos de contracción rápida y lenta (Khaskiye *et al.*, 1987). Se ha visto que el ejercicio aeróbico como el ejercicio de resistencia aumentan la síntesis proteica del músculo y la biogénesis mitocondrial, al parecer a través de incrementar la eficiencia del ADN mitocondrial del músculo (Nair, 2005). Un incremento en el tamaño del músculo por acondicionamiento fuerte es en gran parte el resultado de proteínas contráctiles incrementadas (Evans, 2004) Adicionalmente, después del ejercicio se produce un aumento en la síntesis proteica de todo el cuerpo en tejidos de músculos no ejercitados (Devlin *et al.*, 1990). Aunque el ejercicio también puede estimular la ruptura de la proteína del músculo, esto no provoca una reducción significativa en la masa muscular, debido a que la síntesis proteica del músculo se estimula en la recuperación (Carraro *et al.*, 1990). Por lo que una explicación posible de un mayor rendimiento de canal fría de pollos tratados con 1000 mg de VC

y cCAM en comparación con los no suplementados con VC y cCAM, es que el consumo de vitamina C promovió la recuperación muscular después del ejercicio en las aves, al proteger las células contra el daño oxidativo causado por las especies reactivas al oxígeno; ya sea por la prevención de la mutación de ADN inducida por la oxidación (Lutsenko et al., 2002), protección de las lipoproteínas de baja densidad contra el daño peroxidativo (Kimura et al., 1992) y/o la reparación de residuos de aminoácidos oxidados (Hoey y Butler, 1984). Mientras que la inducción a caminar en los pollos no suplementados, al parecer contrarrestó el proceso de recuperación muscular por un incremento en la generación en los radicales libres de oxígeno y peroxidación lipídica (Evans, 2000). Aunque también se ha reportado que canales de pollos sumergidas en agua fría 1 h postmortem absorben 11.7% de humedad (Young y Smith, 2004). Mientras que Huezo et al., (2007) encontraron que las canales de pollos sumergidas en agua fría durante 50 minutos absorbieron en promedio 9.3% de agua. Estos hallazgos pueden explicar la razón de que la interacción inducción a caminar y vitamina C mejoró el rendimiento de la canal fría, pero no se encontró efecto de la inducción a caminar y de la vitaminas E y C, en la canal caliente. El nivel de vitamina E no mostró efecto en el rendimiento de la canal fría. Los niveles de vitaminas E, C o actividad no afectaron los rendimientos de la canal caliente, pechuga, muslos, alas, pierna o grasa abdominal.

Las aves sCAM mostraron mayores índices de amarillo (b^*) en pechuga y muslo, comparados con el grupo cCAM. Los valores mayores de b^* son característicos de una carne PSE (pálida, suave y exudativa). Mientras que incrementos en vitamina E afectaron los índices de rojo en pechuga, favoreciendo al grupo que consumió 80 mg de vitamina, comparado con los pollos suplementados con 40 mg. Esto significa que la estabilidad del color se mejoró por la inducción a caminar y la adición en la dieta de vitamina E como un agente antioxidante. La vitamina C no afectó las características del color; por lo que cambios en el nivel de suplementación de esta vitamina no están relacionados con modificaciones en la luminosidad y cromaticidad de la carne. No se encontró efecto de la inducción a caminar, vitaminas E y C en la luminosidad de la carne.

7. CONCLUSIONES

La inducción a caminar (cCAM) mejoró la resistencia y contenido de cenizas de la tibia.

La resistencia del tendón *gastrocnemius* mejoró por la interacción de las vitamina E y C, y por la interacción de la vitamina C y sin inducción a caminar de las aves.

La latencia a postrarse de las aves mejoró por la interacción de 80 mg de vitamina E x 1000 mg de vitamina C; además, las aves permanecieron menos tiempo paradas por efecto de la edad.

La asimetría fluctuante relativa del tarso (longitud) disminuyó en las aves suplementadas con 80 mg de vitamina E, sin embargo el ancho del tarso fue mayor en las aves que consumieron 80 mg de vitamina E y sCAM.

La necrosis y epifisiolisis de la cabeza del fémur no se afectaron por los tratamientos evaluados, pero fueron afectados por la edad.

El peso vivo mejoró por la inclusión de 80 mg de vitamina E en la dieta, pero la vitamina C y la inducción a caminar no tuvieron efecto.

Las concentraciones de MDA se redujeron con la suplementación de vitamina C y cCAM, e incrementaron con la vitamina C y sCAM.

El rendimiento de la canal fría mejoró con la suplementación de vitamina C y cCAM.

En aves del grupo cCAM disminuyó el índice de amarillo de pechuga y muslo, y aumentó el índice de rojo en muslo.

El consumo de 80 mg de vitamina E mejoró el índice de rojo en pechuga.

8. LITERATURA CITADA

- Abdukalykova, S. and C.A. Ruiz Feria. 2006. Arginine and vitamin E improve the cellular and humoral immune response of broiler chickens. *Int. J. Poult. Sci.*, 5(5):121-127.
- Aburto, A., and W.M. Britton. 1998. Effects and interactions of dietary levels of vitamins A and E and cholecalciferol in broiler chickens. *Poult. Sci.*, 77(5):666-673.
- Arjmandi, B., Juma, S., Beharka, A., Bapna, M., Akhter, M. and S. Meydani. 2002. Vitamin E improves bone quality in the aged but not in young adult male mice. *J. Nutr. Biochem.*, 13(9):543.
- Aruoma, O.I. and B. Halliwell. 1987. Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. *Biochem. J.* 241:273–278.
- Balog, J.M., Bayyari, G.R., Rath, N.C., Huff, W.E. and N.B. Anthony. 1997. Effect of intermittent activity on broiler production parameters. *Poult. Sci.*, 76(1):6-12.
- Bartov, I. 1998. Moderate excess of dietary vitamin E does not exacerbate cholecalciferol deficiency in young broiler chicks. *Br. Poult. Sci.*, 38(4):442-444.
- Benevides, G., Pimentel, E., Toyama, M., Novello, J.C., Marangoni, S. and L. Gomes. 2004. Biochemical and biomechanical analysis of tendons of caged and penned chickens. *Connect. Tissue Res.*, 45(4-5):206-215.
- Berg, C. and G.S. Sanotra. 2003. Can a modified latency- to- lie test be used to validate gait-scoring results in commercial broiler flocks?. *Anim. Welf.*, 12:655-659.
- Bizeray, D., Estevez, I., Leterrier, C. and J.M. Faure. 2002a. Influence of increased environmental complexity on leg condition, performance, and level of fearfulness in broilers. *Poult. Sci.*, 81(6):767-773.
- Bizeray, D., Leterrier, C., Constantin, P., Picard, M., and J.M. Faure. 2002b. Sequential feeding can increase activity and improve gait score in meat-type chickens. *Poult. Sci.*, 81(12):1798-1806.
- Buyse, J., Simons, P.C.M., Boshouwers, F.M.G. and E. Decuypere. 1996. Effect of intermittent lighting, light intensity and source on the performance and welfare of broilers. *W. Poult. Sci. J.*, 52:121-130.
- Cantatore, F.P., Loperfido, M.C., Magli, D.M., Mancini, L., and M. Carrozzo. 1991. The importance of vitamin C for hydroxylation of vitamin D3 to 1,25(OH)2D3 in man. *Clin. Rheumatol.*, 10(2):162-167.

- Carr, A.C. and B. Frei. 1999. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 69(6):1086-1107.
- Carraro, F., Stuart, C.A., Hartl, W.H., Rosenblatt, J. and R.R. Wolfe. 1990. Effect of exercise and recovery on muscle protein synthesis in human subjects. *Am. J. Physiol.*, 259(4 Pt 1):E470-E476.
- Chae, B. J., Lohakare, J. D. and J.Y. Choi. 2006: Effects of incremental levels of alpha - tocopherol acetate on performance, nutrient digestibility and meat quality of commercial broilers. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 19(2): 203-208.
- Chen, L.H. 1989. Interaction of vitamin E and ascorbic acid (review). *In Vivo*, 3(3):199-209.
- CIE (Comission International de l'Eclairage). 1986. *Colorimetry*, 2da. Ed. Viena. 82 p.
- Cobb Vantress. 2012. Cobb500 broiler performance and nutrition supplement. Cobb-Vantress, Siloam Springs, AR, USA.
- Coetzee, G. J. M. and L.C. Hoffman . 2001. Effect of dietary vitamin E on the performance of broilers and quality of broiler meat during refrigerated and frozen storage. *S. Afr. J. Anim. Sci.*, 31:158–173.
- Colnago, G. L., L. S. Jensen, and P. L. Long. 1984. Effect of selenium and vitamin E on development of immunity to coccidiosis in chickens. *Poult. Sci.* 63:1136-1143.
- Combs, Jr., G. F. 2008. *The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health*. 3rd ed. Elsevier Acad. Press, Philadelphia, PA.
- Danielsen, C.C., Mosekilde, L. and T.T. Andreassen. 1992. Long-term effect of orchidectomy on cortical bone from rat femur: bone mass and mechanical properties. *Calcif. Tissue Int.*, 50(2):169-174.
- Dávila, S.G., Campo, J.L., Gil, M.G., Prieto, M.T. and O. Torres. 2011. Effects of auditory and physical enrichment on 3 measurements of fear and stress (tonic immobility duration, heterophil to lymphocyte ratio, and fluctuating asymmetry) in several breeds of layer chicks. *Poult. Sci.*, 90(11):2459-2466.
- Devlin, J.T., Brodsky, I., Scrimgeour, A., Fuller, S. and D.M. Bier. 1990. Amino acid metabolism after intense exercise. *Am. J. Physiol.*, 258(2 Pt. 1):E249-E255.
- Dingboom, E.G. and W.A. Weijs. 2004. The effect of growth and exercise on muscle characteristics in relation to meat quality. Pages 83–95 in *Muscle Development of Livestock Animals. Physiology, Genetics and Meat Quality*. M. F. W. Te Pas, M. E. Everts, and H. P. Haagsman, ed. CABI Publishing, Wallingford, UK.

- Evans, W.J. 2004. Protein nutrition, exercise and aging. *J. Am. Coll. Nutr.*, 23(6 Suppl.):601S-609S.
- Evans, W.J. 2000. Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am. J. Clin. Nutr.*, 72(2 Suppl.):647S-652S.
- Farm Animal Welfare Council (1992) Report on the Welfare of Broiler Chickens: PB 0910. Tolworth, UK: FAWC
- Farquharson, C., Berry, J.L., Mawer, E.B., Seawright, E., and C.C. Whitehead. 1998. Ascorbic acid-induced chondrocyte terminal differentiation: the role of the extracellular matrix and 1,25 dihydroxyvitamin D. *Eur. J. Cell Biol.*, 76(2):110-118.
- Feresin, R.G., Johnson, S.A., Elam, M.L., Kim, J.S., Khalil, D.A., Lucas, E.A., Smith, B.J., Payton, M.E., Akhter, M.P. and B.H. Arjmandi. 2013. Effects of vitamin e on bone biomechanical and histomorphometric parameters in ovariectomized rats. *J. Osteoporos.*, 2013:825985.
- Finno, C.J. and S.J. Valberg. 2012. A comparative review of vitamin E and associated equine disorders. *J. Vet. Intern Med.*, 26(6):1251-1266.
- Foutz, T.L., Griffin, A.K., Halper, J.T. and G.N. Rowland. 2007a. Effects of activity on avian gastrocnemius tendon. *Poult. Sci.*, 86(2):211-218.
- Foutz, T., Ratterman, A. and J. Halper. 2007b. Effects of immobilization on the biomechanical properties of the broiler tibia and gastrocnemius tendon. *Poult. Sci.*, 86(5):931-936.
- Franchini, A., Meluzzi, A., Manfreda, G. and C. Tosurelli. 1993. Effects of vitamin C on broiler skeleton development. *Attidell'Assoc. Sci. Prod. Anim.*, 10:451-524.
- Gao, J., Lin, H., Wang, X.J., Song, Z.G. and H.C. Jiao. 2010. Vitamin E supplementation alleviates the oxidative stress induced by dexamethasone treatment and improves meat quality in broiler chickens. *Poult. Sci.*, 89(2):318-327.
- Garrett, I.R., Boyce, B.F., Oreffo, R.O., Bonewald, L., Poser, J., and G.R. Mundy. 1990. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.*, 85(3):632-639.
- González Santander, R., Plasencia Arriba, M.A., Martínez Cuadrado, G., González-Santander Martínez, M. and M. Monteagudo de la Rosa. 1996. Effects of "in situ" vitamin E on fibroblast differentiation and on collagen fibril development in the regenerating tendon. *Int. J. Dev. Biol., Suppl.* 1:181S-182S.
- Gutteridge, J.C., Quinlan, G.J. and T.W. Evans. 1994. Transient iron overload with bleomycin detectable iron in the plasma of patients with adult respiratory distress syndrome. *Thorax*, 49:707-710.

- Hall, S.L. and G.A. Greendale. 1998. The relation of dietary vitamin C intake to bone mineral density: results from the PEPI study. *Calcif. Tissue Int.*, 63(3):183-189.
- Hansson, H.A., Engström, A.M., Holm, S. and A.L. Rosenqvist. 1988. Somatomedin C immunoreactivity in the Achilles tendon varies in a dynamic manner with the mechanical load. *Acta Physiol. Scand.*, 134(2):199-208.
- Hoey, B.M. and J. Butler. 1984. The repair of oxidized amino acids by antioxidants. *Biochim. Biophys. Acta*, 791(2):212-218.
- Hueso, R., Smith, D.P., Northcutt, J.K. and D.L. Fletcher. 2007. Effect of immersion or dry air chilling on broiler carcass moisture retention and breast filled functionality. *J. Appl. Poult. Res.*, 16:438-497.
- Jakeman, P. and S. Maxwell. 1993. Effect of antioxidant vitamin supplementation on muscle function after eccentric exercise. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.*, 67(5):426-430.
- Julian, R.J. 1995. Population dynamics and diseases of poultry. In: Hunton, P. (Ed.), *Poult. Prod. World Anim. Sci.*, C9. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 525–560.
- Kaminski, M. and R. Boal. 1992. An effect of ascorbic acid on delayed-onset muscle soreness. *Pain*, 50(3):317-321.
- Kaplan, E.L. and P. Meier. 1958. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.*, 53 (282): 457-481.
- Kestin, S.C., Gordon, S., Su, G. and P. Sørensen. 2001. Relationships in broiler chickens between lameness, liveweight, growth rate and age. *Vet. Rec.*, 148(7):195-197.
- Khaskiye, A., Renaud, D. and G. Le Douarin. 1987. Effects of electrical stimulation upon post-hatching development of fibre types in normally innervated fast and slow latissimus dorsi muscles of the chicken. *Biol. Cell.*, 61(3):163-170.
- Kimura, H., Yamada, Y., Morita, Y., Ikeda, H. and T. Matsuo. 1992. Dietary ascorbic acid depresses plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation in genetically scorbutic rats. *J. Nutr.*, 122(9):1904-1909.
- Kirkendall, D.T. and W.E. Jr. Garrett. 1998. The effects of aging and training on skeletal muscle. *Am. J. Sports Med.*, 26(4):598-602.
- Knowles, T.G., Kestin, S.C., Haslam, S.M., Brown, S.N., Green, L.E., Butterworth, A., Pope, S.J., Pfeiffer, D. and C.J. Nicol. 2008. Leg disorders in broiler chickens: prevalence, risk factors and prevention. *PLoS One*, 3(2):e1545.

- Kuttappan, V.A., Goodgame, S.D., Bradley, C.D., Mauromoustakos, A., Hargis, B.M., Waldroup, P.W. and C.M. Owens. 2012. Effect of different levels of dietary vitamin E (DL- α -tocopherol acetate) on the occurrence of various degrees of white striping on broiler breast fillets. *Poult. Sci.*, 91(12):3230-3235.
- Leeson, S., and J. D. Summers. 2001. *Scott's Nutrition of the Chicken*. 4th ed. University Books, Guelph, Ontario, Canada.
- Lohakare, J. D., Chae B.J. and T. W. Hahn. 2004. Effects of feeding methods (water vs. feed) of vitamin C on growth performance and carcass characteristics in broiler chickens. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 17:1112-1117.
- Lohakare, J. D., Kim, J. K., Ryu, M. H., Hahn, T. W. and B.J. Chae. 2005. Effects of vitamin C and vitamin D interaction on the performance, immunity, and bone characteristics of commercial broilers. *J. Appl. Poult. Res.*, 14(4): 670-678.
- Lutsenko, E.A., Cárcamo, J.M. and D.W. Golde. 2002. Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, 277(19):16895-16899.
- March, B.E., Wong, E., Seier, L., Sim, J., and J. Biely. 1973. Hypervitaminosis E in the chick. *J. Nutr.*, 103(3):371-377.
- Matsumoto, H., Silverton, S.F., Debolt, K., and I.M. Sahpiro. 1991. Superoxide dismutase and catalase activities in the growth cartilage: relationship between oxidoreductase activity and chondrocyte maturation. *J. Bone Miner. Res.*, 6(6):569-574.
- McCoy, M.A., Reilly, G.A. and D.J. Kilpatrick. 1996. Density and breaking strength of bones of mortalities among caged layers. *Res. Vet. Sci.*, 60(2):185-186.
- Moller, A. P. and J. P. Swaddle. 1997. *Asymmetry, developmental stability and evolution*. Oxford University Press. Oxford, U.K. (in press).
- Morton, D.J., Barrett-Connor, E.L. and D.L. Schneider. 2001. Vitamin C supplement use and bone mineral density in postmenopausal women. *J. Bone Miner. Res.*, 16(1):135-140.
- Murphy, T.P., Wright, K.E., and W.J. Pudalkiewicz. 1981. An apparent rachitogenic effect of excessive vitamin E intakes in the chick. *Poult. Sci.*, 60(8):1873-1878.
- Nair, K.S. 2005. Aging muscle. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81(5):953-963.
- Nakagaki, W.R., Biancalana, A., Benevides, G.P. and L. Gomes. 2007. Biomechanical and biochemical properties of chicken calcaneal tendon under effect of age and nonforced active exercise. *Connect. Tissue Res.*, 48(5):219-228.
- Newberry, R.C., Hunt, J.R. and E.E. Gardiner. 1988. Influence of light intensity on behavior and performance of broiler chickens. *Poult. Sci.*, 67(7):1020-1025.

- Niu, Z.Y., Liu, F.Z., Yan, Q.L. and W.C. Li. 2009. Effects of different levels of vitamin E on growth performance and immune responses of broilers under heat stress. *Poult. Sci.*, 88(10):2101-2107.
- National Research Council, 1994. *Nutrient Requirements of Poultry*. 9th Rev. Ed. National Academy Press, Washington, DC.
- Omer, B., Oner, P., Eryürek, F., Sürmen, E. and T. Altuğ. 1989. Influence of eicosapentaenoic acid and vitamin E on hepatic hydroxyproline content in rabbits fed cholesterol-rich diet. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 59(4):396-400.
- Omeroğlu, S., Peker, T., Türközkan, N. and H. Omeroğlu. 2009. High-dose vitamin C supplementation accelerates the Achilles tendon healing in healthy rats. *Arch. Orthop. Trauma Surg.*, 129(2):281-286.
- Orban, J.I., Roland, D.A. Sr., Cummins. K. and R.T. Lovell. 1993. Influence of large doses of ascorbic acid on performance, plasma calcium, bone characteristics, and eggshell quality in broilers and Leghorn hens. *Poult. Sci.*, 72(4):691-700.
- Oviedo-Rondon E. O. 2007. Predisposing factors that affect walking ability in turkeys and broilers. In 34th Annu. Carolina Poult. Nutr. Conf., Research Triangle Park, NC. Available in: <http://www.thepoultrysite.com/articles/1323/predisposing-factors-that-affect-walking-ability-in-turkeys-and-broilers>. Accessed Sep 1, 2014.
- Oviedo-Rondon, E.O. 2009. Aspectos nutricionales que influyen sobre la incidencia de problemas de patas en pollos de engorde. En *Proceedings del XXV Curso de Especialización FEDNA*, Madrid, España. pp. 79-106.
- Pardue, S.L., Thaxton, J.P. and J. Brake. 1985. Influence of supplemental ascorbic acid on broiler performance following exposure to high environmental temperature. *Poult. Sci.*, 64(7):1334-1338.
- Petek, M., Sönmez, G., Yildiz, H. and H. Baspinar. 2005. Effects of different management factors on broiler performance and incidence of tibial dyschondroplasia. *Br. Poult. Sci.*, 46(1):16-21.
- Prieto, M.T. and J.L. Campo. 2010. Effect of heat and several additives related to stress levels on fluctuating asymmetry, heterophil:lymphocyte ratio, and tonic immobility duration in White Leghorn chicks. *Poult. Sci.*, 89(10):2071-2077.
- Polak, M., 2003. *Developmental Instability: Causes and Consequences*. Oxford University Press, New York, New York.
- Rahimi, G., Rezaei, M., Hafezian H. and H. Saiyahzadeh. 2005. The effect of intermittent lighting schedule on broiler performance. *Int. J. Poult. Sci.*, 4 (6): 396-398.

- Rath, N.C., Huff, G.R., Huff, W.E. and J.M. Balog. 2000. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. *Poult. Sci.*, 79(7):1024-1032.
- Reiter, K. and W. Bessei. 1998. Effect of locomotor activity on bone development and leg disorders in broilers. *Archiv Fuer Gefluegelkunde*, 62(6): 247-253.
- Reiter, K. and W. Bessei. 2009. Effect of locomotor activity on leg disorder in fattening chicken. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 122(7-8):264-270.
- Retsky, K.L., Freeman, M.W. and B. Frei. 1993. Ascorbic acid oxidation product(s) protect human low density lipoprotein against atherogenic modification. Anti- rather than prooxidant activity of vitamin C in the presence of transition metal ions. *J. Biol. Chem.*, 268(2):1304-1309.
- Riggs, B.L. and A.M. Parfitt. 2005. Drugs used to treat osteoporosis: the critical need for a uniform nomenclature based on their action on bone remodeling. *J. Bone Miner. Res.*, 20(2):177-184.
- Robling, A.G., Hinant, F.M., Burr, D.B. and C.H. Turner. 2002. Improved bone structure and strength after long-term mechanical loading is greatest if loading is separated into short bouts. *J. Bone Miner. Res.*, 17: 1545-1554.
- Ruiz-Feria, C.A., Arroyo-Villegas J.J., Pro-Martinez, A., Bautista-Ortega, J., Cortes-Cuevas, A., Narciso-Gaytan, C., Hernandez-Cazares, A. and J. Gallegos-Sanchez. 2014. Effects of distance and barriers between resources on bone and tendon strength and productive performance of broiler chickens. *Poult. Sci*93(7):1608-1617.
- Sanotra, G.S., Lund, J.D., Ersboll, A.K., Petersen, J.S. and K.S. Vestergaard. 2001. Monitoring leg problems in broilers: a survey of commercial broiler production in Denmark. *World Poult. Sci. J.*, 57: 55–69.
- Sarrafzadeh-Rezaei, F., Farshid, A.-A., Dalir-Naghadeh, B., Saifzadeh, S., Abbasnia, P. and S.-H. Jarolmasjed. 2010. Effects of ascorbic acid and α -tocopherol on collagen fibril stereological parameters in rabbits. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 54:377-382.
- SAS. 2002. SAS-STAT Software. Version 9.0. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Shipov, A., Sharir, A., Zelzer, E., Milgram, J., Monsonogo-Ornan, E. and R. Shahar. 2010. The influence of severe prolonged exercise restriction on the mechanical and structural properties of bone in an avian model. *Vet. J.*, 183(2):153-160.
- Shuid, A.N., Mehat, Z., Mohamed, N., Muhammad, N. and I.N. Soelaiman. 2010. Vitamin E exhibits bone anabolic actions in normal male rats. *J. Bone Miner. Metab.*, 28(2):149-156.

- Siegel, P.B., Price, S.E., Meldrum, B., Picard, M. and P.A. Geraert. 2001. Performance of pureline broiler breeders fed two levels of vitamin E. *Poult. Sci.*, 80(9):1258-1262.
- Singsen, E. P., R. H. Bunnell, L. D. Matterson, A. Kozeff, and E. L. Tingherr. 1955. Studies on encephalomalacia in the chick. *Poult., Sci.*, 34:262-271.
- Siwik, D.A., Pagano, P.J. and W.S. Colucci. 2001. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 280(1):C53-C60.
- Smith, D.P. and J.K. Northcutt. 2003. Red discoloration of fully cooked chicken products. *J. of Appl. Poult. Res.*, 12:515-521.
- Snedecor G.W. and W.G. Cochran. 1967. *Statistical Methods*. (6th Ed.). The Iowa State Univ.Press, Ames.
- Sørensen, P., Su, G. and S.C. Kestin. 1999. The effect of photoperiod:scotoperiod on leg weakness in broiler chickens. *Poult. Sci.*, 78(3):336-342.
- Staron, R.S. and R.S. Hikita. 2000. Muscular responses to exercise and training. Pages 163-173. In: Garrett W.E., Kirkendall, D.T., (Ed). *Exercise and Sport Sci.*, USA.
- Su, G., Sørensen, P. and S.C. Kestin. 1999. Meal feeding is more effective than early feed restriction at reducing the prevalence of leg weakness in broiler chickens. *Poult. Sci.*, 78(7):949-955.
- Summers, J.D., Shen, H., Leeson, S., and R.J. Julian. 1984. Influence of vitamin deficiency and level of dietary protein on the incidence of leg problems in broiler chicks. *Poult. Sci.*, 63(6):1115-1121.
- Talaty, P.N., Katanbaf, M.N., and P.Y. Hester. 2010. Bone mineralization in male commercial broilers and its relationship to gait score. *Poult. Sci.*, 89(2):342-348.
- Turner, C.H. and A.G. Robling. 2005. Exercises for improving bone strength. *Br. J. Sports Med.*, 39(4):188-189.
- Ventura, B.A., Siewerdt, F. and I. Estevez. 2010. Effects of barrier perches and density on broiler leg health, fear, and performance. *Poult. Sci.*, 89(8):1574-1583.
- Viru A. 1987. Mobilisation of structural proteins during exercise. *Sports Med.*, 4(2):95-128.
- Wang, J.H. 2006. Mechanobiology of tendon. *J. Biomech.*, 39(9):1563-1582.
- Watkins, B.A., Xu, H. and J.J. Turek. 1996. Linoleate impairs collagen synthesis in primary cultures of avian chondrocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 212(2):153-159.

- Weeks, C.A., Knowles, T.G., Gordon, R.G., Kerr, A.E., Peyton, S.T. and N.T Tilbrook. 2002. New method for objectively assessing lameness in broiler chickens. *Veterinary Record*, 151 (25):762-764.
- Whitehead, C.C. and T. Keller. 2003. An update on ascorbic acid in poultry. *World Poult. Sci. J.*, 59: 161-184.
- Xu, H., Watkins, B.A. and M.F. Seifert. 1995. Vitamin E stimulates trabecular bone formation and alters epiphyseal cartilage morphometry. *Calcif. Tissue Int.*, 57(4):293-300.
- Yildiz, H., Petek, M., Sönmez, G., Arican, I., and B. Yilmaz. 2009. Effects of lighting schedule and ascorbic acid on performance and tibiotarsus bone characteristics in broilers. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 33(6): 469-476.
- Young, L.L. and D.P. Smith. 2004. Moisture retention by water and air-chilled chicken broilers during processing and cutup operations. *Poult. Sci.*, 83: 119-122.
- Young, I.S. and J.V. Woodside. 2001. Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.*, 54(3):176-186.
- Zhao, J.P., Chen, J.L., Zhao, G.P., Zheng, M.Q., Jiang, R.R., and J. Wen. 2009. Live performance, carcass composition, and blood metabolite responses to dietary nutrient density in two distinct broiler breeds of male chickens. *Poult. Sci.*, 88(12):2575-2584.