

**Evaluación de la heterogeneidad en la
población de células madres miogénicas y la
morfometría de las fibras musculares en
pollos de engorde**

**Jeanine Auxiliadora Arana Cordonero
Allan Josué Calderón Jiménez**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2017

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Evaluación de la heterogeneidad en la población de células madres miogénicas y la morfometría de las fibras musculares en pollos de engorde

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingenieros Agrónomos en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Jeanine Auxiliadora Arana Cordonero
Allan Josué Calderón Jiménez

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2017

Evaluación de la heterogeneidad en la población de células madres miogénicas y la morfometría de las fibras musculares en pollos de engorde

**Jeanine Auxiliadora Arana Cordonero
Allan Josué Calderón Jiménez**

Resumen. Las células satélites influyen en el desarrollo del músculo después del nacimiento pues donan su núcleo a las fibras musculares existentes permitiendo que estas aumenten su tamaño. Existe escasa información relacionada a la población de células satélites y el tamaño de las fibras musculares en líneas actuales de pollos de engorde. Por lo tanto, se evaluó la población de células satélites y el área transversal de las fibras en los músculos *pectoralis major* (PM) y *biceps femoris* (BF) de las líneas de pollos de engorde Red Ranger® (RR) y Ross® 708. Las aves fueron criadas en corrales iguales y manejadas con las mismas condiciones de intensidad lumínica, fotoperiodo, temperatura, alimento y agua. Al día 43 de edad se cosecharon ocho aves por línea y sexo, y se extrajeron muestras de cada músculo. Las criosecciones de cada músculo se tiñeron con inmunofluorescencia para detectar células miogénicas y satélites que expresaran Myf-5, MyoD y Pax7. Se tomaron imágenes digitales donde se contaron las células y se midió el área transversal de cada fibra. La línea Ross® 708 presentó mayor población de células miogénicas en comparación con la línea RR. El área transversal de la fibra fue similar en ambos sexos y líneas de engorde. El PM presentó una media del área transversal mayor en comparación al músculo BF. Las poblaciones de Myf-5+ y Pax7+ fueron similares en ambos músculos. Las células Myf-5+ MyoD+ fueron mayor en el BF en comparación con el PM. La mayor cantidad de diferencias fueron entre los músculos.

Palabras clave: Células satélites, desarrollo muscular, factores reguladores de la miogénesis, fibras musculares, músculo esquelético.

Abstract. Satellite cells play a role in mediating post-hatch skeletal muscle growth through their donation of nuclei to existing muscle fibers to increase their size. There is scarce information about satellite cells and muscle fiber cross-sectional area (CSA) in modern broiler strains. Therefore, satellite cells and CSA were evaluated in the muscles *pectoralis major* (PM) and *biceps femoris* (BF) from the broiler chicken strains Red Ranger® (RR) and Ross® 708. All birds were penned and managed with the same conditions of light intensity, photoperiod, temperature, feed and water. At day 43 eight birds per sex per strain were euthanized and samples from muscles were taken. Cryosections from each muscle were immunofluorescence stained to detect Myf-5, MyoD, and Pax7-expressing myogenic cells. Digital images were taken where the myogenic stem cell were counted and the muscle fiber CSA was measured. Ross® 708 broilers exhibited greater population of myogenic stem cells compared with RR. Fiber CSA was similar among the two strains and sexes. Mean fiber CSA was greater in the PM compared to the BF muscle. The Myf-5+ and Pax7+ population sizes were similar among muscles but Myf-5+;MyoD+ cells were more plentiful in the BF compared to the. Overall, the major differences in broiler myogenic stem cell populations were between the muscles.

Key words: Muscle development, muscle fibers, myogenic regulatory factors, satellite cells, skeletal muscle.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. METODOLOGÍA.....	2
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
4. CONCLUSIONES.....	11
5. RECOMENDACIONES	12
6. LITERATURA CITADA.....	13
7. ANEXOS	15

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Características de la composición de la dieta utilizada en el experimento para alimentar a las aves dividida en tres etapas.	3
2. Descripción de las siete categorías utilizadas en el conteo celular.	5
3. Comparación en el número de células miogénicas entre las líneas comerciales de pollos de engorde Ross [®] 708 y Red Ranger [®] (RR).	7
4. Comparación en el número de células miogénicas entre ambos sexos de las líneas Ross [®] 708 y Red Ranger [®]	8
5. Comparación en el número de células miogénicas entre los músculos <i>pectoralis major</i> (PM) y <i>biceps femoris</i> (BF) de las líneas Ross [®] 708 y Red Ranger [®]	8
6. Comparación del área transversal de las fibras musculares entre las líneas comerciales Ross [®] 708 y Red Ranger [®] (RR).	9
7. Comparación del área transversal de las fibras musculares entre ambos sexos de las líneas Ross [®] 708 y Red Ranger [®]	9
8. Comparación del área transversal de las fibras musculares entre los músculos <i>pectoralis major</i> (PM) y <i>biceps femoris</i> (BF) de las líneas Ross [®] 708 y Red Ranger [®]	10
Figuras	Página
1. Diferencia en tamaño del área transversal de las fibras musculares de los músculos <i>pectoralis major</i> (izquierda) y <i>biceps femoris</i> (derecha). Imágenes a 200x.	10
Anexos	Página
1. Protocolo de tinción desarrollado en el laboratorio de Biología Muscular del Departamento de Ciencias Avícolas de la Universidad de Auburn.....	15

1. INTRODUCCIÓN

Las investigaciones del sector avícola han logrado grandes avances en la producción de aves. Las mejoras genéticas de las aves de engorde se han enfocado en las características productivas, como el incremento en masa muscular. Las líneas actuales presentan rendimientos hasta 40% más altos que las líneas utilizadas hace 50 años (Havenstein *et al.* 2003). Estos cambios están influenciados por las técnicas de selección genética que se han desarrollado, los cuales se han enfocado en aves que presenten mejor conversión alimenticia (Kokoszynski *et al.* 2013). Una de las áreas de mayor interés es el desarrollo muscular que presentan las aves, enfocándose en obtener carnes magras y de mayor tamaño (The Poultry Site 2014).

El desarrollo del músculo esquelético está mediado por la actividad celular. La etapa crucial en que ocurre mayor actividad es después de la eclosión (Halevy *et al.* 2000). Estudios recientes se han enfatizado en determinar las condiciones en donde los animales pueden expresar de manera óptima sus características genéticas (Powell *et al.* 2014). La importancia de evitar condiciones adversas radica en el proceso que llevan a cabo las células satélites. Las células satélites o células madres miogénicas juegan un rol importante en el desarrollo muscular después de la eclosión (Velleman 2014).

La información relacionada a la población de células madres miogénicas en pollos de engorde es bastante limitada. En animales de rápido crecimiento, las poblaciones de células satélites se activan y reciben señales para que inicien la división mitótica (Mauro 1961). Una vez las células alcanzan una densidad establecida, estas cambian su expresión genética por el proceso de diferenciación, separándose así del ciclo celular y se fusionan con las fibras musculares existentes que se desarrollaron durante la embriogénesis. Esta adición de núcleos incrementa la concentración de ADN disponible dentro de la fibra muscular para la transcripción de genes asociados al desarrollo muscular y así impulsar la síntesis de proteínas que promuevan el crecimiento muscular (Stockdale y Holtzer 1961). El incremento de la síntesis de proteínas dentro de las fibras es el mecanismo por el cual el área transversal crece durante el ciclo de vida del animal.

- El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto que tienen dos líneas de pollos de engorde, ambos sexos y dos músculos comercialmente importantes en los aspectos de población de células miogénicas y la morfometría de las fibras. Además, se pretendió obtener información para futuras investigaciones relacionadas al área de desarrollo muscular en la industria avícola.

2. METODOLOGÍA

El estudio se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Avícola de la Universidad de Auburn, Auburn, Alabama. Este sitio cuenta con una temperatura promedio anual de 17.4°C, una precipitación anual de 1337 mm y se encuentra a una altura de 214 msnm.

Se utilizaron 80 pollos de la línea Ross[®] 708 (Ross[®] 708; Aviagen Group, Huntsville, AL) y 80 pollos de la línea Red Ranger[®] (RR; S& G Poultry, Clanton, AL). Los pollos se obtuvieron de dos criaderos comerciales y fueron transportados a la Unidad de Investigación Avícola de la Universidad de Auburn en Auburn, Alabama. Antes de su llegada, los pollos Ross[®] 708 fueron sexados y separados en corrales acorde a su sexo. En la línea RR no es posible determinar su sexo después de la eclosión por lo que ambos sexos fueron distribuidos en el mismo corral.

Las aves fueron criadas en ocho corrales experimentales con un área por corral de 2.56 m² (1.6 m × 1.6 m), por un tiempo de 43 días que duró el estudio. En cada corral se ubicaron 20 aves según la línea y el sexo en el caso de la línea Ross[®] 708, en el suelo de cada corral se colocó viruta de pino nueva. La temperatura del galpón se controló con calentadores de gas. Los rangos de temperatura utilizados son basados en la edad en días de las aves: día uno al siete de 33 °C, día ocho al 14 de 28 °C, día 15 a 24 de 24 °C y del día 25 a 43 de 20 °C. Las aves fueron expuestas a un fotoperiodo de 23 horas luz y una hora de oscuridad del establecimiento al día siete de edad, después se redujo a 18 horas luz y seis de oscuridad para el resto del experimento. La intensidad de luz se estableció en 30 Lux del día uno al siete de edad, 10 Lux del día ocho al 14 de edad, 5 Lux del día 15 al 24 de edad y 3 Lux del día 25 al 43 de edad.

A las aves se les proveyó acceso *ad libitum* de alimento y agua en la duración total del estudio de campo. Todas las aves fueron alimentadas con una dieta común que se dividió en tres etapas: inicio, crecimiento y finalizado (Cuadro 1). Cada corral estaba equipado con un comedero colgante con una capacidad de 45 libras y con un sistema de bebederos de niple.

Cuadro 1. Características de la composición de la dieta utilizada en el experimento para alimentar a las aves dividida en tres etapas.

Ingrediente	Inicio (%)	Crecimiento (%)	Finalizado (%)
Maíz	57.650	61.092	68.161
Harina de soya	35.146	31.661	25.612
Aceite avícola	3.057	3.000	2.980
Sal	0.452	0.453	0.455
Fosfato dicálcico	1.719	1.475	1.380
Carbonato de calcio	1.283	1.177	1.000
Metionina	0.313	0.892	0.162
Lisina	0.130	0.000	0.000
Pre mezcla de vitaminas	0.100	0.100	0.100
Pre mezcla de minerales	0.100	0.100	0.100
Colina (60%)	0.050	0.050	0.050
TOTAL	100	100	100

Recolección de las muestras de músculo.

A los 43 días de edad, ocho aves de cada línea y sexo fueron sacrificadas. Se tomaron muestras de los dos músculos *pectoralis major* (PM) y *biceps femoris* (BF) (n=32 muestras por músculo). Estas fueron etiquetadas, congeladas instantáneamente con nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C para su posterior análisis.

Montado de las muestras.

Las muestras (n=64) fueron trasladadas a refrigeración de -20 °C donde permanecieron por 24 horas previo a ser seccionadas. Los músculos fueron crio-seccionados a un grosor de 5 µm utilizando un criostato modelo Leica CM 1950® y montadas en portaobjetos carga eléctrica positiva. De cada porción de músculo se prepararon cuatro portaobjetos con cinco secciones de músculo cada uno. Las muestras fueron identificadas con el número de muestra, fecha de seccionado y la persona encargada de seccionar. Los portaobjetos montados fueron almacenadas a 4 °C para su preservación hasta el proceso de tinción.

Marcadores moleculares.

Se utilizaron cuatro marcadores moleculares para la identificación de las células. La identificación de los núcleos celulares, es decir todas las células presentes en el músculo, se marcaron con el marcador molecular 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, por sus siglas en inglés). Este se adhiere al ADN del núcleo de las células. Cuando este se encuentra en el núcleo emite señales fluorescentes lo que permite su fácil identificación. Es un marcador molecular termo y fotosensible por lo que requiere que su manejo sea en contenedores que no tienen entradas de luz y que permanezcan el menor tiempo posible fuera de las condiciones de refrigeración.

Para identificar los Factores Reguladores de la Miogénesis (FRM) se utilizaron los anticuerpos primarios MyoD y Myf5. Estos factores influyen en el proceso de determinación de las células precursoras somáticas a células del mioblasto, que posteriormente se diferenciarán y formarán fibras musculares. La presencia de estas proteínas indica la existencia de actividad celular para el desarrollo muscular, lo cual es un buen indicador. Los químicos fueron obtenidos de la empresa Biotechnology Santa Cruz ubicada en Santa Cruz, California, Estados Unidos.

Las células satélites se identificaron con el uso del marcador Pax7. Este es un factor de transcripción que juega un rol importante en el proceso de miogénesis para la proliferación de células precursoras de las fibras musculares. El marcador se obtuvo de la empresa Developmental Studies Hybridoma Bank ubicada en Iowa City, Iowa, Estados Unidos.

Para intensificar las señales emitidas por los anticuerpos primarios se utilizaron cuatro tintes o anticuerpos secundarios. Los nombres son: Goat anti-mouse IgG2b Alexa-Fluor[®] 488, Goat anti-rabbit IgG (H&L) Alexa-Fluor[®] 546 y Goat anti-mouse IgG1 Alexa-Fluor[®] 633. Su función es teñir con un color de nuestra elección el objetivo a identificar. Los tintes se obtuvieron de la empresa Invitrogen, Carlsbad, CA.

Tinción con inmunofluorescencia.

De los portaobjetos montados con las secciones musculares, se seleccionó un portaobjeto por cada muestra de músculo. Para el proceso de tinción se utilizó un protocolo de tinción (Anexo 1) creado en el laboratorio de Biología Muscular del Departamento de Ciencias Avícolas de la Universidad de Auburn, Auburn, Alabama. Cada portaobjetos fue identificado con la fecha de tinción, los anticuerpos utilizados y el encargado del proceso. Las muestras fueron divididas en grupos de ocho para la tinción según lo indica el protocolo.

El proceso comienza delineando las orillas del portaobjetos utilizando un marcador de tinta hidrofóbica para prevenir que los químicos de la tinción salgan del portaobjetos. Después, se protegió el área de información utilizando un esmalte de uñas transparente. Seguido, las muestras fueron colocadas en solución buffer e incubadas por 10 minutos para rehidratar el tejido. En seguida, el tejido fue transferido a un recipiente que contenía una solución al 4% de para-formaldehído y de nuevo incubado por 10 minutos. Al finalizar el tiempo, se aspiró la solución de cada portaobjetos y fueron enjuagados dos veces en solución buffer. A continuación, se incubaron dentro de una caja plástica negra por 10 minutos en solución al 0.5% de Triton[®] X-100 que tiene la función de permeabilizar el tejido muscular, el mismo método de incubación se utilizó en las siguientes etapas del proceso. Posteriormente, se aspiró los residuos y se incubó en solución bloqueadora por 30 minutos. Al finalizar la incubación, se le aplicó 300 μ L de la solución de anticuerpos primarios a cada portaobjetos y se le incubó por una hora. Al término del tiempo, se aspiró el sobrante de cada muestra e inmediatamente se hicieron tres etapas de enjuague en solución buffer de cinco minutos cada una. Seguido de esto, se aplicó 300 μ L de la solución de anticuerpos secundarios y se incubó por 30 minutos.

Finalizado el tiempo se repitió el procedimiento de enjuague anterior en solución buffer. Posteriormente se le añadió 300 µL de la solución DAPI a cada portaobjetos y se enjuagó dos veces para remover los residuos. Al final, se aplicó solución fluorescente en cada portaobjetos y se colocó un cubre objetos, este se selló con esmalte para uñas. Las muestras se ubicaron en cajas y se almacenaron a 4 °C.

Imágenes.

Las muestras del tejido muscular fueron fotografiadas en aumento de 10x y 20x con un microscopio invertido marca Nikon® ECLIPSE Ti. Las imágenes fueron tomadas y analizadas utilizando el programa Nikon-Elements®. En cada imagen se contó la población de células y se midió el área transversal de las fibras musculares.

Conteo celular.

Un total de 64 imágenes fueron analizadas para el conteo de células. El programa que se utilizó para el conteo fue Nikon-Elements®. Se establecieron siete categorías según los aspectos a identificar (Cuadro 2). Las imágenes contadas fueron la que se tomaron con un aumento de 20x. Dentro del conteo se incluyeron únicamente a las células ubicadas entre las fibras musculares y estas se agruparon en siete categorías según las señales que presentaron.

Cuadro 2. Descripción de las siete categorías utilizadas en el conteo celular.

Categorías	Descripción
DAPI+	Señala todos los núcleos de las células presentes en el músculo.
MyoD+	Señala proteína MyoD presente en células somáticas y células satélites.
Myf-5+	Señala proteína Myf-5 presente en células somáticas y células satélites.
Pax7+	Señala Pax7 ubicada en las células satélites
Myf-5+; Pax-7+	Señal positiva de ambas proteínas.
MyoD+; Pax-7+	Señal positiva de ambas proteínas.
Myf-5+; MyoD+; Pax-7+	Triple señal positiva de las proteínas.
Total de células miogénicas	Es la suma de todas las categorías y las células presentes dentro de la fibra.

Medición de área transversal.

Para conocer el área transversal de la fibra muscular se utilizaron las mismas imágenes que fueron contadas (n=64). En este procedimiento se utilizó el programa Nikon-Elements®. Para evitar el sesgo, se midieron únicamente las fibras que su forma se podía observar por completo.

Análisis estadístico.

Se utilizó el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.4[®]). Las aves individualmente fueron determinadas como unidades experimentales. Las variables establecidas fueron músculo, sexo y línea. El área transversal de las fibras y la población celular se evaluaron con PROC MIXED. Se utilizó un nivel de significancia de $P \leq 0.05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Población celular.

Al día 43 de edad la línea Ross[®] 708 presentó mayor cantidad de células asociadas a la miogénesis ($P \leq 0.05$) (Myf-5+; MyoD+; Pax-7+) (Cuadro 3). La presencia de células miogénicas en la etapa adulta de los organismos está ligado a la reparación muscular debido a lesiones que ocurren en su desarrollo (Schultz *et al.* 1978). Altas poblaciones de células miogénicas son deseadas en esa edad. Esto representa que se mantiene el crecimiento y la consistencia del músculo en el tiempo. Ross[®] 708 es una línea de propósito de engorde, en la cual su genética está enfocada a altos rendimientos de carne (Aviagen 2016). Por lo tanto, los resultados son acuerdo a las características esperadas de las líneas. La línea RR no tiene los mismos rasgos de crecimiento muscular por lo que se espera menor presencia de estas células.

Cuadro 3. Comparación en el número de células miogénicas entre las líneas comerciales de pollos de engorde Ross[®] 708 y Red Ranger[®] (RR).

Categoría	Número de células por mm ²		E	P
	Ross [®] 708	RR		
DAPI+	883	816	50	0.1882
Myf-5+	33	18	15	0.3257
MyoD+	68	69	17	0.9557
Pax-7+	10	9	3	0.5508
Myf-5+; Pax-7+	2	0	3	0.4022
MyoD+; Pax-7+	8	4	3	0.1160
Myf-5+; MyoD+; Pax-7+	92 ^a	67 ^b	12	0.0434
Total de células miogénicas	759	709	47	0.2896

E = Error estándar de la media; P = Probabilidad;

^{a, b} Medidas en filas con distinta letra, difieren estadísticamente entre sí ($P \leq 0.05$).

En la comparación entre sexos no se encontraron diferencias significativas en la población celular (Cuadro 4). Marcato *et al.* (2008) compararon los parámetros de crecimiento en las líneas Ross[®] 308 y Cobb[®] 500, sus resultados demuestran que las diferencias en pollos de engorde se presentan entre líneas, por lo que los animales de la misma línea muestran un patrón similar. Los resultados de este proyecto demuestran que la actividad celular miogénica es también un factor de igualdad entre los sexos de la misma línea.

Cuadro 4. Comparación en el número de células miogénicas entre ambos sexos de las líneas Ross[®] 708 y Red Ranger[®].

Categoría	Número de células por mm ²		E	P
	Hembra	Macho		
DAPI+	845	855	49	0.8358
Myf-5+	15	37	14	0.1134
MyoD+	68	68	17	0.9939
Pax-7+	9	10	3	0.8945
Myf-5+; Pax-7+	0	2	3	0.3811
MyoD+; Pax-7+	6	6	2	0.9018
Myf-5+; MyoD+; Pax-7+	88	72	12	0.1848
Total de células miogénicas	741	727	46	0.7688

E = Error estándar de la media; P = Probabilidad.

La cantidad de células miogénicas entre los dos músculos fueron diferentes. El BF presenta mayor población celular y total de células miogénicas que el músculo PM ($P \leq 0.05$) (Cuadro 5). La diferencia entre estos dos músculos es en razón al origen que tiene cada uno. El BF es un músculo aeróbico que utiliza la glucosa para la producción de energía, esto permite que su metabolismo tenga una producción más eficiente de energía la cual es necesaria para el crecimiento muscular. El PM es un músculo anaeróbico que usa ácido láctico para producir energía, esto hace menos eficiente el metabolismo por lo que la actividad celular miogénica es menor (Westerblad *et al.* 2010).

Cuadro 5. Comparación en el número de células miogénicas entre los músculos *pectoralis major* (PM) y *biceps femoris* (BF) de las líneas Ross[®] 708 y Red Ranger[®]

Categoría	Número de células por mm ²		E	P
	BF	PM		
DAPI+	925 ^a	774 ^b	49	0.0034
Myf-5+	23	19	14	0.3767
MyoD+	82	55	17	0.1121
Pax-7+	11	8	3	0.4006
Myf-5+; Pax-7+	1	1	3	0.7961
MyoD+; Pax-7+	7	6	2	0.7497
Myf-5+; MyoD+; Pax-7+	71	88	12	0.1632
Total de células miogénicas	791 ^a	678 ^b	46	0.0176

E = Error estándar de la media; P = Probabilidad;

^{a, b} Medidas en filas con distinta letra, difieren estadísticamente entre sí ($P \leq 0.05$).

Área transversal de las fibras musculares.

Las dos líneas de engorde no presentaron diferencia en las áreas transversales de las fibras musculares (Cuadro 6). Scheuermann *et al.* (2004) compararon la densidad de las fibras musculares de *pectoralis major* en dos líneas de engorde y una de postura a los días 7 y 21 de edad. La línea de postura presentó mayor densidad de fibras musculares o fibras con

menor tamaño que las líneas de engorde. Esto difiere con los resultados de este experimento en donde no se presentó diferencia en la densidad de fibras entre las dos líneas. La razón es que la línea RR al ser de doble propósito presenta más características de engorde que una línea de postura, por lo que sus tamaños de fibras son mayores y se van a asemejar a las de líneas especializadas en engorde. La edad a la que fueron evaluadas las aves también puede ser un factor de variación en nuestro estudio ya que nuestro análisis se realizó al día 43 de edad.

Cuadro 6. Comparación del área transversal de las fibras musculares entre las líneas comerciales Ross[®] 708 y Red Ranger[®] (RR).

Parámetro	Líneas		Error Std.	P
	RR	Ross [®] 708		
Media (μm^2)	3,027	2,929	351	0.7800
Mínimo (μm^2)	270	333	115	0.5871
Máximo (μm^2)	6,282	5,576	663	0.2916
Densidad (mm^2)	255	276	34	0.5426

Error Std. = Error estándar de la media; P = Probabilidad.

Entre sexos, estadísticamente no se presentaron diferencias por lo que se puede determinar que existe uniformidad entre las aves pertenecientes a la misma línea (Cuadro 7.). Scheuermann y colaboradores también realizaron evaluaciones entre hembras y machos únicamente en las líneas de engorde a los 7 y 21 días de edad. En esta comparación determinaron que no existe diferencias entre los sexos de líneas de engorde, por lo que coincide con los resultados de este estudio (Scheuermann *et al.* 2004). Las casas comerciales han mejorado genéticamente los animales de manera que no exista diferencias entre animales de ambos sexos.

Cuadro 7. Comparación del área transversal de las fibras musculares entre ambos sexos de las líneas Ross[®] 708 y Red Ranger[®]

Parámetro	Sexo		Error Std.	P
	Hembra	Macho		
Media (μm^2)	2,699	2,357	334	0.1002
Mínimo (μm^2)	218	385	109	0.1321
Máximo (μm^2)	5,587	6,271	636	0.2873
Densidad (mm^2)	272	259	34	0.6884

Error Std. = Error estándar de la media; P = Probabilidad.

La evaluación del área transversal entre músculos presentó diferencias en la media, mínimo y máximo ($P \leq 0.05$) (Cuadro 8). La media de las fibras en el músculo PM presentó un valor mayor, esto coincide con las características observadas en el análisis de las imágenes en

donde notablemente se diferenciaba la variación en el área de las fibras de cada músculo (Figura 1). BF presenta el valor mínimo de los tamaños de la fibra, lo cual es un patrón observado en las fibras de los músculos clasificados como de lenta reacción. El máximo valor de área se encontró en el músculo PM, este es clasificado como de rápida reacción en donde se presentan una distribución de fibras con área más grandes en comparación con los de lenta reacción (Starkey 2017).

Cuadro 8. Comparación del área transversal de las fibras musculares entre los músculos *pectoralis major* (PM) y *biceps femoris* (BF) de las líneas Ross® 708 y Red Ranger®.

Parámetro	Músculos		Error Std.	P
	BF	PM		
Media (μm^2)	2,485 ^b	3,471 ^a	334	0.0047
Mínimo (μm^2)	191 ^a	412 ^b	109	0.0477
Máximo (μm^2)	5,110 ^b	6,748 ^a	636	0.0127
Densidad (mm^2)	294	236	34	0.0902

Error Std. = Error estándar de la media; P = Probabilidad;

^{a, b} Medidas en filas con distinta letra, difieren estadísticamente entre sí ($P \leq 0.05$).

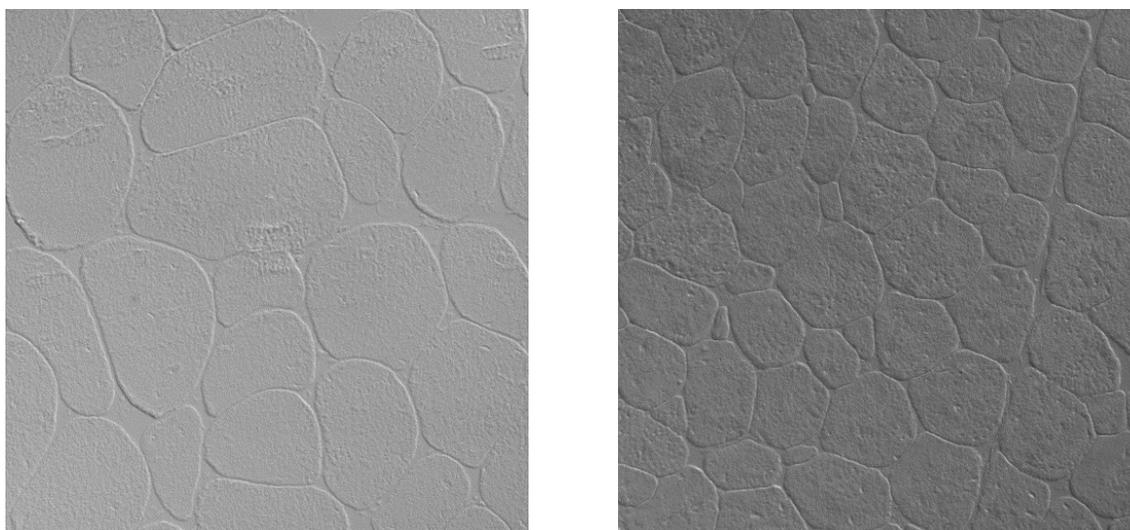


Figura 1. Diferencia en tamaño del área transversal de las fibras musculares de los músculos *pectoralis major* (izquierda) y *biceps femoris* (derecha). Imágenes a 200x.

4. CONCLUSIONES

- La línea de engorde de rápido crecimiento Ross[®] 708 presentó un aumento en las células miogénicas con triple señal positiva (Myf-5:MyoD:Pax7) comparado con la línea doble propósito Red Ranger[®]. Sin embargo, no existió diferencia en la medición del área transversal.
- El sexo del ave no influyó en cantidad de células miogénicas ni en el área transversal de las fibras musculares.
- Los músculos presentaron diferencias en la cantidad de células miogénicas y el área transversal de las fibras. El *biceps femoris* presentó mayor cantidad de células miogénicas y menor área transversal que las fibras del *pectoralis major*.

5. RECOMENDACIONES

- Experimentar nuevamente con las mismas variables evaluadas, pero aumentar el número de muestras para observar si nuestros resultados están afectados por la cantidad de muestras.
- Evaluar las mismas variables durante varias edades del ave para determinar si el patrón observado en nuestros resultados es similar durante toda la vida del ave.
- Evaluar resultados utilizando la covariante de miopatía de la pechuga amaderada.
- Evaluar por separado los factores músculo y sexo de cada línea.

6. LITERATURA CITADA

- Aviagen, Inc. 2017. Ross 708 Parentstock: Performance objectives. [internet]. Alabama, USA; [consultado 2017 jul 15]. <http://en.aviagen.com/brands/ross/products/ross-708>.
- Halevy O, Geyra A, Barak M, Uni Z, Sklan D. 2000. Early posthatch starvation decreases satellite cell proliferation and skeletal muscle growth in chicks. *J. Nutr.* 130 (4):858-864.
- Havenstein GB, Ferket PR, Qureshi MA. 2003. Growth, livability, and feed conversion of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poult Sci.* 82(10):1500–1508.
- Kokoszyński D, Bernacki Z, Korytkowska H, Krajewski K, Skrobiszewska L. 2013. Carcass composition and physicochemical and sensory properties of meat from broiler chickens of different origin. *J. Cent. Eur. Agric.* 14(2):303–315.
- Marcato SM, Sakomura NK, Munari DP, Fernandes JB, Kawauchi ÍM, Bonato MA. 2008. Growth and body nutrient deposition of two broiler commercial genetic lines. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 10(2):117–123.
- Mauro A. 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* 9:493–495.
- Powell DJ, McFarland DC, Cowieson AJ, Muir WI, Velleman SG. 2014. The effect of nutritional status on myogenic gene expression of satellite cells derived from different muscle types. *Poult Sci.* 93(9):2278–2288.
- Scheuermann GN, Bilgili SF, Tuzun S, Mulvaney DR. 2004. Comparison of chicken genotypes: Myofiber number in pectoralis muscle and myostatin ontogeny. *Poult Sci.* 83(8):1404–1412.
- Schultz E, Gibson MC, Champion T. 1978. Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study. *J Exp Zool.* 206(3):451–456.
- Starkey J. 2017. *Poultry Physiology: Muscle Tissue Development and Growth*. Auburn University.
- Stockdale FE, Holtzer H. 1961. DNA synthesis and myogenesis. *Exp Cell Res.* 24(3):508–520.

The PoultrySite. 2014. Optimising Broiler Muscle Development. USA: 5m Enterprises Inc.; [consultado 2017 jul 18]. <http://www.thepoultrysite.com/articles/3096/optimising-broiler-muscle-development>.

Velleman SG. 2014. Effect of Growth Selection on Adipogenic Gene Expression During the Development of the Turkey Breast Muscle. *International J. of Poultry Science*. 13(12):680–684.

Westerblad H, Bruton JD, Katz A. 2010. Skeletal muscle: energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability. *Exp Cell Res*. 316(18):3093–3099.

7. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de tinción desarrollado en el laboratorio de Biología Muscular del Departamento de Ciencias Avícolas de la Universidad de Auburn.

I. Primary Antibodies	II. Secondary Antibodies
1) MyoD a. Mouse IgG2b b. Cat.#: sc-377460 (Lot#: K0816) c. Dilution of 1:50 2) Myf-5 a. Rabbit IgG b. Cat.#: sc-302 (Lot #: H1915) c. Dilution of 1:50 3) Pax7 a. Mouse IgG1 b. Cat.#: DSHB Starkey 4.24.15 3 of 2 c. Dilution of 1:10	1) Goat anti-mouse IgG2b Alexa-Fluor 488 a. Cat.#: A21141 (Lot: 1723667) b. Dilution of 1:1000 2) Goat anti-rabbit IgG (H&L) Alexa-Fluor 546 a. Cat.#: A11010 (Lot: 1691774) b. Dilution of 1:1000 3) Goat anti-mouse IgG1 Alexa-Fluor 633 a. Cat.#: A21126 (Lot: 1504514) b. Dilution of 1:1000
III. Nuclear Counterstain DAPI (0.1 mg / mL); Cat. #:268298; MH/KM; Dilution of 1:1000	
IV. Calculations and Staining Solution Preparation:	
Blocking solution (BS): 8 slides × 400 µL / slide × 3 steps = 9,600 µL of BS → Round to 10,000 µL of BS	
BS components:	
10% (0.1) horse serum (HS) × 10,000 µL BS = 1,000 µL HS	
0.5% bovine serum albumen (BSA) = 0.005 g BSA × 10,000 µL BS × $\left(\frac{1\text{ g}}{1000\text{ mg}}\right)$ = 0.05 g BSA	
In: (10,000 µL BS – 1,000 µL HS) = 9,000 µL Triton X (0.2% in PBS)	
Primary Antibody Solution (1° Ab)	
MyoD (1:50 dilution):	325 µL / 50 = 6.5 µL × 8 slides = 52.0 µL MyoD
Myf-5 (1:50 dilution):	325 µL / 50 = 6.5 µL × 8 slides = 52.0 µL Myf-5
Pax7 DSHB (1:10 dilution):	325 µL / 10 = 32.5 µL × 8 slides = 260.0 µL Pax7
TOTAL = 364.0 µL 1° Ab	
In: 2,236.0 µL BS	
Total Volume of Primary Ab Solution 2,600.0 µL	
Secondary Antibody Solution (2° Ab) Remember to centrifuge antibody tubes 5 s before pipetting Ab out of them!	
AlexaFluor 488 (A21141) (1:1000 dilution)	325 µL / 1000 = 0.325 µL × 8 slides = 2.6 µL
AlexaFluor 546 (A11010) (1:1000 dilution)	325 µL / 1000 = 0.325 µL × 8 slides = 2.6 µL
AlexaFluor 633 (A21126) (1:1000 dilution)	325 µL / 1000 = 0.325 µL × 8 slides = 2.6 µL
TOTAL = 7.8 µL 2° Ab	
In: 2,592.2 µL BS	
Total Volume of Secondary Ab Solution 2,600.0 µL	

DAPI Solution (1:1000 dilution): 325 µL / 1000 = 0.325 µL × 8 slides = **2.6 µL DAPI in 2,597.4**

CHECK V. Staining Procedure:

	<ul style="list-style-type: none"> Record IF stain information on slide. While the slide is dry, use the PAP pen to make a hydrophobic ring around the edge of each slide mounted with 5 μm transverse sections of muscle to be stained being careful not to touch any tissue with the PAP. 	
	<ul style="list-style-type: none"> Coat frosted portion with fingernail polish. Allow to dry. 	
	<ul style="list-style-type: none"> Place the slide in a colored Coplin jar (slide staining container) containing enough volume of 1X PBS to cover the slides up to the frosted portion and <i>incubate at RT for 5 min</i> to rehydrate the tissue. 	
	<ul style="list-style-type: none"> Transfer the slides to a Coplin jar containing 4% PFA in PBS and <i>incubate at RT for 10 min</i> <ul style="list-style-type: none"> Aspirate PFA off of each slide at the end of the 10 min incubation and immediately place slides in slide holder in PBS. Slides should never dry out! 	
	<ul style="list-style-type: none"> Rinse 2X briefly (dunk) in PBS in two separate Coplin jars to remove any residual fixative. <ul style="list-style-type: none"> Use 2 PFA-designated Coplin jars for this step and aspirate waste PBS from the jar. 	
	<ul style="list-style-type: none"> Use the "humidified black box system" for all remaining incubation steps. The box should have the bottom covered in damp paper towels and a slide rack in the middle to provide the humidity for all of the steps where the volume per slide is minimal. Pipette 300 μL of 0.5% TritonX-100 in PBS out of 50 mL conical onto each slide and <i>incubate for 10 min</i> to permeabilize the tissue. <ul style="list-style-type: none"> Aspirate the solution off of each slide after incubation. 	
	<ul style="list-style-type: none"> Add 300 μL of Blocking Solution to each slide and <i>incubate for 30 min at RT</i> in the humidified box to block nonspecific antigen binding. <ul style="list-style-type: none"> Aspirate the blocking solution off of each slide after incubation. 	
	<ul style="list-style-type: none"> Add 300 μL of primary antibody solution to each slide ONE SLIDE AT A TIME (to prevent excessive drying of tissue) and <i>incubate in a humidified box for 1 hour at RT</i>. <ul style="list-style-type: none"> Aspirate the primary antibody solution off of each slide after incubation and immediately place in PBS one slide at a time so that they never dry. 	
	<ul style="list-style-type: none"> Dunk slides in PBS to remove unbound primary antibody, then conduct <i>3 subsequent 5 min rinses at RT</i>. <ul style="list-style-type: none"> Use 4 Coplin jars containing enough volume to cover the slide up to the frosted section. 	
	<ul style="list-style-type: none"> Add 300 μL of secondary antibody solution to each slide and <i>incubate for 30 min at RT</i> in the humidified box. 	
	<ul style="list-style-type: none"> Dunk slides in PBS to remove unbound secondary antibody, then conduct <i>3 subsequent 5 min rinses at RT</i>. <ul style="list-style-type: none"> Use 4 Coplin jars containing enough volume to cover the slide up to the frosted section. 	
	<ul style="list-style-type: none"> Remove all slides from PBS ONE SLIDE AT A TIME and add 300 μL of DAPI solution to each slide to stain all nuclei. 	
	<ul style="list-style-type: none"> Rinse with PBS briefly 2X to remove any residual DAPI. 	
	<ul style="list-style-type: none"> ONE SLIDE AT A TIME, remove slides from PBS and coverslip using fluorescence (IF) mounting media. <ul style="list-style-type: none"> Leave all slides in PBS while coverslipping ONE slide at a time. 	
	<ul style="list-style-type: none"> Place slides in a slide box horizontally and incubate at 4°C overnight. 	
	<ul style="list-style-type: none"> The following day, use fingernail polish to seal the edges of the slide. Once dry, the slides may be stored at 4°C. <ul style="list-style-type: none"> NOTE: The fluorescent signal is usually only strong enough for analysis for 7 days. 	