

**Efecto de tres fuentes de proteína y dos  
condiciones de cama en el desarrollo y  
actividad miogénica de las células satélite de  
pollos de engorde**

**Samuel Francisco Leiva Murcia  
Jorge Luis Sandoval Escobar**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Honduras**  
Noviembre, 2018

ZAMORANO  
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Efecto de tres fuentes de proteína y dos  
condiciones de cama en el desarrollo y  
actividad miogénica de las células satélite de  
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

**Samuel Francisco Leiva Murcia  
Jorge Luis Sandoval Escobar**

**Zamorano, Honduras**  
Noviembre, 2018

## **Efecto de tres fuentes de proteína y dos condiciones de cama en el desarrollo productivo y actividad miogénica de las células satélite de pollos de engorde**

**Samuel Francisco Leiva Murcia**  
**Jorge Luis Sandoval Escobar**

**Resumen.** Se utilizaron 300 pollos de ceba (hembras) con el objetivo de evaluar el desempeño productivo y la actividad miogénica de las células musculares bajo dos condiciones de cama y tres fuentes de proteína. Se empleó un diseño factorial  $2 \times 3$  en bloques completos al azar con seis tratamientos y 50 repeticiones, cada pollo fue una repetición. Los factores evaluados consistieron en: factor tipo de cama (nueva y reutilizada) y factor fuente de proteína (harina de soya sola, harina de soya + 4% de harina de carne y hueso bovina y harina de soya + 2% de harina de aves + 2% de H. de plumas). Las aves recibieron alimentación y agua *ad libitum* y las mismas condiciones de iluminación y temperatura. Al día 20 se tomaron muestras de *Pectoralis major* de 12 pollos para evaluar las poblaciones de células miogénicas. Al día 21 se midió consumo de alimento, ganancia de peso y conversión alimenticia. No se encontraron interacciones entre los factores condición de cama y fuente de proteína sobre el desempeño productivo y las poblaciones de células miogénicas de las aves. La dieta con harina de soya + 2% harina de matadero de aves + 2% harina de plumas promovió una mejor conversión alimenticia. El tipo de cama y las fuentes de proteína no influyeron sobre el comportamiento productivo y actividad miogénica de pollos de engorde. La adición de 2% de harina de matadero avícola + 2% de harina de plumas en las dietas de maíz-soya mejoró la conversión alimenticia.

**Palabras Clave:** Aves, cama avícola, harinas proteicas, músculo.

**Abstract.** 300 broilers (females) were used to evaluate the effect of two litter conditions and three dietary protein sources in the productive performance and satellite cell activity of broilers reared to 21 days. A  $2 \times 3$  complete random blocks design with six treatments and 50 repetitions in which each bird was a repetition was used. The evaluated factors were: litter condition (new and reused) and dietary protein source (soybean meal, soybean meal + 4% mammalian meat and bone meal or soybean meal + 2% poultry by-product meal + 2% feather meal). All broilers received *ad libitum* feed and water and the same photoperiod, light intensity and temperature conditions. *Pectoralis major* muscle samples were taken from 12 broilers on day 20 to assess the populations of satellite cells. On day 21, feed intake, body weight gain and feed conversion measurements were taken. No significant interactions were found between litter condition and dietary protein source over the productive performance and satellite cell populations of broilers. Litter condition and dietary protein source did not have an effect over bird performance and satellite cell activity. Birds fed dietary protein source soybean meal + 2% poultry by-product meal + 2% feather meal showed better feed conversion.

**Keywords:** Litter condition, muscle, poultry, protein sources.

## CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas .....	ii
Resumen .....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos .....	v
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>3</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>15</b>
<b>5. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>16</b>
<b>6. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>17</b>
<b>7. ANEXO .....</b>	<b>19</b>

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXO

Cuadros	Página
1. Tratamientos para el caso de interacciones .....	3
2. Formulación de las dietas utilizadas.....	5
3. Descripción de las categorías de poblaciones celulares utilizadas en el conteo celular.....	7
4. Niveles de significancia de la interacción de los factores fuente de proteína y condición de cama sobre los aspectos productivos de pollos de engorde a 21 días de edad.....	8
5. Efecto del factor tipo de cama sobre el comportamiento productivo de pollos de engorde a 21 días de edad .....	9
6. Efecto del factor dieta sobre el comportamiento productivo de pollos de engorde a 21 días de edad.....	11
7. Niveles de significancia de la interacción de los factores fuente de proteína y condición de cama sobre la taxonomía celular en muestras de <i>Pectoralis major</i> de pollos de engorde a 20 días de edad.....	12
8. Efecto del factor condición de cama sobre la taxonomía celular en muestras de <i>Pectoralis major</i> de pollos de engorde a 20 días de edad .....	13
9. Efecto del factor dieta sobre la taxonomía celular en muestras de <i>Pectoralis major</i> de pollos de engorde a 20 días de edad .....	13
Figuras	Página
1. Composición de aminoácidos en porcentaje de harina de matadero de	
2. aves .....	10
3. Composición de aminoácidos en porcentaje de harina de carne y hueso de bovinos .....	10
4. Composición de aminoácidos en porcentaje de harina de soya .....	11
Anexo	Página
1. Protocolo de tinción desarrollado en el laboratorio de Biología Muscular del Departamento de Ciencias Avícolas de la Universidad de Auburn.....	19

# 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente la industria avícola es una de las mayores productoras de proteína animal en el mercado, esto se debe principalmente a los bajos precios de sus productos en comparación con otras fuentes de proteína como la carne de res y cerdo (Super 2016). A esto se adicionan las nuevas tendencias de consumo de alimentos saludables que apoyan el consumo de carnes blancas por su bajo contenido de grasa (Gottau 2008). En los Estados Unidos, durante el 2016 se consumieron 41.8 kilogramos de pollo por persona siendo éste el consumo de pollo per cápita más alto de la historia (Super 2016).

De acuerdo a los datos mencionados anteriormente, se evidencia que la avicultura representa un rubro muy importante en la economía norteamericana, según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos en 2014 se produjeron 8.54 mil millones de pollos parrilleros (broilers), 9% más que en 2013 (USDA 2015). De acuerdo al censo de agricultura publicado en 2012 por el USDA, se reportaron 233,770 granjas avícolas en los Estados Unidos y según el Instituto Nacional de la Carne (NAMI) la industria de la carne genera 5.4 millones de empleos y paga 257 mil millones de dólares en salarios (Dunham 2014).

Para tener niveles de producción sobresalientes es necesario proveer a los pollos de todas las condiciones ambientales adecuadas para que desempeñen al máximo su potencial genético. La calidad del agua y alimento, así como la temperatura y humedad ambiental son de importancia para el bienestar de las aves. Sin embargo, hay un elemento que juega un rol importante en el desarrollo de las aves, el cual muchas veces no es tomado en cuenta y este es la cama del galpón (Ritz *et al.* 2017).

Se considera cama a la combinación de material absorbente, excreta, plumas, desperdicios de agua y alimento. El material de cama debe de ser liviano, absorbente, barato y no tóxico. La función del material de cama es absorber el exceso de humedad y acelerar el secado al aumentar el área superficial del piso (Ritz *et al.* 2017). Diluye la materia fecal al mismo tiempo que reduce el contacto entre el pollo y esta. Además de las funciones antes mencionadas, la cama sirve como aislante contra el frío y sirve como un cojín que protege a los pollos del piso sólido (Irisarri 2013). Los materiales utilizados comúnmente para cama de galpones son los colochos y aserrín de pino y cascarilla de arroz (Ritz *et al.* 2017).

Debido a la disminución en la disponibilidad de materiales de cama funcionales y el aumento en los precios de los mismos, han llevado a la industria a tomar medidas austeras como la reutilización del material de cama a través de varios ciclos productivos (Yagüe 2009). Esto se puede hacer si la cama recibe labores de mantenimiento como volteos ocasionales y no recibe mucha humedad. Esta práctica ha sido criticada ya que algunos

científicos creen que la reutilización de la cama favorece la proliferación de bacterias y patógenos que afectan la productividad de la parvada (Irisarri 2013).

Ahora bien, estudios realizados por Cressman *et al.* (2010), en la Universidad Estatal de Ohio demostraron que la cama reutilizada contiene mayores concentraciones de micro flora intestinal mientras que la cama nueva contiene mayores concentraciones de bacterias ambientales que muchas veces son las causantes de patologías entéricas. Esto responde al principio de exclusión competitiva en el cual las bacterias benéficas colonizan el intestino y excluyen a las bacterias patógenas, reduciendo así las infecciones gastrointestinales y favoreciendo la productividad de la explotación.

Se conoce que los intestinos de los pollos parrilleros son hábitat para una variedad compleja de microorganismos que juegan un papel crucial en la salud y crecimiento de estas aves. La colonización del intestino por bacterias benéficas aumenta la producción de mucosa, promueve la regeneración de células epiteliales, regula la expresión de genes involucrados en funciones intestinales importantes, en general refuerza el sistema inmunológico y el metabolismo de nutrientes del hospedero (Cressman *et al.* 2010). Asimismo, la alimentación es un factor de mucha importancia en la producción avícola, esta representa alrededor del 75% de los costos totales de producción siendo el costo más grande en la crianza de pollos de engorde (Roush 2010).

La explotación intensiva de la producción avícola ha creado la necesidad de suplementar alimentos que satisfagan todos los requerimientos para el rápido crecimiento y maximizar la producción (Cucca y Ávila 1978). Con respecto a las fuentes de proteína, estas se pueden dividir en dos grupos principales según su procedencia, proteínas vegetales y proteínas animales. Las fuentes vegetales de proteína son generalmente subproductos del procesamiento de vegetales como la soya y el algodón (Kellems y Church 2010). Las fuentes de proteína animal son subproductos reprocesados de la industria cárnica y avícola como la harina de carne y hueso, harina de aves, harina de sangre, entre otras (Irisarri 2013).

Las células satélite están ubicadas entre la lámina basal y la membrana plasmática de las miofibras y se requieren para el crecimiento, mantenimiento y regeneración muscular. Estas pueden ser identificadas ya que expresan factores de transcripción como MyoD y Pax 7 (Bi *et al.* 2018).

Este estudio se concentra en tres fuentes de proteína: harina de ave, harina de carne y hueso y harina de soya. Todas las dietas contienen harina de soya, una de ellas contiene además 4% de harina de carne y otra contiene 2% de harina de matadero avícola más 2% de harina de plumas o sea bajas concentraciones de esas fuentes proteicas de origen animal. Se desconoce el efecto de la interacción entre la condición de cama y diferentes fuentes de proteína en la dieta sobre el desarrollo y crecimiento muscular de los pollos de engorde, por esto resulta necesario investigar esta interacción.

- El objetivo del estudio fue evaluar el desempeño productivo y la actividad mitótica de las células musculares bajo dos condiciones de cama y tres fuentes de proteína en la dieta de pollos de engorde durante los primeros 21 días de vida.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Avícola de la Universidad de Auburn en Alabama, entre los meses de septiembre de 2017 y abril de 2018. Ésta localidad se encuentra a 200 msnm, tiene una precipitación promedio anual de 1337 mm y una temperatura promedio anual de 17.4 °C.

Se evaluó el efecto de tres fuentes de proteína en la dieta (harina de soya, harina de soya + 4% de harina de carne y hueso de bovinos y harina de soya + 2% harina de matadero de aves + 2% harina de plumas) y dos condiciones de cama (nueva vs. reutilizada) en el desempeño productivo y desarrollo muscular de pollos de engorde. Se establecieron relaciones entre los factores mencionados y la actividad miogénica de las células satélite musculares, índice de conversión alimenticia y ganancias diarias de peso. Se utilizaron 300 pollos Yield Plus<sup>®</sup> × Ross 708<sup>®</sup> de sexo femenino y un día de edad (Aviagen 2016) que fueron adquiridos de un criadero comercial en el estado de Alabama.

### **Diseño experimental.**

Se utilizó un diseño factorial 2 × 3 bloques completos al azar con seis tratamientos y 50 repeticiones, donde cada pollo se correspondió con una repetición. Los factores evaluados consistieron en: factor tipo de cama (nueva y reutilizada) y factor fuente de proteína (harina de soya sola, harina de soya + 4% de harina de carne y hueso bovina y harina de soya + 2% de harina de aves + 2% de harina de plumas). Los seis tratamientos se muestran en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Tratamientos para el caso de interacciones.

<b>Tratamiento</b>	<b>Condición de Cama</b>	<b>Fuente de Proteína</b>
1	Nueva	Harina de soya sola
2	Nueva	Harina de soya + 4% harina de carne y hueso de bovinos
3	Nueva	Harina de soya + 4% harina de subproductos de aves
4	Reutilizada	Harina de Soya
5	Reutilizada	Harina de soya + 4% harina de carne y hueso de bovinos
6	Reutilizada	Harina de soya + 4% harina de subproductos de aves

El análisis estadístico se realizó con el programa “Statistical Analysis System” (SAS 9.4®). Los datos de desempeño, así como los datos de taxonomía celular se evaluaron utilizando PROC GLIMMIX con un nivel de significancia de ( $P \leq 0.05$ ). La ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia se corrigieron por mortalidad utilizando covarianza. Se eliminaron datos fuera de tres desviaciones estándar.

### **Crianza de pollos.**

A las 300 hembras se les colocó una etiqueta con un número de identificación en el cuello y se vacunaron contra Newcastle, bronquitis infecciosa y enfermedad de Marek antes de ser transportadas a la Universidad de Auburn. Seguidamente, se colocaron grupos de cinco aves en 60 corrales grupales (corrales de 2.25 m<sup>2</sup>) y se les asignó uno de seis tratamientos al azar. En el día nueve, las aves se redistribuyeron y se colocó un ave por corral (2.25 m<sup>2</sup>) manteniendo el mismo tratamiento que se les asignó al comienzo del experimento.

En el día 20, se tomaron muestras de *Pectoralis major* de 12 pollos seleccionados al azar para evaluar la actividad mitótica de las células satélites musculares. En el día 21 se pesaron todos los pollos y se midió ganancia de peso y consumo de alimento para calcular conversión alimenticia.

La intensidad lumínica se estableció a 30 lux en el día cero y se redujo a 10 y cinco lux en los días seis y 14 respectivamente. El fotoperiodo se estableció a 23 horas de luz y una hora de oscuridad del día cero al seis y se cambió a 18 horas de luz y seis horas de oscuridad hasta la finalización del experimento. La temperatura se programó a 32.5 °C en el día cero y se redujo gradualmente a medida avanzaba la edad de las aves hasta alcanzar un punto final de 21 °C. El comportamiento y bienestar de los pollos, así como las mortalidades fueron monitoreadas dos veces por día.

### **Dietas.**

Las aves tuvieron acceso *ad libitum* al agua y a la dieta que les fue asignada. Las dietas diferían en las fuentes de proteína que contenían pudiendo contener una o tres fuentes de proteína: harina de torta de soya, harina de subproductos de aves o harina de carne y hueso de bovinos. Las proteínas de origen animal recibieron tratamiento térmico para eliminar patógenos antes de ser incluidas en las dietas. El consumo de alimento fue monitoreado individualmente a lo largo del experimento. En el Cuadro 2 se presentan las tres diferentes dietas ofrecidas a las aves de acuerdo a los tratamientos asignados.

**Cuadro 2.** Formulación de las dietas utilizadas.

Ingredientes (%)	Tratamientos		
	Harina de Soya	Harina de subproductos avícolas	Harina de carne y hueso de bovinos
Maíz	59.69	64.59	60.34
Harina de soya	35.54	27.79	32.29
Harina de carne y hueso	-	-	4.00
Harina de plumas	-	2.00	-
Harina de subproductos avícolas	-	2.00	-
Fosfato dicalcico (CaHPO <sub>4</sub> )	1.34	0.95	0.55
Aceite de soya	1.47	0.50	0.93
Carbonato de calcio (CaCO <sub>3</sub> )	0.68	0.67	0.57
Metionina (99%)	0.33	0.32	0.33
Sal (NaCl)	0.33	0.36	0.37
Lisina (78.8%)	0.19	0.33	0.20
Colina (60%)	0.10	0.14	0.10
Pre mezcla de minerales	0.10	0.10	0.10
Treonina (98%)	0.06	0.09	0.06
Premezcla de vitaminas	0.05	0.05	0.05
Premezcla de minerales	0.05	0.05	0.05
Fitasa	0.01	0.01	0.01
<b>Análisis calculado</b>			
Proteína cruda	21.88	21.81	22.69
Energía metabolizable (kcal/kg)	3.03	3.03	3.03
Fósforo disponible (%)	0.48	0.48	0.48
Calcio (%)	0.95	0.95	0.95
Metionina (%)	0.65	0.64	0.67
Lisina (%)	1.36	1.37	1.38

**Toma de muestras.**

En el día 20, 12 pollos fueron seleccionados al azar e inyectados con 5'-bromo-2'-deoxyuridina (BrdU; 100 µg de BrdU por g de peso corporal) para marcar células mitóticamente activas. Luego de la inyección con BrdU las aves se colocaron en canastas desechables por una hora para permitir que las células mitóticamente activas incorporaran el BrdU en su ADN y se marcaran para poder ser detectadas por métodos de inmunquímica y microscopía de fluorescencia. Después del periodo de espera de una hora, las aves fueron sacrificadas y se extrajeron muestras del músculo *Pectoralis major*, estas fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C hasta ser analizadas.

Veinticuatro horas antes de ser seccionadas, las muestras se movieron a un congelador a -20°C. Las muestras fueron crio seccionadas con criostatos Leica CM 1950<sup>®</sup> y Thermo Cryostar NX<sup>®</sup> en secciones de 5 µm de grosor. Se prepararon cuatro portaobjetos con cinco secciones de musculo cada uno y se almacenaron a 4 °C hasta ser teñidas para microscopia de inmunofluorescencia.

### **Tinciones de inmunofluorescencia.**

Todos los protocolos usados para tinciones de inmunofluorescencia, microscopía y taxonomía de células fueron desarrollados por el laboratorio de biología muscular del departamento de ciencias avícolas de la universidad de Auburn en Alabama, Estados Unidos. Se seleccionaron 12 portaobjetos para tinción de inmunofluorescencia, cada portaobjetos contenía cinco crio secciones de *Pectoralis major* correspondientes a los pollos muestreados en el día 20.

El proceso de tinción comienza dibujando un anillo hidrofóbico alrededor de la orilla del portaobjetos con un marcador PAP para evitar que se salieran los químicos usados en la tinción. Luego, se cubrió la parte blanca del portaobjetos que contenía la información de las muestras con esmalte transparente para prevenir que se borrara la información del portaobjetos. Posteriormente, los portaobjetos se sumergieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) por 10 minutos a temperatura ambiente (21°C) para rehidratar el tejido. A continuación, los portaobjetos se transfirieron a un contenedor con una solución de 4% paraformaldehido (PFA) en PBS por 10 minutos a temperatura ambiente.

Luego, los portaobjetos se sumergieron brevemente en PBS para remover residuos de PFA. Inmediatamente después, las muestras se colocaron en un sistema de caja negra humidificada y se les colocó una solución 5% Tritón X-100 en PBS para permeabilizar la membrana celular del tejido. Más tarde, se agregó una solución de ácido clorhídrico 1N y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente para desnaturalizar el ADN y facilitar el acceso de los anticuerpos a utilizar. Posteriormente, se agregó una solución bloqueadora para impedir la unión de antígenos no específicos a las células de interés. Para continuar, se agregó la solución de anticuerpos primarios y se incubó por una hora a temperatura ambiente para marcar las células satélites en el tejido.

Los anticuerpos que no se unieron a las células fueron lavados por medio de inmersiones en PBS. Luego, se agregó la solución de anticuerpos secundarios y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar el tiempo de incubación se removieron los anticuerpos no adheridos por medio de tres inmersiones en PBS. Después de esto, se agregó DAPI diluido en PBS a los portaobjetos y se removió inmediatamente. Finalmente, se agregó medio de montaje de flúor a cada portaobjetos y se les colocó un cubreobjetos de vidrio y se sellaron con esmalte para uñas. Las muestras teñidas se almacenaron a temperatura ambiente por 24 horas hasta ser observadas en el microscopio.

### **Análisis de imágenes digitales.**

Las muestras de musculo fueron observadas y fotografiadas con un microscopio invertido Nikon ECLIPSE Ti<sup>®</sup> utilizando objetivos de 10X y 20X para magnificaciones de 100 y 200X. Las imágenes fueron tomadas y editadas usando el software Nikon Elements y se

usaron para taxonomía celular y medidas de área de fibras musculares. Se tomaron dos imágenes por portaobjetos en dos secciones musculares diferentes.

### **Taxonomía celular**

Se seleccionó una imagen con magnificación de 200X por portaobjetos para realizar la evaluación de taxonomía celular, para esto se utilizó el software Nikon Elements y los conteos se registraron en Microsoft Excel. Se contaron únicamente las células que estaban ubicadas dentro de las fibras musculares y fueron agrupadas en ocho categorías según las señales positivas que presentaron en la microscopía de inmunofluorescencia. En el cuadro 3 se muestran las diferentes categorías de poblaciones celulares utilizadas para la evaluación de actividad miogénica en las muestras de *Pectoralis major*.

**Cuadro 3.** Descripción de las categorías de poblaciones celulares utilizadas en el conteo celular.

<b>Categorías</b>	<b>Descripción</b>
DAPI+	Señala todos los núcleos celulares presentes en el músculo.
MyoD+	Señala la proteína MyoD presente en las células somáticas y células satélites.
BrdU+	Señala las células mitóticamente activas.
Pax7+	Señala Pax7 ubicada en las células satélites.
BrdU+;Pax7+	Señala presencia de Pax7 en células mitóticamente activas.
BrdU+;MyoD+	Señala presencia de MyoD en células mitóticamente activas.
MyoD+;Pax7+	Señal positiva de ambas proteínas.
Pax7+;MyoD+; BrdU+	Señala triple señal positiva de los compuestos en el músculo.
Total de células miogénicas	Es la suma de todas las categorías y células presentes en el músculo.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Aspectos productivos.

No se encontraron interacciones ( $P > 0.05$ ) en los aspectos productivos peso vivo al día cero, peso vivo al día 21, ganancia de peso acumulada, consumo de alimento y conversión alimenticia al día 21 entre los factores fuente de proteína y condición de cama (Cuadro 4), por lo que no se pueden comparar entre sí los seis tratamientos descritos.

**Cuadro 4.** Niveles de significancia de la interacción de los factores fuente de proteína y condición de cama sobre los aspectos productivos de pollos de engorde a 21 días de edad.

	Fuente de Proteína	Condición de Cama	Interacción
Variable	Valor P	Valor P	Valor P
Peso vivo día cero (g/ave)	0.8996	0.0138	0.3471
Peso vivo día 21 (g/ave)	0.2228	0.3030	0.1929
*Ganancia de peso acumulada al día 21 (g/ave)	0.2032	0.272	0.1856
*Consumo de alimento al día 21 (g/ave)	0.1879	0.2225	0.8318
*Conversión alimenticia al día 21	<0.0001	0.0991	0.0796

\* Corregido por mortalidad

En el Cuadro 5, se muestra el efecto del factor condición de cama sobre el comportamiento productivo. Se encontraron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en la variable peso vivo al día cero para el factor condición de cama, sin embargo, dichas diferencias no se debieron directamente al efecto de los tratamientos, sino fue una peculiaridad del proceso de distribución al azar de las aves en los tratamientos.

En general, no se encontraron diferencias significativas a los 21 días entre las condiciones de cama para peso vivo, ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia. Esto coincide con Vejarano *et al.* (2008) quienes no encontraron diferencias significativas al evaluar el efecto de la reutilización de la cama durante cinco campañas en el desempeño productivo de pollos de engorde. Cressman *et al.* (2010) demostraron que el material de cama reutilizado contiene mayores poblaciones de bacterias presentes en el tracto

gastrointestinal de las aves de parvadas anteriores mayormente bacterias del genero Lactobacillus mientras que el material de cama nuevo contiene mayores poblaciones de bacterias ambientales principalmente del género Crostridiales

Al exponer a los pollos de un día de nacidos a este tipo de microorganismos, según el principio de exclusión competitiva las bacterias benéficas colonizarán el tracto intestinal de los pollos previniendo la colonización por parte de microorganismos patógenos reduciendo así la incidencia de patologías entéricas y mejorando el desempeño productivo de las aves, lo cual no ocurrió en este experimento.

**Cuadro 5.** Efecto del factor tipo de cama sobre el comportamiento productivo de pollos de engorde a 21 días de edad.

Variable	Valor P	Condición de Cama		
		Nueva	Reutilizada	E
Peso vivo día cero (g/ave)	0.0138	38a	37b	0.18
Peso vivo día 21(g/ave)	0.3030	671	682	7
*Ganancia de peso acumulada al día 21 (g/ave)	0.272	634	645	7
*Consumo de alimento al día 21 (g/ave)	0.2225	798	810	7
*Conversion alimenticia al día 21	0.0991	1.2750	1.2496	0.01

\* Corregido por mortalidad

E = Error estándar de la media

En el Cuadro 6, se muestra que el factor fuente de proteína en la dieta no tuvo efecto sobre el peso vivo, ganancia de peso y consumo de alimento, sin embargo, tuvo un efecto significativo sobre la conversión alimenticia de las aves al día 21. Las aves a las que se les proveyó la dieta que contenía harina de soya + 4% harina de subproductos de aves fueron las que mostraron una mejor conversión alimenticia.

Es posible que desde el punto de vista nutricional el balance de amino ácidos se haya favorecido con el empleo de las harinas de mataderos de aves. En las figuras uno, dos y tres (Figura 1, 2 y 3) se observa una comparación del perfil de aminoácidos de las tres fuentes de proteína empleadas en el experimento según el NRC (1994). Se puede observar que la harina de matadero de aves tiene un mayor porcentaje de metionina y cisteína al compararlo con las otras dos fuentes de proteína (harina de soya y harina de carne y hueso de bovinos).

Salvador y García (2017), mencionan que, al aplicar los principios de proteína ideal, es posible partir del primer nivel del aminoácido limitante aceptado como el requerimiento de la población, que en aves resultan ser los aminoácidos azufrados (metionina y cisteína). Además, se observan mayores niveles de Arginina, Leucina, Treonina y Valina en la harina

de matadero de aves. Al tener un mejor balance de aminoácidos, la harina de matadero de aves permitió una mejor conversión alimenticia.

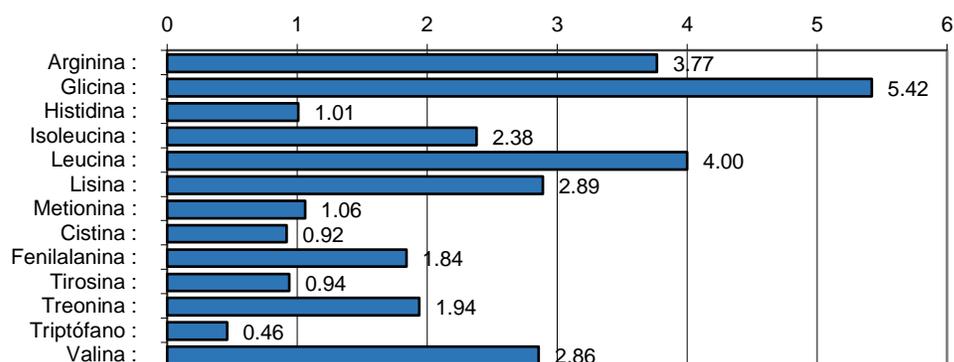


Figura 1. Composición de aminoácidos en porcentaje de harina de matadero de aves (NRC 1994).

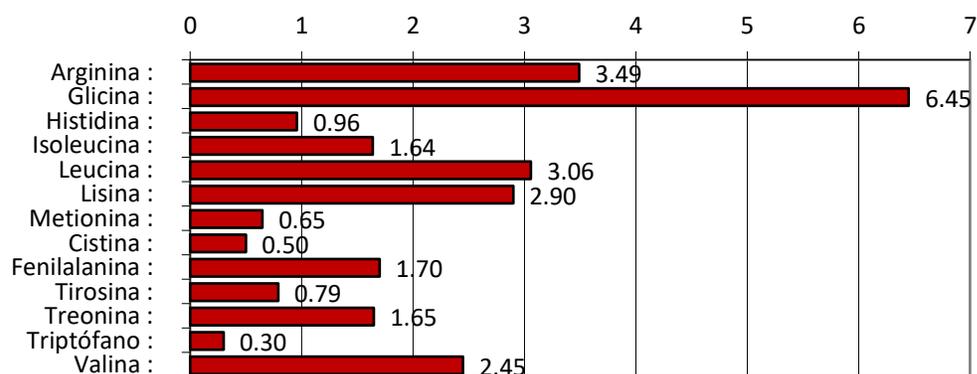


Figura 2. Composición de aminoácidos en porcentaje de harina de carne y hueso de bovinos (NRC 1994).

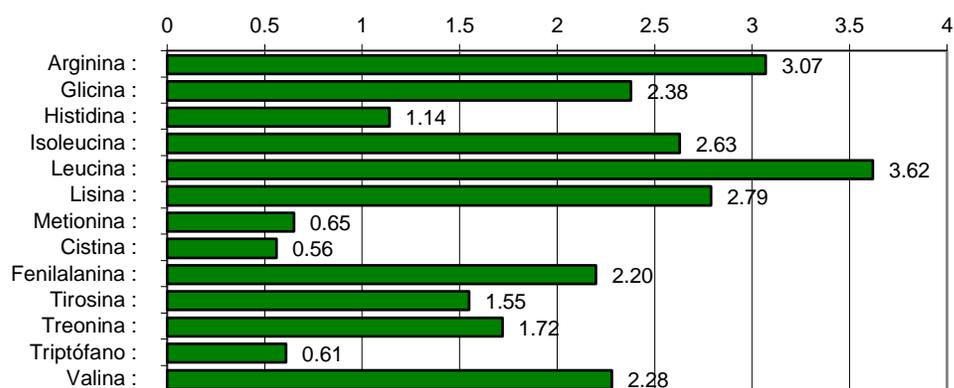


Figura 3. Composición de aminoácidos en porcentaje de harina de soya (NRC 1994).

**Cuadro 6.** Efecto del factor dieta sobre el comportamiento productivo de pollos de engorde a 21 días de edad.

Variable	Valor P	Fuente de Proteína			
		HCH	HAS	HS	E
Peso vivo día cero (g/ave)	0.8996	37	37	37	0.23
Peso vivo día 21(g/ave)	0.2228	669	669	672	9
*Ganancia de peso acumulada al día 21 (g/ave)	0.2032	631	652	635	9
*Consumo de alimento al día 21 (g/ave)	0.1879	807	791	813	9
*Conversion alimenticia al día 21	<0.0001	1.28 <sup>a</sup>	1.21 <sup>b</sup>	1.30 <sup>a</sup>	0.01

\* Corregido por mortalidad

HCH = Harina de soya + 4% harina de carne y hueso de bovinos.

HAS = Harina de soya + 2% harina de plumas + 2% de harina de matadero avícola.

HS = Harina de soya

E = Error estándar de la media

### Conteos celulares.

Se muestra que no hubo interacciones significativas ( $P > 0.05$ ) de los factores fuente de proteína y condición de cama sobre las poblaciones de células satélite presentes en las muestras de *Pectoralis major* evaluadas de pollos a los 20 días de edad (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Niveles de significancia de la interacción de los factores fuente de proteína y condición de cama sobre la taxonomía celular en muestras de *Pectoralis major* de pollos de engorde a 20 días de edad.

	Fuente de Proteína	Condición de Cama	Interacción
Variable	Valor P	Valor P	Valor P
DAPI+ / mm <sup>2</sup>	0.7087	0.7872	0.9949
BrdU+ / mm <sup>2</sup>	0.3759	0.7905	0.4739
MyoD+ / mm <sup>2</sup>	0.7377	0.1451	0.1527
Pax7+ / mm <sup>2</sup>	0.4113	0.4759	0.4449
MyoD+;BrdU+ / mm <sup>2</sup>	0.8699	0.1273	0.2684
BrdU+;Pax7+ / mm <sup>2</sup>	0.9349	0.1621	0.7985
MyoD+;Pax7+ / mm <sup>2</sup>	0.4619	0.2410	0.1945
MyoD+;Pax7+;BrdU+ / mm <sup>2</sup>	0.4690	0.9435	0.7552
Total de células miogénicas / mm <sup>2</sup>	0.9566	0.1522	0.1064

Como se puede observar en el Cuadro 8, el factor condición de cama no tuvo efecto significativo sobre la taxonomía celular de las muestras del músculo *Pectoralis major* de pollos de engorde a 20 días de edad. Arana y Calderón (2017), demostraron que la cantidad de células miogénicas en el músculo está influenciada por la línea de las aves y por el tipo de músculo evaluado mientras que otros factores como el sexo de las aves no tienen efecto sobre las poblaciones de células miogénicas. Este estudio demostró que la condición de cama en la que se crían los pollos es otro factor que no afecta las poblaciones de células miogénicas.

**Cuadro 8.** Efecto del factor condición de cama sobre la taxonomía celular en muestras de *Pectoralis major* de pollos de engorde a 20 días de edad.

Variable	Valor P	Condición de Cama		
		Nueva	Reutilizada	E
DAPI+ / mm <sup>2</sup>	0.7872	888	952	166
BrdU+ / mm <sup>2</sup>	0.7905	60	55	15
MyoD+ / mm <sup>2</sup>	0.1451	117	242	58
Pax7+ / mm <sup>2</sup>	0.4759	78	63	14
MyoD+;BrdU+ / mm <sup>2</sup>	0.1273	19	37	8
BrdU+;Pax7+ / mm <sup>2</sup>	0.1621	9	2	3
MyoD+;Pax7+ / mm <sup>2</sup>	0.2410	42	71	17
MyoD+;Pax7+;BrdU+ / mm <sup>2</sup>	0.9435	10	10	3
Total de células miogénicas / mm <sup>2</sup>	0.1522	236	376	66

E = Error estándar de la media

No se encontraron diferencias significativas en la evaluación del efecto del factor fuente de proteína sobre las poblaciones de células satélites de muestras de *Pectoralis major* de pollos de engorde a 20 días de edad (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Efecto del factor dieta sobre la taxonomía celular en muestras de *Pectoralis major* de pollos de engorde a 20 días de edad.

Variable	Valor P	Fuente de Proteína			E
		HCH	HAS	HS	
DAPI+ / mm <sup>2</sup>	0.7087	819	1040	900	218
BrdU+ / mm <sup>2</sup>	0.3759	38	60	74	19
MyoD+ / mm <sup>2</sup>	0.7377	205	201	133	76
Pax7+ / mm <sup>2</sup>	0.4113	52	78	82	18
MyoD+;BrdU+ / mm <sup>2</sup>	0.8699	31	29	24	10
BrdU+;Pax7+ / mm <sup>2</sup>	0.9349	5	5	7	4
MyoD+;Pax7 / mm <sup>2</sup>	0.4619	61	36	72	22
MyoD+;PAX7+;BRDU+ / mm <sup>2</sup>	0.4690	8	8	15	4
Total de células miogénicas / mm <sup>2</sup>	0.9566	318	315	286	86

HCH = Harina de soya + 4% harina de carne y hueso de bovinos.

HAS = Harina de soya + 2% harina de plumas + 2% de harina de matadero avícola.

HS = Harina de soya

E= Error estándar de la media

Powell *et al.* (2014), mencionan que las células miogénicas en pollos de engorde están máximamente activas durante las primeras horas pos eclosión y hasta la primera semana pos eclosión, después de eso la actividad de estas se reduce rápidamente. Esto pudo haber

afectado los resultados de este estudio ya que las muestras de *Pectoralis major* se tomaron al día 20 pos eclosión y es posible que la actividad de las células miogénicas ya se hubiera disminuido para entonces. En futuras investigaciones se deberían de tomar muestras durante la primera semana pos eclosión y compararlas con los resultados de este proyecto para evaluar más objetivamente las diferencias en poblaciones de células miogénicas entre diferentes tratamientos.

#### **4. CONCLUSIONES**

- El tipo de cama (nueva y reutilizada) no influye sobre el comportamiento productivo y actividad miogénica de pollos de engorde a 21 días de edad.
- La inclusión de 4% de harina de carne y hueso de bovinos y 2% de harina de matadero avícola + 2% de harina de plumas en dietas de maíz-soya no tiene efecto sobre el comportamiento productivo y la actividad miogénica de las células satélites de pollos de engorde en la etapa de uno a 21 días de edad.
- La adición de 2% de harina de matadero avícola + 2% de harina de plumas en las dietas de maíz-soya mejora la conversión alimenticia de pollos de engorde criados de uno a 21 días de edad.

## **5. RECOMENDACIONES**

- Repetir el experimento con un mayor número de repeticiones para ver si al tener una muestra más grande se encuentran diferencias entre los tratamientos.
- Tomar muestras de músculo durante la primera semana pos eclosión para comparar las poblaciones de células miogénicas con las observadas en las muestras del día 20.
- Incluir 2% de harina de matadero de aves + 2% harina de plumas en dietas de maíz-soya para mejorar la conversión alimenticia de las aves.

## 6. LITERATURA CITADA

- Arana J, Calderón A. 2017. Evaluación de la heterogeneidad en la población de células madres miogénicas y la morfometría de las fibras musculares en pollos de engorde [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano-Honduras. 16 p.
- Aviagen. 2016. Broiler Yield Plus x Ross 708 Performance Objectives. 1-12. [http://www.rossna.aviagen.com/assets/Tech\\_Center/Specialty\\_Males//YPx708-BroilerPO2016-EN.pdf](http://www.rossna.aviagen.com/assets/Tech_Center/Specialty_Males//YPx708-BroilerPO2016-EN.pdf)
- Bi P, McAnally J, Shelton J, Sanchez-Ortiz E, Bassel-Duby R, Olson E. 2018. Fusogenic micropeptide is essential for satellite cell fusion and muscle regeneration. [consultado 2018 ago 05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29581287>
- Cressman M, Yu Z, Nelson M, Moeller S, Lilburn M, Zerby H, 2010. Interrelations between the Microbiotas in the Litter and in the Intestines of Commercial Broiler Chickens. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(19):6572-6582.
- Cucca M, Ávila G, 1978. Fuentes de energía y proteína para la alimentación de las aves. *Ciencia veterinaria*. 2:326-352.
- Dunham J. 2014. New Economic Impact Study Shows U.S. Meat and Poultry Industry Represents \$1.02 Trillion in Total Economic Output [internet]. New York City (EE.UU.). North American Meat Institute. [consultado 2018 jun 01]. <file:///D:/Downloads/News-Release-Meat-Fuel-America-2016.pdf>.
- Gottau G. 2008. Carne de pollo (I): su composición nutricional [internet]. Argentina: Vitónica [consultado 2018 jul 02]. <https://www.vitonica.com/proteinas/carne-de-pollo-y-su-composicion-nutricional>.
- Irisarri M. 2013. Manejo y tratamiento de camas en producción avícola [internet]. Buenos Aires (Argentina): Engormix [consultado 2018 jul 04]. <https://www.engormix.com/avicultura/articulos/manejo-tratamiento-camasproduccion t30517 .htm>.
- Kellems R, Church D. 2010. *Livestock feeds and feeding*. 6th ed. New Jersey (EE.UU): Prentice Hall. 711 p.

- National Research Council. 1994. Nutrient Requirements of Poultry. Ninth Revised Edition. Washington DC (EE.UU): The National Academies Press. [consultado 2018 jul 29]. <https://www.nap.edu/catalog/2114/nutrient-requirements-of-poultry-ninth-revised-edition-1994>.
- Powell DJ, McFarland DC, Cowieson AJ, Muir WI, Velleman SG. 2014. The effect of nutritional status and muscle fiber type on myogenic satellite cell fate and apoptosis. *Poultry Science*. 93(1): 163-173.
- Ritz C, Fairchild BD, Lacy MP. 2017. Litter quality and broiler performance [internet]. University of Georgia (EE.UU.) [consultado 2018 abr 10]. <http://extension.uga.edu/publications/detail.html?number=B1267>
- Roush W. 2010. Livestock feeds and feeding. 6th ed. New Jersey (EE.UU): Prentice Hall. 711 p.
- Salvador F, García I. 2017. Formulación de raciones con aminoácidos digestibles en especies no rumiantes [internet] Engormix; [consultado 2018 ago 05]. <https://www.engormix.com/avicultura/articulos/formulacion-racionesaminoacidos-digestibles-t40697.htm>
- Super T. 2016. State of chicken: consumption at all- time high. [internet]. Washington, DC. The National Provisioner; [consultado 2018 abr 10]. <https://www.provisioneronline.com/articles/103922-state-ofchickenconsumtion-at-all-time-high>.
- USDA. 2017. Poultry – Production and Value. [internet]. U.S. Department of Agriculture, National Agricultural Statistics Service (NASS). [consultado 2018 jun 22]. <file:///D:/Downloads/PoulProdVa-04-28-2017.pdf>.
- Vejarano M, Alba M, Reina P, Casas E, 2008. Comparación productiva de pollos criados en camas nuevas vs camas reutilizadas por cinco campañas. *Revista de investigaciones veterinarias del Perú*. 19(2):126-133.
- Yagüe U. 2009. La reutilización de las camas en la avicultura no aumenta los riesgos sanitarios. Embrapa (Brasil): albeitar [consultado 2018 jul 02]. <https://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/4265/especial-figan-archivo/la-reutilizacion-de-las-camas-en-avicultura-no-aumentan-los-riesgossanitarios.html>.

## 7. ANEXO

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

**EXP F1-2017-005**  
**Immunofluorescence Staining Protocol for: BrdU – MyoD – Pax7**

**I. Fixative:**  
4% paraformaldehyde (PFA) in PBS (pH of 7.4)

**II. Blocking Solution:**  
10% Horse Serum (HS)/ 2% Bovine Serum Albumin (BSA)/0.2% TritonX-100 in PBS (pH of 7.4)

III. Primary Antibodies	IV. Secondary Antibodies
1) BrdU (#52) a. Mouse IgG2a b. Cat.#: MA3071 (Lot: _____) c. Dilution of 1:1000	1) Goat anti-Mouse IgG2a Alexa-Fluor 488 g. Cat.#: A21131 (Lot: _____) Dilution of 1:1000
2) MyoD (#19) a. Mouse IgG2b b. Cat.#: sc-377460 (Lot: _____) c. Dilution of 1:2,000	2) Goat anti-mouse IgG2b Alexa-Fluor 546 h. Cat.#: A21143 (Lot: _____) i. Dilution of 1:1000
3) Pax7 (# N/A) d. Mouse IgG1 e. Cat.#: Pax7 (Lot : _____) f. Dilution of 1:10	3) Goat anti-mouse IgG1 Alexa-Fluor 633 (#43) j. Cat.#: A21126 (Lot: _____) k. Dilution of 1:1000

**V. Nuclear Counterstain**  
**DAPI** (0.1 mg / mL); Cat. #:268298; JS/KM/MH; Dilution of 1:1000

**VI. Calculations and Staining Solution Preparation:**

**Blocking solution (BS):** 6 slides × 400 µL per slide × 3 step = 7,200 µL of BS → Round to 8,000 µL of BS  
BS components:  
10% (0.1) horse serum (HS) × 8,000 µL BS = **800 µL HS**  
0.5% bovine serum albumen (BSA) = 0.005 g BSA × 8,000 µL BS ×  $\left(\frac{1\text{g}}{1,000\text{mg}}\right)$  = **0.04 g BSA**  
In: (3,000 µL BS – 300 µL HS) = **7,200 µL Triton X** (0.2% in PBS)

**Primary Antibody Solution (1° Ab)**

BrdU (1:1000 dilution)	325 µL / 1000 = 0.325 µL × 6 slides =	<b>1.95 µL</b>
MyoD (1:2000 dilution)	325 µL / 2,000 = 0.163 µL × 6 slides =	<b>0.98 µL</b>
Pax7 (1:10 dilution)	325 µL / 10 = 32.5 µL × 6 slides =	<b>195 µL</b>
	<b>TOTAL:</b>	<b>197.93 µL 1° Ab</b>
		<b>In: 1752.07 µL BS</b>
	<b>Total Volume of Primary Ab Solution</b>	<b>1950 µL</b>

**Secondary Antibody Solution (2° Ab) Remember to centrifuge antibody tubes 5 s before pipetting Ab out of them!**

AlexaFluor 488 (A11006) (1:1000 dilution)	325 µL / 1,000 = 0.325 µL × 6 slides =	<b>1.95 µL</b>
AlexaFluor 546 (A21143) (1:1000 dilution)	325 µL / 1,000 = 0.325 µL × 6 slides =	<b>1.95 µL</b>
AlexaFluor 633 (A21126) (1:1000 dilution)	325 µL / 1,000 = 0.325 µL × 6 slides =	<b>1.95 µL</b>
	<b>TOTAL:</b>	<b>5.85 µL</b>
		<b>In: 1944.15 µL</b>
	<b>Total Volume of Secondary Ab Solution</b>	<b>1950 µL</b>

**DAPI Solution** (1:1000 dilution): 325 µL / 1000 = 0.325 µL × 6 slides = **1.95 µL DAPI** in **1,948 µL PBS**

## CHECK VII. Staining Procedure:

_____	<ul style="list-style-type: none"> <li>Record IF stain information on slide. While the slide is dry, use the hydrophobic ring around the edge of each slide mounted with 5 <math>\mu</math>m to be stained being careful not to touch any tissue with the PAP. <b>Set #: _____ of 1</b> <b>Date Stained: _____</b></li> </ul>	_____
_____	<ul style="list-style-type: none"> <li>Coat frosted portion with fingernail polish. Allow to dry.</li> </ul>	_____
_____	<ul style="list-style-type: none"> <li>Place the slide in a colored Coplin jar (slide staining container) containing enough volume of <b>1X PBS</b> to cover the slides up to the frosted portion and <i>incubate at RT for 10 min</i> to rehydrate the tissue.</li> </ul>	_____
_____	<ul style="list-style-type: none"> <li>Transfer the slides to a Coplin jar containing <b>4% PFA in PBS</b> and <i>incubate at RT for 10 min</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>Aspirate PFA off of each slide at the end of the 10 min incubation and immediately place slides in slide holder in PBS. <b>Slides should never dry out!</b></li> </ul> </li> </ul>	_____
_____	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rinse 2X briefly (dunk) in PBS in two separate Coplin jars to remove any residual fixative.           <ul style="list-style-type: none"> <li>Use 2 PFA-designated Coplin jars for this step and aspirate waste PBS from the jar.</li> </ul> </li> </ul>	_____
_____	<ul style="list-style-type: none"> <li>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.</li> </ul>	_____
_____	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pipette 300 <math>\mu</math>L of <b>0.5% TritonX-100 in PBS</b> 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"> <li>Aspirate the solution off of each slide after incubation.</li> </ul> </li> </ul>	_____
_____	<ul style="list-style-type: none"> <li>Denature DNA (to improve anti-BrdU antibody binding access) by incubating the slides in <b>300 <math>\mu</math>L of 1N hydrochloric acid (HCl)</b> solution for <i>5 min at RT</i> in the humidified black box.           <ul style="list-style-type: none"> <li>Aspirate the solution off of each slide after incubation.</li> </ul> </li> </ul>	_____
_____	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rinse briefly (dunk) in PBS           <ul style="list-style-type: none"> <li>Aspirate the solution off of each slide after incubation.</li> </ul> </li> </ul>	_____
_____	<ul style="list-style-type: none"> <li>Add 300 <math>\mu</math>L of <b>Blocking Solution</b> 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"> <li>Aspirate the <b>blocking solution</b> off of each slide after incubation.</li> </ul> </li> </ul>	_____
_____	<ul style="list-style-type: none"> <li>Add 300 <math>\mu</math>L of <b>primary antibody solution</b> to each slide <b>ONE SLIDE AT A TIME</b> (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"> <li>Aspirate the <b>primary antibody solution</b> off of each slide after incubation and immediately place in PBS one slide at a time so that they never dry.</li> </ul> </li> </ul>	_____
_____	<ul style="list-style-type: none"> <li>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"> <li>Use 4 Coplin jars containing enough volume to cover the slide up to the frosted section.</li> </ul> </li> </ul>	_____
_____	<ul style="list-style-type: none"> <li>Add 300 <math>\mu</math>L of <b>secondary antibody solution</b> to each slide and <i>incubate for 30 min at RT</i> in the humidified box.</li> </ul>	_____
_____	<ul style="list-style-type: none"> <li>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"> <li>Use 4 Coplin jars containing enough volume to cover the slide up to the frosted section.</li> </ul> </li> </ul>	_____
_____	<ul style="list-style-type: none"> <li>Remove all slides from PBS <b>ONE SLIDE AT A TIME</b> and add 300 <math>\mu</math>L of <b>DAPI solution</b> to each slide to stain all nuclei. Aspirate DAPI before rinsing in BSA.</li> </ul>	_____
_____	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rinse with PBS briefly 2X to remove any residual DAPI.</li> </ul>	_____
_____	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>ONE SLIDE AT A TIME</b>, remove slides from PBS and coverslip using <b>150 <math>\mu</math>L</b> of fluorescence mounting media (FluorGel). Wick off excess mounting media using a paper towel. Then, use fingernail polish to seal the edges of the slide fully.           <ul style="list-style-type: none"> <li>Leave all slides in PBS while coverslipping and nail polishing <b>ONE</b> slide at a time.</li> </ul> </li> </ul>	_____
_____	<ul style="list-style-type: none"> <li>Place slides in a slide box horizontally and incubate at RT in the hood in microscopy overnight to ensure the nail polish sealant is completely dry before putting on microscope stage.</li> </ul>	_____
_____	<ul style="list-style-type: none"> <li>Once dry and imaged, the slides may be stored at RT.           <ul style="list-style-type: none"> <li><b>NOTE:</b> The fluorescent signal is usually only strong enough for analysis for 3 days.</li> </ul> </li> </ul>	_____