

UNIVERSIDAD DE MURCIA  
FACULTAD DE VETERINARIA

TESIS DOCTORAL

"ORGANIZACION MORFOLOGICA E HISTOQUIMICA DE  
LOS DISTINTOS TIPOS DE FIBRAS QUE INTEGRAN EL  
MUSCULO FLEXOR CARPORRADIAL DEL PERRO".

RAFAEL LATORRE REVIRIEGO.  
NOVIEMBRE, 1990.

FRANCISCO GIL CANO, TITULAR DE ANATOMIA Y EMBRIOLOGIA DE  
LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA.

INFORMA:

Que D. RAFAEL LATORRE REVIRIEGO, licenciado en  
Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección y  
asesoramiento el presente trabajo sobre "ORGANIZACION  
MORFOLOGICA E HISTOQUIMICA DE LOS DISTINTOS TIPOS DE  
FIBRAS QUE INTEGRAN EL MUSCULO FLEXOR CARPORADIAL DEL  
PERRO", el cual considero reúne las condiciones y calidad  
científica deseadas para su presentación por el  
interesado, con vistas a optar al título de doctor.

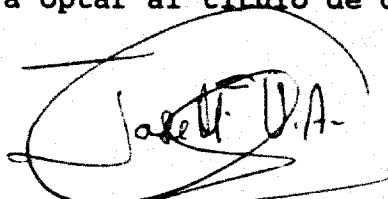


Murcia, 26 de Noviembre de 1990.

JOSE MARIA VAZQUEZ AUTON, TITULAR DE ANATOMIA Y  
EMBRIOLOGIA DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA  
UNIVERSIDAD DE MURCIA.

INFORMA:

Que D. RAFAEL LATORRE REVIRIEGO, licenciado en  
Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección y  
asesoramiento el presente trabajo sobre "ORGANIZACION  
MORFOLOGICA E HISTOQUIMICA DE LOS DISTINTOS TIPOS DE  
FIBRAS QUE INTEGRAN EL MUSCULO FLEXOR CARPORADIAL DEL  
PERRO", el cual considero reúne las condiciones y calidad  
científica deseadas para su presentación por el  
interesado, con vistas a optar al título de doctor.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Jose M. V.A.", enclosed within a large, loopy circular scribble.

Murcia, 26 de Noviembre de 1990.

FRANCISCO MORENO MEDINA, CATEDRATICO DE ANATOMIA Y EMBRIOLOGIA DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA.

INFORMA:

Que D. RAFAEL LATORRE REVIRIEGO, licenciado en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo sobre "ORGANIZACION MORFOLOGICA E HISTOQUIMICA DE LOS DISTINTOS TIPOS DE FIBRAS QUE INTEGRAN EL MUSCULO FLEXOR CARPORRADIAL DEL PERRO", el cual considero reúne las condiciones y calidad científica deseadas para su presentación por el interesado, con vistas a optar al título de doctor.



Murcia, 26 de Noviembre de 1990.

A mis padres.

A Pilar.

A Quique.

INDICE

## INDICE

<u>I. INTRODUCCION.</u> .....	1
<u>II. REVISION BIBLIOGRAFICA.</u> .....	3
II.1 SOBRE LOS TIPOS DE FIBRAS DEL MUSCULO ESQUELETICO .....	3
II.2 ASPECTOS HISTOQUIMICOS DE LA FIBRA MUSCULAR DURANTE EL DESARROLLO .....	15
II.3 DISTRIBUCION FIBRILAR. ....	18
<u>III. MATERIAL Y METODO.</u> .....	21
III.1 ANIMALES EMPLEADOS Y TOMA DE MUESTRAS .....	21
III.2 PROCESADO DE LAS MUESTRAS .....	23
III.3 TECNICAS HISTOQUIMICAS UTILIZADAS .....	24
III.3.1 TECNICAS ATP <sup>asa</sup> MIOSINICAS .....	24
III.3.2 TECNICAS NADH-TR Y M-GPDH .....	33
III.4 MORFOMETRIA .....	35
III.5 MICROFOTOGRAFIADO .....	36
<u>IV. RESULTADOS</u> .....	49
A. RESULTADOS EN EL MUSCULO SEMITENDINOSO DE PERROS ADULTOS .....	37
B. RESULTADOS EN EL MUSCULO FLEXOR CARPORRADIAL DE PERROS ADULTOS .....	45
C. DESARROLLO POSTNATAL DEL MUSCULO SEMITENDINOSO .....	54
D. DESARROLLO POSTNATAL DEL MUSCULO FLEXOR CARPORRADIAL .....	64
<u>V. DISCUSION.</u> .....	83
V.1 DE LOS TIPOS DE FIBRAS Y METODOLOGIA EMPLEADA (ANIMALES ADULTOS) .....	83
V.2 DE LA DISTRIBUCION FIBRILAR EN EL MUSCULO FLEXOR CARPORRADIAL (ANIMALES ADULTOS). ....	87
V.3 DEL COMPORTAMIENTO DE LAS FIBRAS DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL. ....	90
<u>VI. RESUMEN</u> .....	97
<u>VII. CONCLUSIONES</u> .....	100
<u>VIII. BIBLIOGRAFIA.</u> .....	103

## INTRODUCTION



## I.- INTRODUCCION.

Las técnicas histoquímicas aplicadas a secciones transversales de músculo esquelético aportan información sobre los tipos de fibras, distribución y tamaño de las mismas, lo que en definitiva contribuye al conocimiento de la estructura y función muscular. Basándonos en estos hechos, planteamos el presente trabajo, enmarcado dentro de la línea de investigación que desde 1982 desarrolla la Unidad Docente de Anatomía y Embriología de la Facultad de Veterinaria de Murcia. El músculo flexor carporradial fue elegido a raíz de las investigaciones llevadas a cabo por **McCONATHY et al.**, (1983), quienes en un extenso estudio indican la presencia de dos cabezas con distribución fibrilar muy peculiar, de lo que se pueden extraer interesantes conclusiones sobre la función muscular. Sin embargo, cuando comenzamos a aplicar las técnicas histoquímicas sobre el referido músculo, nos encontramos con diversos problemas concernientes a la identificación fibrilar. La dificultad para establecer los tipos de fibras que integran el músculo esquelético del perro ya había sido advertida por numerosos

investigadores. Teniendo en cuenta estas premisas, surgieron los trabajos de MORENO Y GIL (1986), y nos obligó a incluir un nuevo objetivo en nuestro trabajo: la selección y adecuación de distintas técnicas histoenzimáticas al músculo del perro, con el fin de proceder a la correcta identificación de los tipos de fibras. Por esta razón, analizamos también el M. semitendinoso, que fue tomado como referencia a la hora de abordar dichos aspectos. Elegimos este músculo, por haberse descrito en él hasta cuatro tipos distintos de fibras (SNOW et al., 1982), lo que supone una garantía para la fiabilidad de las técnicas empleadas. Decidimos completar nuestro trabajo con el estudio de ambos músculos durante el desarrollo postnatal (0-65 días), resultados que nos permiten corroborar las observaciones realizadas en el adulto. La descripción de los resultados se fundamenta en el análisis de los aspectos histoquímicos que muestran las fibras del músculo esquelético del perro y se complementa con datos referentes a la morfometría fibrilar. Las relaciones establecidas por los miembros de esta Unidad Docente con el Prof. Francesco Mascarello, prolífico investigador de estos temas, nos permitieron acceder a nuevas técnicas, resultando sus recomendaciones y sugerencias imprescindibles para el logro de nuestros objetivos, razón por la cual le quedamos enormemente agradecidos.

**REVISION BIBLIOGRAFICA**

## II.- REVISION BIBLIOGRAFICA.

### II.1.- SOBRE LOS TIPOS DE FIBRAS DEL MUSCULO ESQUELETICO:

#### Introducción histórica:

Desde que **STEFANO LORENZINI\*** en 1678 clasificara a los músculos por su color en rojos y blancos, se inician una serie de estudios que tratan de buscar una explicación a este hecho en base a características estructurales y/o fisiológicas de la propia fibra muscular. Los estudios más extensos en la mitad del siglo XIX los realiza **RANVIER\*** (1873, 1874 Y 1880), quien además de confirmar las observaciones previas referentes al mayor aporte de sangre que recibe el músculo rojo, establece la correlación fibras rojas: contracción lenta, fibras blancas: contracción rápida.

La distinción de fibras por su mayor o menor contenido en gránulos es realizada por **KOLLIKER\*** (1857), y relaciona a los mismos con el metabolismo fibrilar. Estas observaciones son corroboradas posteriormente por

**SRUTZNER\*** (1884); **RETZIUS\*** (1890) propone la denominación de "sarcosomas" (mitocondrias) para dichos gránulos. Un año más tarde, **KNOLL\*** (1891) sugiere clasificar a las fibras en ricas y pobres en protoplasma (fibras oscuras y claras, respectivamente). Observa además, que músculos de actividad constante (oculomotores, masticadores, respiratorios), se encuentran integrados mayoritariamente por fibras oscuras. Manifiesta asimismo, que los gránulos presentes en las fibras son de naturaleza lipídica. La técnica del sudán III es aplicada por **BULLARD\*** (1919), clasificando a las fibras en oscuras, intermedias y claras según su mayor o menor contenido en grasa, respectivamente. Indica, también, que la proporción y tamaño de esas fibras es variable dependiendo del músculo. **DENNY/BROWN\*** (1929), encuentran en el gato fibras oscuras y claras de acuerdo con el planteamiento anterior, e intentan, sin conseguirlo, establecer una correlación entre las características histológicas de las fibras y su velocidad de contracción.

Mediante centrifugación, **BENSLEY/HOERR\*** (1934) consiguen localizar ciertas enzimas de diferentes fracciones de las fibras musculares, demostrando una correlación entre la densidad mitocondrial y la actividad respiratoria. Los estudios de **PAUL/SPERLING\*** (1952) confirman esto último al evidenciar que en los músculos blancos pobres en mitocondrias, la actividad respiratoria es mucho más baja que en los músculos rojos, ricos en mitocondrias.

(\*) Autores citados por Dubowitz (1985).

### **La histoquímica aplicada al músculo esquelético:**

Con la llegada de las técnicas histoquímicas que permiten la localización de ciertas enzimas y otros componentes químicos a nivel celular en el músculo esquelético, es posible establecer la correlación directa entre morfología fibrilar y actividad funcional. Usando la clásica técnica del azul de metileno, que permite la detección de la actividad succinicodehidrogenasa (SDH), **SEMENOFF** (1935) encuentra variaciones entre las fibras de músculos de anfibios. **SELIGMANG/RUTENBURG** (1951) y **PADYKULA** (1952) encuentran esta variación también en el músculo de la rata, pero aplicando ya técnicas más sensibles y depuradas para la detección de dicha enzima. La actividad SDH es también estudiada por **WACHSTEIN/MEISEL** (1955) y **BUÑO/GERMINO** (1958), quienes encuentran mayor proporción de fibras que reaccionan fuertemente a la SDH en los músculos masetero y diafragma, en relación con los músculos de los miembros. **NACHMIAS/PADYKULA** (1958) indican que la reacción SDH más fuerte tiene lugar en las fibras que son más pequeñas, sugiriendo que las mismas contienen un mayor número de mitocondrias por unidad de área.

Una relación recíproca entre la actividad fosforilasa y varias enzimas oxidativas es encontrada por **DUBOWITZ/PEARSE** (1960a,b), denominándolas de la siguiente forma:

Fibras tipo 1: alta actividad oxidativa y baja glucolítica.

**Fibras tipo 2: baja actividad oxidativa y alta glucolítica.**

Sobre biopsias de músculo humano, **ENGEL** (1962) también es partidario de denominar así a las fibras, pero haciéndolo en base a la **actividad ATPasa** miofibrilar, correspondiéndose las fibras tipo 1 y 2 con fibras de baja y alta actividad, respectivamente.

Introduciendo preincubaciones y variaciones de pH (9.4, 4.6 y 4.3) a la técnica de la ATPasa, **BROOKE/KAISER** (1970), definen tres tipos de fibras en el músculo del hombre. De esta forma, a las fibras tipo I (de color claro a pH 9.4) añaden dos subtipos dentro de las fibras tipo II (de color oscuro a pH 9.4), que denominan **IIA** (claras a pH 4.6 y 4.3) y **IIB** (oscuras a pH 4.6 y claras a pH 4.3). Incluso llegan a reconocer un tercer subtipo, las fibras **IIC**, que siguen siendo algo oscuras a pH 4.3.

La diferenciación de tres tipos de fibras, en base a la técnica de la **SDH** es realizada por **OGATA** (1958), quien trabajando sobre músculos de peces, aves, mamíferos y anfibios describe:

- a) Fibras de gran tamaño, blancas y de escasa actividad enzimática.
- b) Fibras de pequeño tamaño, rojas y de elevada actividad enzimática.

c) Fibras de tamaño intermedio, con actividad enzimática media.

Tres tipos de fibras son también reconocidos por **STEIN/PADYKULA** (1962), en base a las reacciones SDH, ATPasa y esterasas en el músculo gastronemio de la rata. Optan por denominarlas como "A", "B" y "C", y establecen unos "perfiles histoquímicos" para cada tipo fibrilar.

A esta denominación siguieron otras, creándose cierta confusión al no adoptarse un sistema único de nomenclatura. En este sentido, **GAUTHIER** (1969) propone clasificar a las fibras en "rojas", "blancas" e "intermedias". **SAMAHA et al.**, (1970), las denominan  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\alpha/\beta$ . **ASHMORE/DOERR** (1971), las llaman  $\alpha W$ ,  $\beta R$  y  $\alpha R$ , mientras que **PETER et al.**, (1972), en función de sus propiedades metabólicas, las catalogan como fibras SO (slow-oxidative), FG (fast-glycolytic) y FOG (fast-oxidative-glycolytic).

No satisfecho con los tres tipos de fibras descritos por la mayoría de investigadores reseñados, **ROMANUL** (1964) llega a definir hasta ocho tipos diferentes en los Mm. gastronemio y plantar de la rata. Su clasificación se basa en la realización de una serie de permutaciones sobre las actividades relativas que ofrecen un gran número de reacciones enzimáticas que incluyen a las citocromo oxidasas, diaforasas, varias deshidrogenasas, fosforilasas y esterasas. Ocho perfiles histoquímicos son establecidos también por **EDJTEHADI/LEWIS** (1974) en el M. flexor digital largo del



gato. Las fibras tipo I han sido subdivididas en dos subtipos en varias especies (JENNEKENS et al., 1974; ASKANAS/ENGEL, 1975; KARPATI et al., 1975; DEKLEVA/SIRCA, 1978; ORVIJ/CARDINET, 1981; GOLLA<sup>CK</sup> et al., 1983), al igual que las IIC (JANSSON et al., 1978; STARON/PETTE, 1986). Fibras con características intermedias entre las IIA y IIB, fibras IIAB, han sido referidas en distintas especies por ANDERSON/HENRIKSSON (1977), INGJER (1979), STARON et al. (1983) y MARTINEZ GALISTEO (1989).

Los trabajos de KUGELBERG/EDSTROM (1968), EDSTROM/KUGELBERG (1968), BURKE (1981), BURKE et al., (1971, 1973, 1974) y BUCHTHAL/SCHMALBRUCH, (1980), establecen una correlación entre las propiedades fisiológicas de las unidades motoras y las características histoquímicas de las fibras que las integran. En base a técnicas de depleción de glucógeno (estimulación repetida a diversas frecuencias de determinadas motoneuronas), se confirma que las fibras que integran una unidad motora poseen características histoquímicas uniformes. Se demostró por tanto, que las fibras inervadas por una misma motoneurona son todas del mismo tipo, y que mientras la velocidad de contracción está en relación directa con la actividad ATPasa miosínica (BARANY., 1967), la resistencia a la fatiga se correlaciona con el metabolismo oxidativo (EDSTROM/KUGELBERG, 1968; BURKE., 1981). De esta forma, las fibras que ofrecen una fuerte reacción ATPasa miosínica son de contracción rápida, mientras que las de escasa reacción son de contracción lenta. Las unidades

motoras identificadas hasta la fecha (BURKE, 1971, 1973; GARNETT et al., 1978) se resumen en las siguientes:

Unidad motora tipo S: integrada por fibras de elevado metabolismo oxidativo (fuerte reacción NADH-TR), baja actividad ATPasa miosinica (ácido-resistente y alcalino-lábil). Histoquímicamente se las denomina fibras tipo I, ST ó SG. Son de contracción lenta y resistentes a la fatiga. Al ser capaces de mantener una actividad sostenida durante largos periodos de tiempo, intervienen en las funciones posturales o de aplomo. Son desde un punto de vista energético muy eficientes y desarrollan relativamente poca fuerza.

Unidad motora tipo FR (de contracción rápida y resistente a la fatiga): las fibras que la integran se caracterizan por tener un metabolismo oxidativo y glicolítico, elevada actividad ATPasa miosinica (ácido-lábil y alcalino resistente). Se las denomina fibras tipo IIA, FOR o FOG (Fast-twitch-red, Fast-twitch-glycolytic, respectivamente). Son muy eficientes en aquellos movimientos que se traducen en un acortamiento muscular.

Unidad Motora FP (de contracción rápida pero fácilmente fatigables): sus fibras poseen un metabolismo predominantemente glicolítico y elevada actividad ATPasa miosinica ácido-resistente a pH 4.6, ácido-lábil a pH 4.3 y alcalino-resistente. Se las clasifica como fibras tipo IIB o FG (Fast-glycolytic). Son las fibras de mayor tamaño, pero insuficientes desde el punto de vista energético. Intervienen en los movimientos de fuerza rápidos (vigorosos).

Sin embargo, debemos señalar, que lo expuesto anteriormente no siempre se ajusta a la realidad. La estimación de la actividad enzimática sobre fibras aisladas mediante microdissección, ha puesto de manifiesto la existencia de una marcada variabilidad entre los tipos de fibras descritos y su actividad SDH. De esta forma, mientras en el conejo existe una correlación entre las fibras IIA y IIB (BROOKE/KAISER, 1970) y FOG y FG (PETER et al., 1972), respectivamente, la actividad SDH ofrece, en cambio, una gran variabilidad en las fibras IIB de otras especies (NEMETH/PETTE, 1981; DUBOWITZ, 1985; GIL, 1986; DIZ, 1987; LOPEZ RIVERO, 1988; MORALES LOPEZ, 1989; MARTINEZ GALISTEO, 1990).

Con la introducción de modernas técnicas inmunohistoquímicas, basadas en el poder antigénico de la miosina, se ha podido demostrar que cada tipo de fibra contiene una característica isoforma de miosina, y que puede establecerse una correlación entre la tinción que se obtiene con las técnicas de mATPasa y el tipo de miosina que predomina en la fibra (GAUTHIER/LOWEY, 1977; GAUTHIER et al., 1978; RUBINSTEIN et al., 1978; LUTZ et al., 1979; PIEROBON-BORMIOLI et al., 1980, 1981; CARPENE et al., 1982). Así, se ha demostrado que los tipos de fibras que poseen diferente actividad ATPasa, contienen diferentes isoformas de miosinas (WEEDS, 1980), aceptandose de forma general que las fibras tipo I (lentas) difieren de las tipo II (rápidas) en el modelo electroforético de las cadenas ligeras de sus miosinas (LOWEY/RISBY, 1971; HOH et al., 1976; WEEDS, 1980), y en sus cadenas pesadas (WEEDS/BURRIDGE, 1975;

**RUSHBROOK/STRACHER, 1979; BILLETER et al., 1981).** Estudios más concretos demuestran también diferencias en cuanto a la cadena pesada de la miosina de las fibras IIA y IIB (**DALLA LIBERA et al., 1980; BILLETER et al., 1981).** Significado especial merecen las fibras IIC, al ser consideradas por algunos autores como fibras de transición entre las tipo I y IIA (**STARON/PETTE, 1986),** ya que los estudios inmunohistoquímicos revelan, en este tipo de fibra, la presencia de ambas isoformas de miosina, lenta y rápida (**BILLETER et al., 1980).**

Aunque las fibras I, IIA y IIB parecen ser suficientes para cubrir la mayoría de las necesidades funcionales del músculo esquelético, otros tipos que han sido descritos en algunas especies o en determinados músculos son asociados con especiales adaptaciones funcionales (**MASCARELLO et al., 1986).** De esta forma, **SNOW et al., (1982),** indican que en el perro no existe la clásica fibra IIB glicolítica, sino que ésta se encuentra reemplazada por otro tipo de fibra II de marcada actividad oxidativa y con características ATPásicas e inmunohistoquímicas propias que las hacen diferente de las IIA. Estudios posteriores (**MASCARELLO et al., 1983)** señalan la presencia de este tipo de fibras en el músculo esquelético de otras especies (hurón, zorro, monos del nuevo mundo y marta). Los músculos masticadores también ofrecen ciertas particularidades. Así, en el masetero y temporal de carnívoros y primates predomina un tipo de fibra que histoquímica e inmunohistoquímicamente difiere de los tipos I, IIA y IIB. Se trata de las fibras IIM (**MASCARELLO et al., 1979; MAXWELL et al., 1980; ROWLERSON**

et al., 1981, 1983), relacionadas con los movimientos de mordedura o dentellada rápidos. Estas fibras han sido detectadas también en el M. tensor del tímpano del perro, gato y monos del nuevo mundo (MASCARELLO et al., 1983). En este mismo músculo y en el estapedio de diversas especies (MASCARELLO et al., 1983) han sido identificadas fibras con características similares a las "slow-tonic" de las aves y vertebrados inferiores, aunque carentes de inervación múltiple.

Otros ejemplos de adaptaciones fibrilares son los que se dan en la musculatura estriada del esófago y en los músculos oculomotores. Las fibras denominadas como IIOes, con un tipo característico de miosina (MASCARELLO et al., 1984), han sido descritas en el esófago del perro y gato, mientras que en otros mamíferos, la musculatura esofágica se compone de fibras tipo I y II (hombre y herbívoros) o de fibras tipo IIA (cobaya, rata y conejo). Otro tipo especial de fibra denominado IIEO, ha sido descrito para los músculos extraoculares, particularmente rápidos (CLOSE/LUFF, 1974; HARSON/LENNERSTRAND, 1977). Este tipo de fibras se caracteriza también por tener una isoforma rápida de miosina diferente a la de las otras fibras catalogadas como "rápidas". Recientemente (GORZA, 1990), en algunos músculos del miembro pelviano de rata, ratón y cobaya ha descrito fibras con características histoquímicas y estructurales (cadena pesada de miosina) propias, que denomina 2X.

De todo lo expuesto, se deduce la existencia de un rango considerable de tipos de fibras de contracción

rápida que contienen isoformas de miosina diferentes, en respuesta a las diversas y variadas necesidades funcionales (MASCARELLO et al., 1986). Este polimorfismo de la miosina no sólo afecta a las fibras de contracción rápida hasta ahora evidenciadas (IIA, IIB, 2X, IIM, IIoes, IIEO y tipo II del perro), sino también a los dos tipos de miosinas "lentas": fibras "slow-twitch" y "slow-tonic" (PIEROBON-BORNIOLI et al., 1980); a los dos tipos de miosinas cardíacas: atrial y ventricular (SARTORE et al., 1978, 1981; GORZA et al., 1982), así como a los tipos de miosina presentes durante el desarrollo embrionario y neonatal (WHALEN et al., 1981).

#### **Tipos de fibras en el perro:**

Respecto al músculo esquelético del perro, y más concretamente en lo referente a la musculatura de los miembros, se plantean ciertas discrepancias a la hora de evidenciar las fibras tipo IIB. En base a la actividad m-ATPasa, y siguiendo la clasificación propuesta por BROOKE/KAISER (1970), diversos autores han definido los subtipos IIA, IIB y IIC (CASTLE/REYMAN, 1984; GIL, 1986; MORENO, 1986; GIL et al., 1987; DIZ, 1987), dentro de las fibras tipo II de esta especie, mientras que otros no reconocen la presencia del tipo IIB (BRAUND et al., 1978; BRAUND/LINCOLN, 1981; BRAUND et al., 1982; CARDINET et al., 1982; GREEN et al., 1982; SNOW et al., 1982; RODRIGUEZ BARBUDO et al., 1983; MARTINEZ LOPEZ, 1987; BRAUND, 1989). Modificando la técnica m-ATPasa, ya sea tras fijación previa de las secciones en formaldehído (TREVINO et al., 1973), mediante control riguroso de los

medios y tiempos de preincubación ácidos (GOLLNICK et al., 1983) o preincubando en medios con cobre (MATOBA et al., 1985), también ha sido posible subdividir a las fibras tipo II del perro en tres subpoblaciones, aunque con diferentes denominaciones (fibras IIA1, IIA2 y IIA3). Igualmente variables son las interpretaciones en cuanto al potencial oxidativo que presentan las fibras tipo II al aplicar las técnicas NADH-TR o SDH. En este sentido, MAXWELL et al. (1977), GUNN (1978), BRAUND et al., (1978), MASCARELLO/VEGETTI (1979), ARMSTRONG et al., (1982), GIL (1986), opinan que todas las fibras tipo II del perro poseen de moderada a alta actividad oxidativa. Únicamente GUY/SNOW (1981) y McCONATHY et al., (1983) refieren la existencia de fibras con baja actividad SDH y NADH respectivamente, pero que comparadas con las de otras especies (caballo), presentan sin duda mayor potencial oxidativo.

SNOW et al., (1982) realizan un extenso trabajo aportando resultados y técnicas muy interesantes. En base a modificaciones realizadas en las técnicas ATPásicas, y aplicando sueros antimiosinas (anti IIA y IIB), subdividen a las fibras tipo II del perro en dos poblaciones principales. Estas pueden ser diferenciadas entre sí cuando se ajustan y se aplican con pulcritud las técnicas modificadas de mATPasa. Ambos tipos de fibras presentan un potencial metabólico oxidativo/glicolítico, y desde el punto de vista inmunohistoquímico difieren en la estructura de las cadenas pesadas de la miosina y en las reacciones que presentan cuando se las enfrenta a sueros antimiosinas IIA y IIB.

Por todo lo expuesto, SNOW et al., indican que es posible identificar en el músculo semitendinoso del perro cuatro tipos de fibras, que podrían denominarse como I, IIA, II del perro, y IIC.

## **II.2.- ASPECTOS HISTOQUIMICOS DE LA FIBRA MUSCULAR DURANTE EL DESARROLLO:**

Los aspectos histoquímicos de los tipos de fibras del músculo esquelético han sido estudiados durante el desarrollo postnatal por numerosos autores. Los hallazgos de WIRSEN/LARSSON (1964), DUBOWITZ (1965), BEATTY et al., (1967), DORN (1969), ONMER (1971) y ASHMORE et al., (1972), vienen a demostrar que el inicio de la diferenciación fibrilar es variable dependiendo de la especie. Esta variación, según DUBOWITZ (1965), guarda relación directa con la duración de la gestación, que repercute en un mayor o menor grado de madurez de la fibra muscular en los neonatos. De esta forma, se ha observado que la diferenciación de los tipos de fibras al nacimiento es escasa en especies como la rata (DUBOWITZ, 1965; BROOKE et al., 1971; GUTH/SAMAH, 1972; CURLESS/NELSON, 1976; HALTIA et al., 1978; WELT et al., 1978; ONTELL/DUNN, 1978; HUDSON et al., 1982; WIRTZ et al., 1983; OVALLE et al., 1983), ratón (WIRSEN/LARSSON, 1964; DUBOWITZ, 1965; OVALLE et al., 1983), hamster (DUBOWITZ, 1965), conejo (DUBOWITZ, 1965; LOBLEY et al., 1977), gato (KARPATI/ENGEL, 1967; NYSTRON, 1968; GUTH/SAMAH, 1972)), cerdo (COOPER et al., 1970, 1971; DAVIES, 1972; ASHMORE et al., 1972; HANZLIKOVA, 1980;



SWATLAND, 1983; HANDEL/STICKLAND, 1987), perro (CARDINET et al., 1969, 1982, 1983; AQUIN/BANCHERO, 1981; BRAUND/LINCOLN, 1981; GIL, 1986; MORENO, 1986; GIL et al., 1987). Por el contrario, las fibras musculares quedan bien definidas en estos periodos en el cobaya (DUBOWITZ, 1965; KARPATI/ENGEL, 1967; MAXWELL et al., 1970; RILEY, 1973), hombre (FENICHEL, 1966; BROOKE/ENGEL, 1969; DUBOWITZ/BROOKE, 1973; FARKAS-BAGERTON, 1977; SCHLON/SCHLOTTMAN, 1979) y caballo (ABERLE et al., 1976; RONEUS/ESSEN-GUSTAVSON, 1986; ALNAQUEEB/GOLDSPINK, 1986; MARTINEZ GALISTEO, 1990).

Las técnicas ATPásicas aplicadas al músculo en desarrollo aportan interesantes datos sobre el mismo, ya que el modelo de tinción que se obtiene en las fibras en periodos embrionarios, fetales y neonatales, se va perdiendo de forma gradual y progresiva hasta la constitución definitiva de los modelos adultos (RILEY, 1973; MORENO, 1986; GIL, 1986). Estudios desde el punto de vista inmunohistoquímico indican, además, que durante el desarrollo postnatal, las isoenzimas "lenta" y "rápida" de la miosina coexisten en todas las fibras que integran músculos de contracción rápida en los mamíferos (GAUTHIER et al., 1978). Este hecho guarda relación con la existencia en estos periodos, de una inervación polineural. Cuando ésta es sustituida por la inervación simple (una placa motora por fibra muscular), la fibra queda definitivamente configurada con el tipo de miosina que le corresponde (GAUTHIER, 1980). Sin embargo, RUBINSTEIN/KELLY (1980) han señalado que la síntesis del tipo definitivo de miosina, característico de cada fibra,

tiene lugar antes de que se instaure la inervación simple, incluso en los propios miotubos. Además, está demostrada la existencia de distintos tipos de miosinas, que bajo la denominación de "embrionaria" y "neonatal" (WHALEN et al., 1981), forman parte de la fibra muscular en cada periodo del desarrollo, con una sustitución gradual y progresiva (DHOOOT, 1986) hasta conformar la miosina propia de la fibra del músculo adulto.

Otro de los aspectos más estudiados durante el desarrollo es el referente al crecimiento de la fibra muscular. Tras el nacimiento, se produce un crecimiento de las fibras, fruto del proceso hipertrófico que tiene lugar en ellas. Los trabajos de ROWE/GOLDSPIK (1969) ponen de manifiesto que el número total de fibras, por sección transversal de músculos de ratones de ambos sexos, no experimenta cambio alguno desde el nacimiento. El tamaño se va incrementando de forma gradual y progresiva debido a una hipertrofia mono o bimodal. Sin embargo, estudios anteriores (CHIAKULAS/PAULY, 1965), indican en la rata un incremento del número de fibras musculares, sugiriendo que un crecimiento hiperplásico en el músculo de esta especie es posible en las tres primeras semanas de vida, a partir de mioblastos no diferenciados situados en las bandas de perimisio. Fenómenos hiperplásicos ya fueron apuntados por LOBINZEV (1960) al observar procesos de "splitting" (desdoblamiento), procesos también reflejados por GIL et al., (1987). WIRTZ et al., (1983) sugieren, que existe una relación entre el perfil histoquímico de la fibra y

su tamaño, por lo que indican que cada tipo de fibra sigue un determinado patrón de crecimiento.

### **II.3.- DISTRIBUCION FIBRILAR:**

La unidad motora puede ser definida como el conjunto de fibras musculares esqueléticas inervadas por una misma motoneurona. Como ya tuvimos ocasión de comentar, todas las fibras de una unidad motora presentan idénticas características morfológicas, bioquímicas e histoquímicas; si bien, no suelen estar agrupadas, sino entremezcladas con las de otras unidades distintas, confiriendo al músculo en sección transversal un aspecto de mosaico o tablero de ajedrez. Sin embargo, la distribución fibrilar es muy variable, no solo entre los diferentes músculos y las distintas especies, sino incluso dentro de un mismo músculo (JENNEKINS et al., 1971; JOHNSON et al., 1973; ARIANO et al., 1973; EDGERTON et al., 1975; GONYEA/ERICSON, 1977; PULLEN, 1977; GUNN, 1978; SANDSTEDT, 1981; ARMSTRONG et al., 1982; ELDER et al., 1982; NYGAARD/SANCHEZ, 1982; LEXELL et al., 1983; RODRIGUEZ-BARBUDO et al., 1984; MAHON et al., 1984; NEWSHOLME et al., 1988; MARTINEZ GALISTEO, 1989). De forma general se admite que los músculos del miembro torácico de los mamíferos contienen un mayor porcentaje en fibras de contracción lenta (tipo SO ó I) que los del pelviano, donde predominan las fibras tipo II (contracción rápida). Este hecho se ha relacionado con la función principal que desempeña el miembro torácico (aplomo) y la propiamente propulsora del pelviano (ARMSTRONG/PHELPS, 1984). Las variaciones en porcentaje

guardan también relación con la actividad locomotora característica de la especie o raza. Los músculos de animales de actitud sedentaria (por ejemplo la rata) son ricos en fibras FG (de contracción rápida, metabolismo glicolítico y fácilmente fatigables). Por el contrario, en especies como el perro, "corredor de largas distancias por excelencia", la práctica totalidad de las fibras se caracteriza por su alta capacidad oxidativa, y por lo tanto, mayor resistencia a la fatiga (MAXWELL et al., 1977; SNOW et al., 1982; RODRIGUEZ BARBUDO et al., 1983). Incluso dentro de un mismo músculo, las variaciones pueden ser importantes. La mayoría de los trabajos realizados en este sentido indican, que las fibras tipo I (contracción lenta y fatigorresistentes) tienden a distribuirse en mayor número hacia el centro del músculo, correspondiendo el predominio de las tipo II (contracción rápida) a las zonas periféricas (JAMES, 1971a,b; DAVIES/GUNN, 1971; GUNN, 1973; ARMSTRONG et al., 1982; LEXELL et al., 1983; RODRIGUEZ-BARBUDO et al., 1983; SCHWARTZ-GIBLIN et al., 1983; McINTOSH et al., 1985). El grado de distribución de un determinado tipo de fibra puede llegar a ser tan extremo, hasta el punto de formar auténticos compartimentos dentro de un mismo músculo, como se ha descrito en los músculos flexor carporradial, gastronemio (cabeza lateral), semitendinoso y esplenio del gato (GONYEA/ERICSON, 1977; GONYEA, 1979; GONYEA et al., 1981; ENGLISH/LETBETTER, 1982; BODINE et al., 1982; BOTTERMAN et al., 1983; ENGLISH/WEEKS, 1984; BOTTERMAN et al., 1985; RICHMOND et al., 1985). En el músculo flexor carporradial del perro, McCONATHY et al., (1983) han señalado la presencia de dos cabezas, "cubital" y

"radial", indicando que ésta última se compone casi de forma exclusiva (95-100%) de fibras SO. Sugieren que los compartimentos fibrilares podrían funcionar de forma independiente dentro del músculo de acuerdo con las necesidades motoras de este último, lo que podría tener un significado funcional relevante.

## **MATERIAL Y METODO**

### III.- MATERIAL Y METODOS.

#### III.1.- ANIMALES EMPLEADOS Y TOMA DE MUESTRAS.

Para la experiencia se utilizaron 15 perros adultos de talla media y pesos entre 15-20 Kgs., que fueron sometidos a control sanitario y que no presentaban signo alguno de alteración en su actividad locomotora. Asimismo, analizamos 29 cachorros de raza pastor belga, procedentes de cuatro camadas, con edades entre el nacimiento y los 65 días (TABLA I).

Edad (Días)	0	5	8	10	15	20	22	23	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Nº Animales	2	1	2	1	3	1	2	1	1	3	1	3	1	2	1	2	2

**TABLA I:** Grupo de animales empleados para estudiar el desarrollo postnatal de los Mm. semitendinoso y flexor carporradial.

Los animales se sacrificaron, previa sedación con clorhidrato de xilacina (1cc./10Kg.peso vivo), mediante

sobredosis de tiopental sódico via intravenosa (perros adultos) y con fluotane via inhalatoria (cachorros).

Seguidamente se procedió a la disección y extracción de los Mm. flexor carporradial y semitendinoso del miembro derecho, siendo desprovistos de fascias y grasa de recubrimiento y de sus tendones de origen e inserción. A continuación, el M. flexor carporradial se cortó transversalmente, obteniéndose 4-6 secciones (perros adultos) o 2-4 (cachorros), dependiendo del tamaño del mismo. Las secciones, de 1 cm. de lado, se realizaron proximo-distalmente (de origen a inserción), afectando a la totalidad del vientre muscular. Del M. semitendinoso se tomaron, a nivel de su tercio medio, tantas muestras como secciones fueron obtenidas del M. flexor carporradial.

Las muestras se colocaron de forma perpendicular sobre un portabloques metálico al que previamente habíamos añadido una gota de OCT-Compound. En cada portabloques situamos una sección del M. flexor carporradial y otra del M. semitendinoso. Esta última se dispuso lateralmente a la del M. flexor carporradial, marcando en el portabloques la zona correspondiente a su borde craneal. Con ello, tenemos dos puntos de referencia que nos permiten identificar correctamente las distintas zonas de este músculo una vez cortado y teñido. La diferenciación fibrilar del M. semitendinoso sirvió como patron a la hora de analizar los resultados en el M. flexor carporradial.



### III.2.- PROCESADO DE LAS MUESTRAS.

#### **Congelación:**

Tiene lugar durante la primera hora que sigue a la muerte del animal, al objeto de evitar posibles alteraciones morfológicas y/o morfométricas de la fibra (BRAUND, 1989). Se efectúa en un vaso de precipitado que contiene 100 c.c. de 2-Metilbutano, previamente enfriado sobre nitrógeno líquido a  $-190^{\circ}\text{C}$ . El vaso se introduce de manera lenta, hasta llevar el 2-Metilbutano a  $-160^{\circ}\text{C}$  (DUBOWITZ/BROOKE, 1973) lo que se hace evidente al congelarse y quedar adherido al fondo y paredes del vaso de precipitado, momento idóneo para sumergir el portabloques con su muestra durante 10 - 15 segundos. Una vez congelada se protege con papel de aluminio (previamente enfriado) y se introduce en un arcon congelador a  $-40^{\circ}\text{C}$ , donde permanecerá hasta el momento de proceder a su corte.

#### **Corte de las muestras:**

Se realiza en un criostato Reichert Jung modelo Criocut E a  $-20^{\circ}\text{C}$ , obteniéndose secciones transversales seriadas de  $10\ \mu\text{m}$  de grosor. Los cortes se recogen de la cuchilla apoyando sobre la misma un portaobjetos limpio y seco. La disposición transversal de las fibras y la correcta congelación de la muestra se comprueba mediante una tinción rápida de Hematoxilina-Eosina. Tras esta tinción de rigor se realizan de cada muestra 60-80 cortes seriados, que son almacenados a  $-40^{\circ}\text{C}$  hasta su tinción histoquímica.

En los cachorros, además de situar en cada portabloque una muestra de los Mm. flexor carporradial y semitendinoso del mismo animal, se coloca también una sección del M. semitendinoso de perro adulto. Ello nos permitirá disipar dudas en cuanto a la fiabilidad de la técnica empleada.

### III.3.- TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS UTILIZADAS.

#### III.3.1.- Técnicas ATPasa miosínicas (mATPasa):

Las preparaciones se incuban en una solución que contiene ATP y calcio a pH 9'45. La ATPasa libera el fosfato terminal y, al existir calcio en la solución, se combina con este para formar fosfato de calcio. En un pH alcalino el fosfato de calcio es insoluble y, por lo tanto, se deposita en el lugar de la actividad enzimática. A continuación, la preparación se traslada a una solución de cloruro de cobalto. El cobalto desplaza al calcio, formándose fosfato de cobalto donde previamente estaba el fosfato de calcio. Después se coloca en una solución de sulfuro de amonio, resultando la formación de sulfuro de cobalto insoluble y negro. Se demuestra así el lugar de la actividad enzimática original y se detecta esencialmente la ATPasa miosínica. (DUBOWITZ/BROOKE, 1973).

Si previamente a la incubación, las secciones de tejido muscular son introducidas en medios más alcalinos (pH 10'2-10.6) o ácidos (pH 4'6-4'3) se consigue

evidenciar un mayor número de tipos fibrilares, por la diferente labilidad que manifiestan los distintos tipos de isomiosinas. La reacción tiene lugar en las miofibrillas que se aprecian separadas por el espacio intermiofibrilar no teñido. Si el corte de la fibra fuera longitudinal observaríamos que la tinción acontece sobre las bandas A y, dado que esta zona se encuentra ocupada por miosina, se adopta el término ATPasa miosínica. (DUBOWITZ, 1985)

Las técnicas empleadas en nuestro trabajo se corresponden a las referidas por SNOW et al., (1982) para preincubaciones alcalinas (sistema A) y ácidas (sistemas A y C), y por DUBOWITZ/BROOKE (1973) para preincubaciones ácidas. Si bien hemos introducido modificaciones, por lo que reflejamos el desarrollo íntegro de dichas técnicas. Completamos las mismas con el método de MABUCHI/SRETER (1980) (detección de Ca-Mg-ATPasa sin preincubación), modificado por Mascarello en 1987 (comunicación personal).

A.- Método Snow et al., (1982):

A.1.- ATPasa miosínica preincubación alcalina: Sistema "A" modificado.

1-Preincubación durante 15 minutos en la solución:

Cl<sub>2</sub>Ca.....0'1M  
Acetato de sodio.....0'07M  
Barbital sódico.....0'075M

pH: 10'2, 10'3, 10'4, 10'5 y 10'6. (Ajustados con NaOH 0'1M)

2-Lavado durante 5 minutos con agua destilada.

3-Incubación durante 60 minutos en la solución:

Cl<sub>2</sub>Ca.....0'1M  
Acetato de sodio.....0'07M  
Barbital sódico.....0'075M  
A.T.P. ....1'5mg/ml

pH: 9'45 (ajustado con NaOH 0'1M).

4-Lavado con cloruro de calcio 0'2M: dos baños de 5 minutos.

5-Lavado durante 5 minutos con cloruro de cobalto al 2%

6-Lavado con agua destilada minuciosamente: dos baños.

7-Lavado de un minuto con sulfuro de amonio al 1%.

8-Lavado de 2 a 5 minutos con agua destilada.

9-Deshidratación y montaje con Eukitt.

A.2.- ATPasa miosinica preincubaciones ácidas:

A.2.1.- Sistema "A" modificado. Acetato de sodio 0'2M.

1-Preincubar en la siguiente solución:  
Acetato de sodio.....0'2 M

pH: 4'4, 4'55 y 4'6. (Ajustados con Ac. acético puro).

Tiempo de preincubación: 5 minutos.

2-Lavar con agua destilada: un baño de 5 minutos.

**3-Incubar durante 30 minutos en la siguiente solución:**

Cl<sub>2</sub>Ca.....0'1M  
Acetato de sodio.....0'07M  
Barbital sódico.....0'075M  
A.T.P. ....1'5mg/ml

pH: 9'45 (ajustado con NaOH 0'1M).

Los pasos del 4 al 9 son iguales a los de la técnica anterior.

**A.2.2.- Sistema "C" modificado. Acetato de sodio 0'1M.**

Para referirnos a esta técnica utilizamos la denominación **SISTEMA "A-M"**, pues se corresponde con el sistema "C" de **SNOW et al., (1982)** modificado por **MASCARELLO (1989)** (comunicación personal).

La variación de este sistema (A-M), como la del sistema siguiente (B-M), radica en la utilización de una solución de acetato de sodio 0'1 M como medio de preincubación. Con ello, se obtiene una óptima diferenciación de los de los subtipos de fibras II en el perro (**SNOW et al., 1982**). Concretamente, en el sistema "A-M" se parte de una solución madre de Acetato de sodio 0'1M sobre la que se calibran los distintos pH : 4'2, 4'35 y 4'6 con ácido acético 0'1M. Las cantidades utilizadas para obtener 100ml son:

pH	Acetato de Na 0'1M	Ac. Acético 0'1M
4'2	47'8 ml.....	52'2ml
4'35	57'8 ml.....	42'2ml
4'6	89'8 ml.....	10'2Ml

Esto conlleva la obtención de una molaridad en la solución preincubadora inferior a 0'1M, cercana incluso a 0'05M.

Destacar también que en estas técnicas (ATPasa miosinicas ácidas A-M y B-M), para cada medio de preincubación (pH 4'2, 4'35, 4'6) se utilizan tres tiempos (5, 10 y 15 minutos), decisivos para obtener el punto óptimo de pH y el tiempo de preincubación en el que la diferenciación fibrilar es máxima.

La metódica a realizar consiste en:

**1-Preincubar en la siguiente solución:**

Acetato de sodio.....0'1 M

pH: 4'2, 4'35 y 4'6 ( Ajustados con ac. acético 0'1 M).

Tiempo de preincubación: 5, 10 y 15 minutos

**2-Lavar con agua destilada:un baño de 5 minutos.**

**3-Incubar en la siguiente solución:**

Cl<sub>2</sub>Ca.....0'1M

Acetato de sodio.....0'07M

Barbital sodico.....0'075M

A.T.P. ....1'5mg/ml

pH: 9'45 (ajustado con NaOH 0'1M).

Tiempo de incubación: 30 minutos.

Los pasos del 4 al 9 son comunes a las técnicas anteriores.

**A.2.3.- Sistema "C" modificado. Acetato de sodio 0'1M.**

La denominación que adoptamos para esta técnica es la de SISTEMA "B-M". La aportación personal de Mascarello consistió en la manera de obtener el Acetato de sodio 0'1M (50% Acetato de sodio 0'2M + 50% de agua destilada, previo ajuste de pH).

Con esta preincubación ácida se obtiene una concentración de acetato de sodio 0'1M exacta, al partir de una solución madre 0'2M que se diluye al 50% con agua destilada (una vez calibrados los pH con ácido acético puro).

El protocolo de la técnica es como sigue:

**1-Preincubar en la siguiente solución:**  
Acetato de sodio.....0'2 M (\*)

pH: 4'2, 4'35 y 4'6 (Ajustados con Ac.acético puro).

(\*)Dilución de Acetato de sodio: 50%  
Acetato de sodio 0'2 M + 50% de agua  
destilada, después de ajustar los pH

Tiempo de preincubación: 5, 10 y 15  
minutos.

**2-Lavar con agua destilada:**un baño de 5  
minutos.

**3-Incubar en la siguiente solución:**

Cl<sub>2</sub>Ca.....0'1M  
Acetato de sodio.....0'07M  
Barbital sodico.....0'075M  
A.T.P. ....1'5mg/ml

pH: 9'45 (ajustado con NaOH 0'1M).

**Tiempo de incubación: 30 minutos.**

**Los pasos del 4 al 9 son similares a los ya referidos para las técnicas anteriores.**

**B.- Método Dubowitz/Brooke (1973) modificado:**

Se recurre a este método clásico para diferenciar los cuatro tipos de fibras detectados en el perro por MORENO (1986), GIL (1986) y DIZ (1987), mediante preincubación ácida. No empleamos la ATPasa miosínica alcalina debido a que únicamente diferencia fibras tipo I y II, sin distinguir subtipos dentro de estas últimas. En esta técnica la concentración del Acetato de sodio es muy baja, y la solución preincubadora incorpora cloruro sódico.

El desarrollo de la misma contempla los siguientes pasos:

**1-Preincubar en la solución:**

50 ml de solución A  
101'5 ml de solución B  
20 ml de Cloruro de Na (8'5%)  
Completar con agua destilada hasta 250 ml

**Solución A:**

Acetato de sodio (Pm: 136'08).....(1'94 gr)  
Barbital sódico (Pm: 206'18).....(2'94 gr)  
Agua destilada .....( 100 ml)

**Solución B: ClH 0'1 N.**

**pH: 4'3, 4'55 y 4'6 (Ajustados con NaOH  
0'1M)**



Tiempo de preincubación: 5 minutos.

2-Lavar en la siguiente solución:

Barbital sódico 0'1 M ....(2ml)  
Cloruro de cálcico 0'18M ..(1ml)  
Agua destilada .....(7ml)

pH: 9'4 (Ajustado con ClH 0'1 N)

Tiempo de lavado: 30 segundos.

3-Incubar en la siguiente solución:

Solución lavadora + 15 mgr. de ATP.

pH: 9'4 ( Ajustado con NaOH 0'1M)

Tiempo de incubación: 45 minutos.

4-Cloruro de calcio al 1% : Dos baños de 5 minutos.

5-Cloruro de cobalto al 2% : un baño de 5 minutos

6-Barbital sódico 0.01 M: un baño de 5-10 minutos.

7-Agua destilada: un baño de 30 segundos

8-Sulfuro de amonio al 1% :un baño de 30-60 segundos.

9-Lavar con agua destilada:un baño de 2 a 5 minutos.

10-Deshidratar y montar con Eukitt.

C.- Método de Mabuchi/Sreter (1980) para la Ca-Mg-ATPasa, modificado.

La técnica se fundamenta en incubar a pH 9'3-9'4 las secciones musculares en un medio, que además de

barbital sódico y cloruro de calcio, contiene cloruro de magnesio. Ello hace posible distinguir las fibras tipo I, IIA y IIB, sin necesidad de preincubación, en el músculo esquelético de la especie humana, rata y conejo (MASUCHI/SRETER, 1980).

La metodología de esta técnica es la siguiente:

**1-Incubar en la solución:**

A.T.P. ....16'5mg  
Agua destilada .....10ml  
Solución Stok .....10ml

**Solución Stok:**

Barbital sódico .....40mM  
Cloruro de calcio ...20mM  
Cloruro de magnesio..20mM

pH: 9'3-9'4 ( Ajustado con NaOH 0'1M)

Tiempo de incubación: 20, 30 y 40 minutos.

**2-Lavar con cloruro de calcio 0'2M:** dos baños de 5 minutos.

**3-Lavar con cloruro de cobalto al 2%:** un baño de 5 minutos.

**4-Lavar con agua destilada minuciosamente:** dos baños.

**5-Lavar con sulfuro de amonio al 1%:** un baño de un minuto.

**6-Lavar con agua destilada:** un minuto.

**7-Deshidratar y montar con Eukitt.**

### III.3.2.- Técnicas para determinación del metabolismo de las fibras:

#### A.- Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Reduced)-Tetrazolium Reductase. (NADH-TR). Método Dubowitz/Brooke (1973).

Las enzimas oxidativas, entre las que se incluyen las deshidrogenasas (SDH), diaforasas (NADH-tr) y oxidasas, son importantes porque reflejan la utilización de varios intermediarios metabólicos del ciclo de Krebs y vías relacionadas. Indican, por consiguiente, las posibles fuentes de energía en el metabolismo muscular.

El fundamento de estas técnicas estriba en el uso de una sal tetrazolio insoluble e incolora, que intercepte electrones en algún punto a lo largo de la cadena respiratoria, con lo que queda reducida, coloreada y precipitada por su carácter de insolubilidad.

En la empleada por nosotros (Diaforasas), la NADH es usada como sustrato y uno de los compuestos de tetrazolium (NBT) como captador de electrones. Mediante dicha técnica, se manifiesta bien el espacio intermiofibrilar que comprende mitocondrias y retículo sarcoplásmico, ya que las miofibrillas no se tiñen (DUBOWITZ, 1985).

A continuación se especifica la metódica a seguir:

**1-Incubar en la siguiente solución:**

0'2 M-Tris Buffer (pH 7.4).....10ml.  
NBT .....10mg.  
NADH .....8mg.

pH:7.4 (ajustar con ac.acético puro y 1M).

Tiempo de incubación: 60 minutos a 37°C.

**2-Lavado en agua destilada: un minuto.**

**3-Deshidratación en cadena de acetonas (un minuto): 30%-60%-90%-60%-30%.**

**4-Lavado en agua destilada: un minuto.**

**5-Montaje en glicerina (sellado con parafina o esmalte)**

**B.- Menadione-Linked Alpha-Glycerophosphate Dehydrogenase (M-GPDH). Método Dubowitz/Brooke (1973).**

Esta técnica, que tiene como substrato el Alpha-glycerophosphate, indica las posibles fuentes de metabolismo glicolítico.

Los pasos a tener en cuenta son los que siguen:

**1-Incubar en la solución:**

Alfa-glycerophosphate ..... 30mg.  
NBT ..... 10mg.  
Menadione ..... 2mg.  
0'2 M-Tris Buffer (pH 7.4)..... 10ml.

pH:7.4 (ajustar con ac.acético puro y 1M).

Tiempo de incubación: 60 minutos a 37°C.

Pasos 2 a 5 iguales a la técnica anterior.

#### III.4.- MOKFOMETRIA.

Se realiza mediante un sistema interactivo de análisis de imagen ( IBAS-1, Kontron) en el que seleccionamos el parámetro DELL-B, correspondiente al diámetro menor de una estructura elíptica equivalente (SONG et al., 1963). Analizamos exclusivamente éste último, evitando así posibles errores por la oblicuidad en el corte (DUBOWITZ/BROOKE, 1973). De cada sección muscular estudiamos un mínimo de 150 fibras, sin hacer distinción entre animales machos y hembras (BLOMSTRANG/EKBLOM, 1982 y SHOREY/CLELAND, 1983).

Los datos referentes a las medias, error standar, desviaciones típicas y análisis estadístico (prueba t-student) de los diámetros menores se obtuvieron mediante los programas STAT-1 y CLASS-1 del analizador de imágenes.

El porcentaje fibrilar se extrae de contar entre 500 y 1000 fibras de campos superficiales y profundos, elegidos al azar, en las secuencias fotográficas que se obtienen de las secciones completas del M. flexor carporradial adulto y de cachorros. Para el M. semitendinoso se proyecta un campo también al azar en una pantalla mediante la incorporación de un sistema de lentes adaptado al ocular del microscopio.

### III.5.- MICROFOTOGRAFIADO.

Se hace lo antes posible, ya que la intensidad y calidad de las tinciones enzimáticas disminuye con el tiempo. Utilizamos un microscopio LEITZ DIALUX 20 con equipo fotográfico automático incorporado. Las preparaciones son fotografiadas a 10X, 20X y 40X, utilizando películas en color.

Se persiguen dos objetivos:

A) Fotografiar a 10X las secciones completas del musculo flexor carporradial correspondientes a los segmentos obtenidos durante el procesado de las muestras, a fin de obtener "reconstrucciones fotográficas" de estos musculos una vez montadas correctamente.

B) Fotografiar a 20X y 40X campos histologicos seriados sometidos a distintas tecnicas histoquimicas. Con ello se consigue tener series fotográficas completas donde estudiar el comportamiento de un mismo grupo de fibras musculares frente a distintas reacciones histoquimicas. Estas series se obtienen de los Mm. semitendinoso y flexor carporradial de adultos y cachorros.

## **RESULTADOS**

#### IV.- RESULTADOS.

En el presente capítulo analizamos, en primer lugar, los resultados obtenidos en los músculos de animales adultos, y a continuación los correspondientes al estadio postnatal. La respuesta tintorial que ofrece el M. semitendinoso ante cada una de las técnicas marca los criterios para una correcta identificación de sus tipos fibrilares, tanto en animales adultos como en cachorros. Estos mismos criterios son aplicados al M. flexor carporradial considerando, además, aspectos relacionados con la morfología de dicho músculo y la distribución de sus fibras en los diferentes niveles analizados. Los tamaños y porcentajes fibrilares representan un complemento al estudio realizado.

##### **A.- RESULTADOS EN EL M. SEMITENDINOSO DE PERROS ADULTOS.**

##### **A.1.- TIPOS DE FIBRAS.**

Las técnicas utilizadas nos permiten clasificar a las fibras según la actividad de su ATPasa miosinica frente a preincubaciones en medios alcalinos y ácidos, y



por su metabolismo oxidativo y/o glicolítico. Comparando secciones transversales seriadas sometidas a las técnicas referidas en Material y Métodos hemos podido identificar cuatro tipos de fibras. La diferenciación de las mismas es optima cuando se comparan secciones teñidas con el método de SNOW et al., (1982) preincubación alcalina (Sistema "A"), con las preincubaciones ácidas a pH 4'6 y 4'3 (DUBOWITZ/BROOKE, 1973; modificado), 4'35 (Sistema A-M) y 4'6 (Sistema B-M). De acuerdo con los criterios de clasificación establecidos por SNOW et al., (1982), optamos por denominarlas como: tipos I, IIA, IIp y IIC. La actividad oxidativa es alta en las fibras tipo I, IIA y IIC y moderada/alta en las IIp, mientras que la actividad glicolítica es baja en las fibras tipo I, moderada/alta en las IIA y IIC y alta en las IIp.

Los resultados referentes a porcentajes y tamaño de cada una de estas fibras quedan reflejados en la tabla siguiente:

	I	IIA	IIp	IIC
%	25%	31%	43'4%	0.6%
X	34'6±0'5	45'0±0'5	53'1±0'5	43'1±2'9

(X: media ± error standard del diámetro menor expresado en micras).

Podemos observar que las fibras tipo II superan en tamaño a las tipo I, siendo las IIp las de mayor diámetro ( $p < 0'001$ ).

Analizando los resultados obtenidos con cada una de las técnicas, podemos establecer de forma más concreta las características histoquímicas de cada uno de los tipos fibrilares identificados.

**A.2. Técnica ATPasa miosínica preincubación alcalina. Sistema "A" de Snow et al., (1982), modificado (Figs. 1A, 1B).**

La diferenciación se obtiene a lo largo de la escala de pH comprendida entre 10'2 y 10'6. Aunque podemos obtenerla a pH 10'2 (Fig. 1A), no es tan óptima como a pH 10'6 (Fig. 1B). Debemos señalar en este sentido que el intervalo de pH en el que más frecuentemente se detecta va de 10'4 a 10'6.

El grado de tinción cuando la diferenciación fibrilar es óptima queda reflejado en la siguiente tabla:

Tipo I	Negativa	(-)
Tipo IIA	Muy intensa	(++++)
Tipo IIp	Intensa	(+++)
Tipo IIC	Intensa/Moderada	(+++ / ++)

Apreciamos que las fibras IIC suelen quedar solapadas con la población IIp, al presentar tonalidades tintoriales parecidas.

**A.3. Técnica ATPasa miosínica ácida. Método acetato de sodio 0'2M. Sistema "A" de Snow et al. (1982), modificado (Figs. 1C, 1D).**

Esta técnica aunque conlleva unas condiciones de molaridad, pH y tiempo de preincubación tremendamente críticas, permite una diferenciación entre los cuatro tipos de fibras musculares.

Las fibras IIA y IIp no siempre siguieron un patrón tintorial estable, presentando dos modelos de comportamiento, que a continuación reflejamos:

MODELO 1			MODELO 2		
4'4	4'6-4'55	FIBRAS	4'6-4'55	4'4	
(++++)	(++++)	Muy intensa	I	Muy intensa	(++++)
(-)	(-)	Negativa	IIA	Moderada	(++)
(-)	(+)	Moderada	IIP	Negativa	(-)
(+++)	(+++)	Intensa	IIC	Intensa	(+++)

Es muy frecuente que las fibras IIA tengan mayor resistencia a la preincubación pH 4'6-4'55 que las fibras IIP (Fig. 1C). Por lo tanto el modelo 2 predomina sobre el modelo 1.

Las fibras IIC en ocasiones pueden confundirse con las IIA, si bien su tonalidad es algo más fuerte. Aparecen claramente definidas a pH 4'4 (Fig. 1D), al pasar a negativas la fibras IIA y IIP.

**A.4. Técnica ATPasa miosinica. Sistema "A-M" (Figs. 1E, 1F, 1G, 1H).**

Es necesario emplear tres tiempos de preincubación (5, 10 y 15 minutos) para cada valor de pH (4'2, 4'35 y 4'6), con el fin de asegurar una óptima tinción de todos

y cada uno de los tipos de fibras musculares. No obstante, la preincubación a pH 4'6 no diferencia los distintos tipos de fibras II (IIA, IIp y IIC).

El grado de intensidad tintorial de cada una de las fibras es el siguiente:

	pH 4'35		pH 4'2	
Tipo I	Muy intensa	(++++)	Muy intensa	(++++)
Tipo IIA	Moderada	(++)	Negativa	(-)
Tipo IIp	Negativa	(-)	Negativa	(-)
Tipo IIC	Intensa	(+++)	Intensa	(+++)

Con preincubación a pH 4'35 y tiempos de 5, 10 y 15 minutos, como refleja la tabla anterior, se obtiene la mejor diferenciación entre fibras IIA y IIp (Figs.1F,1G,1H). Para la clara diferenciación de las fibras IIC aplicamos preincubaciones de pH 4'2 (Fig.1E), ya que con las anteriores se produce un solapamiento entre las fibras IIC y IIA.

A.5. Técnica ATPasa miosinica. Sistema "B-M" (Figs.2A,2B).

A los diferentes pH la tonalidad tintorial que presentan las fibras es la siguiente:

	pH 4'6		pH 4'35-4'2	
Tipo I	Muy intensa	(++++)	Muy intensa	(++++)
Tipo IIA	Moderada	(++)	Negativa	(-)
Tipo IIp	Negativa	(-)	Negativa	(-)
Tipo IIC	Estable	(+++)	Estable	(+++)

Como observamos, la diferenciación fibrilar es total a pH 4'6 y 15 minutos de preincubación (Fig.2A). Asimismo, pueden existir también problemas de solapamiento de las fibras IIC con las IIA a pH 4'6 e incluso con las tipo I.

Al utilizar la preincubación de pH 4'35 (Fig.2B), destaca la respuesta negativa de las fibras tipo IIA y IIP independientemente de los tiempos de preincubación empleados (5, 10 y 15 minutos). Únicamente hay diferenciación entre fibras tipo I y IIC. La diferenciación de las IIA y IIP puede apreciarse cuando el pH fluctúa hacia valores más ácidos.

A preincubación con pH 4'2, la respuesta tintorial de las fibras es similar a la de pH 4'35.

**A.6. Técnica ATPasa miosinica preincubación ácida. Método Dubowitz/Brooke (1973) modificado, con valores de pH: 4'6, 4'55 y 4'3 (Figs.2C,2D).**

Los resultados con esta técnica ATPasa miosinica son bastantes satisfactorios, pues existe una neta diferenciación, a pH 4'6 y 4'55, entre todos los tipos de fibras musculares anteriormente descritos (Fig.2C).

Sin embargo, en algunos casos, la diferenciación de las fibras IIC y IIP en el pH 4'6 puede presentar cierta dificultad, siendo necesario recurrir al pH 4'3, en el que las fibras IIC mantienen su grado de tinción intenso, pasando a negativas las IIP (Fig.2D).

Los matices cromáticos con esta técnica son los siguientes:

	pH 4'6		pH 4'3	
Tipo I	Muy intensa	(++++)	Muy intensa	(++++)
Tipo IIA	Negativa	(-)	Negativa	(-)
Tipo IIP	Moderada	(++)	Negativa	(-)
Tipo IIC	Intensa	(+++)	Intensa	(+++)

**A.7. Resultados obtenidos con la técnica Ca-Mg-ATPasa. Método de Mabuchi/Sreter (1980), modificada (Fig.2E).**

Con esta técnica, y a tiempos de incubación de 30 y 40 minutos, las fibras tipo I se manifiestan negativas. La limitación radica en poder diferenciar las fibras IIA (tinción moderada) de las IIP (tinción intensa), presentando las IIC una coloración intermedia entre las fibras I y IIA (Fig. 2E).

Las características tintoriales con la Ca-Mg-ATPasa son estos:

Tipo I	Negativas(-)
Tipo IIA	Moderadas(++)
Tipo IIP	Intensas (+++)
Tipo IIC	Moderada (+)

**A.8. Resultados obtenidos con las técnicas NADH-TR (Fig.2F,2H) y M-GPDH (Fig.2G).**

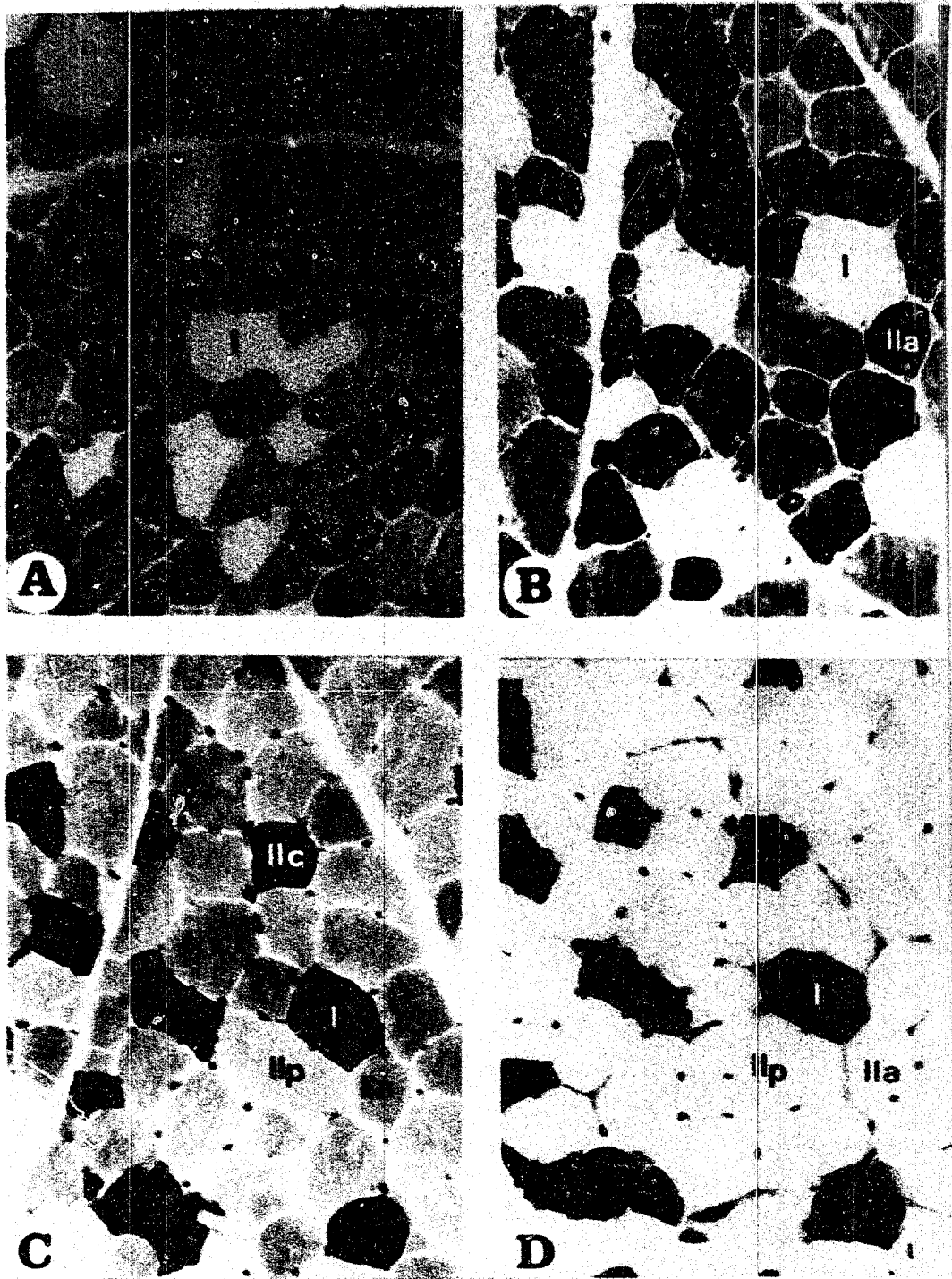
Las fibras reaccionan más o menos intensamente y ofrecen una distribución variable de los precipitados

tintoriales. Ambas circunstancias (intensidad de tinción y tipo de distribución) son tenidas en cuenta a la hora de la identificación fibrilar, que resumimos en el cuadro siguiente:

**Fibras Distribución**

NADH-TR		M-GPDH	
intensa (+++)	I	homogénea	negativa (-)
intensa (+++)	IIA	homogénea	intensa/m (+++/++)
moderada (+)	IIP	periférica	muy intensa (++++)
intensa (+++)	IIC	homogénea	moderada/alta (++)

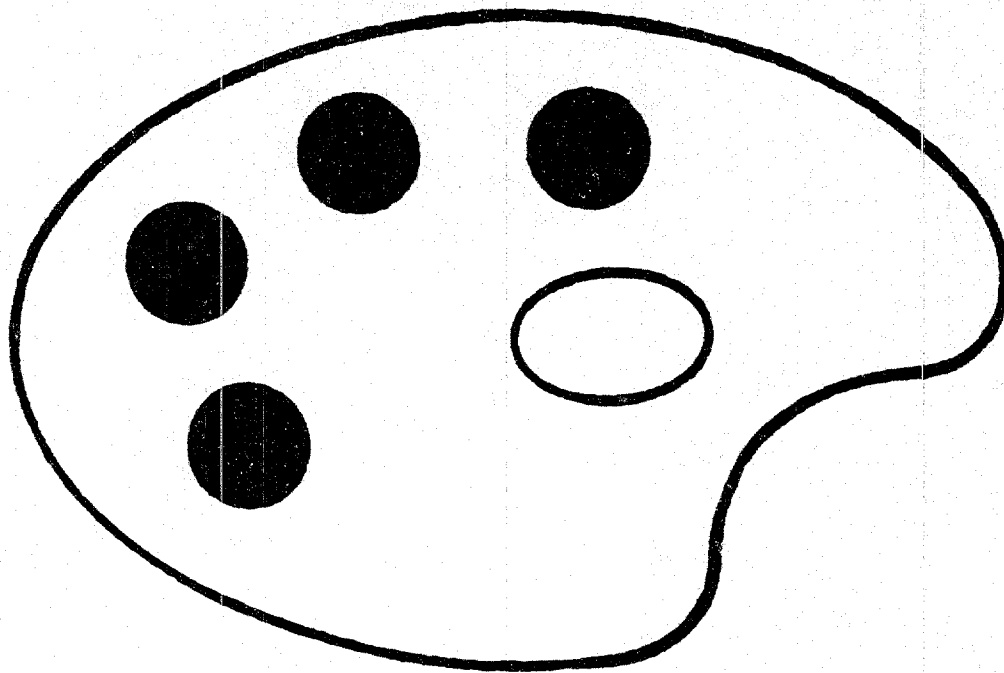
Debemos señalar que este cuadro solo tiene un valor indicativo, ya que hemos observado notables variaciones en el comportamiento de las fibras IIA y IIP. En este sentido, no es raro encontrar fibras IIA teñidas intensamente con la NADH-TR (Fig.2F) y con la M-GPDH (Fig.2G), lo que hace difícil diferenciarlas de las tipo I y IIP, respectivamente, si no se tienen en cuenta las secciones teñidas con la técnica MATPasa. En algunas ocasiones las fibras IIP aparecieron escasamente teñidas con la reacción NADH-TR (Fig.2H).



**FIGURA 1:** Secciones del M. semitendinoso de perros adultos.

Técnica m-ATPasa: preincubación alcalina a pH 10'2 (A) y 10'6 (B); preincubación ácida (Sistema acetato de sodio 0'2 M) a pH 4'6 (C) y 4'4 (D).

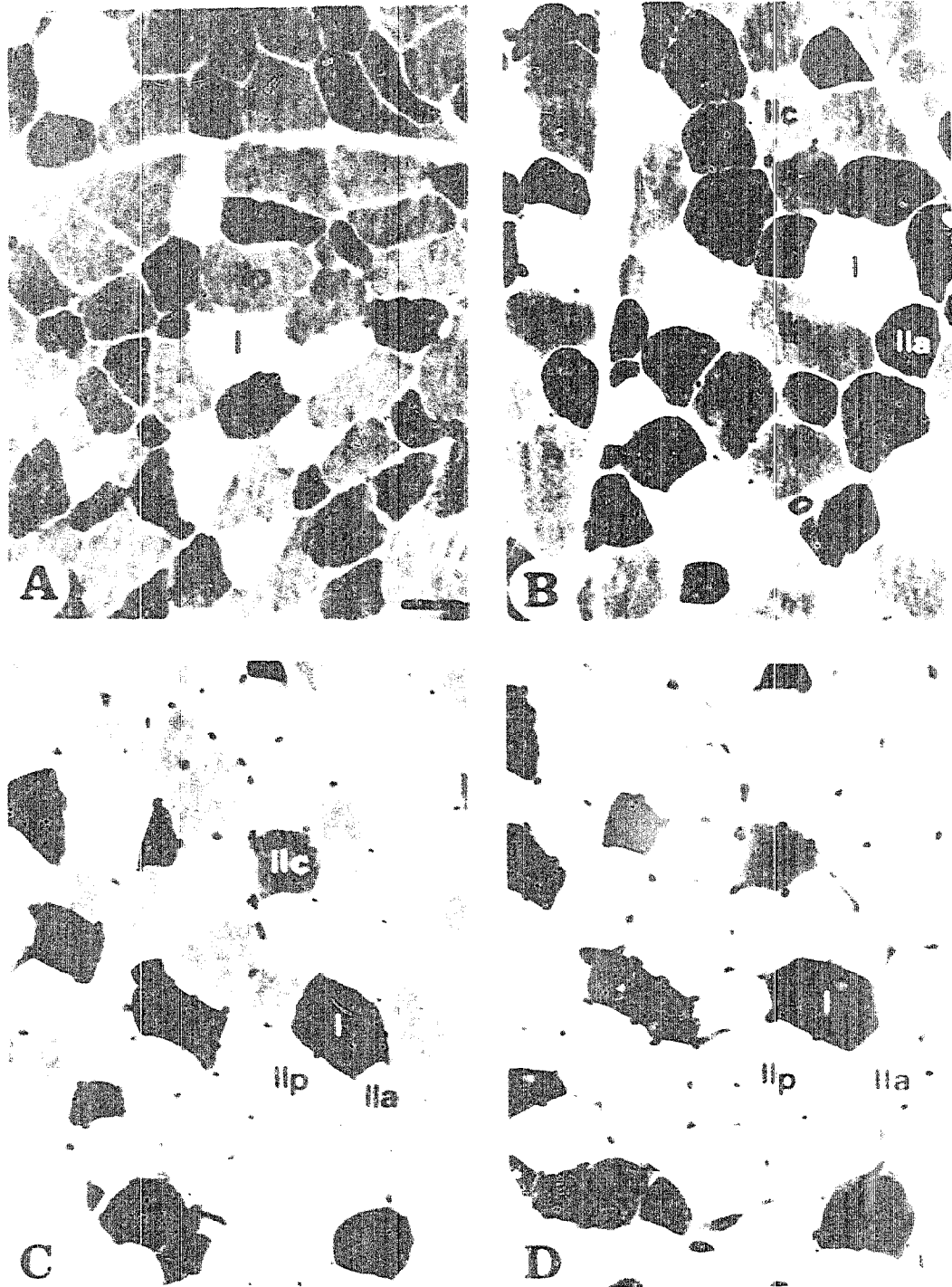




**ORIGINAL EN COLOR**

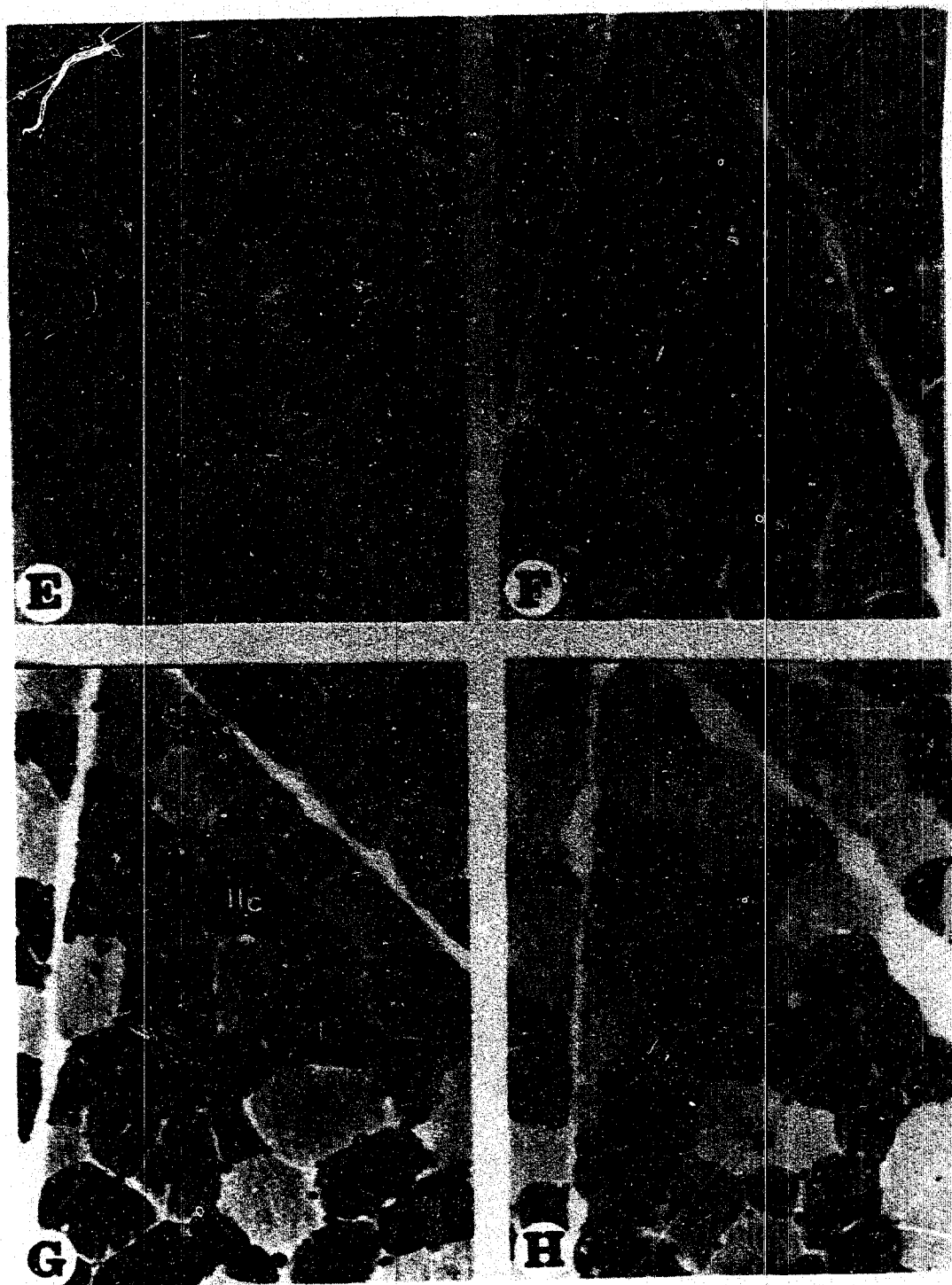


**ESTUDIOS Y TRATAMIENTO DE LA DOCUMENTACION, S.A.**



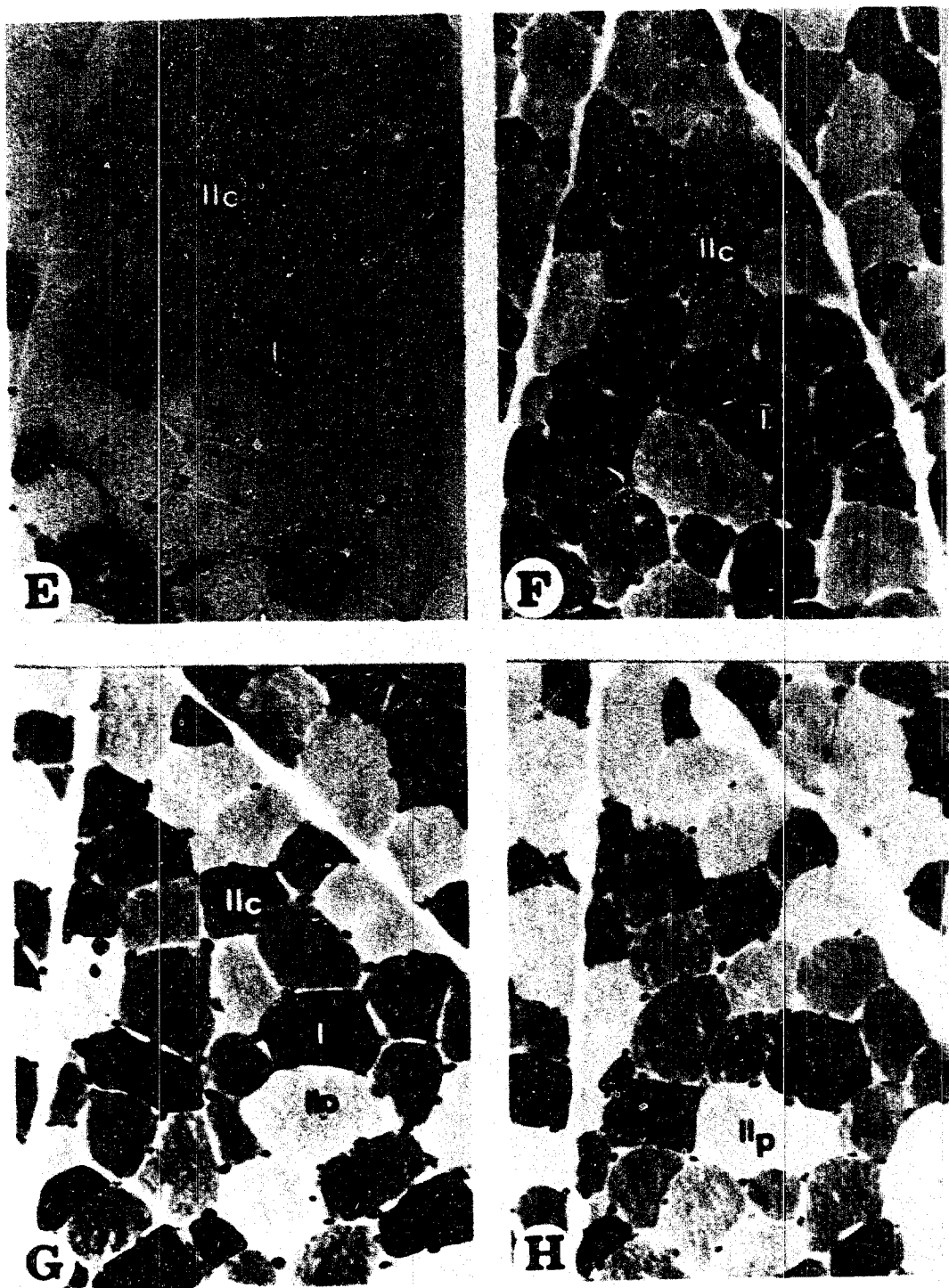
**FIGURA 1:** Secciones del M. semitendinoso de perros adultos.

Técnica m-ATPasa: preincubación alcalina a pH 10'2 (A) y 10'6 (B); preincubación ácida (Sistema acetato de sodio 0'2 M) a pH 4'6 (C) y 4'4 (D).



**FIGURA 1:** Secciones del M. semitendinoso de perros adultos.

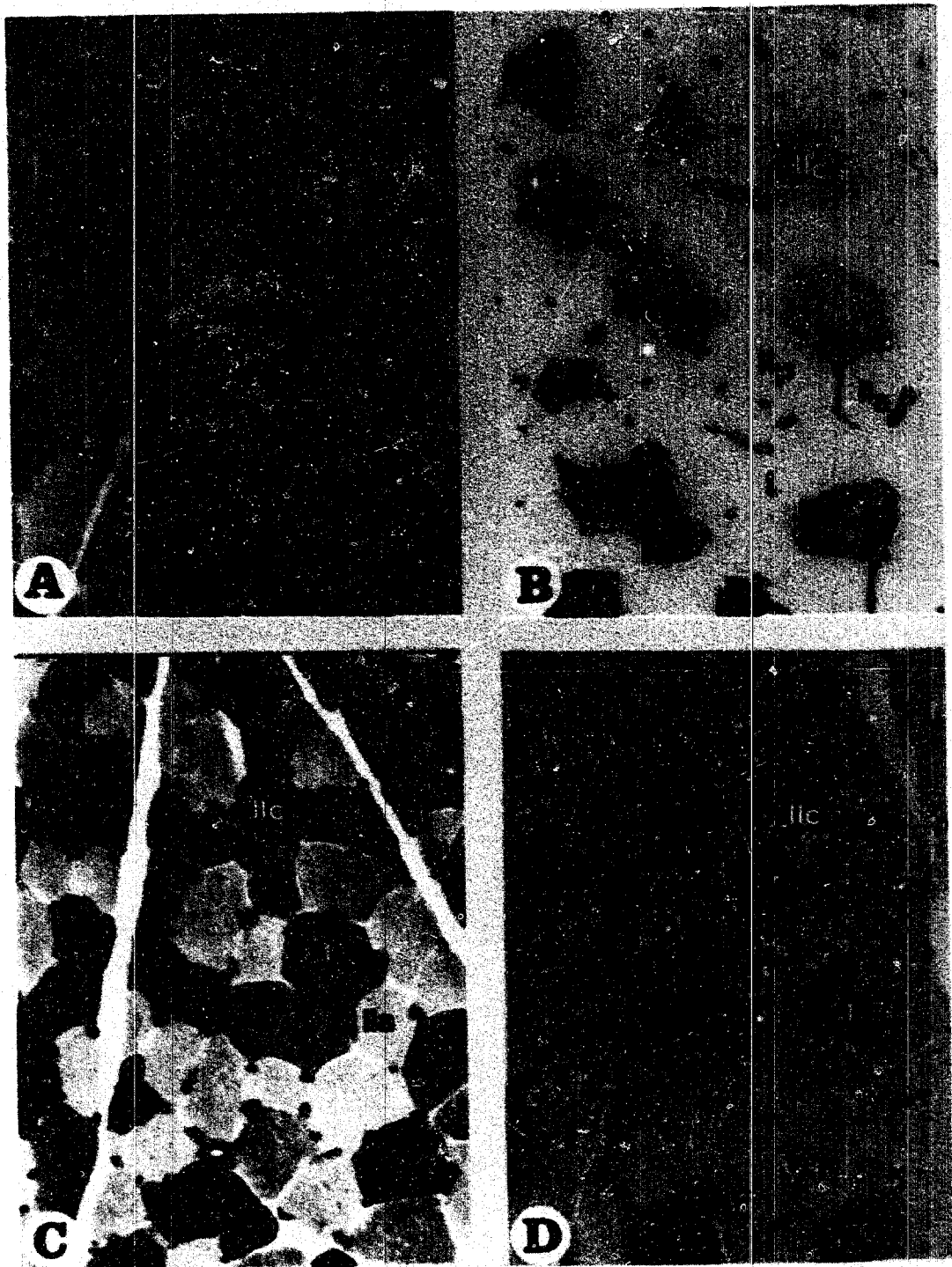
Técnica m-ATPasa: preincubación ácida (Sistema "A-M") a pH 4'2 -15 minutos- (E), pH 4'35 -5 minutos- (F), pH 4'35 -10 minutos- (G) y pH 4'35 -15 minutos- (H). La barra que aparece en la Fig.1A es válida para todas las fotografías y equivale a 40 micras.



**FIGURA 1:** Secciones del M. semitendinoso de perros adultos.

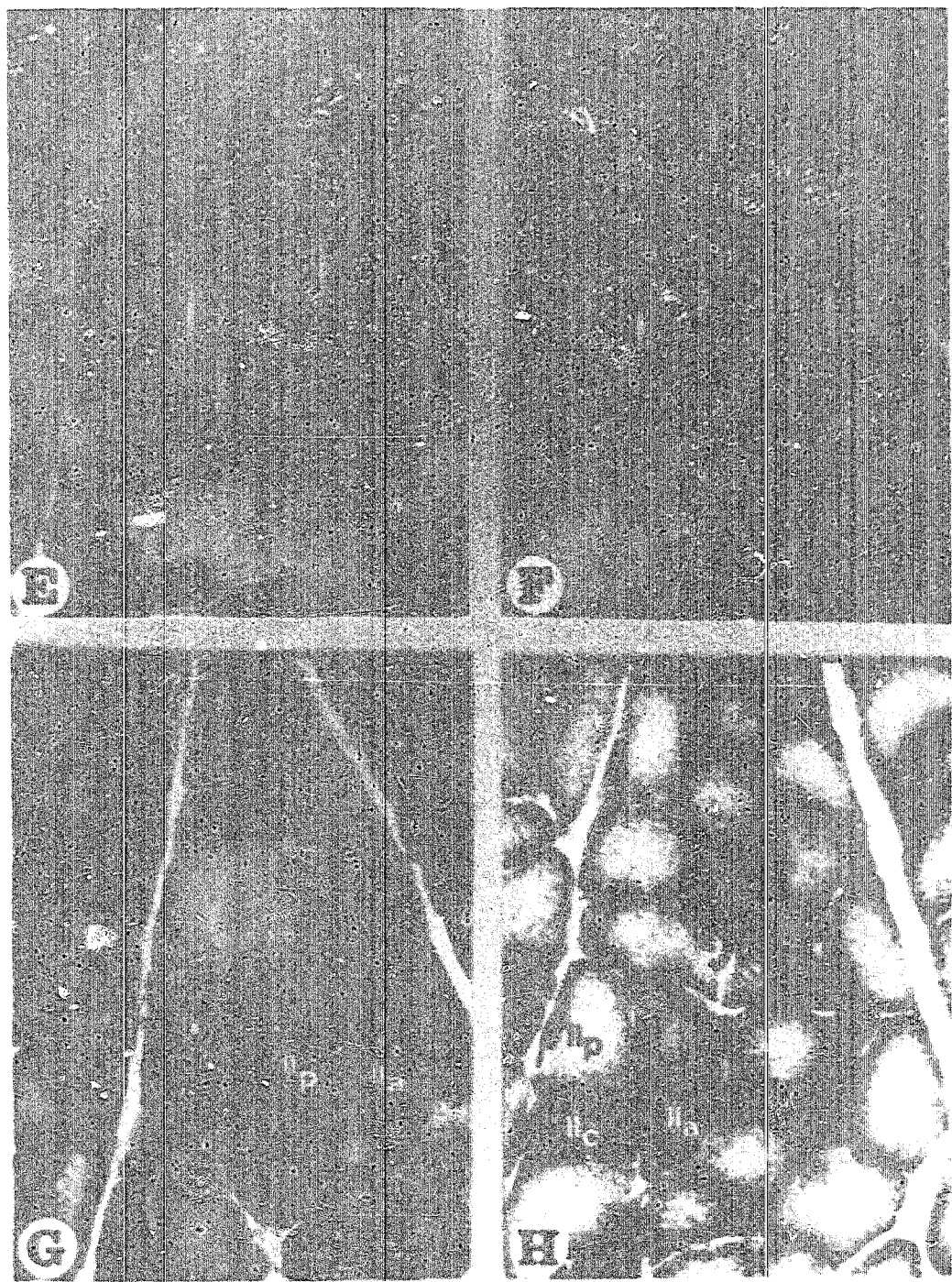
Técnica m-ATPasa: preincubación acida (Sistema "A-M") a pH 4'2 -15 minutos- (E), pH 4'35 -5 minutos- (F), pH 4'35 -10 minutos- (G) y pH 4'35 -15 minutos- (H).

La barra que aparece en la Fig.1A es válida para todas las fotografías y equivale a 40 micras.



**FIGURA 2:** Secciones del M. semitendinoso de perros adultos.

Técnica mATPasa: preincubación ácida (Sistema "B-M") a pH 4'6 -15 minutos- (A) y pH 4'35 -10 minutos- (B); preincubación ácida [Método Dubowitz/Brooke (1973), modificado] con pH 4'6 (C) y 4'3 (D).

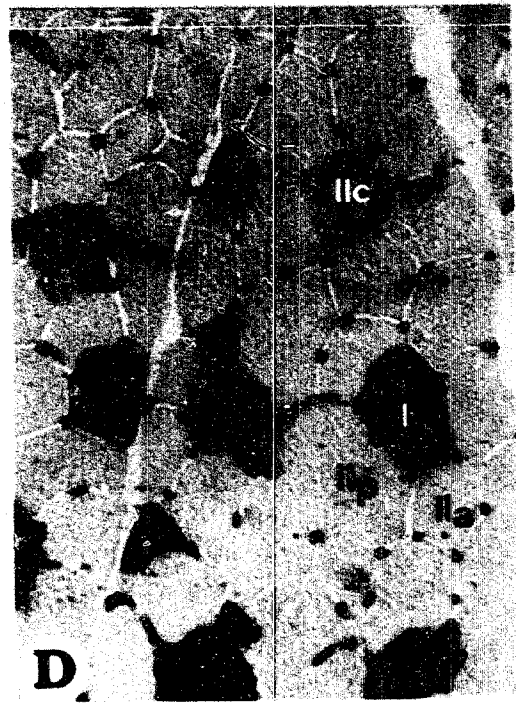
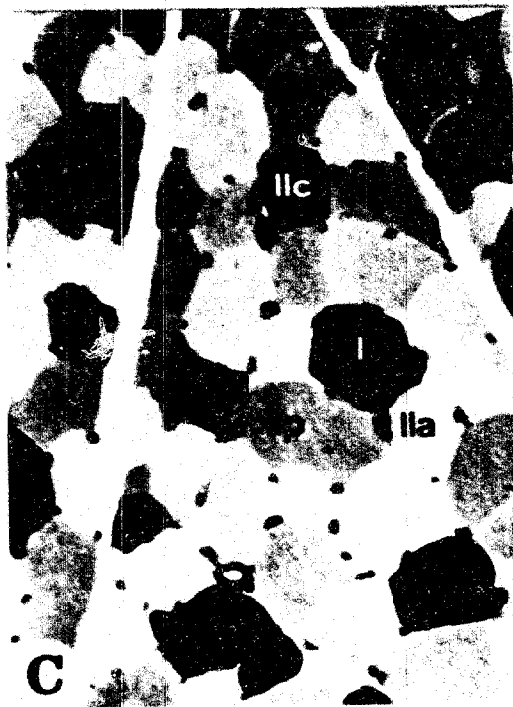
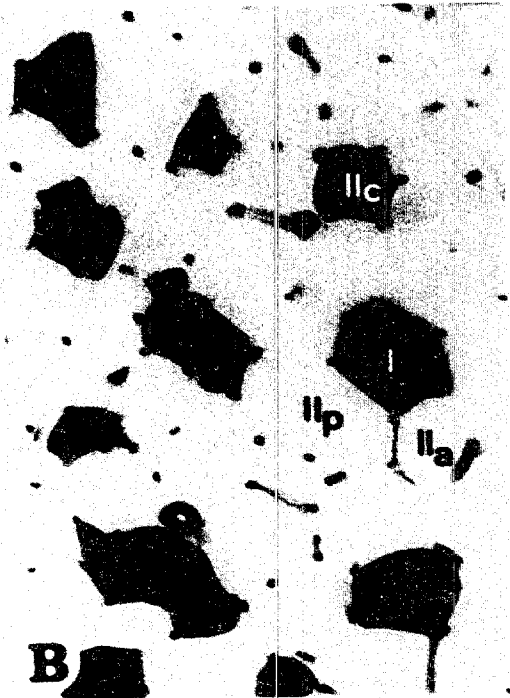
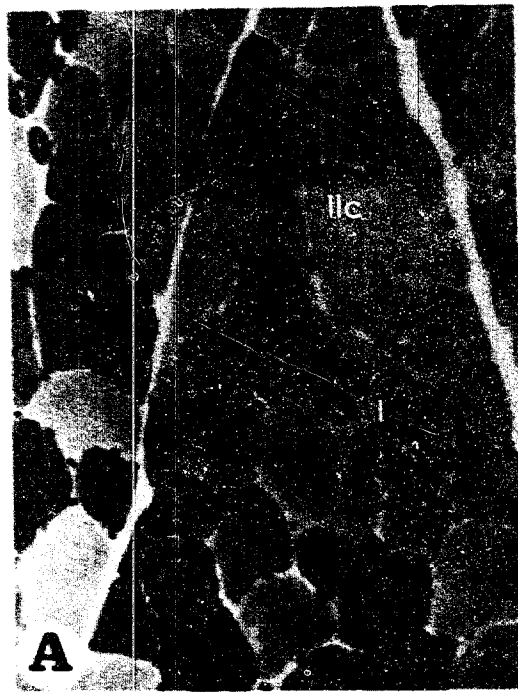


**FIGURA 2:** Secciones del *M. semitendinoso* de perros adultos.

Técnica Ca-Mg-ATPasa con 30 minutos de incubación (E).

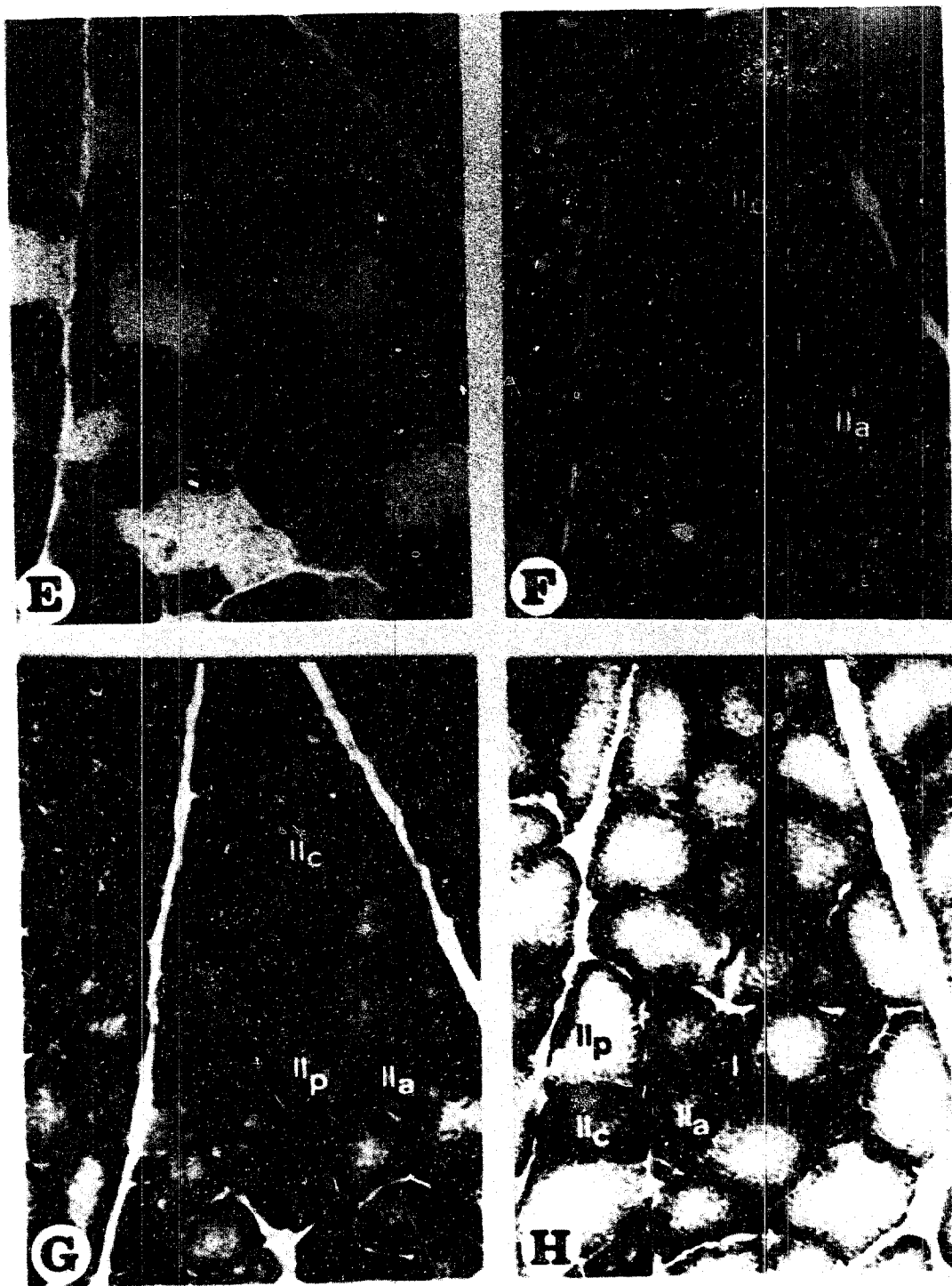
Técnicas metabólicas: NADH-TR (F,H), M-GPDH (G).

La barra corresponde a 40 micras (A-H).



**FIGURA 2:** Secciones del M. semitendinoso de perros adultos.

Técnica mATPasa: preincubación ácida (Sistema "B-M") a pH 4'6 -15 minutos- (A) y pH 4'35 -10 minutos- (B); preincubación ácida [Método Dubowitz/Brooke (1973), modificado] con pH 4'6 (C) y 4'3 (D).



**FIGURA 2:** Secciones del M. semitendinoso de perros adultos.

Técnica Ca-Mg-ATPasa con 30 minutos de incubación (E).

Técnicas metabólicas: NADH-TR (F,H), M-GPDH (G).

La barra corresponde a 40 micras (A-H).



## B.- RESULTADOS M. FLEXOR CARPORADIAL DE PERROS ADULTOS.

### B.1.- ANALISIS MACROSCOPICO DE LAS SECCIONES MUSCULARES.

Analizamos las secciones referidas en Material y Metodos en orden próximodistal, desde el origen a la inserción del musculo.

En primer lugar el musculo tiene su origen en el epicondilo medial del humero. A partir de este origen, las fibras se agrupan y conforman dos cabezas denominadas "cabeza radial" y "cabeza cubital" (McCONATHY et al., 1983), que se prolongan a lo largo del vientre muscular. Dichas cabezas, presentes ya desde el primer nivel de seccion, confluyen distalmente para constituir un unico tendon de insercion (Fig.3).

**Sección 1ª (Fig.4):** Observamos como la cabeza radial se dispone hacia las caras craneal y medial del musculo. La cabeza cubital ocupa el resto de la seccion, es decir las caras lateral y caudal completas, extendiendose tambien por la mitad caudal de la cara medial. El tendón de origen presente a este nivel, queda entre ambas cabezas musculares. En ocasiones lo hemos observado englobado en la cabeza cubital, ya que progresivamente se desplaza hacia la periferia siempre en relacion con la cara craneal.

**Sección 2ª (Fig.5):** La cabeza radial sigue ocupando la cara craneal en parte y a este nivel se extiende por casi toda la cara medial, llegando a las

inmediaciones de la cara caudal. Dicha cabeza representa, como máximo, un tercio del total de la sección.

La **cabeza cubital** adquiere una morfología más redondeada que en secciones anteriores. Ocupa la parte restante de la cara craneal, la cara lateral completa y se extiende además por la cara caudal.

A este nivel se localiza con frecuencia el hilio vascular, siempre por la cara craneal y entre ambas cabezas. Los **tendones** de origen e inserción quedan aquí muy reducidos. Sin embargo, entre este nivel y el anteriormente considerado, se produce la confluencia de sus extremos. El de origen en relación con la cabeza cubital y el de inserción hacia la parte caudal de la cabeza radial.

**Sección 3ª (Fig.6):** La sección adquiere a este nivel forma ovalada y coincide con la zona ecuatorial y de mayor diámetro del músculo. El **tendón** de inserción, una formación tendinosa a este nivel, queda entre las cabezas radial y cubital.

La disposición de la **cabeza radial** varía mucho respecto al nivel anterior, al sufrir un claro desplazamiento hacia la cara caudal del músculo, que queda constituida únicamente por dicha cabeza. Cranealmente la cabeza radial se extiende hacia la mitad de la cara medial.

La cabeza cubital representa casi las tres cuartas partes de la sección. Su topografía parece no variar mucho respecto al eje central del músculo. Ocupa totalmente el tercio craneal de la sección, proyectándose en diagonal desde el punto medio de la cara medial hasta la parte más caudal de la cara lateral, ocupando dicha cara de manera completa.

**Sección 4' (Fig.7):** La sección muscular adquiere una morfología alargada en sentido craneocaudal, siendo su diámetro mayor (craneo-caudal) el triple que el diámetro menor (medio-lateral). El tendón de inserción permanece en el límite de ambas cabezas aunque muy reducido en su espesor.

La cabeza radial ocupa plenamente el tercio caudal de la sección, proyectándose ahora en parte por la cara lateral y quedando sus extremos medial y lateral prácticamente nivelados. No obstante, siempre es el extremo medial el que se topografía algo más cranealmente.

La cabeza cubital pasa a ocupar los tercios craneal y medio de la sección, con una inclinación mediolateral por su zona más caudal.

**Sección 5' (Fig.8):** La morfología de la sección varía mucho respecto al nivel anterior. Las dos cabezas quedan muy separadas, como si se tratara de dos músculos totalmente independientes, interponiéndose entre ellas el tendón de inserción, muy engrosado a estos niveles. Dicho

tendón en secciones más distales queda parcialmente englobado por la cabeza radial.

La topografía de la **cabeza radial** no varía respecto a la de la sección anterior, manteniéndose en posición caudal. A estos niveles la cabeza radial adquiere mayor extensión dentro de la sección que la cabeza cubital, hecho que se acentúa a medida que analizamos secciones más distales. Esto se debe a que la cabeza radial tiene mayor continuidad a lo largo del tendón de inserción.

La **cabeza cubital** ocupa, al igual que en niveles anteriores, la parte craneal de la sección. La morfología que adquiere es alargada y con una extensión relativamente pequeña respecto a niveles anteriormente considerados.

En resumen, podemos concluir diciendo que los límites que establecen ambas cabezas son claros y se acentúan al distanciarnos del punto de origen. Asimismo, cada cabeza presenta unas características comunes en cualquiera de los niveles, por las que se diferencia de la otra:

**Cabeza cubital:**

-Representa por término medio (secciones 1ª a 4ª) los dos tercios del total de la sección.

-Se topografía en mayor o menor grado por la cara lateral del músculo.

### Cabeza radial:

-Representa un tercio de la sección muscular completa.

-Su localización, a pesar de la variación que experimenta a lo largo de los diferentes niveles, se corresponde siempre con la cara medial del músculo.

### **B.2.- TIPOS DE FIBRAS (Fig.9).**

Con idénticos criterios de identificación fibrilar que en el M. semitendinoso, y desde el punto de vista de la actividad mATPasa, no hemos podido constatar en el M. flexor carporradial la presencia de fibras tipo IIP. Por otra parte, las fibras I, IIA y IIC se identifican sin dificultad (Figs.9A,9B,9C,9D), aunque sus porcentajes y distribución ofrecen ciertas particularidades que merecen ser reflejadas de forma exhaustiva. Antes de abordar estos aspectos, destaquemos el comportamiento variable que muestran las fibras IIA ante técnicas oxidativas (NADH-TR) (Fig.9E) y glicolíticas (M-GPDH) (Fig.9F). Así, apreciamos fibras de actividad oxidativa moderada, con depósitos tintoriales concentrados en las proximidades del sarcolema (actividad periférica) y de alta actividad glicolítica, junto a fibras IIA con actividad M-GPDH moderada y alta actividad oxidativa, que presentan depósitos tintoriales distribuidos homogéneamente por todo el sarcoplasma. Incluso en algunas ocasiones hemos detectado un tercer comportamiento metabólico al evidenciar fibras IIA con alto potencial tanto oxidativo como glicolítico.

### **B.3.- DISTRIBUCION, PORCENTAJES Y MORFOMETRIA DE LAS FIBRAS EN LOS DIFERENTES NIVELES CONSIDERADOS.**

Las fibras I, IIA y IIC se distribuyen de forma muy variable, dependiendo del nivel de la sección y de la zona muscular que consideremos (caras lateral, medial, craneal y caudal, zonas superficial y profunda).

En la cabeza cubital, desde el punto de vista histoquímico, se advierte un predominio de las fibras tipo I en el centro de la cabeza, siendo mayoritarias en la periferia las fibras IIA. Esta distribución fibrilar se acentúa en los niveles medios (secciones tercera y cuarta).

La cabeza radial está constituida casi de forma exclusiva por fibras tipo I, aunque existe una zona que presenta fibras tipo II. A ésta última la denominamos "Zona mixta", y al resto de la cabeza radial "Zona tipo I".

Analizando en concreto cada una de las secciones podemos referir lo siguiente:

**Sección 1' (Fig.4):** En la cabeza radial siempre es evidente la presencia de una zona tipo I, que en este nivel tiene escaso desarrollo al ocupar la zona mixta una amplia extensión. En las secciones más distales dicha zona, que se ha ido reduciendo progresivamente, desaparece, quedando la cabeza integrada exclusivamente por fibras tipo I. En este sentido la proporción de

fibras tipo II en la zona mixta de esta primera sección representa el 50.6%.

La distribución de las fibras tipo I y II en la **cabeza cubital** es uniforme de superficie a profundidad y los porcentajes aparecen reflejados en la TABLA II.

**Sección 2° (Fig.5):** Sigue siendo clara la demarcación entre zona tipo I y zona mixta en la **cabeza radial**. La primera queda situada hacia la cara medial del músculo y la segunda próxima a la cabeza cubital de la que aparece separada por el tendón de inserción. La proporción de fibras tipo I y II en la zona mixta es casi igual, 51% y 49% respectivamente. Ocasionalmente observamos que de la zona mixta partía un fascículo hacia la zona tipo I, quedando integrado en el espesor de esta última.

En la **cabeza cubital** existe un predominio de fibras tipo I hacia el centro de la misma. En la zona limitrofe con la cabeza radial se aprecian, en ocasiones, fascículos integrados únicamente por fibras de tipo II. Los porcentajes fibrilares quedan reflejados en la TABLA II.

**Sección 3° (Fig.6):** Es muy nítida la separación entre las zonas mixta y tipo I dentro de la **cabeza radial**. La primera aparece ya muy reducida y se topografía en las proximidades de la cabeza cubital. El resto lo ocupa la zona tipo I.

En profundidad la cabeza cubital permanece ocupada mayoritariamente por fibras tipos I y IIC, siendo en la periferia donde éstas últimas son mas escasas. Hay que destacar, como una constante en las distintas secciones de esta cabeza, la presencia de un fascículo de forma semilunar, integrado exclusivamente por fibras tipo I, dispuesto muy próximo a un huso neuromuscular.

Como siempre los porcentajes fibrilares quedan reflejados en la TABLA II.

Sección 4ª (Fig.7): La cabeza radial está integrada exclusivamente por fibras tipo I. A este nivel ha desaparecido totalmente la zona mixta, siendo muy pocas o ninguna las fibras tipo II presentes.

En la cabeza cubital la distribución de las fibras sigue siendo a manera de mosaico, y en la zona profunda se sigue observando un predominio de fibras tipo I, como en niveles anteriores. Los porcentajes se analizan en la TABLA II.

Sección 5ª (Fig.8): La cabeza radial, al igual que en el nivel anterior, queda integrada únicamente por fibras tipo I.

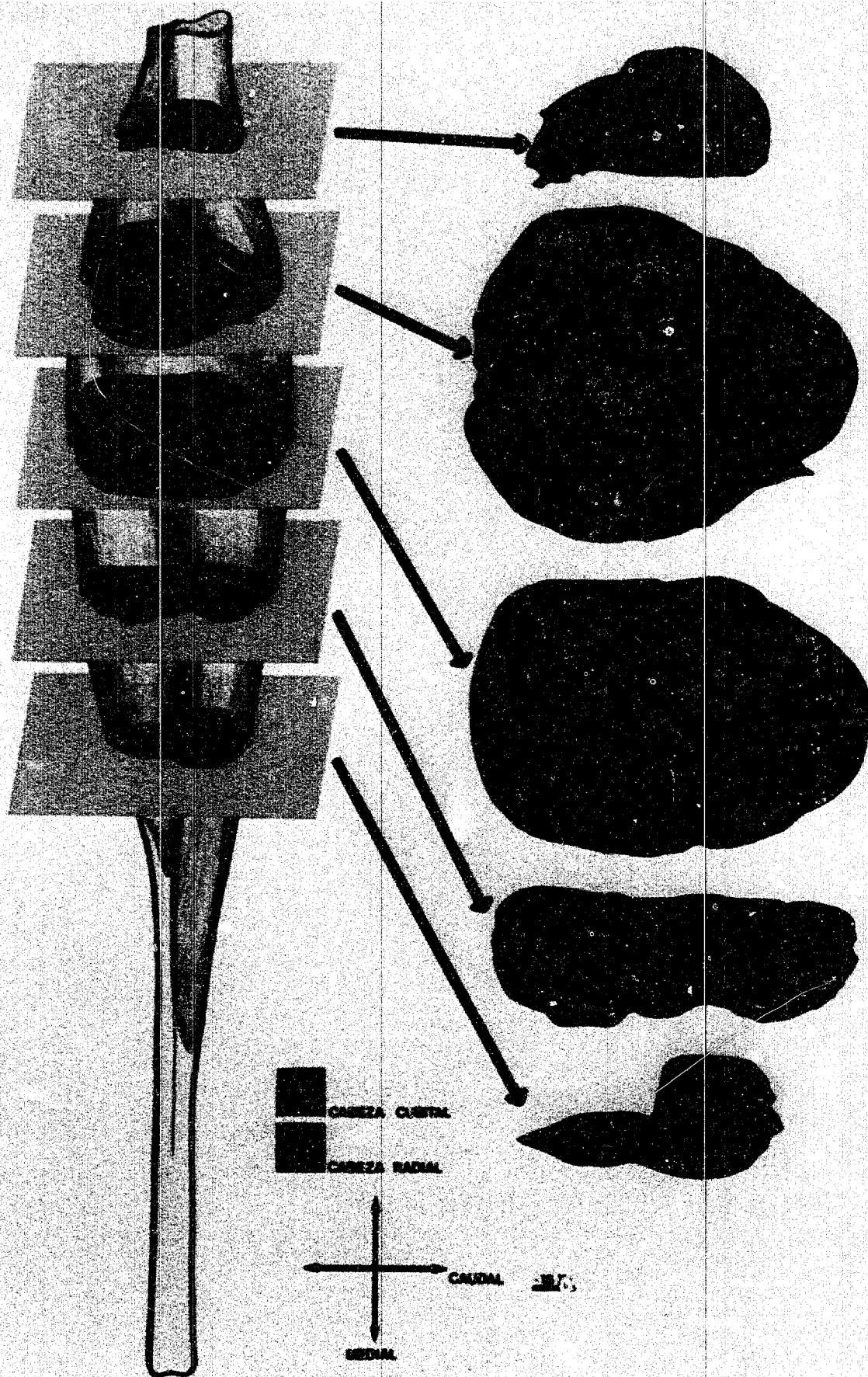
En la cabeza cubital la principal diferencia con respecto a niveles anteriores, es la distribución homogénea que ofrecen las fibras tipo I y II. Los porcentajes fibrilares se reflejan en la TABLA II.



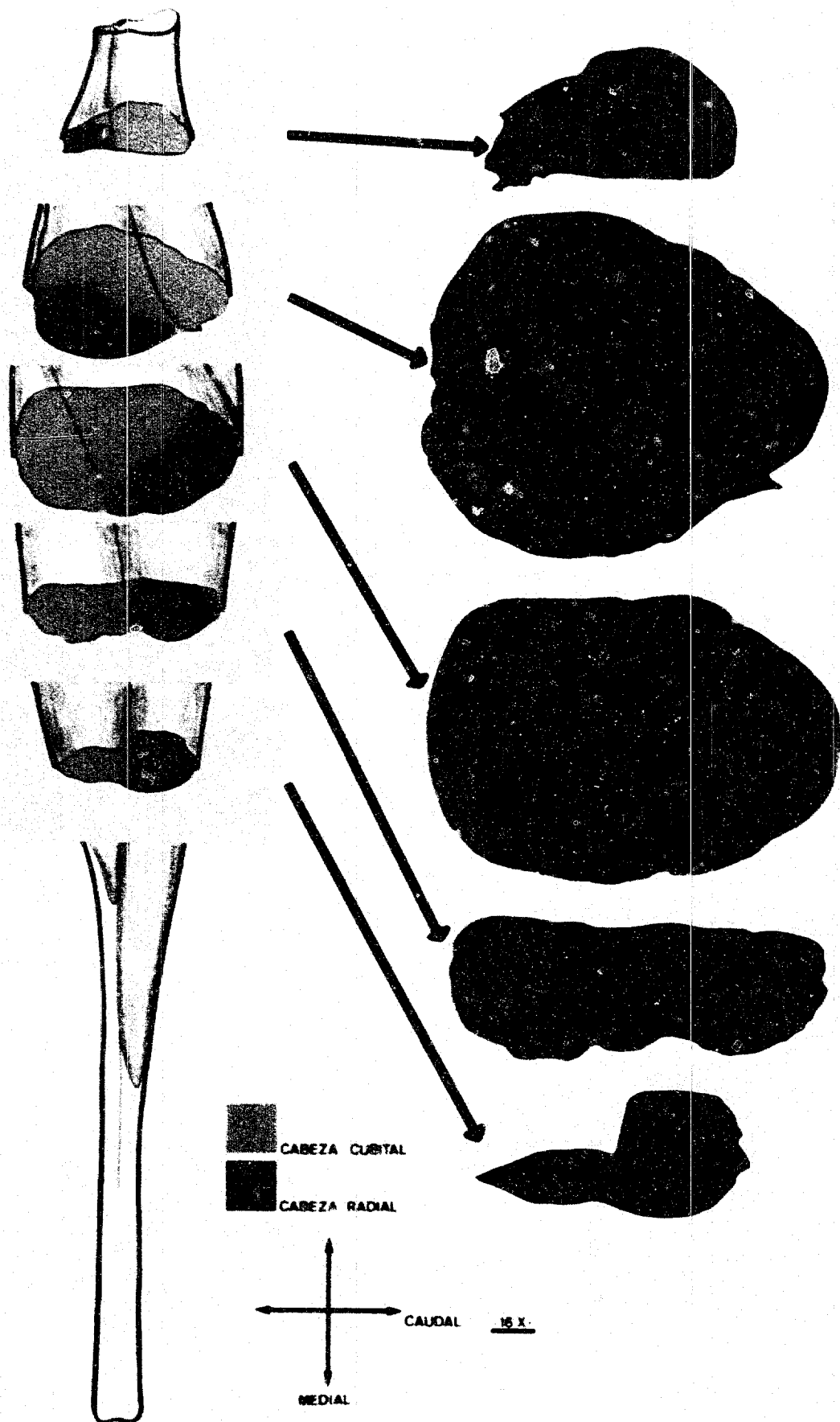
#### ASPECTOS MORFOMETRICOS.

Los valores de diámetro mínimo obtenidos para cada uno de los tipos de fibras identificados quedan reflejados en la TABLA III.

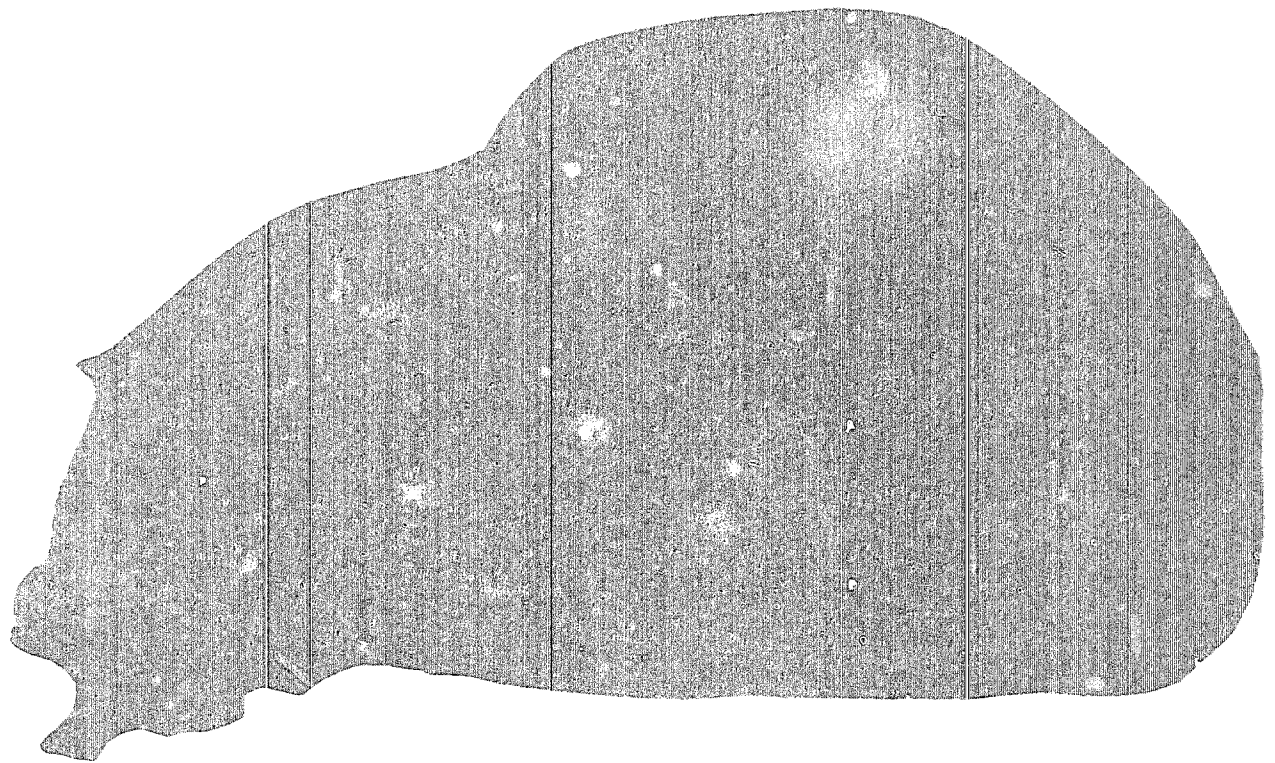
Como se puede observar, en la cabeza radial las fibras tipo I superan siempre en tamaño a las tipo IIA ( $p < 0.001$ ), cualquiera que sea el nivel analizado. Todo lo contrario sucede en la cabeza cubital, donde las IIA son las que presentan siempre un mayor diámetro ( $p < 0.001$ ). Las fibras IIC de la cabeza radial tienen valores comprendidos entre las I y IIA. En la cabeza cubital, el diámetro de estas fibras es menor ( $p < 0.05$ ) que el de las I y II en el nivel 1° y similar al de las tipo I en los siguientes niveles.



**FIGURA 3:** Representación gráfica del M. flexor carporradial de perros adultos, donde quedan reflejadas la orientación y localización de las cinco secciones consideradas para el estudio de dicho músculo.  
**CC:** Cabeza cubital; **CR:** Cabeza radial.  
 Original reducido al 45%.



**FIGURA 3:** Representación gráfica del M. flexor carporradial de perros adultos, donde quedan reflejadas la orientación y localización de las cinco secciones consideradas para el estudio de dicho músculo.  
**CC:** Cabeza cubital; **CR:** Cabeza radial.  
 Original reducido al 45%.



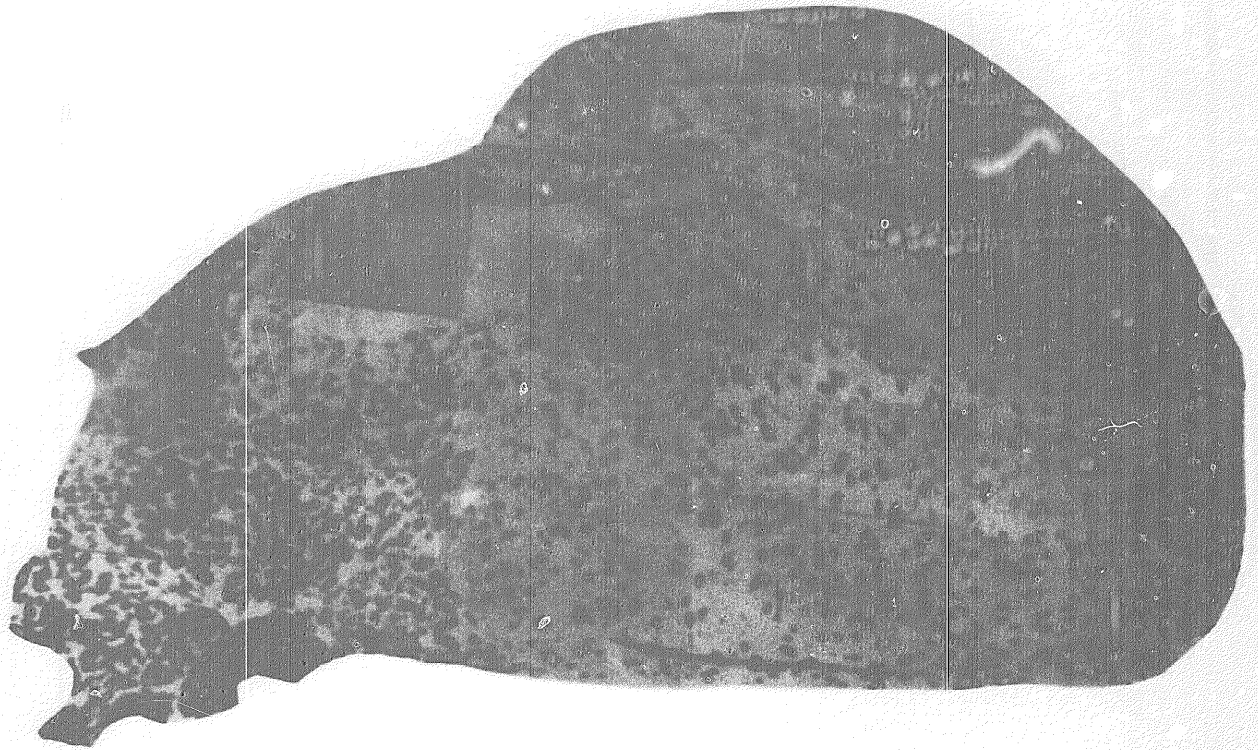
**FIGURA 4:** Sección 1ª del M. flexor carporradial de  
perros adultos.

**CC:** cabeza cubital.

**CR:** cabeza radial.

**to:** tendón de origen.

**27X**



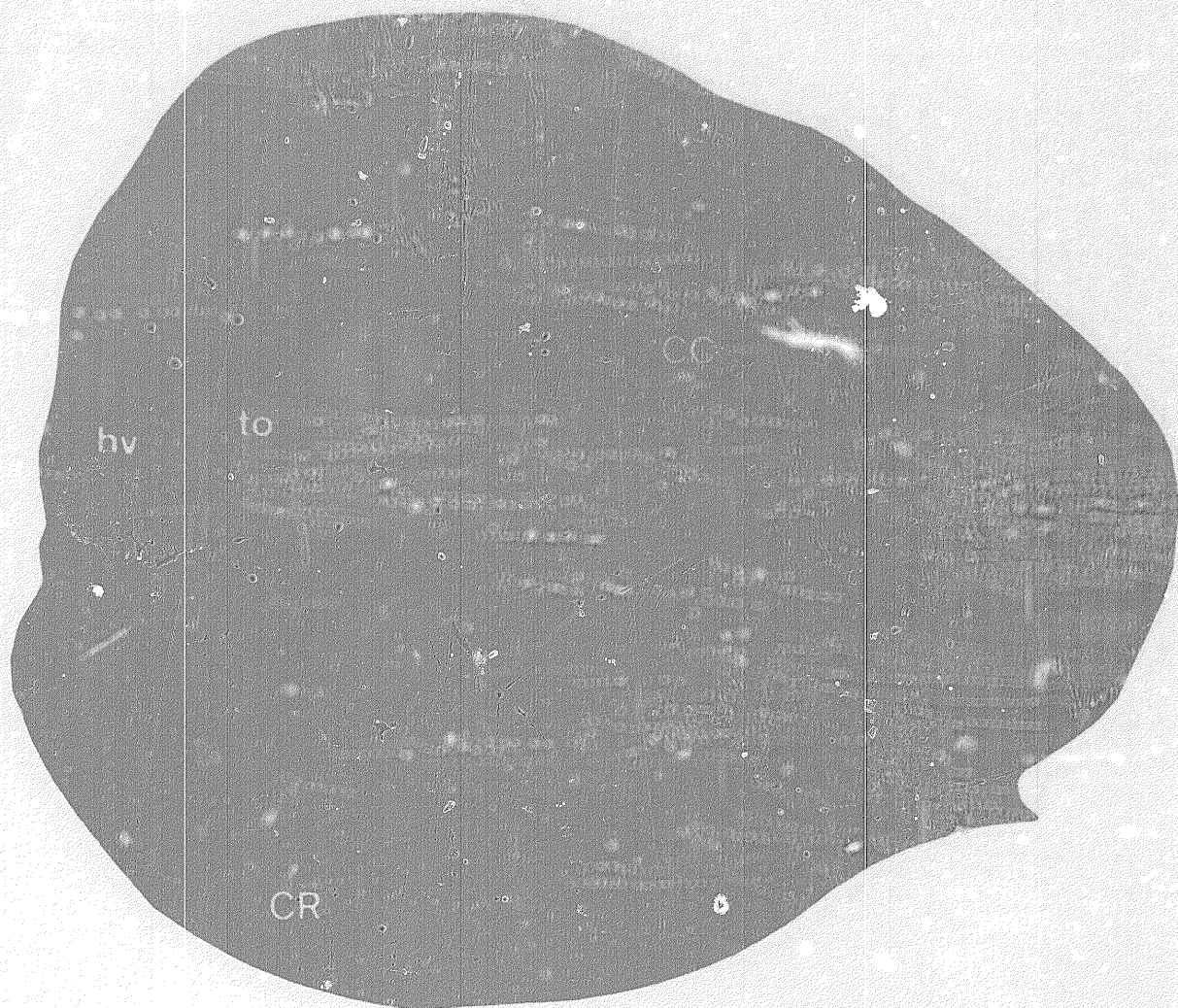
**FIGURA 4:** Sección 1ª del M. flexor carporradial de  
perros adultos.

**CC:** cabeza cubital.

**CR:** cabeza radial.

**to:** tendón de origen.

**27X**



**FIGURA 5:** Sección 2ª del M. flexor carporradial de perros adultos.

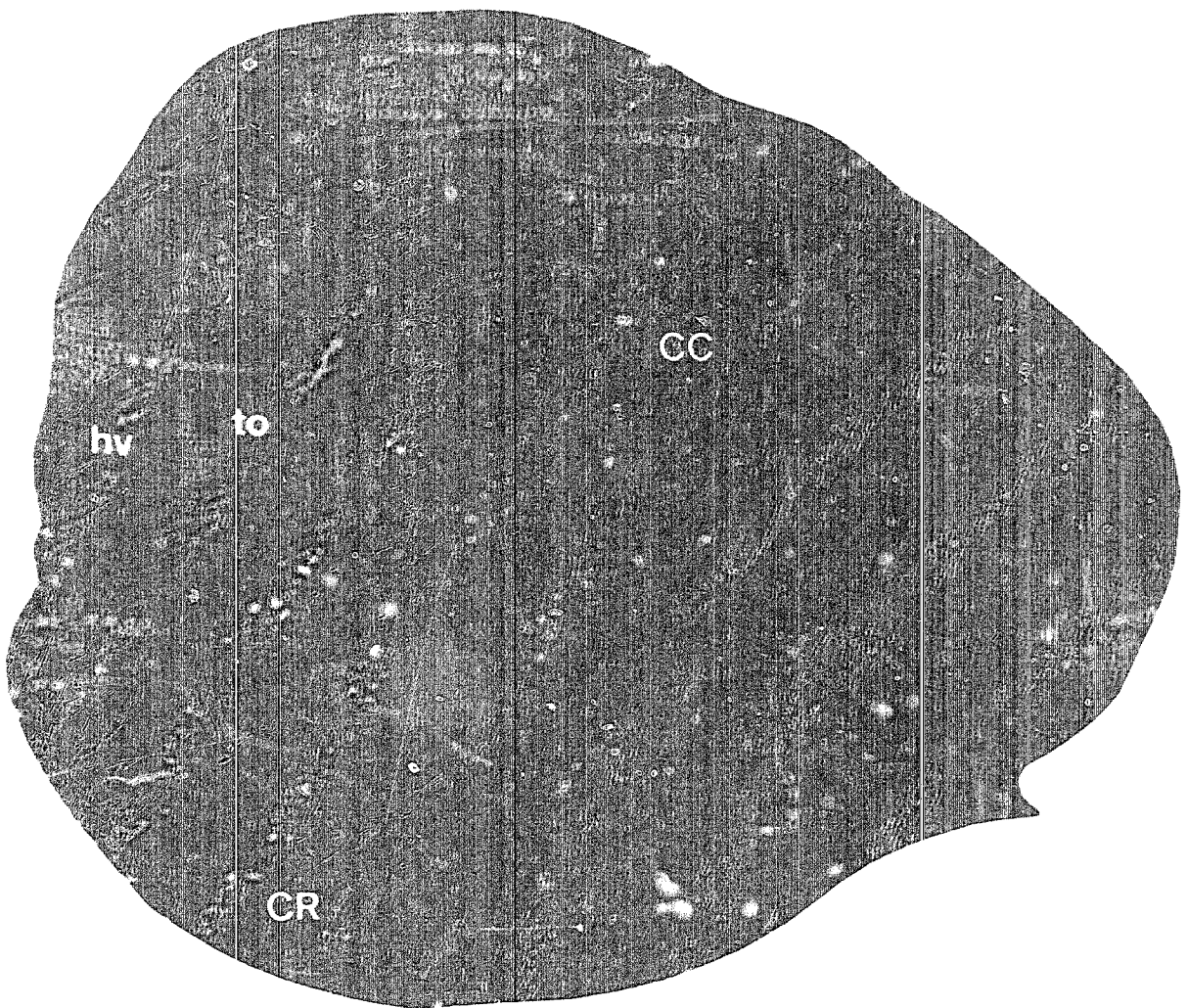
**CC:** cabeza cubital.

**CR:** cabeza radial.

**to:** tendón de origen.

**hv:** hilio vascular.

**16X**



**FIGURA 5:** Sección 2ª del M. flexor carporradial de perros adultos.

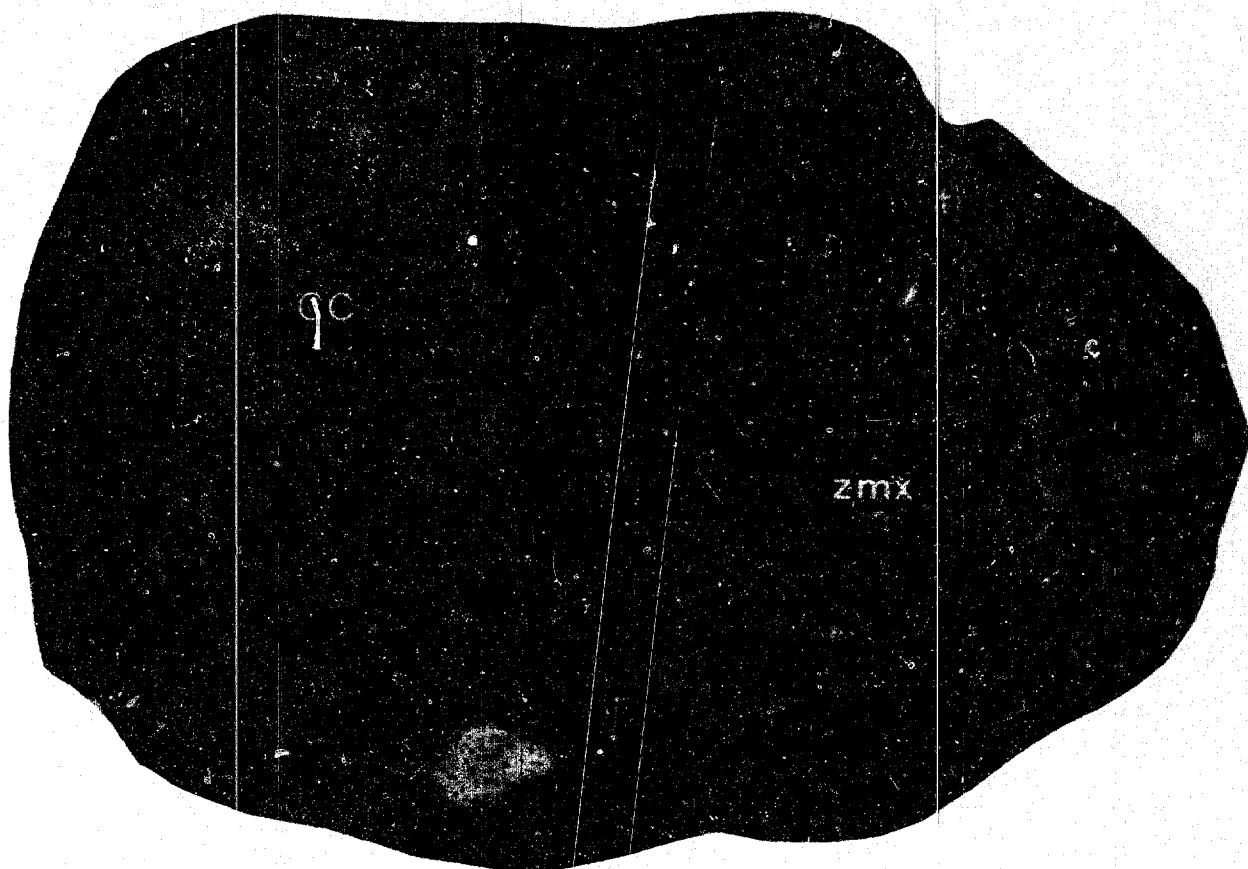
**CC:** cabeza cubital.

**CR:** cabeza radial.

**to:** tendón de origen.

**hv:** hilio vascular.

**16X**



**FIGURA 6:** Sección 3ª del M. flexor carporradial de perros adultos.

**CC:** cabeza cubital.

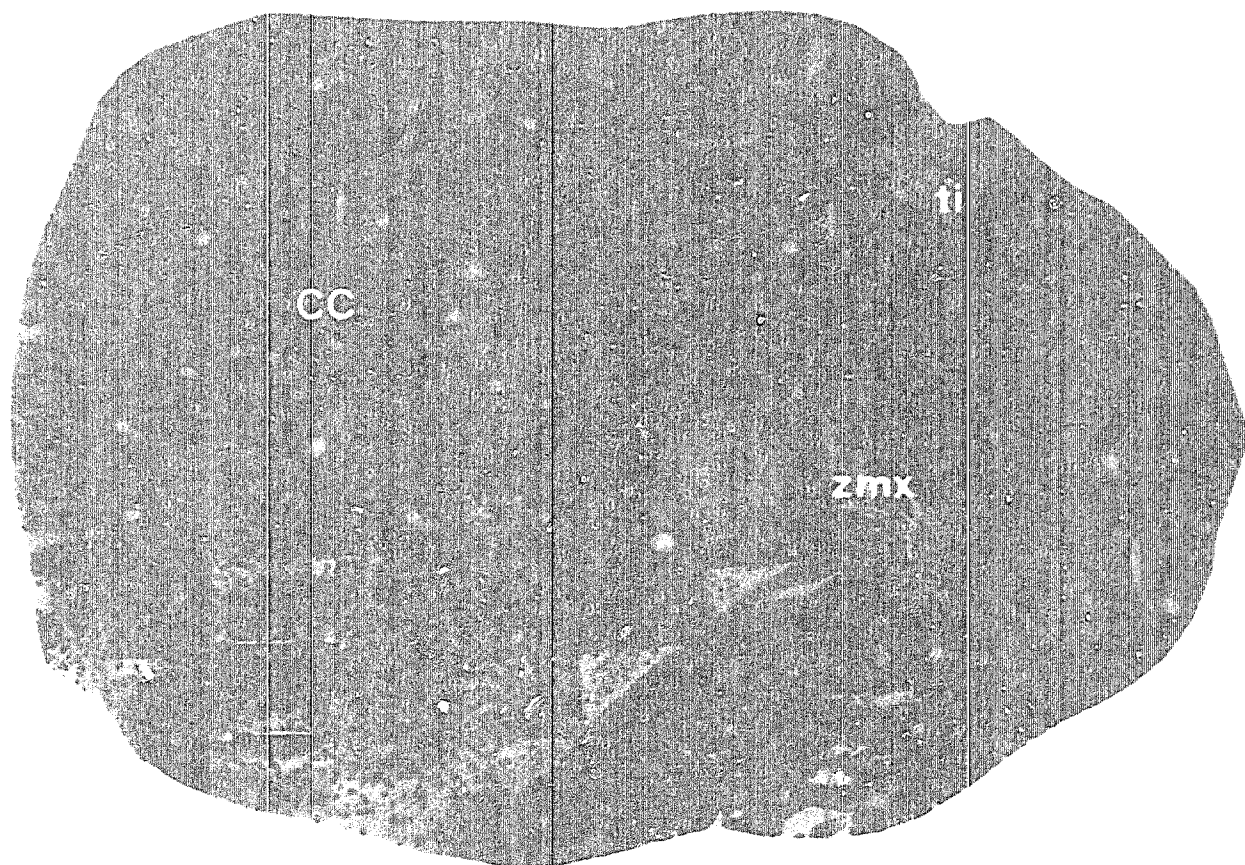
**CR:** cabeza radial.

**ti:** tendón de inserción.

**zmx:** zona mixta de la cabeza radial.

**16X**





**FIGURA 6:** Sección 3ª del M. flexor carporradial de perros adultos.

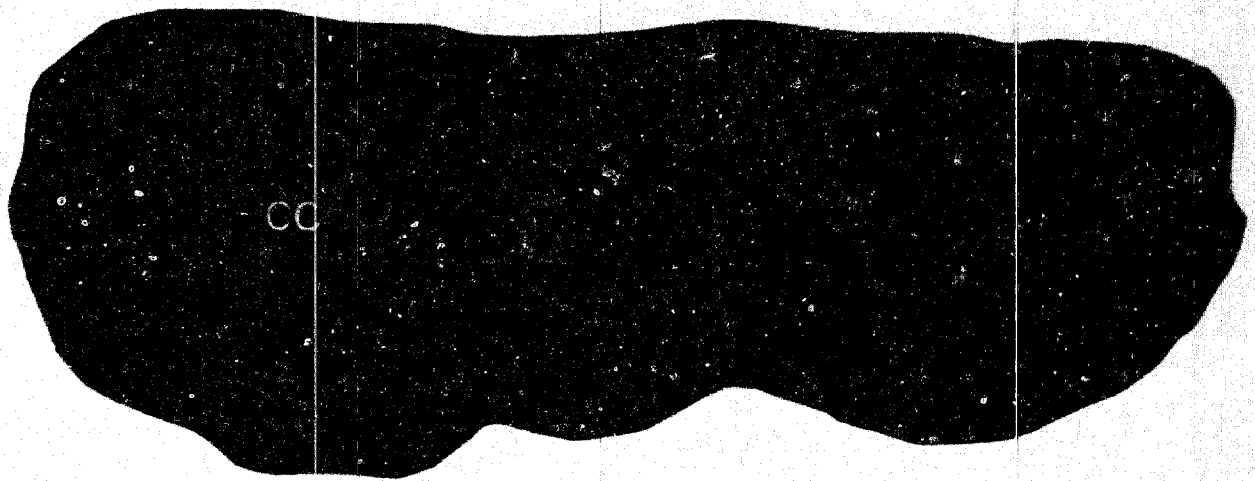
**CC:** cabeza cubital.

**CR:** cabeza radial.

**ti:** tendon de inserción.

**zmx:** zona mixta de la cabeza radial.

**16X**



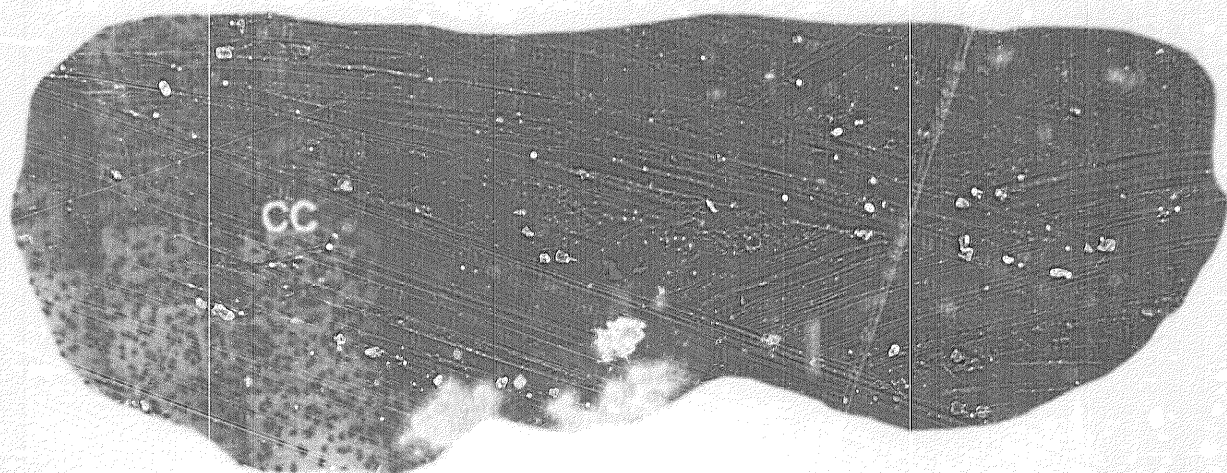
**FIGURA 7:** Sección 4ª del M. flexor carporradial de  
perros adultos.

**CC:** cabeza cubital.

**CR:** cabeza radial.

**ti:** tendón de inserción.

**16X**



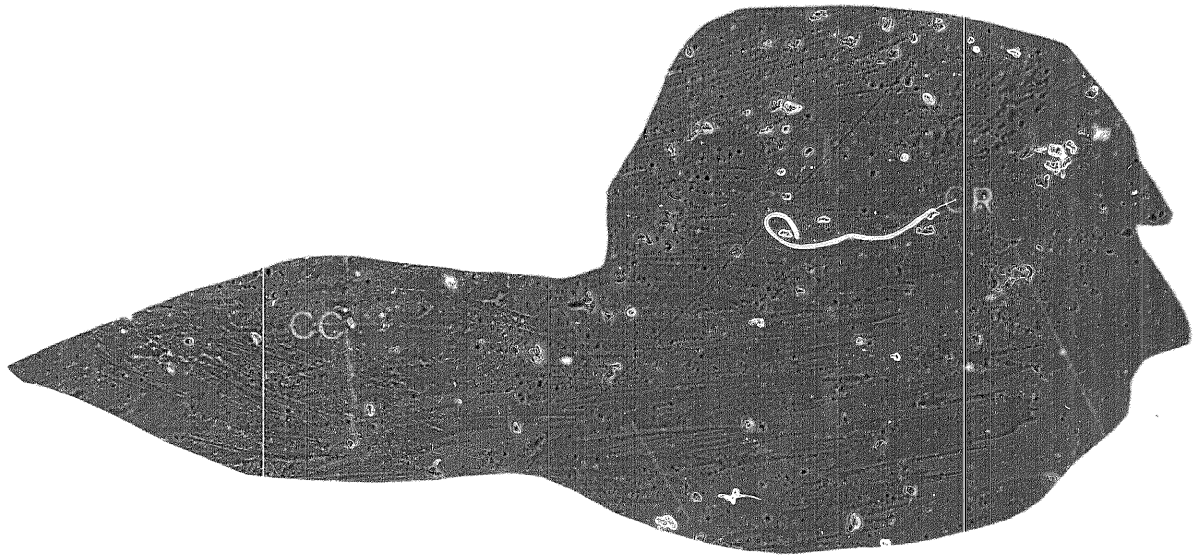
**FIGURA 7:** Sección 4ª del M. flexor carporradial de  
perros adultos.

**CC:** cabeza cubital.

**CR:** cabeza radial.

**ti:** tendón de inserción.

**16X**



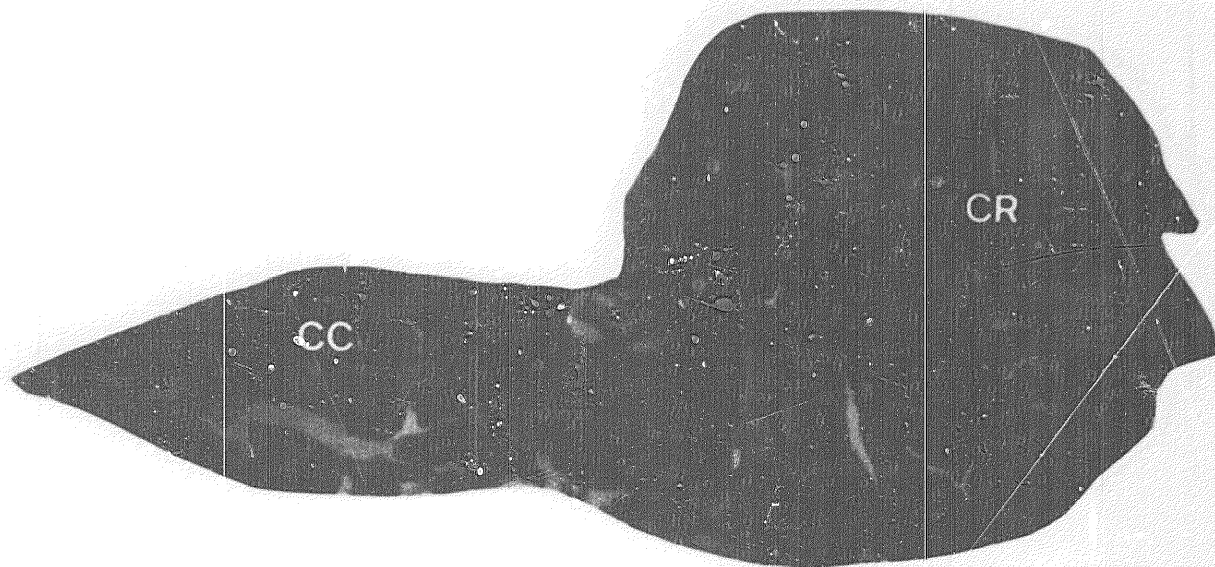
**FIGURA 8:** Sección 5ª del M. flexor carporradial de  
perros adultos.

**CC:** cabeza cubital.

**CR:** cabeza radial.

**ti:** tendón de inserción.

**24X**



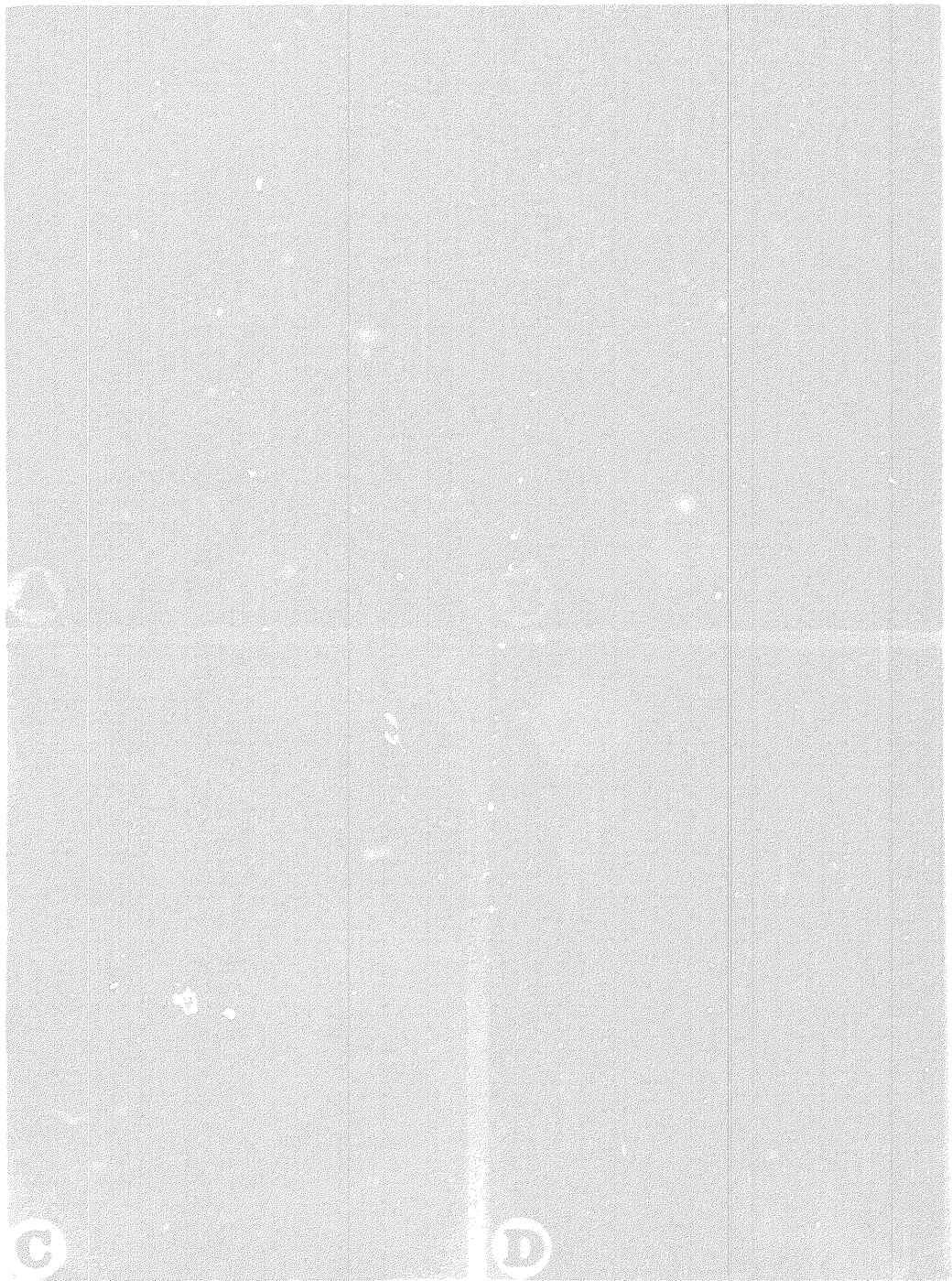
**FIGURA 8:** Sección 5ª del M. flexor carporradial de perros adultos.

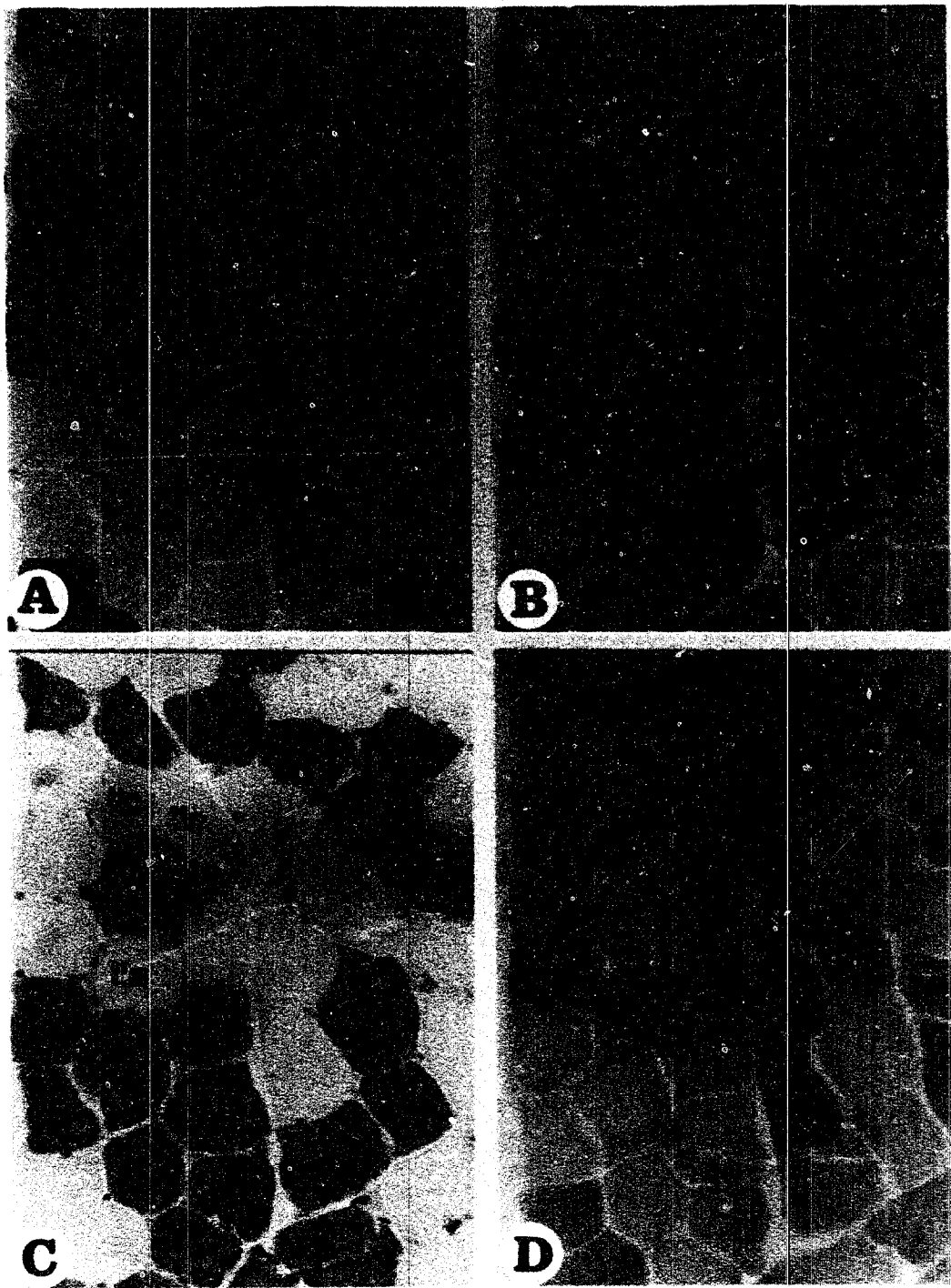
**CC:** cabeza cubital.

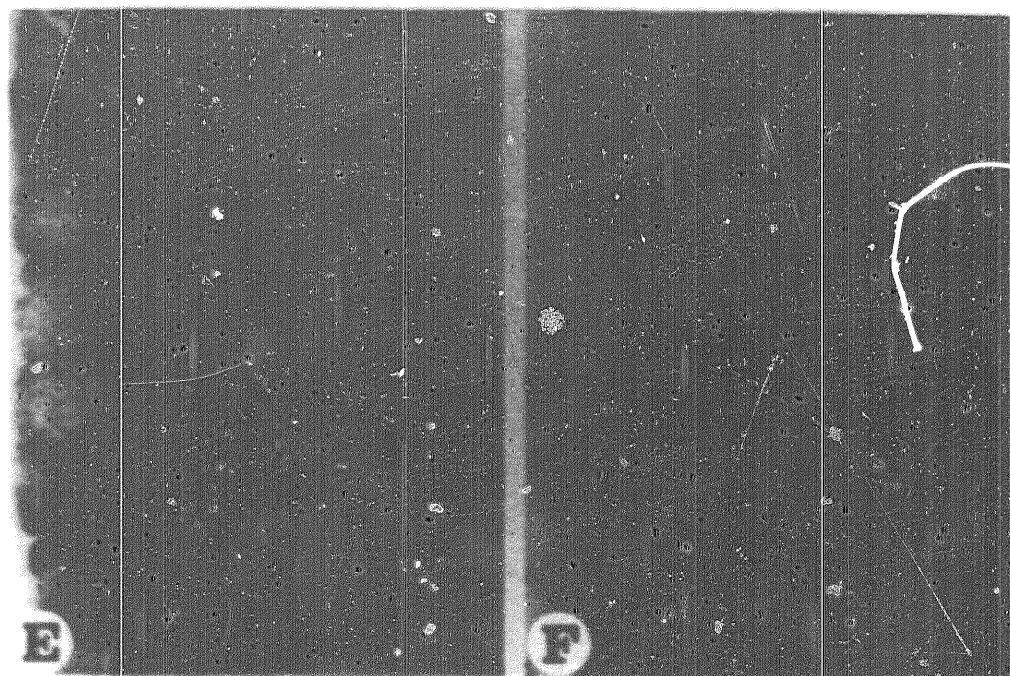
**CR:** cabeza radial.

**ti:** tendón de inserción.

**24X**







**FIGURA 9:** Secciones del M. flexor carporradial de perros adultos.

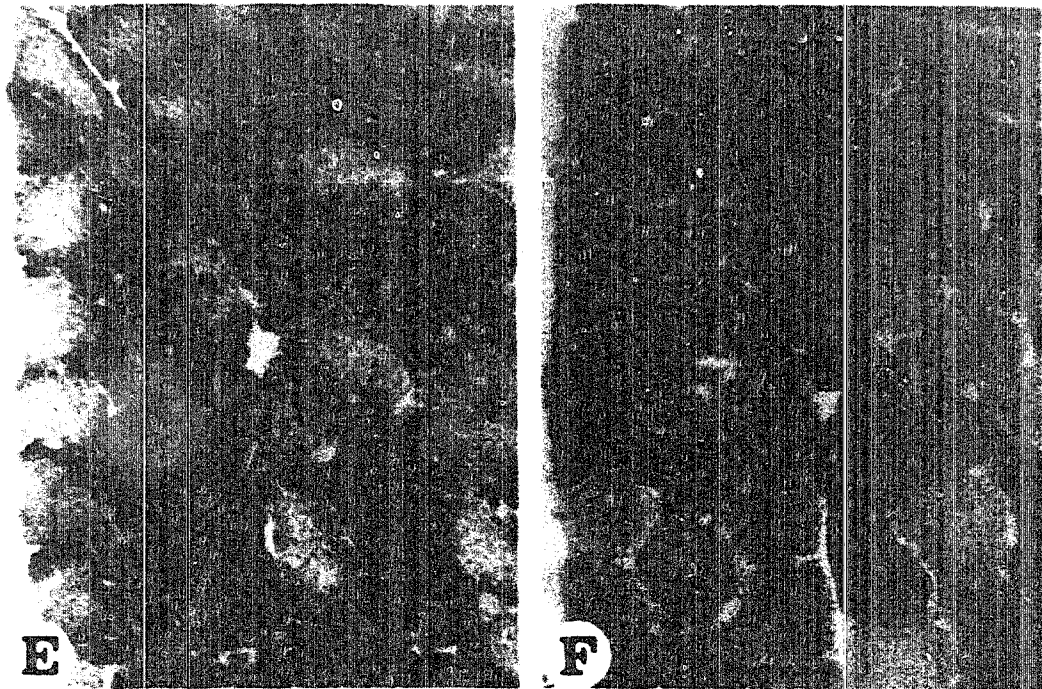
Técnica mATPasa: preincubación alcalina con pH 10'5 (A); preincubación ácida (Sistema acetato de sodio 0'2 M) con pH 4'6 (B) y 4'4 (C).

Técnica Ca-Mg-ATPasa con 30 minutos de incubación (D).

Técnicas metabólicas NADH-TR (E) y M-GPDH (F).

La barra corresponde a 40 micras.





**FIGURA 9:** Secciones del M. flexor carporradial de perros adultos.

Técnica mATPasa: preincubación alcalina con pH 10'5 (A); preincubación ácida (Sistema acetato de sodio 0'2 M) con pH 4'6 (B) y 4'4 (C).

Técnica Ca-Mg-ATPasa con 30 minutos de incubación (D).

Técnicas metabólicas NADH-TR (E) y M-GPDH (F).

La barra corresponde a 40 micras.

## C. CUBITAL

## C. RADIAL(\*)

PCR/NIVEL	I	IIA	IIC		I	IIA	IIC
I	15.7%	83.3%	1%		49.3%	46.6%	4%
II	20.1%	70.6%	9.2%		50.2%	40.2%	0.5%
III	29.3%	70.5%	-		60.6%	39.3%	-
IV	35.2%	60.6%	4.1%		80.3%	18.23%	1.4%
V	37.9%	54.3%	7.7%		100%	-	-

**TABLA II:** M. flexor carporradial de perro adulto. Datos porcentuales de cada tipo fibrilar analizado por secciones musculares (I-V).  
 (\*) Los valores que se reflejan en la cabeza radial corresponden a la población de fibras de la zona mixta de esta cabeza.

## C. CUBITAL

## C. RADIAL(\*)

PCR/NIVEL	I	IIA	IIC		I	IIA	IIC
I	21.91±0.3	23.14±0.3	17.43±0.6		24.73±0.5	19.80±0.3	22.48±0.6
II	22.91±0.3	28.05±0.5	22.06±1.1		36.89±0.5	25.39±0.3	26.30±1.2
III	25.18±0.3	26.74±0.3	-		34.93±0.4	25.92±0.3	-
IV	26.10±0.3	33.10±0.3	27.66±2.1		43.53±0.6	36.21±0.7	34.76±2.1
V	21.36±0.4	29.17±0.5	21.05±1.1		36.66±0.5	-	-

**TABLA III:** M. flexor carporradial de perro adulto. Valores correspondientes a las medias ( $\bar{x}$ ) de los diámetros mínimos ± el error standard analizados por secciones.

(\*) Los valores que se reflejan en la cabeza radial corresponden a la población de fibras de la zona mixta de esta cabeza.

### C.- DESARROLLO POSTNATAL MUSCULO SEMITENDINOSO.

Durante el desarrollo postnatal estudiamos la evolución de las dos poblaciones fibrilares presentes al nacimiento, morfológica e histoquímicamente diferentes:

a) Grupo de fibras caracterizadas morfológicamente por tener un gran tamaño (TABLA VIII) y por su disposición central en el fascículo (Fig.10A). Algunas de ellas aún conservan el núcleo centralizado y, desde el punto de vista histoquímico, reúnen las siguientes propiedades: son totalmente lábiles con preincubaciones ATPásicas alcalinas a pH superiores a 10'4 (Fig.10B) y se muestran intensas a preincubaciones ácidas con pH 4'6-4'55 (Fig.10C), pero no por debajo de éstos (pH 4'3) (Fig.10D). Tanto por sus propiedades morfológicas como histoquímicas las denominamos **FIBRAS "Ib"** (MORENO,1986).

b) Grupo de fibras de menor tamaño (TABLA VIII) que se dispone rodeando a las anteriores. Desde el punto de vista histoquímico mantienen una coloración intensa ante las técnicas de mATPasa, tanto a preincubaciones alcalinas como ácidas (Fig.10). Por esta razón, decidimos denominarlas **FIBRAS "INDIFERENCIADAS"**.

A continuación, analizamos por separado estas dos poblaciones, desde el punto de vista de su ATPasa miosínica, utilizando el método "A" de Snow et al., (1982) modificado para preincubaciones alcalinas y el método de

Dubowitz/Brooke (1973) modificado para preincubaciones ácidas. Asimismo, hacemos algunas consideraciones sobre sus propiedades metabólicas, utilizando para ello las técnicas NADH-TR y M-GPDH.

### C.1.- TIPOS DE FIBRAS.

#### FIBRAS Ib (TABLA IV).

Como apuntábamos anteriormente, en los animales recién nacidos se caracterizan por tener una coloración moderada, frente a preincubaciones alcalinas con pH inferior a 10'3. A partir de los 8-10 días pierden la resistencia que presentan frente a preincubaciones con esos pH (Fig.11A). Hacia los 20-25 días adquieren resistencia con la preincubación a pH 4'3 (Fig.11D), aunque sin llegar a la intensidad de color característica de las fibras tipo I del animal adulto. Por tanto, es a partir de esta edad cuando podemos considerarlas como fibras adultas, siempre desde el punto de vista de su actividad mATPasa.

Debemos señalar también, que a partir de los 30 días el dimorfismo existente entre las fibras Ib y el resto disminuye, debido al crecimiento experimentado por estas últimas (TABLA VIII).

Referente a las propiedades metabólicas, apreciamos como en los primeros estadios (nacimiento-25 días), la intensidad de tinción frente a técnicas NADH-TR y M-GPDH, es de moderada a intensa en todas las fibras,

no siendo posible establecer diferencias. Sólo a partir de los 30 días será posible discernir las fibras tipo I con la técnica M-GPDH, dado el bajo potencial glicolítico que presentan (Fig.11H).

#### GRUPO DE FIBRAS INDIFERENCIADAS.

En esta población, a partir de los 15-20 días, se distinguen dos grupos de fibras según su comportamiento frente a preincubaciones con pH alcalinos (Fig.11A). Empleamos la denominación "X" e "Y,Z" para estas dos poblaciones, siendo el grado de tinción el siguiente:

	pH: 10'2-10'3	10'4-10'6
GRUPO X	++++	++++
GRUPO Y	++	-

Analizamos en primer lugar la evolución de las fibras indiferenciadas que hemos integrado en el grupo X y en segundo lugar las del grupo Y,Z.

#### FIBRAS X (TABLA V).

Presentan como característica constante, hasta los 65 días de desarrollo postnatal, intensa resistencia frente a las preincubaciones alcalinas de la técnica mATPasa. Por dicho motivo, siempre las denominaremos fibras X, pero dependiendo de su comportamiento frente a preincubaciones ácidas las dividimos en tres subtipos:

FIBRAS	pH: 4'6	4'3
X1	-	-
X2	+++/**	+++/**
X3	****	****

Si analizamos la evolución de estos tres subtipos de fibras X, podemos apreciar cómo a la misma edad en que se desdobra la población de fibras indiferenciadas (15-20 días) se evidencian las fibras X2, quedando las restantes como fibras X3 (Figs.11A,11B). Las fibras X1 no hacen su aparición hasta los 30 días, presentando una actividad mATPasa similar al tipo IIA del músculo adulto (Figs.11E,11F,11G). Coincidiendo con esta edad, el resto de fibras X (X2 y X3) adquieren una tonalidad nitida (Figs.11F,11G), que no tenían anteriormente. La intensidad de la tinción, como se refleja en la TABLA V, disminuye en la preincubación a pH 4'3 respecto de la preincubación a pH 4'6 (Figs.11F,11G).

Hacia los 40-45 días las fibras X, observadas en la Fig.12A con preincubaciones alcalinas, van a responder de manera distinta según se apliquen preincubaciones ácidas a pH 4'6 ó 4'3. Así observamos, que mientras a las fibras X1 no les influyen estas dos preincubaciones (Figs.12B,12C) ya que desde su aparición se muestran negativas a ambos pH, las fibras X2 pierden su resistencia frente a la preincubación a pH 4'3 pasando a ser negativas (Figs.12B,12C), como ocurría con las fibras IIP del M. semitendinoso adulto. Las fibras X3 también reducen su intensidad, pero a diferencia de las fibras X2, conservan a pH 4'3 cierta tonalidad de tinción

(Fig.12C), similar al comportamiento de las fibras IIC adultas.

A los 45 días es cuando encontramos una mayor similitud entre las fibras X1 y las IIA adultas, no sólo desde el punto de vista mATPásico sino también metabólico.

La edad en torno a los 65 días es considerada como fundamental en el desarrollo del M. semitendinoso, pues se inicia la inversión y, por tanto, la diferenciación entre las fibras X1-X3 y las X2 mediante preincubaciones mATPasa alcalinas. Esta diferenciación consiste en una pérdida parcial de resistencia de las fibras X2 frente a preincubaciones alcalinas (Fig.12F), a la vez que mantienen la resistencia frente a la preincubación ácida a pH 4'6 (Fig.12H), lo que las identifica totalmente con las fibras IIp. Las fibras X1 y X3 mantienen una intensa resistencia con preincubaciones alcalinas, hecho que hace algo dificultoso el poder diferenciarlas (Figs.12F,12G), para lo cual recurrimos a una preincubación ácida (Fig.12H).

Por lo tanto, ahora es correcto hablar de fibras IIA y IIp. Las fibras X3 que todavía aparecen a esta edad se identifican como fibras IIC.

Las técnicas NADH-TR y M-GPDH revelan las siguientes características metabólicas para cada subtipo de fibra X:

**Fibras X1:** En el momento de su aparición se caracterizan por una fuerte respuesta frente a la técnica M-GPDH (Fig.11H) de lo que se deduce su alta actividad glicolítica. A los 45 días presentan una gran variabilidad (moderada/alta) de sus intensidades tintoriales frente a esta misma técnica (Fig.12D) (actividad glicolítica). Con la técnica NADH-TR muestran una coloración uniforme, entre moderada e intensa, hasta llegar a los 40-45 días donde ya son intensas (Fig.12E).

**Fibras X2:** Metabólicamente a la edad de 15-20 días se pueden calificar de moderadas con la técnica M-GPDH, y a los 30 días como moderadas o intensas (Fig.11H). Al igual que las X1, ofrecen también a los 45 días una gran variabilidad (moderada/alta) de sus intensidades frente a esta misma técnica (Fig.12D). Las fibras X2 no presentan un perfil oxidativo que las diferencie del resto hasta muy avanzado el desarrollo (45 días) (Fig.12E), siendo éste moderado.

**Fibras X3:** Su principal característica consiste en que son fuertemente oxidativas. Su actividad glicolítica podemos considerarla entre moderada y negativa, desde los 15-20 días en adelante (Fig.11H).



## FIBRAS Y,Z (TABLA VI).

Por su actividad ATPasa miosínica, las fibras Y se aprecian a los 15-20 días de edad (Fig.11A) y se corresponden con fibras indiferenciadas que se muestran moderadas a pH comprendidos entre 10'2-10'4 y negativas cuando la preincubación es a pH superior a 10'4 (responden de manera idéntica a como lo hacen las fibras Ib al nacimiento), lo que las diferencia del resto.

Las fibras Z se distinguen de las fibras Y por ser totalmente lábiles en todo el barrido de pH alcalinos al igual que las fibras Ib, pero diferenciándose de éstas en el tamaño (\*) ( $X=10'76\pm 0'15$ ). Aparecen hacia los 20-25 días (Fig.11C), y a partir de los 30 días comienzan a solaparse con las fibras Ib, ya que su única diferencia, el tamaño, deja de existir por el crecimiento progresivo que experimentan (\*) (Ib:  $X=20'86\pm 0'53$ ; Z:  $X=16'67\pm 0'22$ ). Es en este momento cuando hay que comenzar a hablar de una única población que constituye el grupo "Tipo I", integrado a partir de las fibras Z y Ib (Fig.11B).

(\*) (X: media  $\pm$  error standard del diámetro menor expresado en micras) TABLA VIII.

A los 65 días podemos seguir observando algunas fibras Y, dada la tonalidad moderada que presentan frente a preincubaciones mATPasa con pH 10'2-10'3 (Figs.12F,12G). Por sus características histoquímicas las asociamos con las fibras IIC del animal adulto.

La actividad glicolítica de las fibras Y, Z (estas últimas ya consideradas como tipo I adultas) no queda definida hasta alcanzar los 25-30 días de desarrollo, momento en que se muestran negativas frente a la técnica M-GPDH (Fig.11E). La actividad oxidativa intensa, propia de las fibras I adultas (Ib + Z), se observa con cierta claridad en este grupo de fibras a partir de los 45 días (Fig.12E). Las fibras Y tienen un perfil oxidativo similar a las anteriores. También a esta edad seguimos observando cómo las fibras I tienen baja actividad glicolítica (Fig.12D).

#### C.2.- ESTUDIO PORCENTUAL EN LOS DISTINTOS TIPOS DE FIBRAS (TABLA VII).

Las fibras Ib al nacimiento representan un 3% del total, cifra que se mantiene constante hasta los 30 días. A partir de esta edad se solapan con las fibras Z y suponen juntas un 15% de la comunidad fibrilar, porcentaje que va incrementándose progresivamente debido al aumento en número de las fibras alcalino negativas. A los 65 días representan el 35'4%, lo que coincide con una disminución de las fibras Y.

Las fibras indiferenciadas al nacimiento representan el 97% del total. De este 97%, a los 15-20 días, se diferencian el grupo de fibras X que supone el 94% y la población de fibras Y (3%). Las fibras X disminuyen en su porcentaje y pasan del 94% inicial a un 62'9% a la edad de 65 días. Analizemos porcentualmente cada uno de los subtipos de fibras X:

**Fibras X3:** Comienzan con el 71'7% a los 15-20 días y disminuyen bruscamente hacia los 30 días (8'6%), coincidiendo con la aparición de las fibras X1. A partir de entonces, reducen su porcentaje de forma gradual para significar a los 65 días el 0'5% del total de la población.

**Fibras X2:** Entre los 15 y 25 días representan un 22%, que disminuye a un 12'2% a los 30 días. A partir de esta edad aumentan en número para llegar al 27'7% a los 65 días de edad. [es probable que los porcentajes entre los 15-23 días no sean muy exactos, pues es difícil a estas edades diferenciarlas con claridad de las X3].

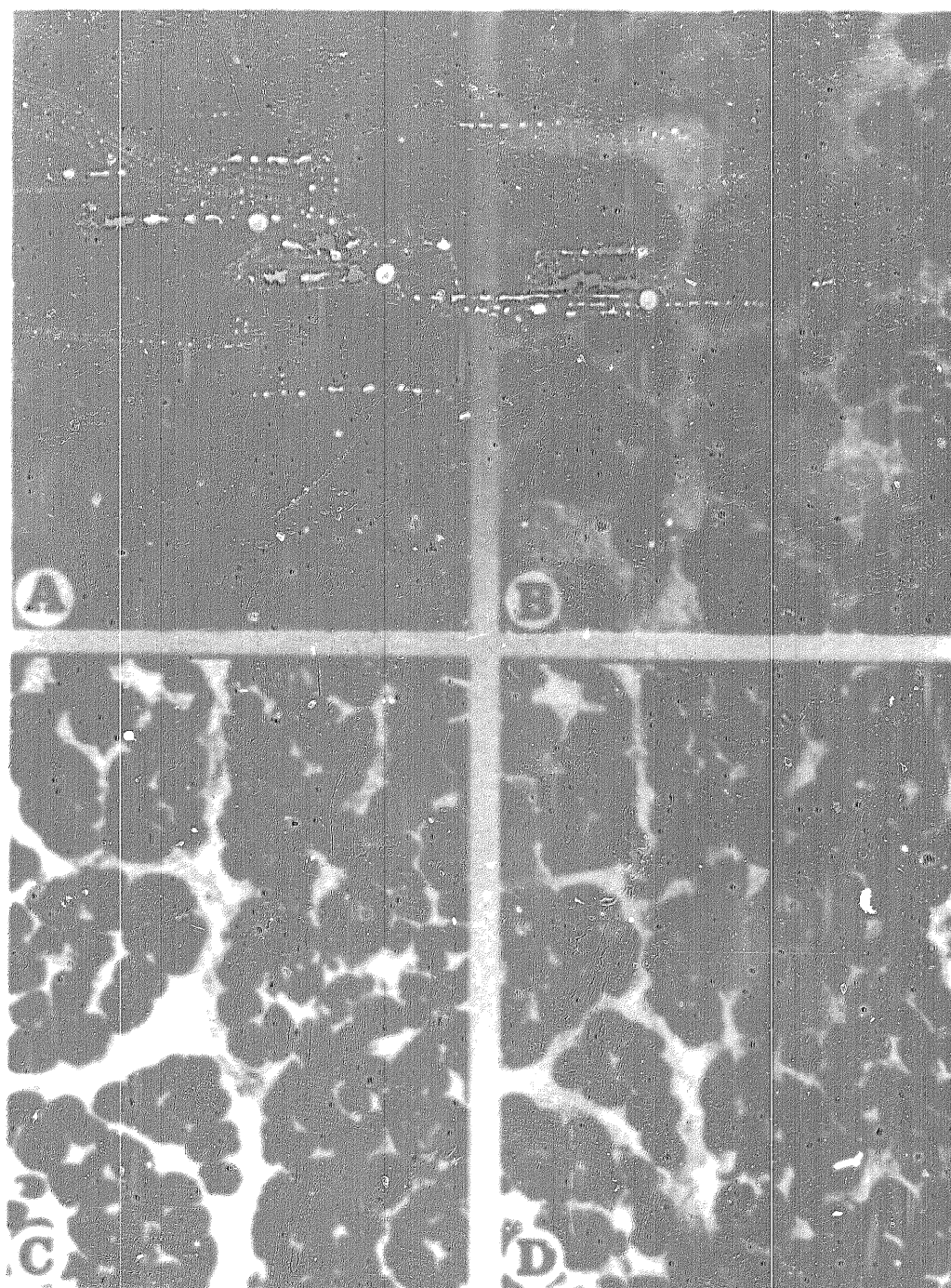
**Fibras X1:** Cuando se diferencian claramente (30 días), su porcentaje es alto (54'3%). Hasta los 35-40 días se mantiene esta cifra y, a partir de los 40 días, comienza a disminuir para llegar al 34'7% a los 65 días.

Considerando conjuntamente las fibras Y,Z se aprecia un cambio porcentual brusco, pasando del 3% de fibras Y existente a los 15 días al 21'7% global a los 30 días. A partir de esta edad, la población de ambas fibras aumenta ligeramente para alcanzar el 34'1% a los 65 días. El ritmo de aumento del conjunto de las fibras Y,Z se corresponde con el de disminución de las fibras X, manteniéndose constante el número de fibras Ib.

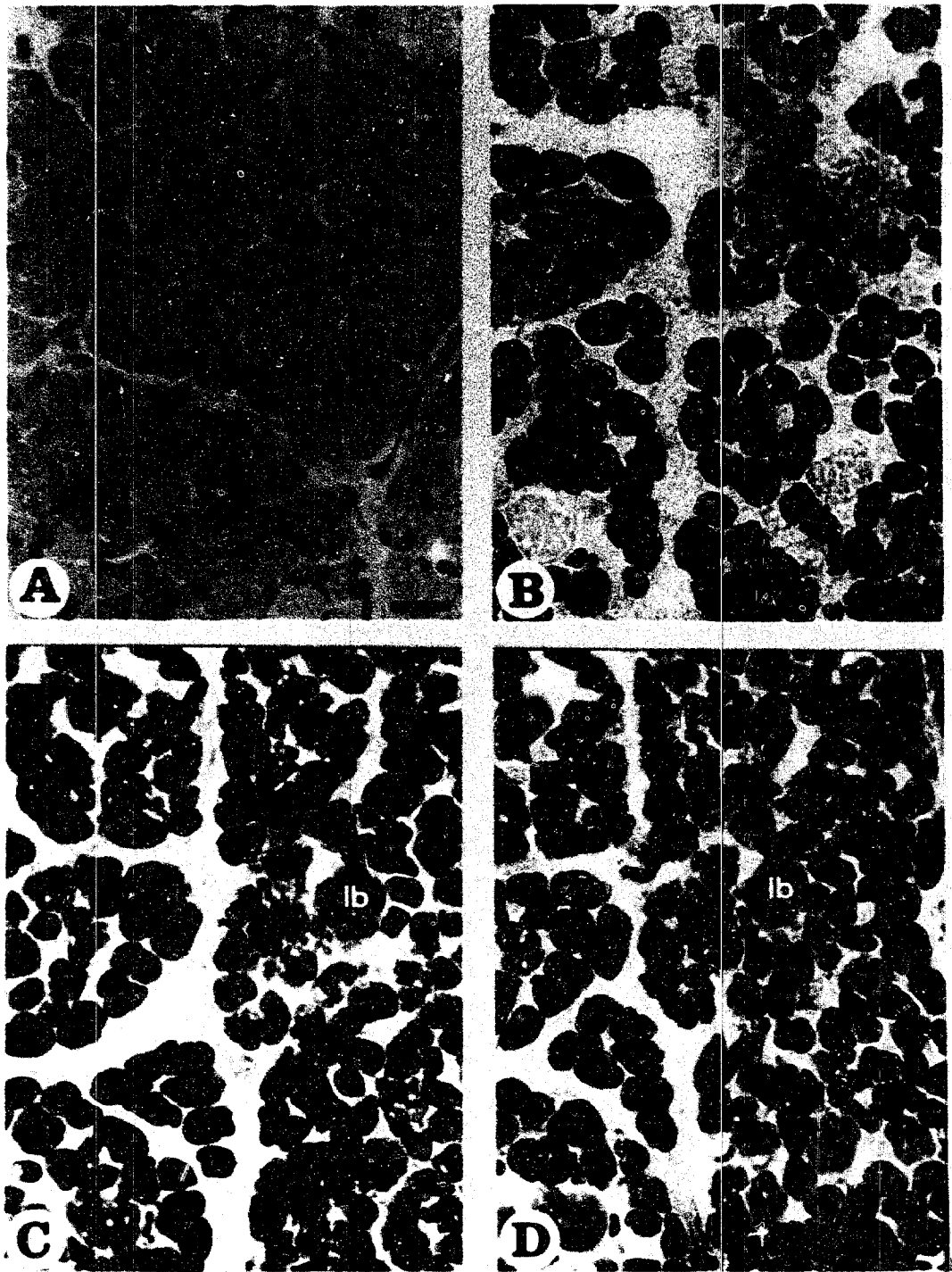
Analizándolas de forma independiente, observamos que las fibras Y alcanzan su máximo número a los 30 días

(9'7%), para ir disminuyendo a medida que avanza la edad y quedar su porcentaje reducido al 1'7%. a los 65 días.

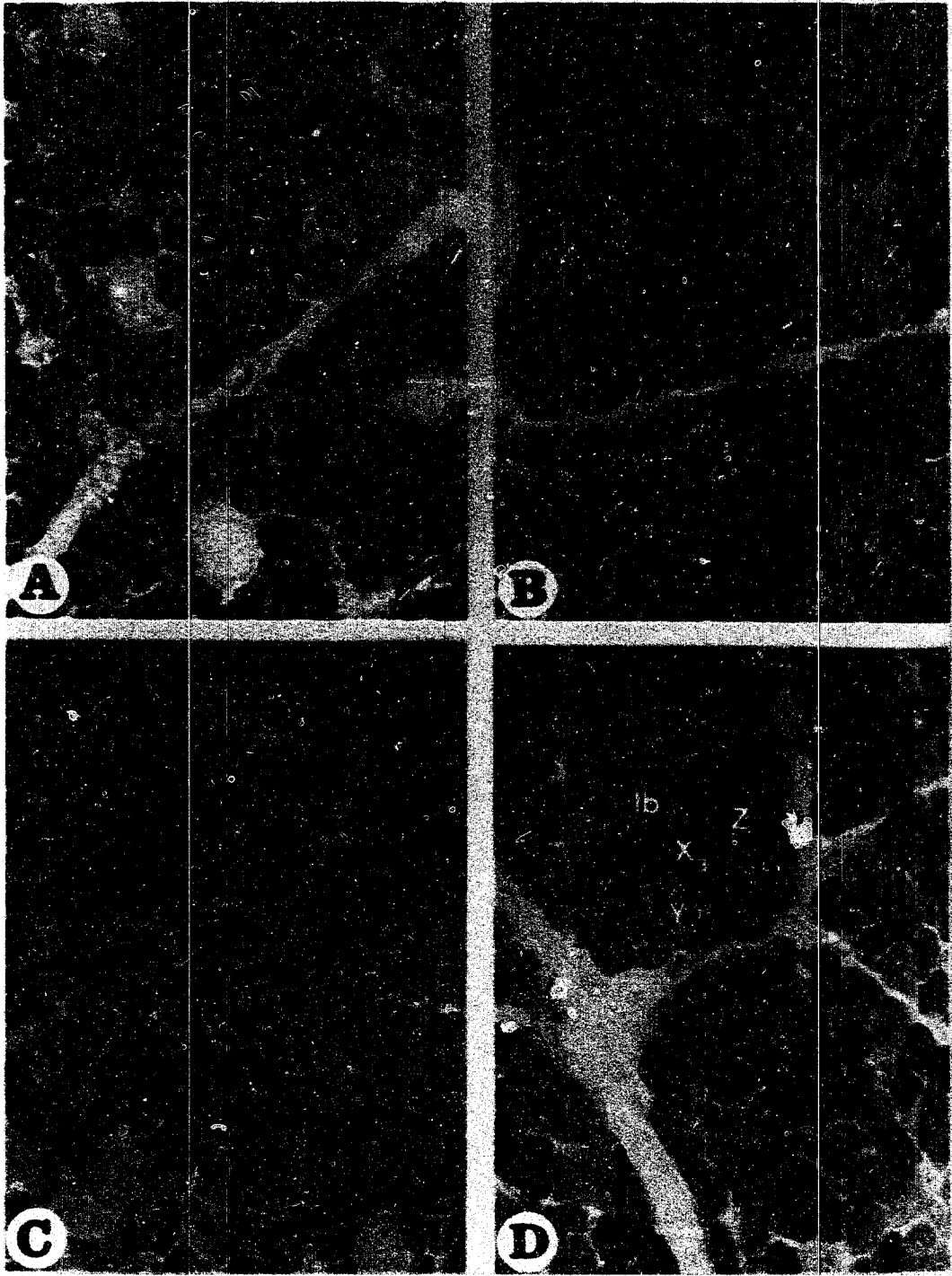
El análisis de las fibras Z lo hacemos basándonos en que el porcentaje de las fibras Ib permanece constante hasta el final de la experiencia, como lo ha sido hasta los 30 días. Partiendo de esta premisa, y analizando los porcentajes de las fibras Z a las distintas edades, se observa un aumento progresivo hasta un 32'4% a los 65 días del desarrollo.

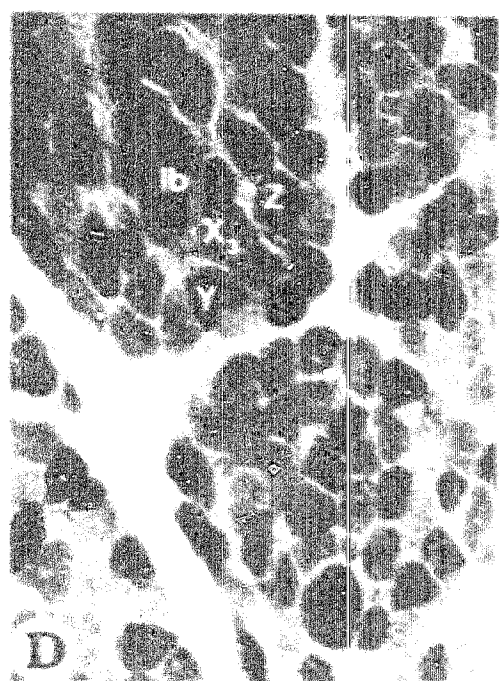
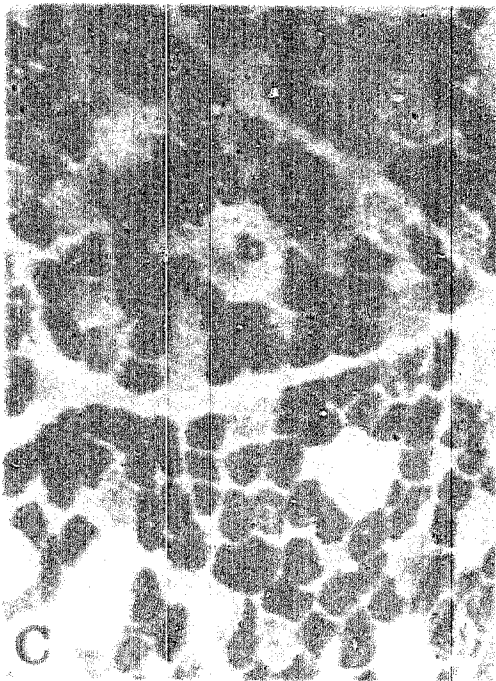
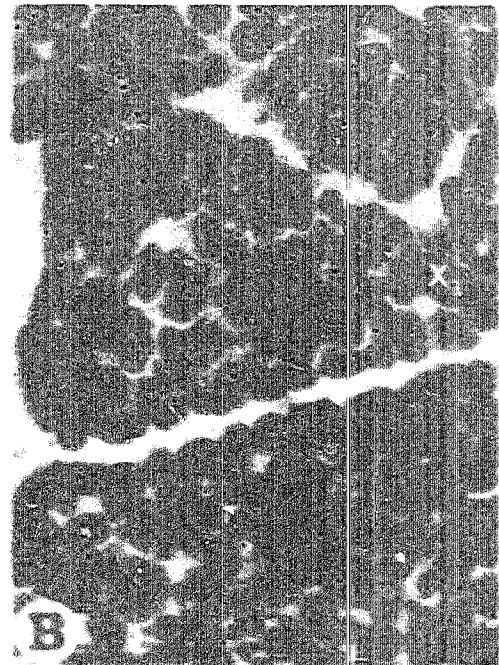
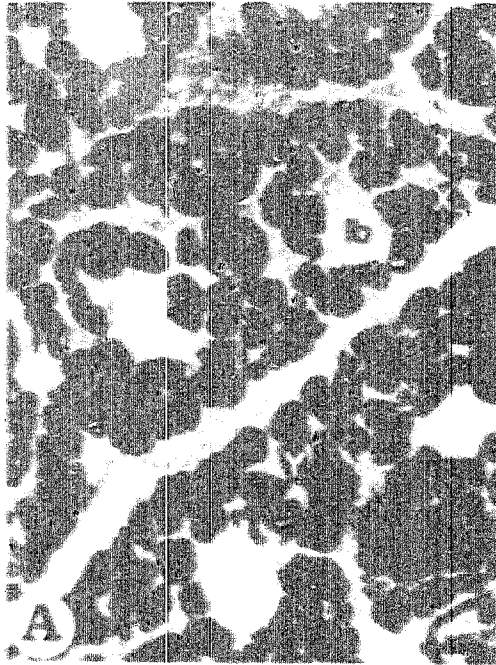


**FIGURA 10:** Secciones del M. semitendinoso de perros recién nacidos (A) y de 8 días (B-D).  
 Técnica Hematoxilina-Eosina (A).  
 Técnica MATPass: preincubación alcalina con pH 10'4 (B);  
 preincubación ácida con pH 4'6 (C) y 4'3 (D).  
 La barra equivale a 20 micras.

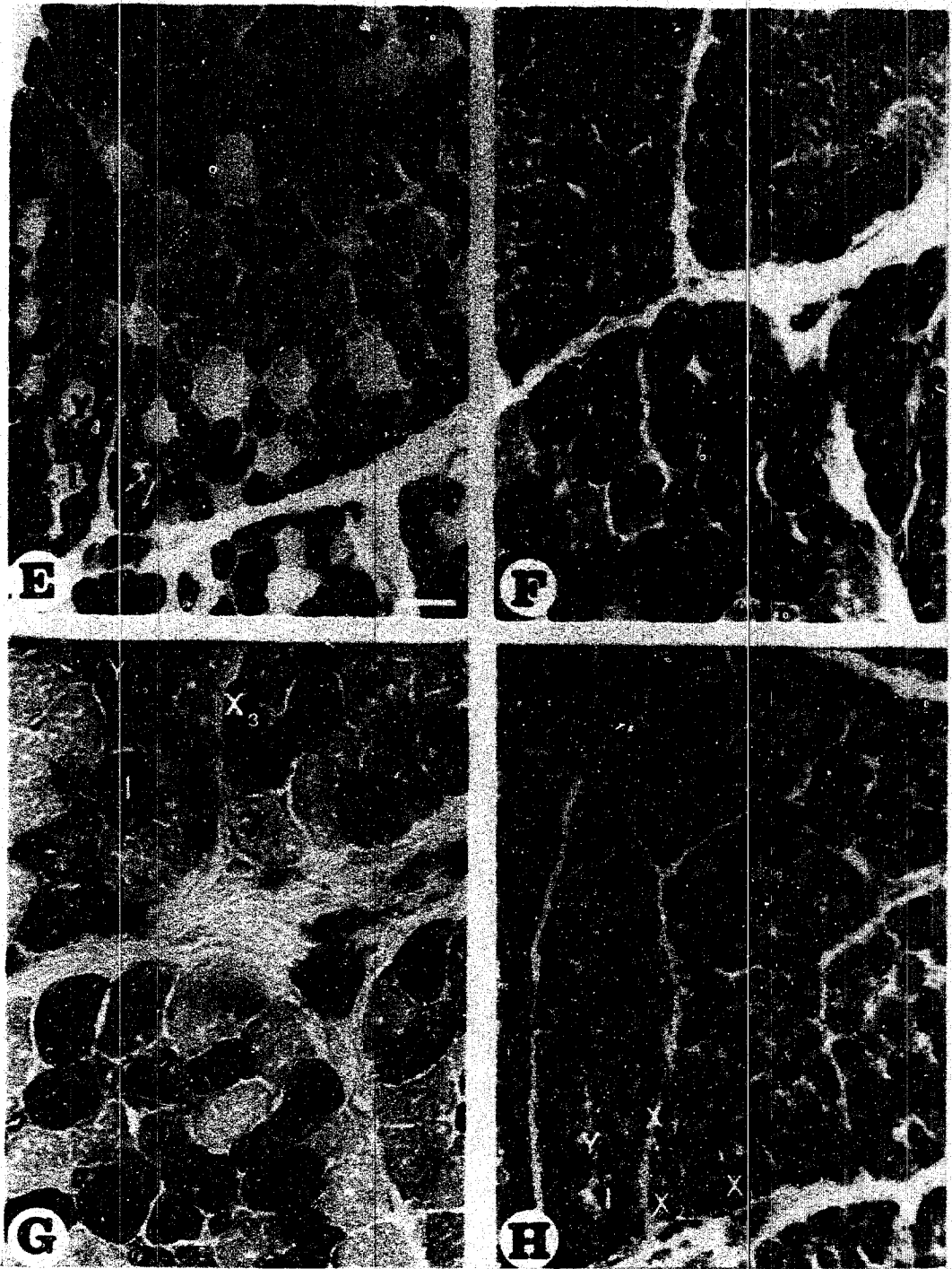


**FIGURA 10:** Secciones del *M. semitendinoso* de perros recién nacidos (A) y de 8 días (B-D).  
 Técnica Hematoxilina-Eosina (A).  
 Técnica mATPasa: preincubación alcalina con pH 10'4 (B);  
 preincubación ácida con pH 4'6 (C) y 4'3 (D).  
 La barra equivale a 20 micras.

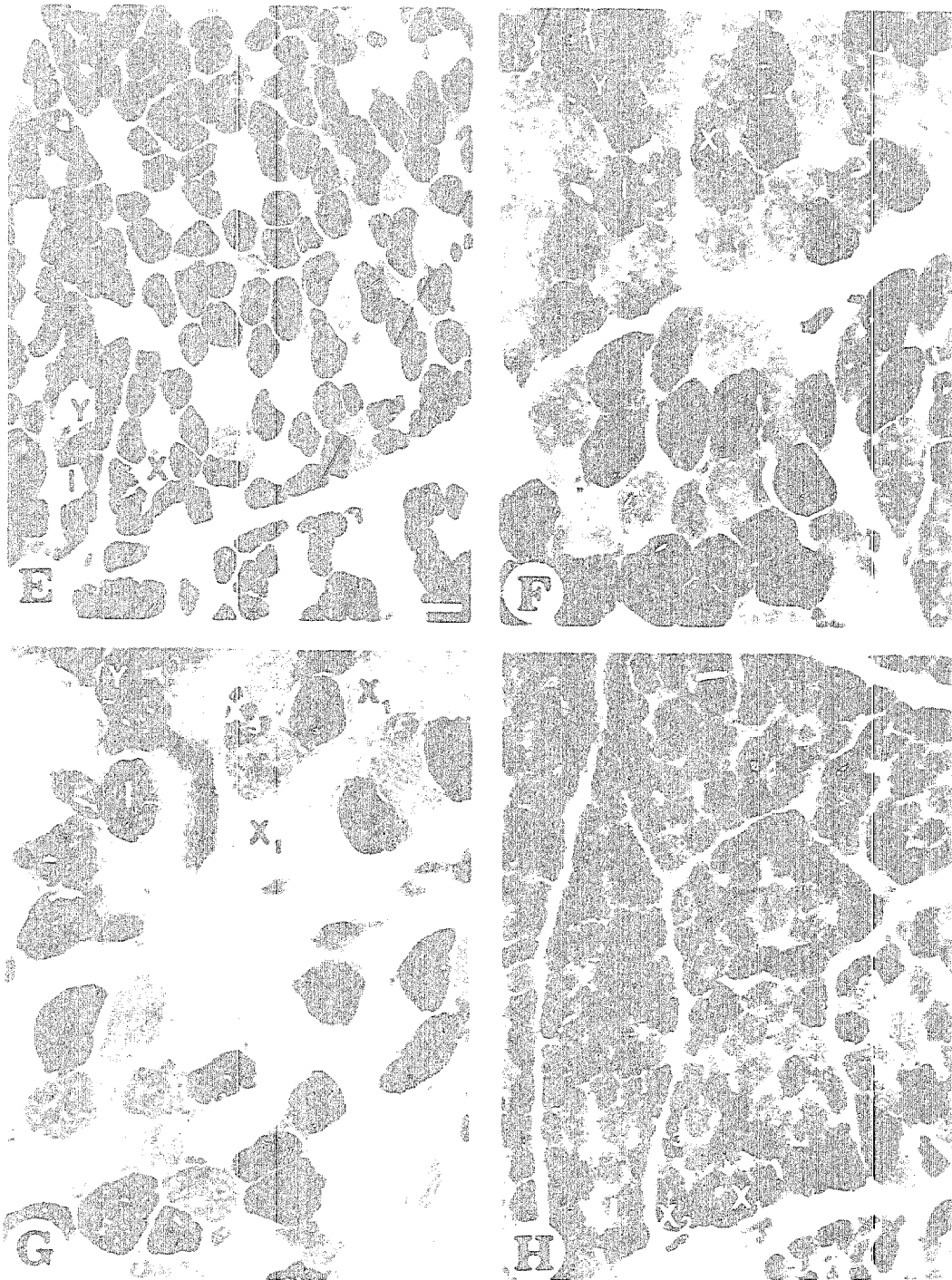




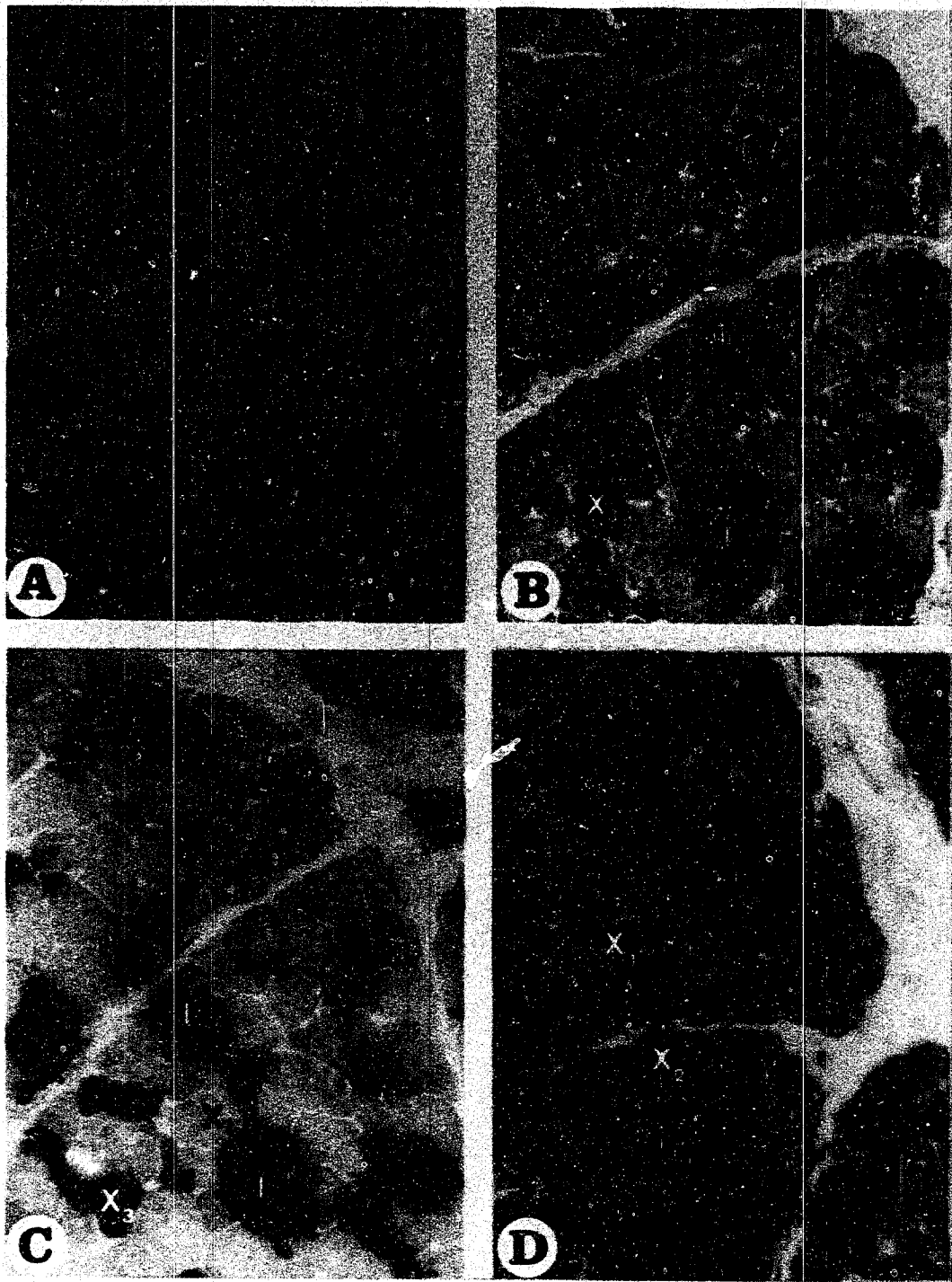




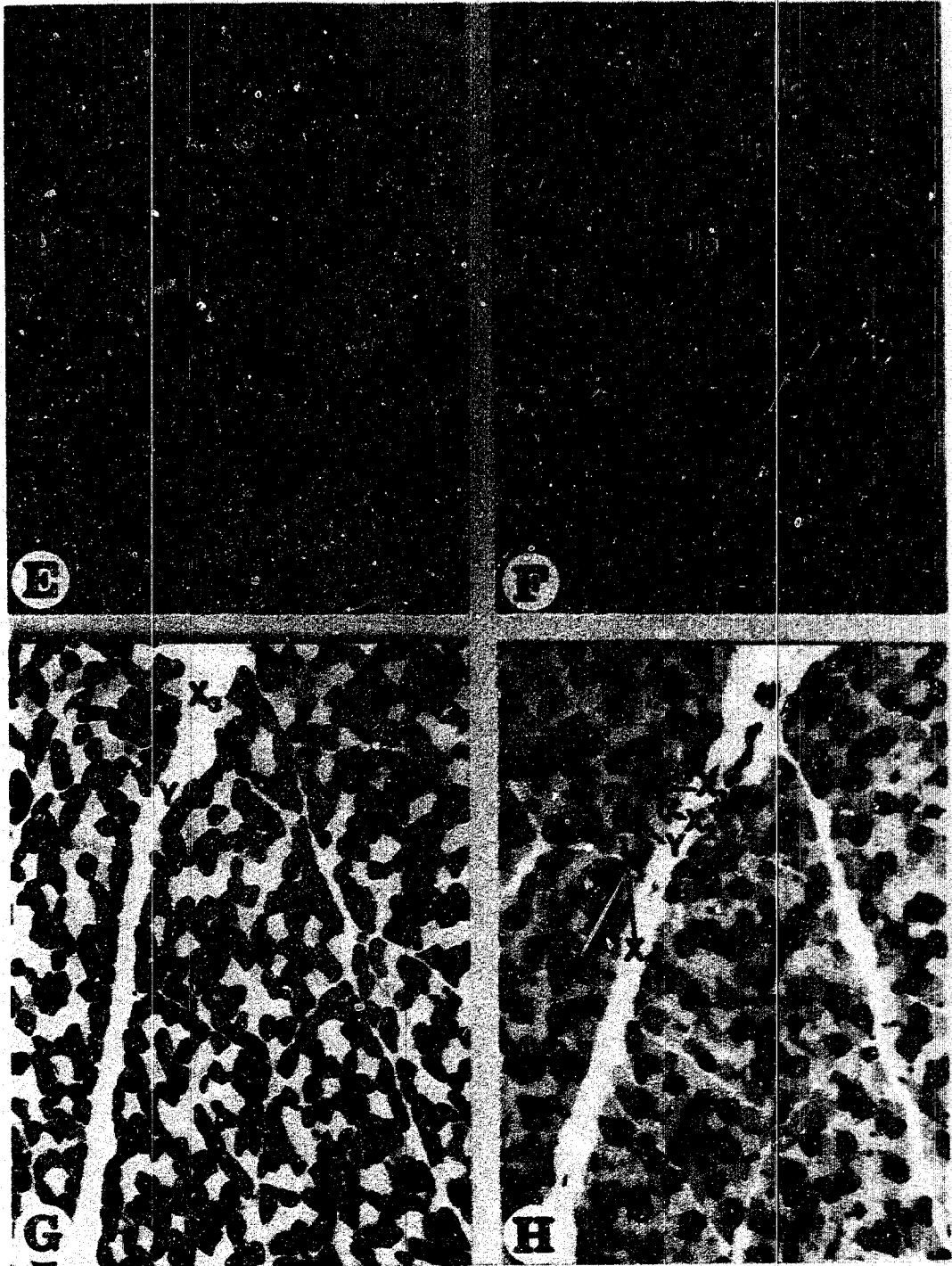
**FIGURA 11:** Secciones del M. semitendinoso de cachorros con 15 días (A,B), 22 días (C,D) y 30 días (E-H). Técnica mATPasa: Preincubación alcalina a pH 10'2 (A,C) y 10'4 (E); preincubación ácida con pH 4'6 (F) y 4'3 (B,D,G). Técnica metabólica M-GPDH (H). La barra equivale a 20 micras en A-D,F,G y a 40 micras en E,H.



**FIGURA 11:** Secciones del M. semitendinoso de cachorros con 15 días (A,B), 22 días (C,D) y 30 días (E-H). Técnica mATPasa: Preincubación alcalina a pH 10'2 (A,C) y 10'4 (E); preincubación ácida con pH 4'6 (F) y 4'3 (B,D,G). Técnica metabólica M-GPDH (H). La barra equivale a 20 micras en A-D,F,G y a 40 micras en E,H.





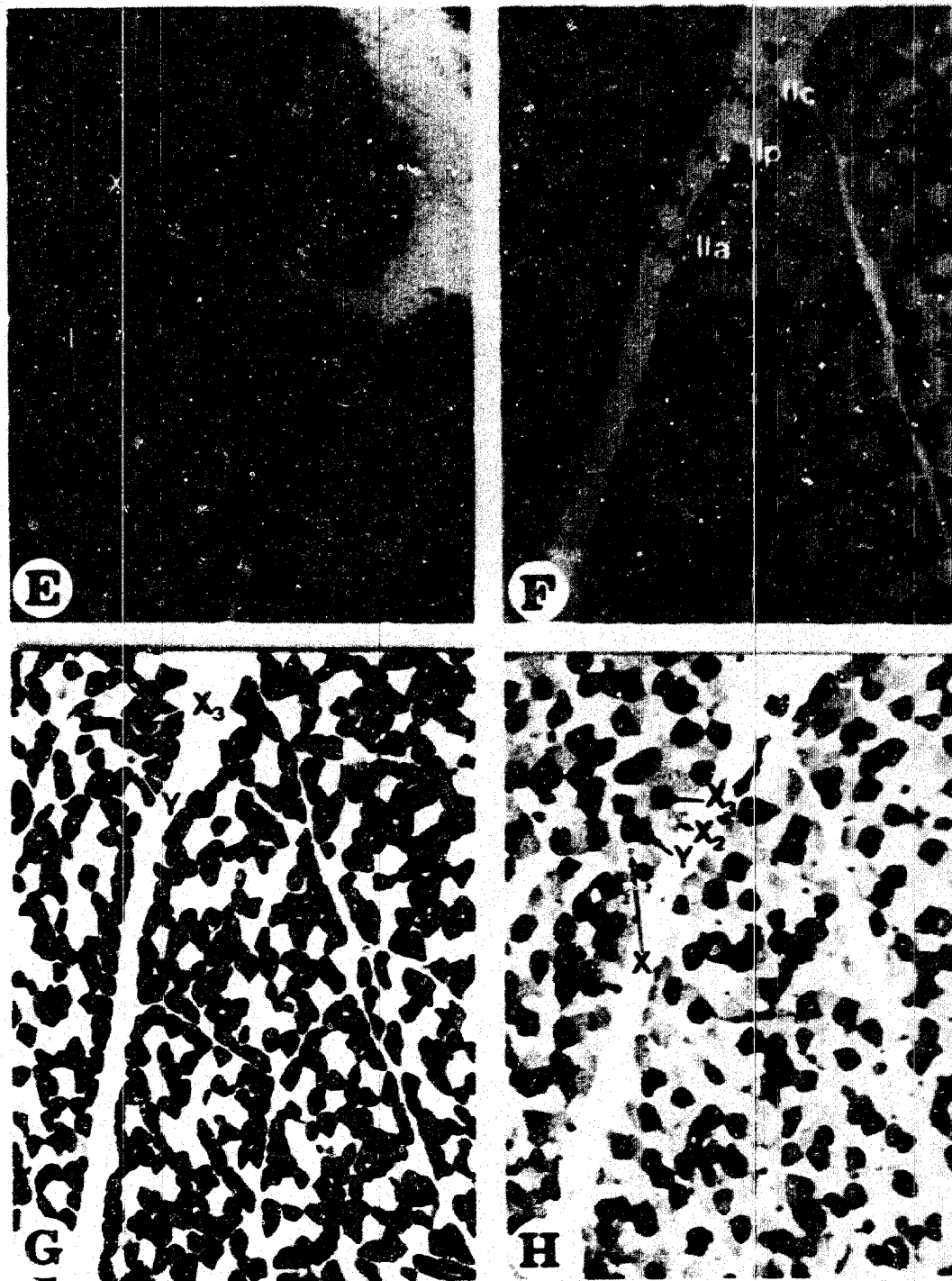


**FIGURA 12:** Secciones del M. semitendinoso de perros con 45 días (A-E) y 65 días (F-H).

Técnica mATPasa: preincubación alcalina con pH 10'2 (A,G) y 10'6 (F); preincubación ácida con pH 4'6 (B,H) y 4'3 (C).

Técnicas metabólicas M-GPDH (D) y NADH-TR (E).

La barra equivale a 20 micras en A-E y a 80 micras en F-H.



**FIGURA 12:** Secciones del M. semitendinoso de perros con 45 días (A-E) y 65 días (F-H).

Técnica mATPasa: preincubación alcalina con pH 10'2 (A,G) y 10'6 (F); preincubación ácida con pH 4'6 (B,H) y 4'3 (C).

Técnicas metabólicas M-GPDH (D) y NADH-TR (E).

La barra equivale a 20 micras en A-E y a 80 micras en F-H.

Días	10'2-10'3	10'4-10'6	4'6	4'55	4'3	NADH-TR	MacPDE
Ncto.	++	-/+	+++	+++	+/**	+++	+++
8-10	-	-	+++	+++	+/**	+++	+++
20-25	-	-	++++	+++	+++	+++	+++
30	-	-	++++	++++	++++	+++	-

**TABLA IV:** M. semitendinoso. Estudio postnatal de los distintos grados de intensidad tinctorial que presentan las fibras "Ib" hasta quedar integradas en el grupo Tipo I.

Días	10'2-10'3	10'4-10'6	4'6	4'55	4'3	NADH-TR	MacPDE
Ncto. (Ind.)	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++
15-20	X2	++++	++	++	++	+++	++
	X3	++++	+++	+++	+++	+++	+
30	X1	++++	-	-	-	+++	++++
	X2	++++	++	++	+/**	+++	++
	X3	++++	++++	++++	+++	+++	-
40-45	X1	++++	-	-	-	+/+++	+/+++
	X2	++++	++	++	-	++	+/+++
	X3	++++	++++	+++	++	+++	-
65	X1	++++	-	-	-	+++	++
	X2	++	+/+	++	++	-	+++
	X3	++++	+++	+++	+++	++	+/+

**TABLA V:** M. semitendinoso. Estudio de los distintos grados de intensidad tinctorial que presentan los subtipos de fibras "X" (X1, X2, X3) a lo largo del desarrollo postnatal.

Días 10'2-10'3 10'3-10'6 4'6 4'55 4'3 MADE-TR MCGPDE

Ncto. (Ind.)	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++
15-20 Y	++	+/-	++++	+++	+++	+++	++
20-25	Y	+/-	++++	+++	+++	+++	+/-
	Z	-	++++	++++	+++	+++	+/-
35-40	Y	-	++++	++++	++++	+++	+/-
	Z	-	++++	++++	++++	+++	+/-
45	Y	-	++++	++++	++++	+++	+/-
	I	-	++++	++++	++++	+++	+/-

TABLA VI: M. semitendinoso. Estudio postnatal de los diferentes grados de intensidad tintorial que presentan las fibras "Y", "Z".



Edad	Ib	Z	Y	X1	X2	X3	Y+Z	Z	X	
Ncto.	3%	97%								
8 d.	2%	98%								
15 d.	2.5%		3.1%		22.8%	71.7%	3.1%		94.3%	
22-23 d.	3.4%	5.5%	8.7%		82.3%		14.2%	5.5%	82.3%	
30 d.	15%		9.7%	54.3%	12.2%	8.6%	21.7%	12%	75%	
35 d.	14.5%		9.2%	54.2%	15.2%	6.4%	20.7%	11.5%	75%	
40 d.	15.5%		4.6%	58.8%	15.8%	5.2%	17.1%	12.5%	70.8%	
45 d.	35.6%			40.3%	21%	3.1%	32.6%		64.4%	
65 d.	35.4%		1.7%	34.7%	27.7%	0.5%	34.1%	32.4%	62.9%	

TABLA VII: M. semitendinoso. Estudio postnatal de los porcentajes que presentan los distintos grupos de fibras presentes a cada edad.

Nac. 8 d.		20-25 d.		30 d.		65 d.	
Ib	15.27±0.19	Ib	18.06±0.38	Ib	20.86±0.52	I	21.18±0.34
Ind	9.92±0.22	Y-Z	10.76±0.15	Z	16.67±0.22	Y	15.62±0.75
		X	8.33±0.13	Y	14.16±0.33	IIA	16.37±0.33
				X	13.74±0.26	IIP	23.69±0.34
				X1	17.82±0.23	X3	17.82±0.66

TABLA VIII: M. Semitendinoso de cachorros. Datos morfométricos correspondientes a medias ( $\bar{x}$ ) de los diámetros mínimos  $\pm$  el error standard en los distintos tipos fibrilares analizados en las edades más relevantes.

#### **D.- DESARROLLO POSTNATAL DEL MUSCULO FLEXOR CARPORRADIAL.**

El análisis del desarrollo postnatal en el M. flexor carporradial lo hacemos de manera independiente para las cabezas cubital y radial, ya que desde edades tempranas los límites y las diferencias histoquímicas entre ellas están bien marcados. Para el estudio de este músculo seguimos las pautas y nomenclatura aplicadas en el M. semitendinoso, al ser éste el patrón tenido en cuenta a la hora de establecer posibles diferencias.

Los dos tipos de fibras presentes al nacimiento en el M. flexor carporradial tienen idénticas características mATPásicas que las del M. semitendinoso y, por tanto, las seguimos denominando:

- GRUPO DE FIBRAS Ib.
- GRUPO DE FIBRAS INDIFERENCIADAS.

Aplicando las mismas técnicas, estudiamos por separado el desarrollo de estas dos poblaciones en cada una de las cabezas:

##### **D.1.- CABEZA CUBITAL.**

##### **D.1.1.- TIPOS DE FIBRAS.**

##### **FIBRAS Ib (TABLA IX).**

Al nacimiento sus características histoquímicas frente a preincubaciones alcalinas (Fig.13A) coinciden con las del M. semitendinoso, e igualmente se tiñen de

forma intensa al someterlas a preincubaciones ácidas de pH 4'6-4'55. Sin embargo, son moderadas cuando el medio de preincubación es más ácido (pH 4'3). A los 8-10 días pasan a ser negativas frente a toda la escala de preincubaciones alcalinas (Fig.13B). A los 20-25 días su tonalidad tintorial a pH 4'3 resulta intensa, como ocurría en el M. semitendinoso. A la referida edad, su actividad mATPasa es similar a la que tienen las fibras adultas. A los 30-35 días comienza a desaparecer el dimorfismo existente entre estas fibras y las restantes. Ello conlleva que la diferenciación entre fibras Ib y Z se haga difícil (Figs.14B,14C), siendo a los 40-50 días cuando terminan de adquirir las propiedades morfológicas de las fibras adultas.

En lo referente a sus características metabólicas, a los 8-10 días ya observamos como con la técnica M-GPDH se manifiestan negativas (Fig.13C), matiz tintorial que permanece a los 15-20 días (Fig.13E), 20-25 días (Fig.13H) y 30 días (Fig.14E). Con la técnica NADH-TR la tinción es intensa y homogénea sin poder diferenciarse de las restantes fibras, situación que perdura hasta los 20-25 días (Fig.14A).

#### GRUPO DE FIBRAS INDIFERENCIADAS.

Como en el M. semitendinoso, se caracterizan por ser muy intensas con las técnicas m-ATPásicas, independientemente del pH del medio de preincubación (Fig.13A). Sometiéndolas a un barrido de preincubaciones alcalinas (10'2-10'6) se observan, a los 8-10 días, dos

grupos con respuestas claramente diferentes, a los que también denominamos X e Y,Z (Fig.13B.)

	10'2-10'3	10'4-10'6
GRUPO X	++++	++++
GRUPO Y	++	-

#### FIBRAS X (TABLA X).

Partimos de la clasificación realizada en el M. semitendinoso, subtipos X1, X2 y X3, en función de su comportamiento ante las diferentes preincubaciones ácidas (4'6, 4'55 y 4'3).

Desde los 8-10 días se aprecian las fibras X2, caracterizadas por ser parcialmente lábiles a preincubaciones ácidas. El resto de fibras X se corresponden con el subtipo X3. A los 15-20 días observamos estos dos subtipo en la figura 13D.

El subtipo X1, como el anterior, se observa antes que en el M. semitendinoso, hacia los 20-25 días (Fig.13G), y a partir de entonces empieza a ser cuantificable.

Atendiendo a la respuesta histoquímica de su ATPasa miosínica con preincubaciones ácidas, las fibras X1 a los 30 días se comportan de manera similar a como lo hace una fibra IIA de animal adulto (Figs.14B,14C,14D). Al igual que en el M. semitendinoso, a esta edad, la diferenciación entre los subtipos X2 y X3 es fácil, dado que sus tonalidades son claramente distintas.

A los 50-55 días es rara la presencia de fibras X2 (Figs.14F,14G,14H). Las fibras parcialmente resistentes a preincubaciones ácidas (pH 4'6-4'3) se engloban dentro del subtipo X3.

A los 60-65 días las fibras X3, que se tiñen de manera intensa o moderada ante preincubaciones ácidas de pH 4'6-4'3 (Fig.15C), pierden su resistencia pasando de intensas (Fig.15B) a moderadas (Fig.15A) durante el barrido con preincubaciones alcalinas. Estas propiedades histoquímicas las identifican con las fibras IIC adultas.

Las características metabólicas de cada subtipo de fibras X, con la técnica M-GPDH queda concretado desde los 8-10 días. Por el contrario con la NADH-TR la diferenciación fibrilar no es posible hasta los 40-50 días, siendo intensa y homogénea hasta entonces como apreciamos a los 20-25 días (Fig.14A). Analizamos cada subtipo de manera individual:

**Fibras X1:** Desde los 20-25 días, edad a la que aparecen, son muy intensas con la técnica M-GPDH (Fig.13H). Esta intensidad se mantiene a los 30 (Fig.14E) y 65 días (Fig.15D). Con la técnica NADH-TR son intensas y homogéneas como el resto de la población hasta los 40-50 días.

**Fibras X2:** Su actividad glicolítica se considera intensa desde los 8-10 días (Fig.13C), al igual que a los 15-20 días (Fig.13E), 20-25 días (Fig.13H) y 30

días (Fig.14E). Su actividad oxidativa es también intensa, prácticamente hasta el momento en que dejan de identificarse (50 días).

**Fibras X3:** El grado de tinción que presentan estas fibras con la técnica M-GPDH se considera moderado desde los 8-10 días (Fig.13C) y negativo a partir de los 15-20 días, aspecto que observamos en la Fig.13E (15-20 días), Fig.13H (15-20 días), Fig.14E (30 días) y Fig.15D (65 días). Con la técnica NADH-TR se caracterizan por presentarse desde los 8-10 días intensas, pudiendo ser diferenciadas del resto de fibras solo a partir de los 50 días.

#### GRUPO DE FIBRAS Y,Z (TABLA XI).

Las fibras tipo Y se evidencian en la cabeza cubital del M. flexor carporradial a los 8-10 días (Fig.13B). Al alcanzar los 15-20 días, adquieren resistencia a la preincubación de pH 4'3. A esta misma edad se manifiestan también las fibras Z, claramente intensas a preincubación ácida (Fig.13D), y con idénticas características mATPásicas que las fibras tipo Ib. Hacia los 30 días, la intensidad de tinción con las técnicas metabólicas y la que presentan tras las referidas preincubaciones es similar a la de una fibra tipo I de animal adulto. Es entonces, cuando la diferencia de tamaño entre las fibras Z y fibras Ib comienza a desaparecer y, al igual que en el M. semitendinoso, decidimos denominar al conjunto de ellas como grupo Tipo I, siempre desde la óptica de su actividad mATPasa. A

partir de esta edad, sólo las fibras tipo Y son factibles de ser controladas individualmente hasta el final de la experiencia. Así, a los 60-65 días se aprecian fibras Y en la cabeza cubital del M. flexor carporradial; para ello basta con analizar las preincubaciones mATPásicas con pH alcalino (Figs.15A,15B) y contrastarlas con la preincubación ácida a pH 4'3 (Fig.15C). Para entonces dichas fibras son, por sus propiedades mATPasa, equiparables a las IIC del animal adulto.

La actividad glicolítica de las fibras Y se califica de moderada-negativa a partir de los 8-10 días (Fig.13C), como también podemos apreciar a los 15-20 días (Fig.13E), 20-25 días (Fig.13H), 30 días (Fig.14E) y 65 días (Fig.15D). Las fibras Z se comportan, con la técnica M-GPDH, igual que las tipo Y. De manera similar al resto de la población, la actividad oxidativa de este grupo fibrilar es intensa, grado de tinción que se mantiene hasta el final de la experiencia.

#### **D.1.2.- DISTRIBUCION, PORCENTAJES Y MORFOMETRIA DE LOS DISTINTOS TIPOS DE FIBRAS.**

##### **DISTRIBUCION FIBRILAR (Fig.19).**

##### **FIBRAS TIPO I.**

Consideramos la aparición de este grupo de fibras a partir de los 30-35 días, quedando integrado por el conjunto de fibras alcalino-negativas (Fibras Ib y Z) y las fibras tipo Y (moderadas con las preincubaciones alcalinas).

Las fibras tipo I tienden a localizarse mayoritariamente en el centro de la cabeza cubital, lo que se observa con claridad desde los 40 días (Fig.19), siendo ésta la disposición fibrilar que advertíamos en las secciones analizadas en el animal adulto.

#### **FIBRAS X.**

Al mes de vida la diferencia entre los tres subtipos de fibras X es clara, distribuyéndose homogéneamente por toda la cabeza. En edades posteriores (40-45 días) se observa una distribución mayoritaria de las X2 y X3 en la zona central (Fig.19) . Hacia los 50-55 días la zona periférica queda integrada casi de forma exclusiva por fibras tipo I y subtipo X1 (IIA), continuando la mayoría de las fibras X3 en la zona central.

#### **PORCENTAJES DE LOS DISTINTOS TIPOS DE FIBRAS (TABLA XIII).**

##### **FIBRAS Ib.**

El porcentaje de fibras Ib se mantiene prácticamente constante, alrededor de un 3 %, hasta los 30 días. A partir de esta edad es imposible su seguimiento ya que integran el grupo Tipo I con las fibras Z, aunque a veces es posible detectarlas a los 45 días. Al considerar en conjunto el grupo Tipo I, observamos que aumentan cronológicamente pasando del 16'3% a los 30 días a un 33% a los 65 días.



En edades posteriores a los 45-50 días, los porcentajes son diferentes según la zona de distribución fibrilar que consideremos (centro o periferia de la cabeza). El porcentaje de las fibras tipo I en la zona central es casi el doble que en la periferia. Así, a los 65 días en la zona central suponen el 60%, cuando en la zona periférica representan el 33%.

#### FIBRAS X.

El conjunto de fibras indiferenciadas constituye un 97% de la población. A partir de los 8-10 días queda desdoblado en una población de fibras X (79-80%) y en otra de fibras Y (17%). El porcentaje de fibras X va disminuyendo de manera progresiva hasta un 62% a los 65 días.

Analizamos por separado cada uno de los porcentajes de los subtipos de fibras X:

**Fibras X3:** Representa el mayor número al inicio del desarrollo (63'2% a los 15 días). A los 30 días dicho porcentaje queda reducido aproximadamente a un tercio del anterior (23'4%). En el intervalo de 35 a 45 días disminuye casi hasta la mitad, pasando del 21'3% al 11'4%. Es a partir de esta edad (45 días) cuando se advierten los porcentajes más bajos, un 2'5% a los 60 días.

**Fibras X2:** La tendencia general en este subtipo es disminuir su porcentaje a lo largo del desarrollo. A los 15 días, momento en que son identificadas como tales,

presentan el máximo porcentaje (28'7%). A los 30 días se reduce a menos de la mitad (13'5%) y a partir de los 45 días su presencia es muy escasa o nula.

**Fibras X1:** Estas fibras se caracterizan porque aumentan bruscamente desde su aparición a los 22 días (16'5%), hasta los 30 días (39'7%) . Entre los 30 y 45 días la población de fibras X1 queda estabilizada, para llegar casi a duplicarse de los 55 días en adelante, alcanzando porcentajes del orden del 60%-63%.

#### **FIBRAS Y,Z.**

El conjunto de fibras Y,Z aumentan de manera gradual entre los 15 y los 45 días. A partir de esta edad, la proporción se mantiene más o menos constante hasta el final de la experiencia (34%-35%). Si consideramos constante la proporción de fibras Ib en un 3%, incluso más allá de los 30 días, queda claro que el aumento de las fibras Y,Z coincide con la disminución progresiva del conjunto de fibras X. Analizadas de forma independiente, obtenemos que las fibras Y alcanzan su mayor porcentaje entre los 25 y 35 días (9%). A partir de los 35 días el porcentaje desciende y se estabiliza entre el 2-2'5%. Las fibras Z, partiendo de la misma premisa que en el M. semitendinoso, aumentan en número con la edad . Entre los 22 y 30 días suponen un 6'4%-13'3%, para alcanzar entre los 35 y 55 días sus mayores porcentajes (15'8%-32'2%). Se advierte cómo al pasar de una a otra edad en cada uno de los intervalos, se producen incrementos de aproximadamente el doble en los porcentajes fibrilares.

## ASPECTOS MORFOMETRICOS (TABLA XVII).

Como aspectos más relevantes en cuanto a los valores morfométricos de los distintos tipos de fibras destacamos:

A los 20-25 días, es manifiesta la diferencia de tamaño que existe entre las Ib ( $19'35 \pm 0'19$ ) y las fibras Z ( $12'09 \pm 0'18$ ). Sin embargo al llegar a los 30 días estas dos poblaciones equiparan sus tamaños y quedan integradas en el grupo Tipo I con un valor medio de  $15'57 \pm 0'19$ , que pasa a  $18'87 \pm 0'19$  a los 65 días.

El valor medio del diámetro mínimo en las fibras X a los 20-25 días ( $13'62 \pm 0'17$ ) es algo mayor que el de las fibras Y,Z ( $12'09 \pm 0'18$ ) a esta misma edad.

Las fibras X1 cuando se identifican a los 30 días, tienen un tamaño ( $16'21 \pm 0'18$ ) algo mayor que el resto de la población de fibras X ( $13'56 \pm 0'20$ ). Esta diferencia se mantiene a los 40 días: X1 ( $19'68 \pm 0'25$ ), resto de fibras X ( $16'78 \pm 1'07$ ).

Hay que reflejar que a partir de los 30 días el tamaño de las fibras X1 ( $17'21 \pm 0'18$ ) es superior al de las fibras I ( $15'57 \pm 0'19$ ). Diferencias de tamaño que se mantienen a los 40 días: fibras X1 (IIA) ( $19'68 \pm 0'25$ ), fibras I ( $18'01 \pm 0'19$ ) y a los 65 días: fibras IIA ( $20'76 \pm 0'23$ ), fibras I ( $18'87 \pm 0'19$ ).

## D.2.- CABEZA RADIAL.

En la cabeza radial del M. flexor carporradial, a partir de los 35-40 días de desarrollo, hemos de considerar dos "ZONAS" diferentes por el tipo de fibras que las integran. Así, observamos una región donde las fibras son todas tipo I, región a la que hemos denominado en el adulto "ZONA TIPO I", y otra donde se evidencian fibras tipo I y los distintos subtipos de fibras X; a ésta última la seguimos denominando "ZONA MIXTA". La "zona mixta" reduce su extensión a medida que avanza el desarrollo, lo que conlleva a que la "zona tipo I" se amplíe e integre, casi en exclusividad, la cabeza radial.

### D.2.1.- TIPOS DE FIBRAS.

#### FIBRAS Ib (TABLA XIII).

Al nacimiento, el comportamiento de estas fibras es idéntico al de las fibras Ib del M. semitendinoso y de la cabeza cubital del M. flexor carporradial (Figs.16A,16B).

A la edad de 8-10 días son negativas cuando las sometemos al barrido de preincubaciones alcalinas (Fig.16C), presentando un comportamiento idéntico a la edad anterior cuando las preincubaciones son ácidas .

A los 15 días la tonalidad tintorial, tras preincubación a pH 4'6, puede calificarse como de "muy intensa" (Fig.16E), a pesar de seguir manifestándose moderadas cuando la preincubación es a pH 4'3. Entre los

22-25 días la preincubación a ese pH obtiene una respuesta en las fibras Ib calificable de intensa, pero sin llegar al grado de intensidad característico de estas fibras tras una preincubación a pH 4'6 (Figs.16G,16H). A estas edades ya es difícil la diferenciación entre fibras Ib y Z, pues comienzan a equiparar sus tamaños. Hacia el mes de edad, por su tonalidad tintorial frente a técnicas mATPásicas, se asemejan a las del músculo adulto (Fig.17A).

Entre los 30 y 40 días la población de fibras Ib queda totalmente solapada en tamaño con las fibras Z, recibiendo ambas la denominación de grupo Tipo I.

La actividad metabólica, a edades tempranas del desarrollo, es uniforme tanto para la técnica M-GPDH como para la técnica NADH-TR (Fig.16F). Desde los 15 días presentan una baja actividad glicolítica, similar a la observada a los 30 días (Fig.17C). Sin embargo, a esta última edad, con la técnica NADH-TR (actividad oxidativa), se muestran intensas, igual que el resto de la población (Fig.17D).

#### GRUPO DE FIBRAS INDIFERENCIADAS.

El grupo de fibras indiferenciadas se desdobra a los 8-10 días en fibras X e Y, al someterlas a preincubaciones alcalinas (Fig.16 C).

	10'2-10'3	10'4-10'6
GRUPO X	++++	++++
GRUPO Y	++	-

#### FIBRAS X (TABLA XIV).

La cabeza radial del músculo flexor carporradial se caracteriza por presentar exclusivamente fibras X3 hasta los 20-25 días (Figs.16D,16E). A partir de esta edad comienza la diferenciación entre los subtipos X2 y X3, aunque no con total nitidez (Figs.16G,16H), pues las primeras se califican de intensas y las segundas de muy intensas.

A los 30 días puede ser observado el subtipo X1, aunque algo solapado con las fibras X2, al no ser las primeras claramente negativas a preincubaciones ácidas (Figs.17A,17B). Las X2 se evidencian nitidamente al pasar a moderadas, permaneciendo muy intensas las X3 .

A la edad de 40 días empieza a diferenciarse la "zona tipo I" de la "zona mixta" (Fig.18A). La población de fibras X se localiza en la zona mixta, siendo la mayoría del subtipo X2. Es a los 55-60 días cuando la zona mixta presenta con claridad fibras X1 (Figs.18B,18C), ya que son totalmente negativas frente a preincubaciones ácidas. A los 65 días predominan las fibras X3 (Figs.18D,18E).

La técnica M-GPDH hasta los 20-25 días no aporta información puntual sobre el metabolismo de cada uno de estos subtipos de fibras. Hacia el mes de vida (Fig.17C), las fibras X1 y X2 destacan por su mayor intensidad ante

la técnica glicolítica, contrariamente a lo que sucede con las fibras X3.

Con la técnica NADH-TR el grado de tinción que se observa desde el nacimiento hasta los 15-20 días (Fig.16F), y de los 30 (Fig.17D) hasta los 40-50 días, es siempre moderada y homogénea en toda la comunidad fibrilar. A partir de los 40-50 días, las únicas fibras que quedan perfiladas, y con una tonalidad más intensa que el resto, son las X3.

Los perfiles metabólicos de las fibras que integran la cabeza radial quedan bien definidos hacia los 65 días de desarrollo postnatal (Fig.18F).

#### FIBRAS Y, Z (TABLA XV).

A edades tempranas (8-10 días) se aprecian las fibras Y, así como algunas fibras Z (Fig.16C).

Las fibras Y a los 20 días alcanzan una intensa resistencia frente a preincubaciones con pH ácido (Fig.16E). Igualmente responden las fibras Z.

A los 30-40 días la diferencia de tamaño existente entre las fibras Ib y Z deja de ser evidente, considerándose al conjunto de ambas poblaciones como grupo Tipo I, con características mATPásicas propias de fibras adultas (Figs.17A,17B).

Las fibras tipo Y, por su resistencia frente a preincubaciones con pH comprendido entre 10'2 y 10'3, son factibles de ser analizadas desde su aparición en todos los estadios del desarrollo postnatal. Concretamente a los 65 días (Figs.18D,18E) siguen apreciándose en la zona mixta de esta cabeza.

Aplicando la M-GPDH desde los 15-20 días en adelante, como apreciamos a los 30 días (Fig.17C), se presentan negativas al igual que las fibras tipo I. Sus perfiles metabólicos con la NADH-TR se pueden calificar de intensos a partir de los 55-60 días: en edades precedentes la tonalidad tintorial es intensa y homogénea en toda la comunidad fibrilar (Figs.16F,17D).

#### D.2.2.- DISTRIBUCION, PORCENTAJES Y MORFOMETRIA DE LOS DISTINTOS TIPOS DE FIBRAS.

##### DISTRIBUCION FIBRILAR (Fig.19).

##### FIBRAS TIPO Ib.

Hasta los 30-40 días podemos considerar uniforme la distribución de las fibras tipo Ib, una fibra por cada fascículo analizado.

A los 40 días distinguimos las dos zonas ya mencionadas, "Zona tipo I" y "Zona mixta". La última se localiza en las proximidades de la cabeza cubital, quedando interpuesto entre ambas el tendón de inserción. El resto de la cabeza radial lo ocupa la Zona tipo I.



#### **FIBRAS X.**

La distribución es homogénea hasta llegar a los 40 días de desarrollo. A partir de esta edad, la localización de fibras X queda restringida únicamente a la zona mixta, zona variable en cuanto a su topografía y extensión dentro de la cabeza radial. Un factor importante a tener en cuenta para analizar la topografía de la zona mixta en la cabeza radial es la edad del animal; así, en los últimos estadios queda muy reducida y próxima a la cabeza cubital.

#### **FIBRAS Y,Z.**

Su distribución es similar a la que presentan los subtipos de fibras X, pasando de ser homogénea antes de los 40 días a localizarse en la zona mixta pasada esta edad (lógicamente las fibras que aquí observamos son de tipo Y).

Hay que destacar que la diferente distribución al igual que en las fibras X, está en función del nivel de sección muscular que se considere dentro de una misma edad.

#### **PORCENTAJES DE LOS DISTINTOS TIPOS DE FIBRAS (TABLA XVI).**

#### **FIBRAS Ib.**

Hasta la edad de 25-30 días es posible contabilizar aisladamente las fibras Ib, obteniéndose siempre un porcentaje alrededor del 5-6%. Si consideramos

el grupo Tipo I, en el que incluimos las fibras Ib y las Z, se observa un aumento del 46'2% a los 30 días al 69% a los 40 días. La zona tipo I, considerada a partir de los 40 días, queda constituida de manera exclusiva por fibras tipo I (100%), aumentando éstas en la zona mixta del 60-65% a los 40-45 días al 85-90% a los 60 días.

No obstante, los últimos porcentajes son variables según el nivel del músculo en que se haga el muestreo.

#### **FIBRAS X.**

La población de fibras X constituye más de los dos tercios del total en los primeros estadios del desarrollo (nacimiento-8 días). A medida que avanza el desarrollo la población disminuye quedando por debajo de un sexto.

Es necesario, a partir de los 40 días de desarrollo, considerar por separado los porcentajes en la "Zona tipo I" y en la "Zona mixta". En la primera es raro encontrar fibras X. En la "Zona mixta" el porcentaje de cada uno de los subtipos de fibras X varía no sólo con la edad del animal, sino también con el nivel del músculo en que se toma la muestra. No hacemos un análisis porcentual de cada uno de los subtipos de fibras X al ser difícil distinguirlas con claridad.

#### **FIBRAS Y,Z.**

Desde su aparición, a los 8-10 días, representan un cuarto del total de la población, porcentaje que se incrementa de manera homogénea paralelamente a como disminuye el conjunto de fibras X. A los 40 días

alcanzan, aproximadamente, un 80%. Las fibras Z cuando aparecen representan un 2-3% para alcanzar a los 30 días el 40% y quedar solapadas al mes con las fibras tipo Ib.

Considerando homogéneo el porcentaje de fibras Ib (5-6%), se puede observar cómo las fibras Z alcanzan un 63% a los 40 días, aunque ya para entonces se pueden advertir zonas completas de tipo I.

Las fibras tipo Y disminuyen de un 25% a los 8-10 días a un 17% a los 40 días. Sus porcentajes a partir de esta edad son muy variables, siempre en función del nivel de sección y de la edad. Constatamos su presencia hasta el término de la experiencia, principalmente en niveles de sección próximos al tendón de origen.

#### ASPECTOS MORFOMETRICOS (TABLA XVII).

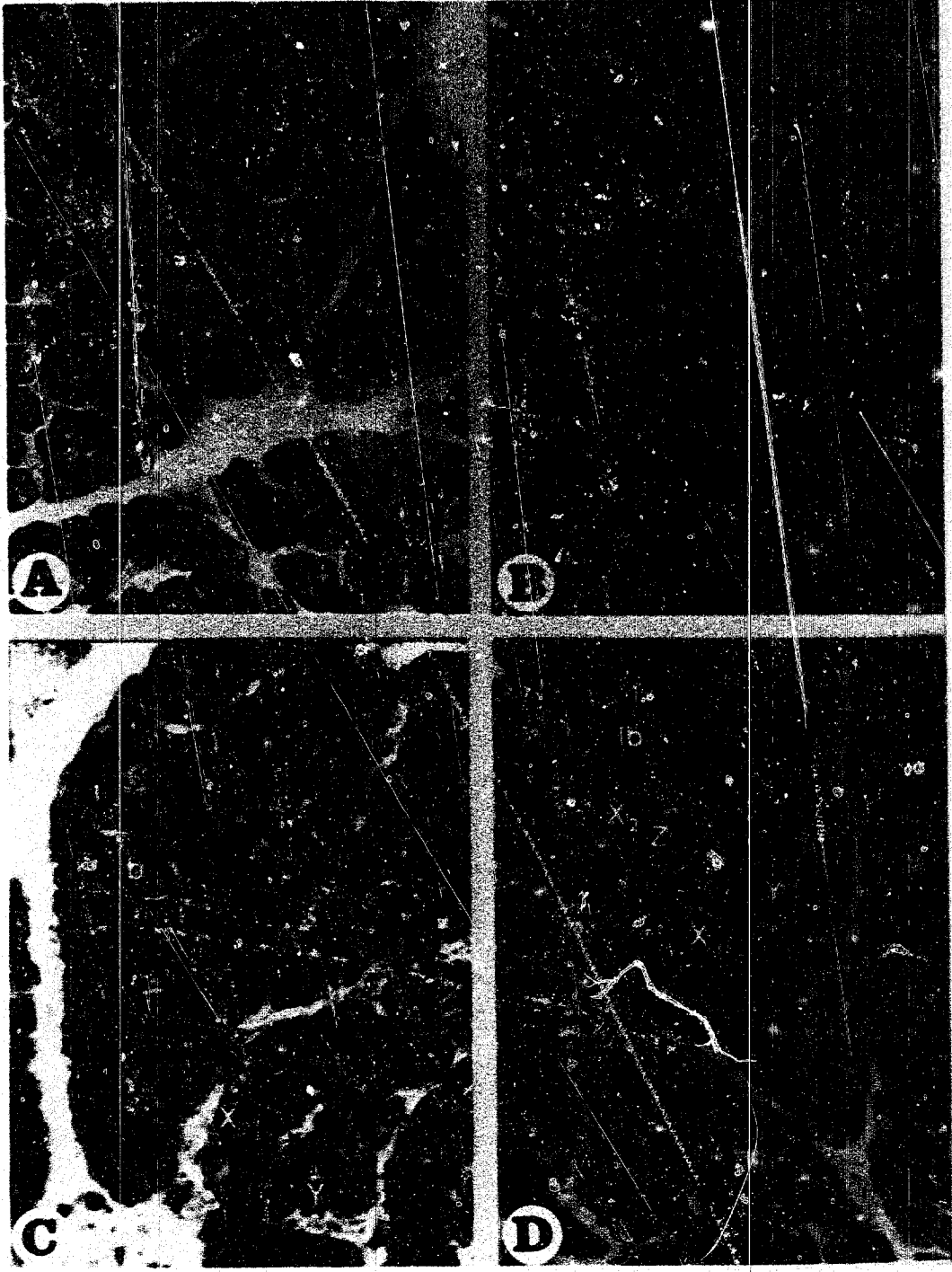
Cuando se constituye el grupo Tipo I (30-40 días) el valor medio del diámetro mínimo de este conjunto de fibras es  $13'25 \pm 0'18$ .

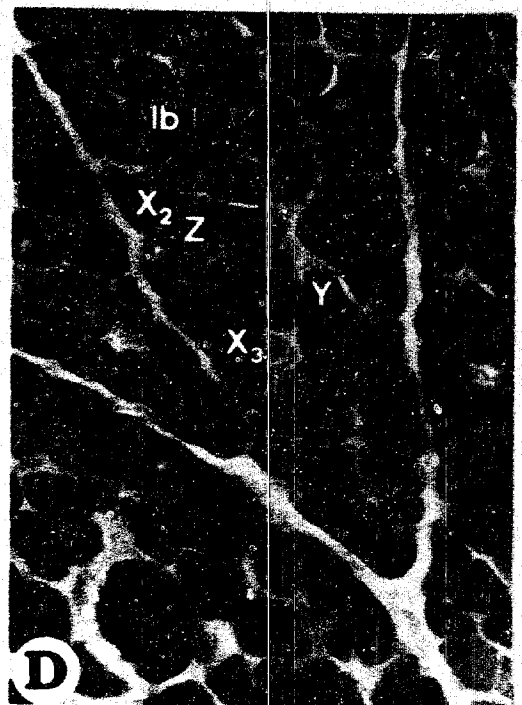
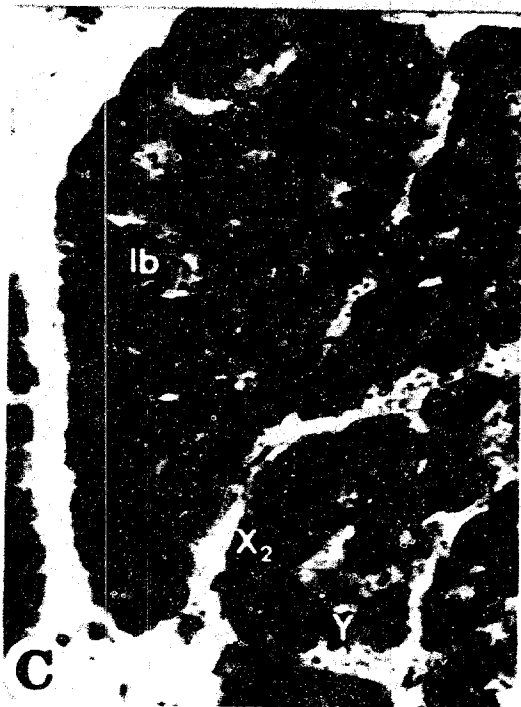
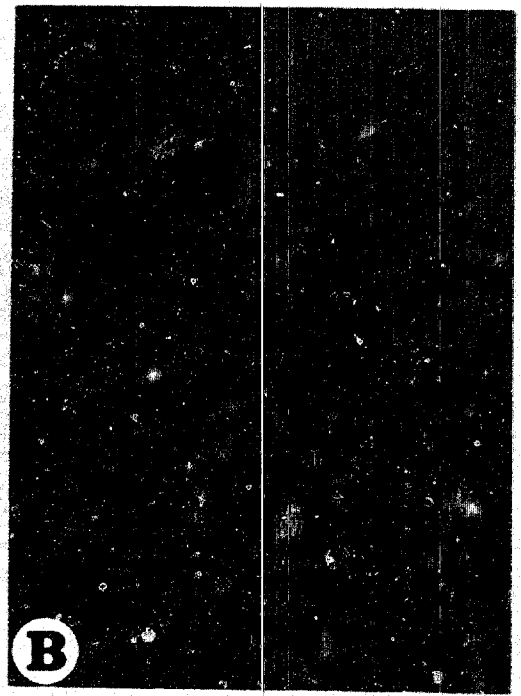
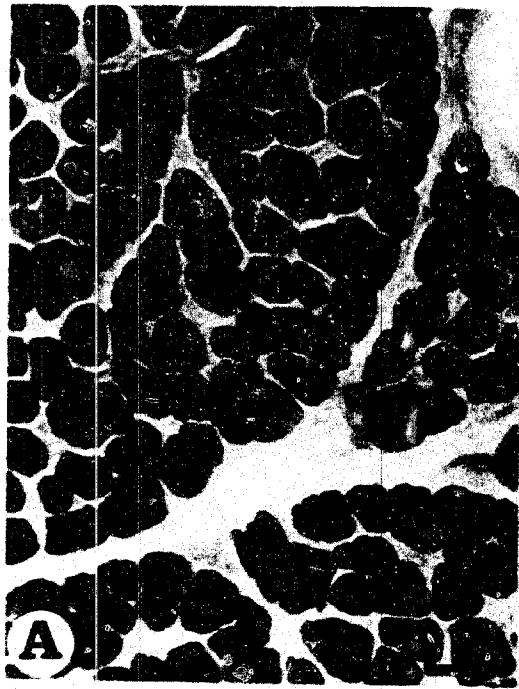
El tamaño de las fibras tipo I en la zona tipo I a los 40 días, ( $14'97 \pm 0'21$ ) es ligeramente superior al que presentan las fibras tipo I de la zona mixta ( $13'69 \pm 0'13$ ).

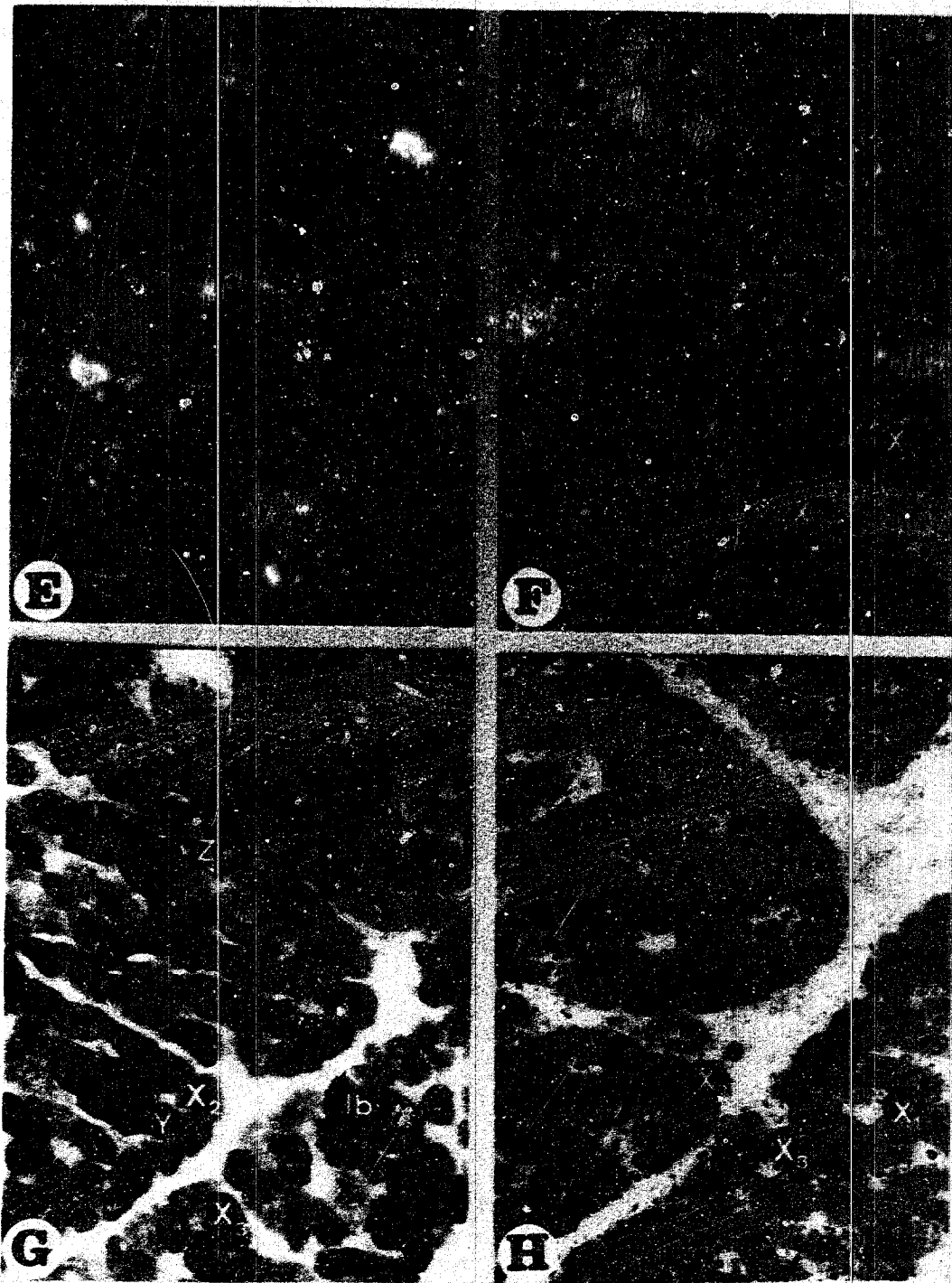
La media del diámetro mínimo que adquieren las fibras tipo I a los 65 días es de  $20'69 \pm 0'22$ .

El tamaño de las fibras X1 ( $11'07 \pm 0'11$ ) a los 30 días no difiere apenas del que presenta el resto de fibras X a esa edad ( $11'57 \pm 0'20$ ). Las mismas consideraciones son válidas para la edad de 40 días.

Comparando entre sí las medias de las fibras tipo I ( $13'25 \pm 0'18$ ) y las del subtipo X1 a los 30 días, se observa que las primeras superan en diámetro mínimo a las segundas, hecho que también se advierte a los 40 días.





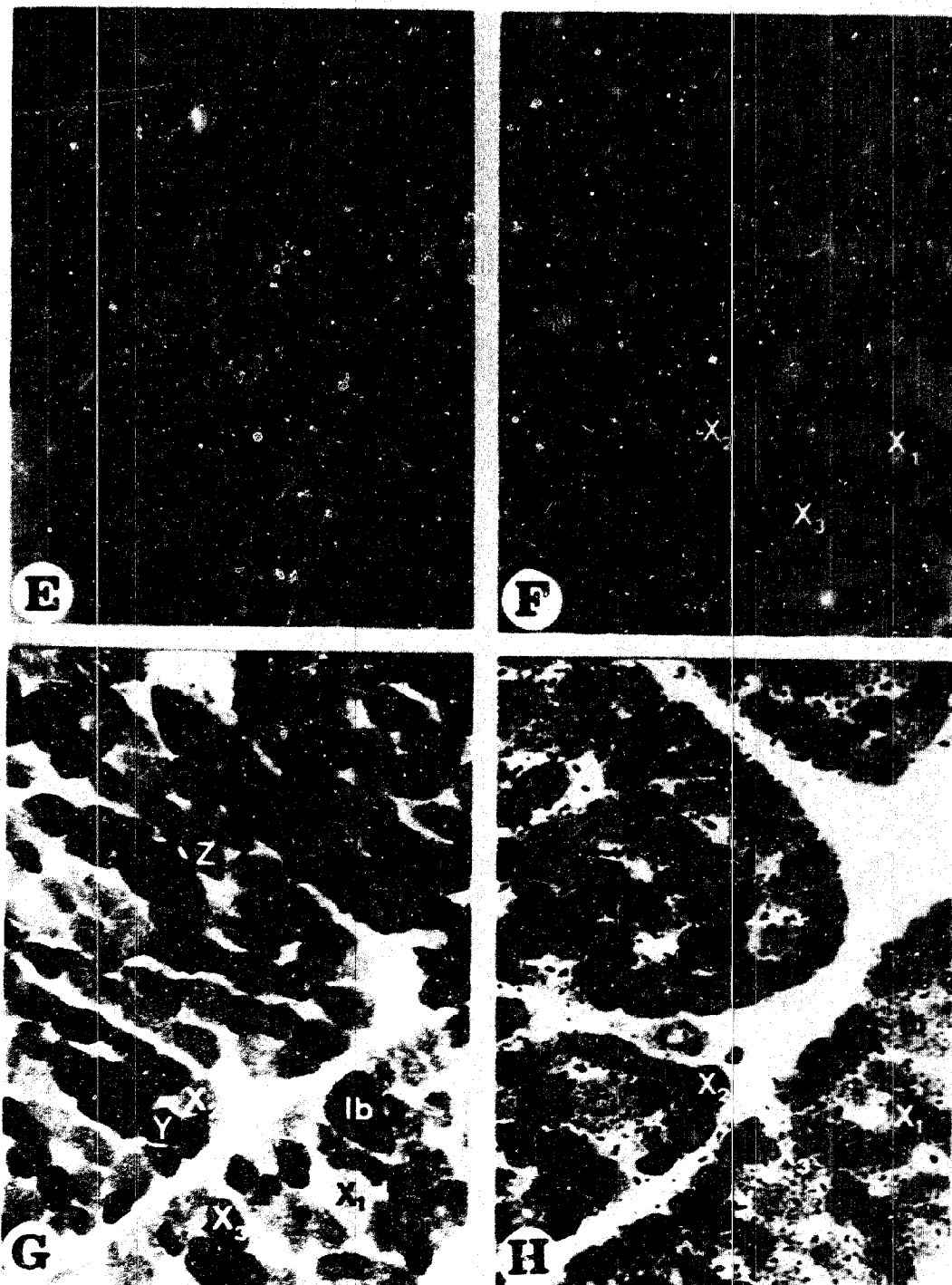


**FIGURA 13:** Secciones del M. flexor carporradial (cabeza cubital) de cachorros con 1 día (A), 8 días (B,C), 15 días (D,E) y 22 días (F-H).

Técnica mATPasa: preincubación alcalina a pH 10'2 (A), 10'3 (F) y 10'4 (B); preincubación ácida a pH 4'6 (D,G).

Técnica metabólica M-GPDH (C,E,H).

La barra corresponde a 20 micras.



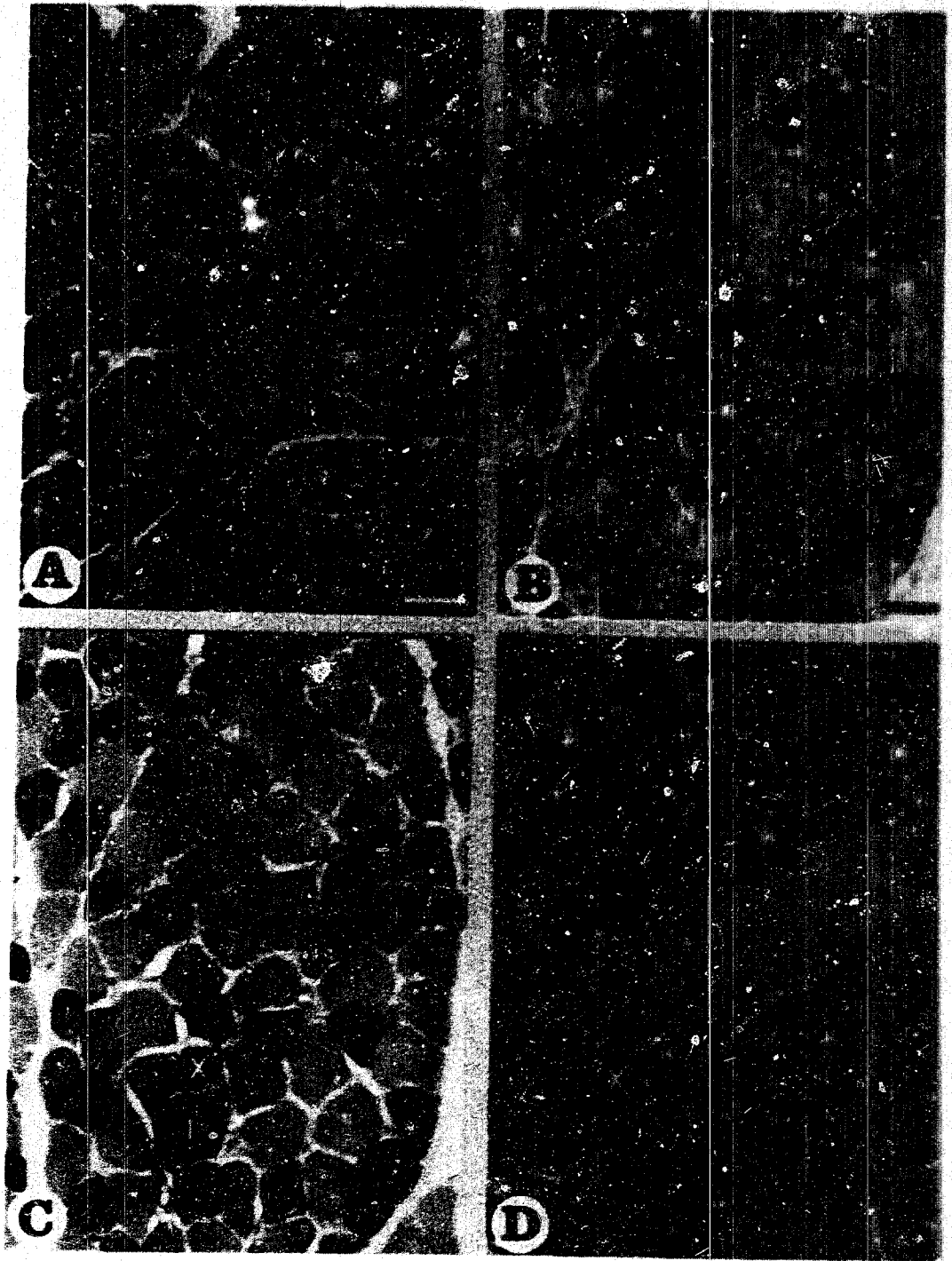
**FIGURA 13:** Secciones del *M. flexor carporradial* (cabeza cubital) de cachorros con 1 día (A), 8 días (B,C), 15 días (D,E) y 22 días (F-H).

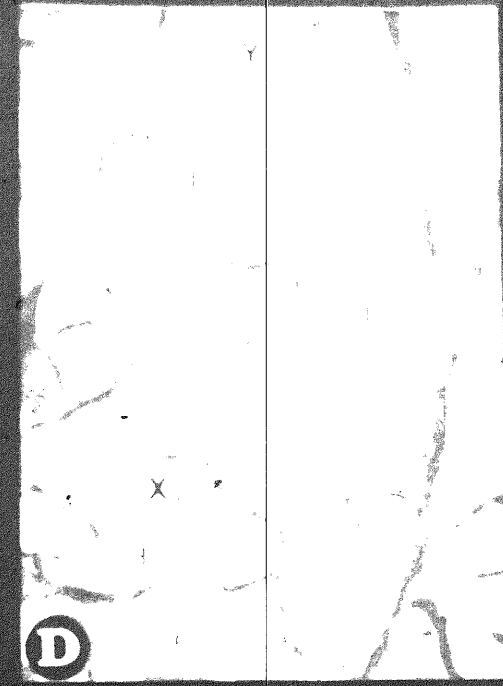
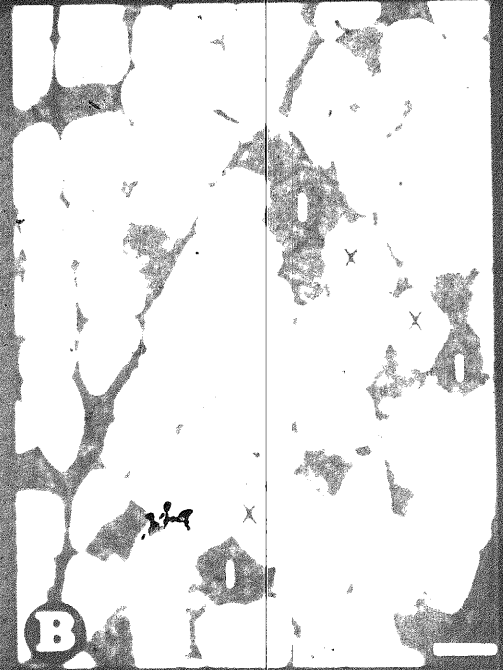
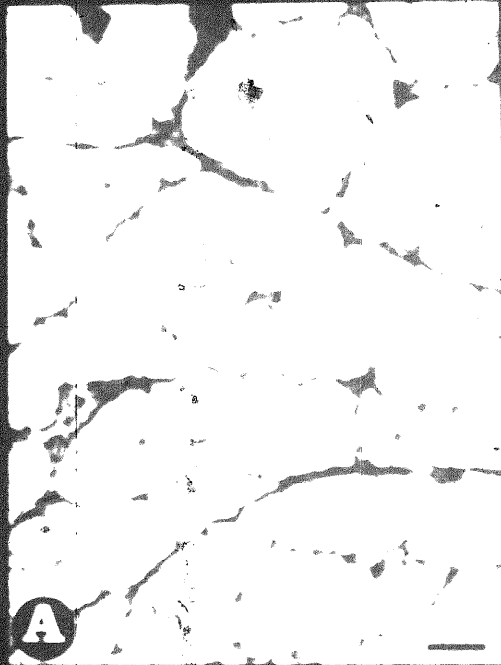
Técnica mATPasa: preincubación alcalina a pH 10'2 (A), 10'3 (F) y 10'4 (B); preincubación ácida a pH 4'6 (D,G).

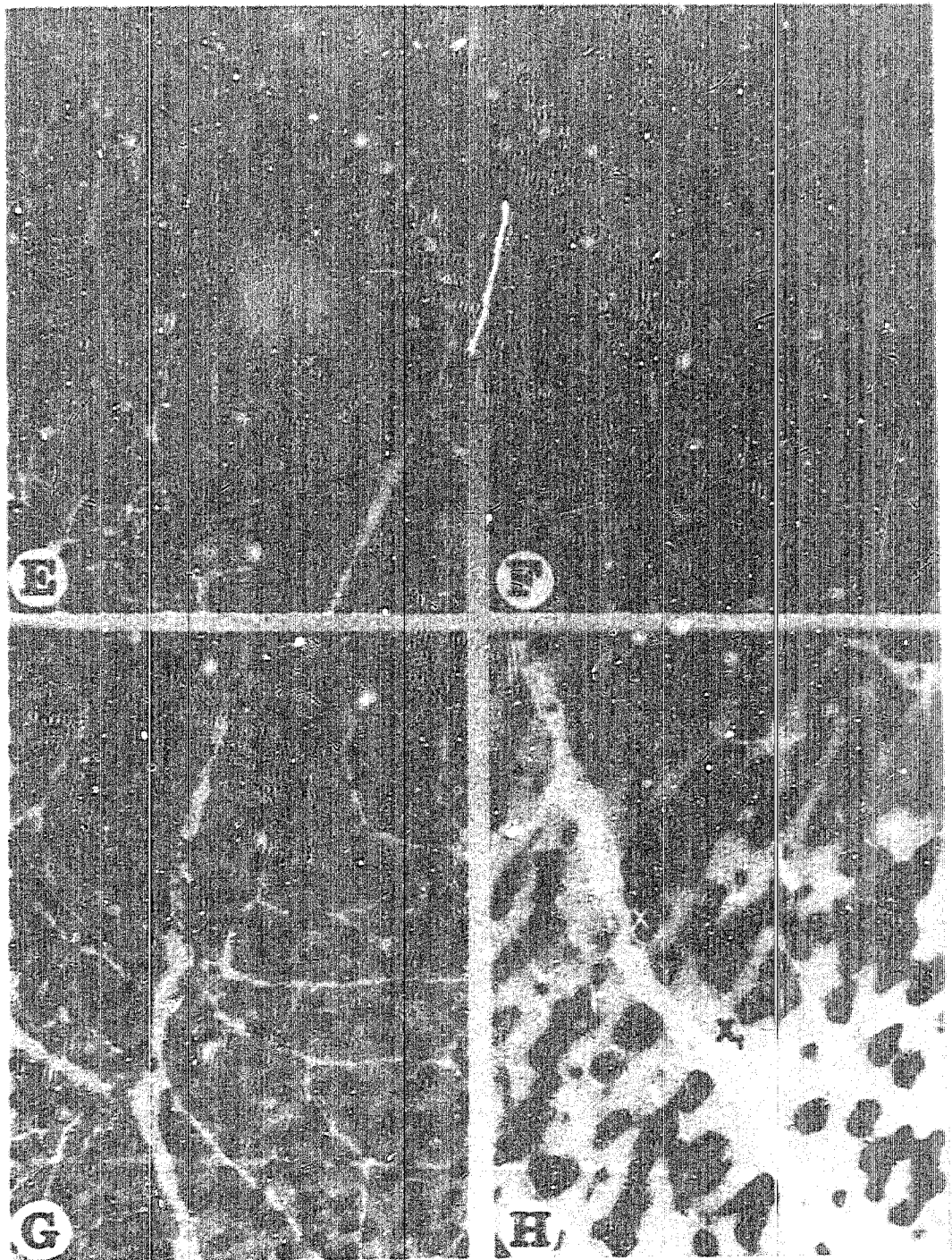
Técnica metabólica M-GPDH (C,E,H).

La barra corresponde a 20 micras.







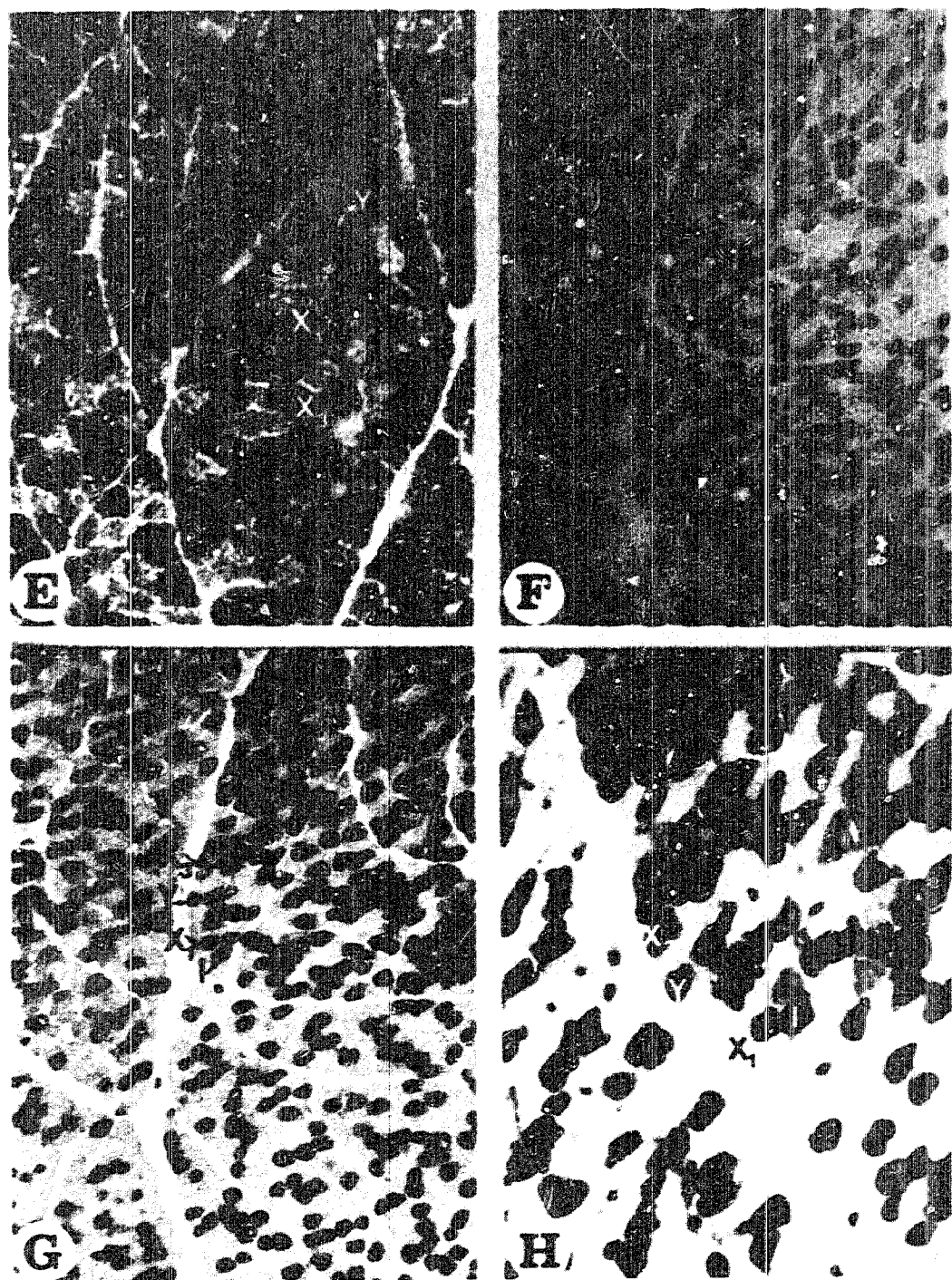


**FIGURA 14:** Secciones del M. flexor carporradial (cabeza cubital) de perros con 23 días (A), 30 días (B-E) y 55 días (F-H).

Técnica metabólica NADH-TR (A) y M-GPDE (E).

Técnica mATPasa: preincubación alcalina a pH 10'2 (F) y 10'4 (B); preincubación ácida a pH 4'6 (C), 4'55 (G) y 4'3 (D,H).

La barra corresponde a 40 micras en A,E,H, a 20 micras en B-D, y a 30 micras en F,G.

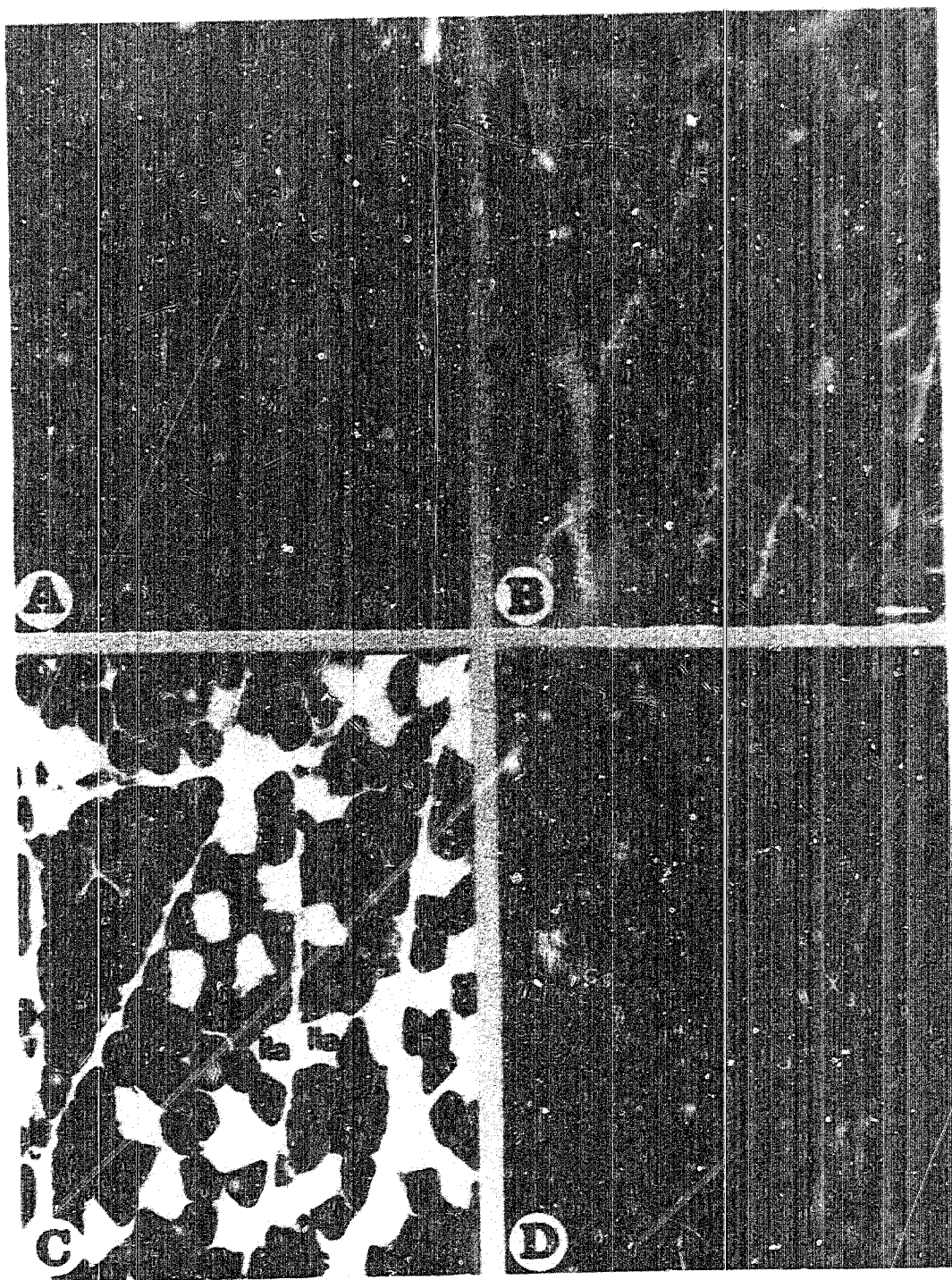


**FIGURA 14:** Secciones del M. flexor carporradialis (cabeza cubital) de perros con 23 días (A), 30 días (B-E) y 55 días (F-H).

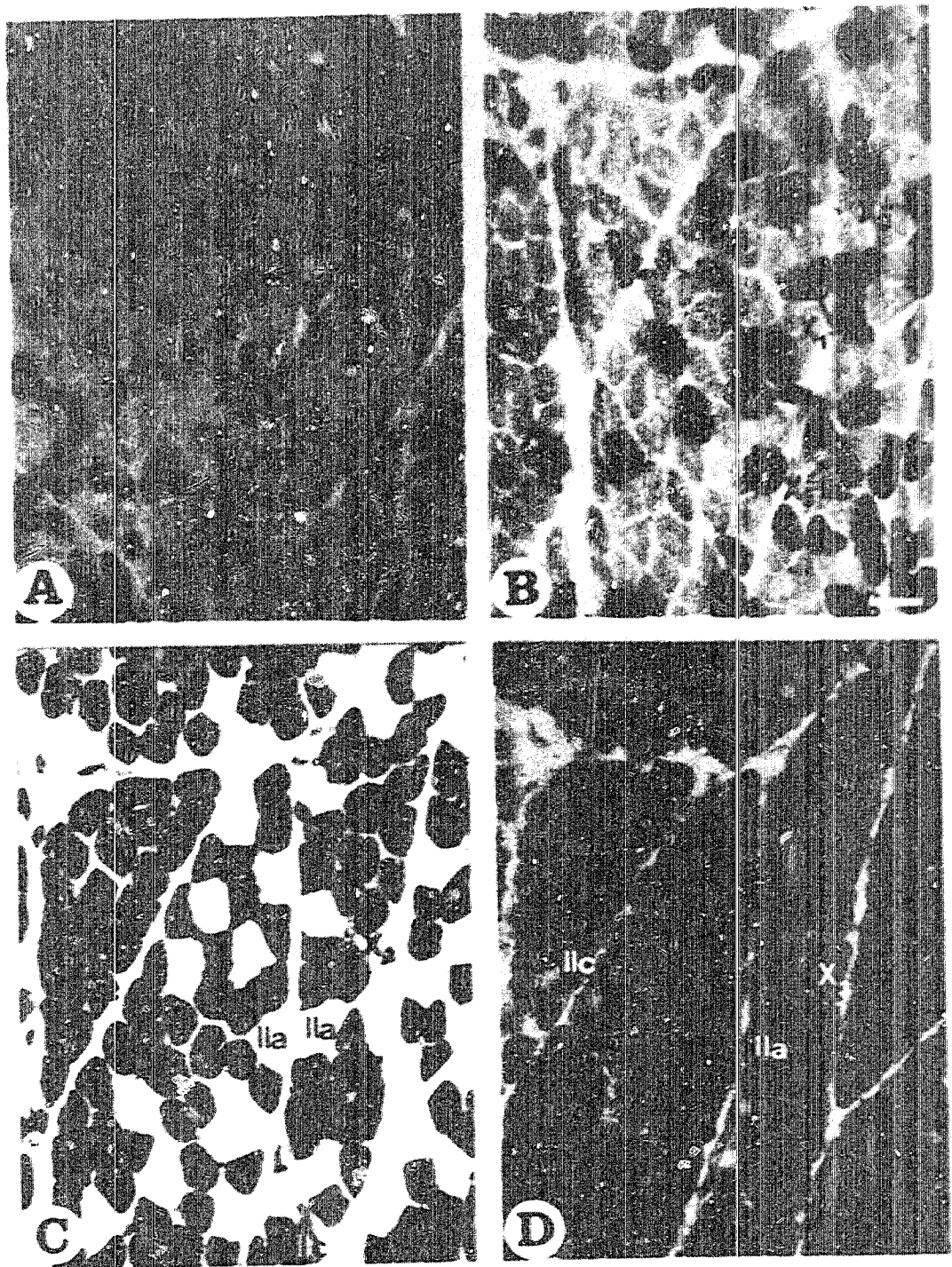
Técnica metabólica NADH-TR (A) y M-GPDH (E).

Técnica mATPasa: preincubación alcalina a pH 10'2 (F) y 10'4 (B); preincubación ácida a pH 4'6 (C), 4'55 (G) y 4'3 (D,H).

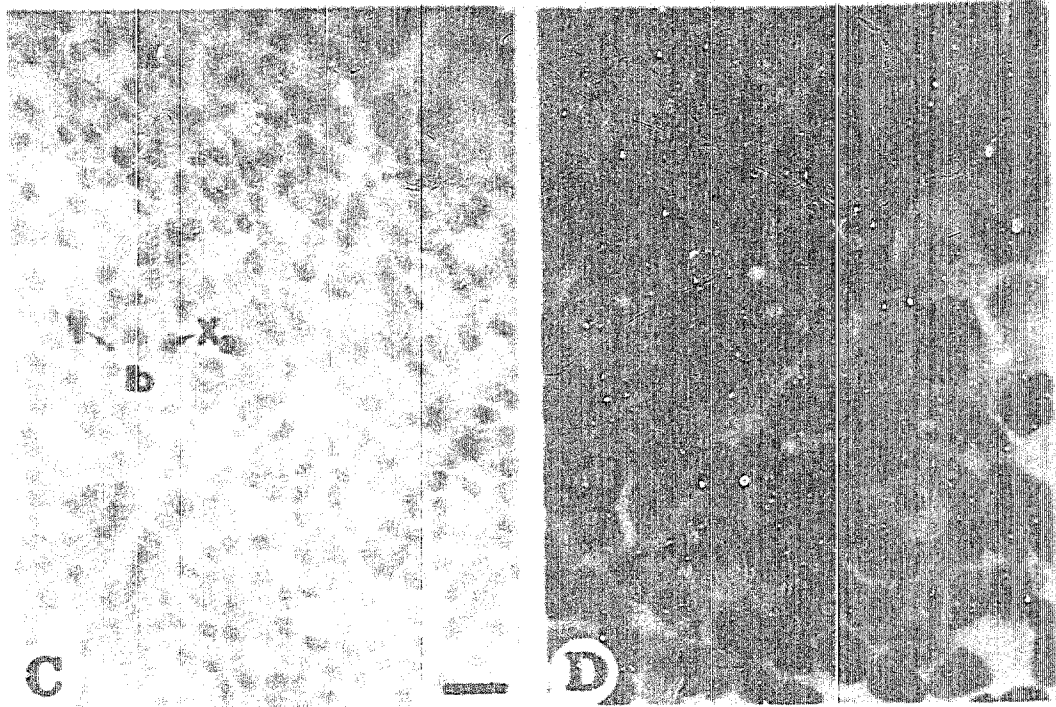
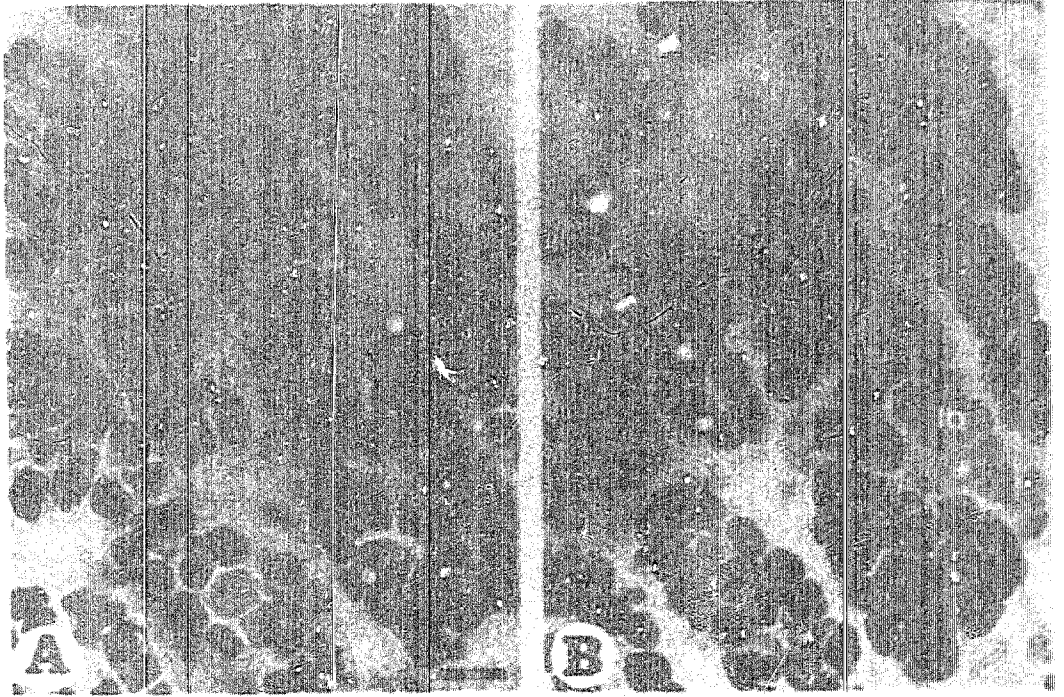
La barra corresponde a 40 micras en A,E,H, a 20 micras en B-D, y a 80 micras en F,G.

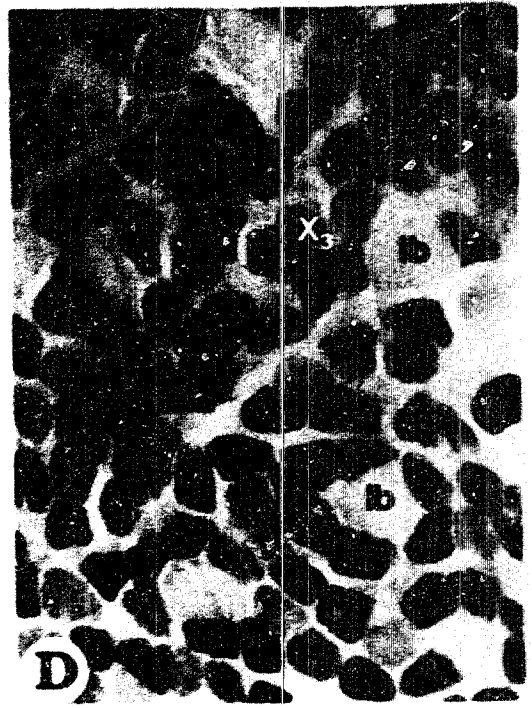
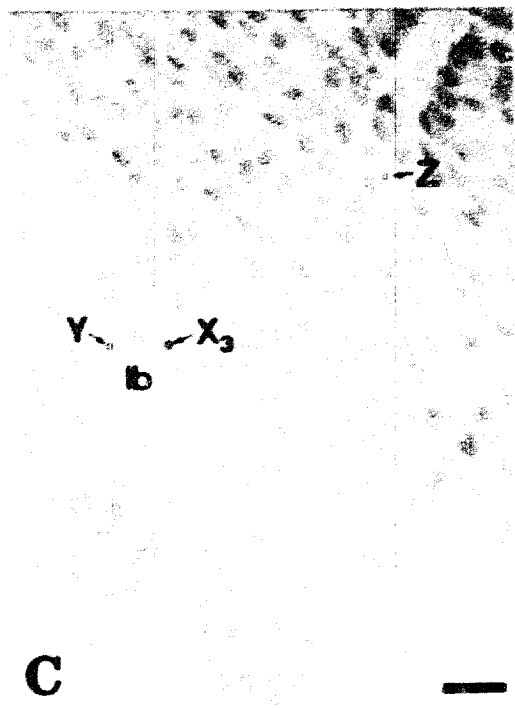
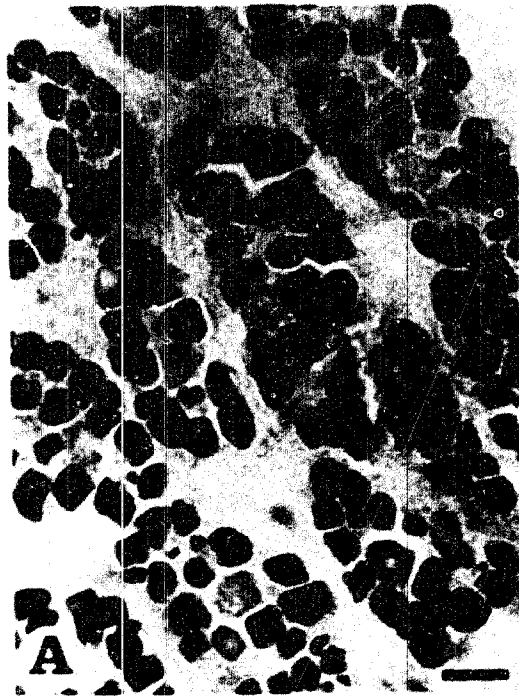


**FIGURA 15:** Secciones del músculo flexor carporradial (cabeza cubital) de perros con 65 días. Técnica mATPasa: preincubación alcalina a pH 10'2 (B) y 10'6 (A); preincubación ácida a pH 4'3 (C). Técnica metabólica M-GPDE (D). La barra corresponde a 80 micras en A y a 40 micras en B-D.

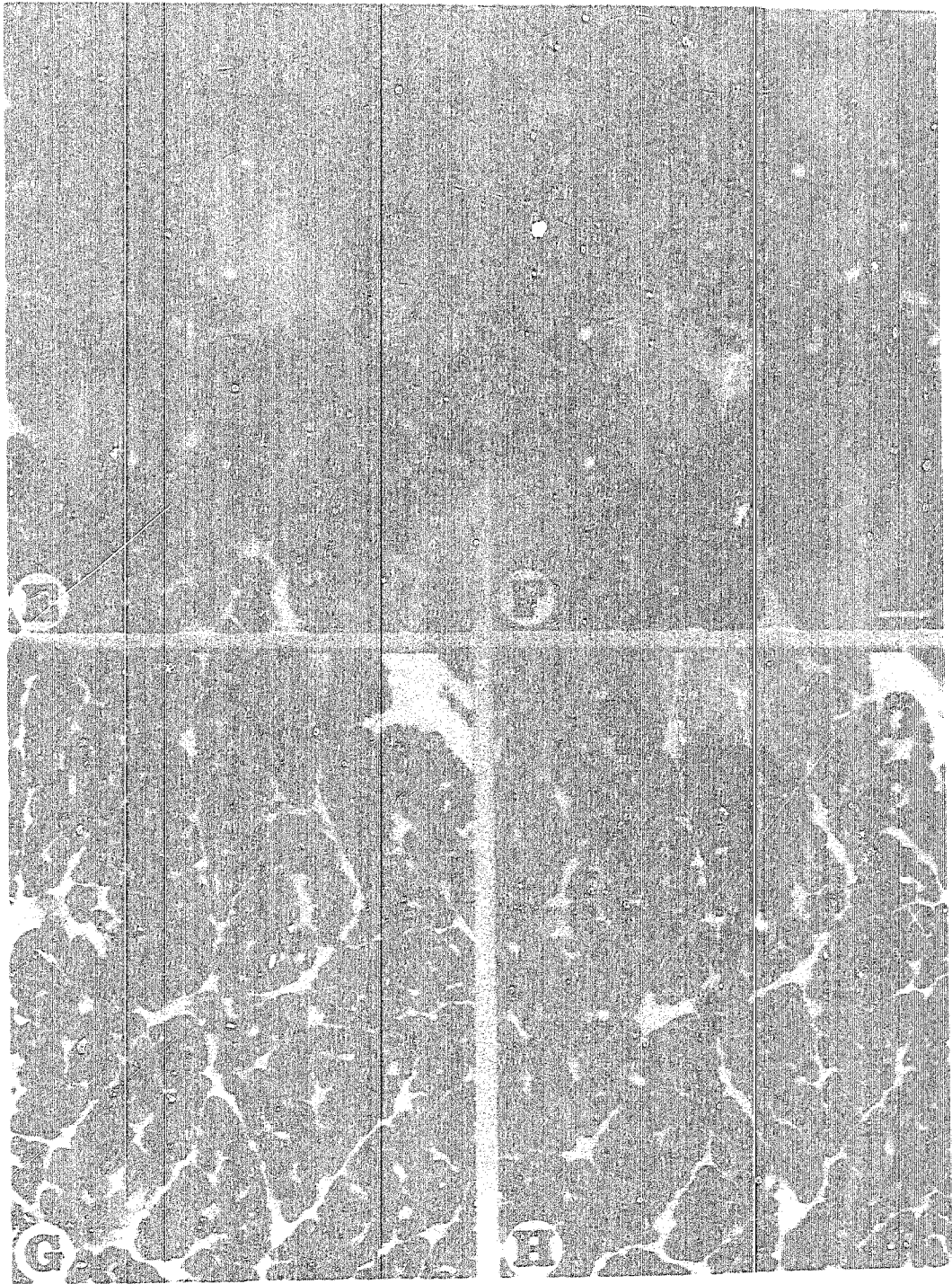


**FIGURA 15:** Secciones del músculo flexor carporradial (cabeza cubital) de perros con 65 días. Técnica mATPasa: preincubación alcalina a pH 10'2 (B) y 10'6 (A); preincubación ácida a pH 4'3 (C). Técnica metabólica M-GPDH (D). La barra corresponde a 80 micras en A y a 40 micras en B-D.

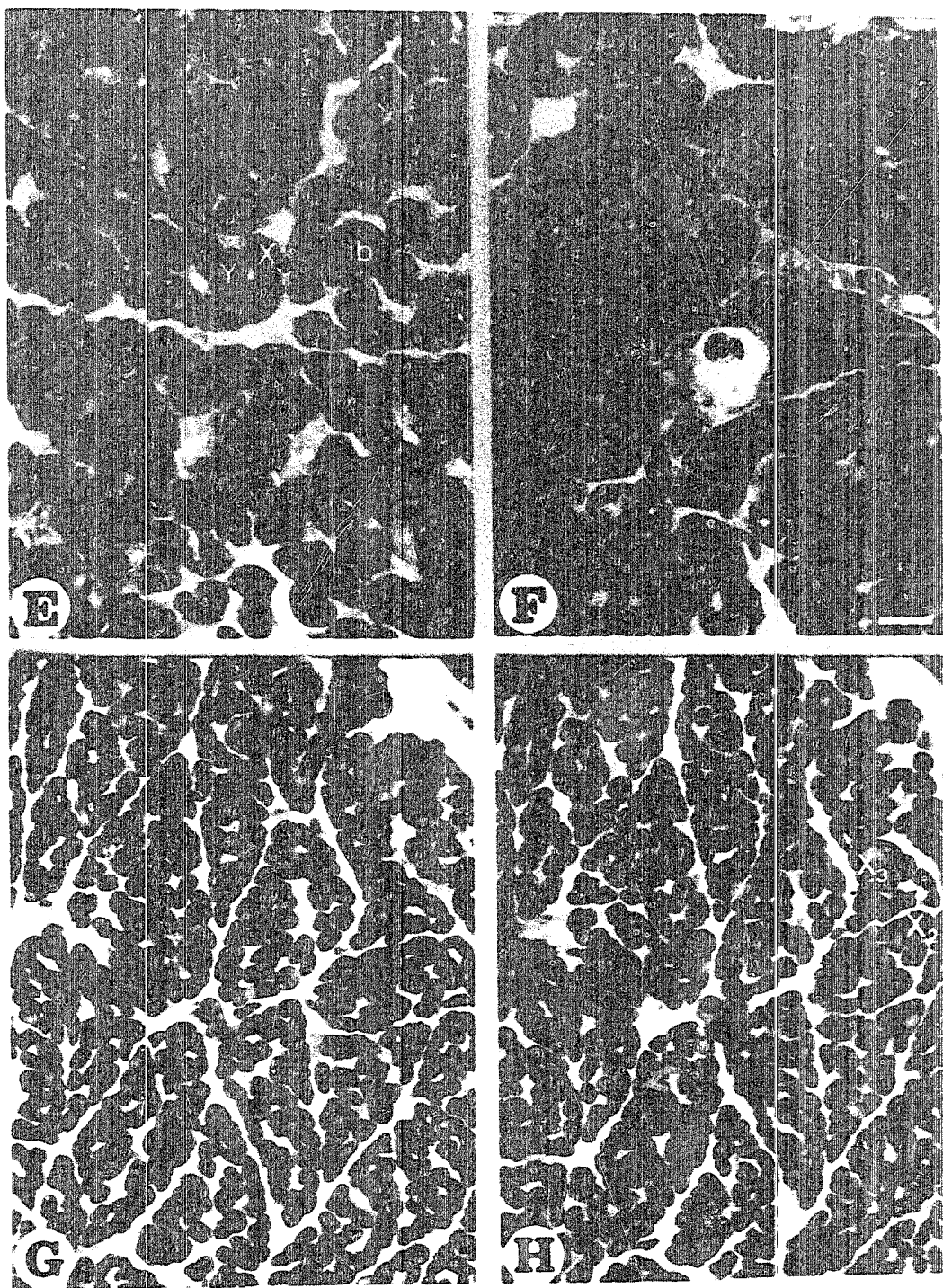








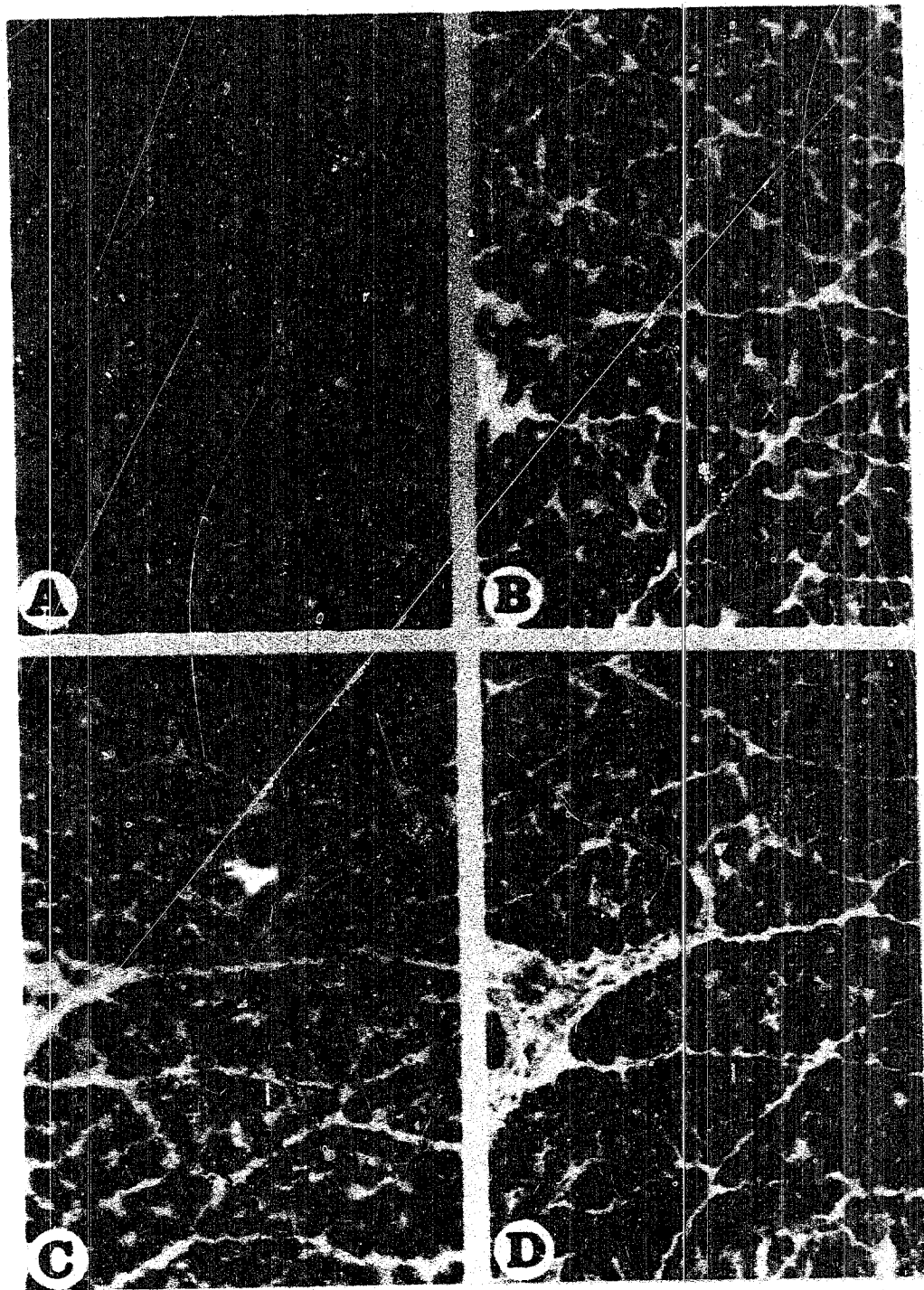
**FIGURA 16:** Secciones del M. flexor carporradial (cabeza radial) de cachorros con 1 día (A,B), 8 días (C), 15 días (D-F) y 22 días (G,H).  
 Técnica MATPasa: preincubación alcalina a pH 10'2 (A,C,D); preincubación ácida a pH 4'6 (E,G) y 4'3 (B,H).  
 Técnica metabólica NADE-TR (F).  
 La barra se corresponde a 20 micras en A,B,D,E; a 40 en C,G,H y a 80 en F.



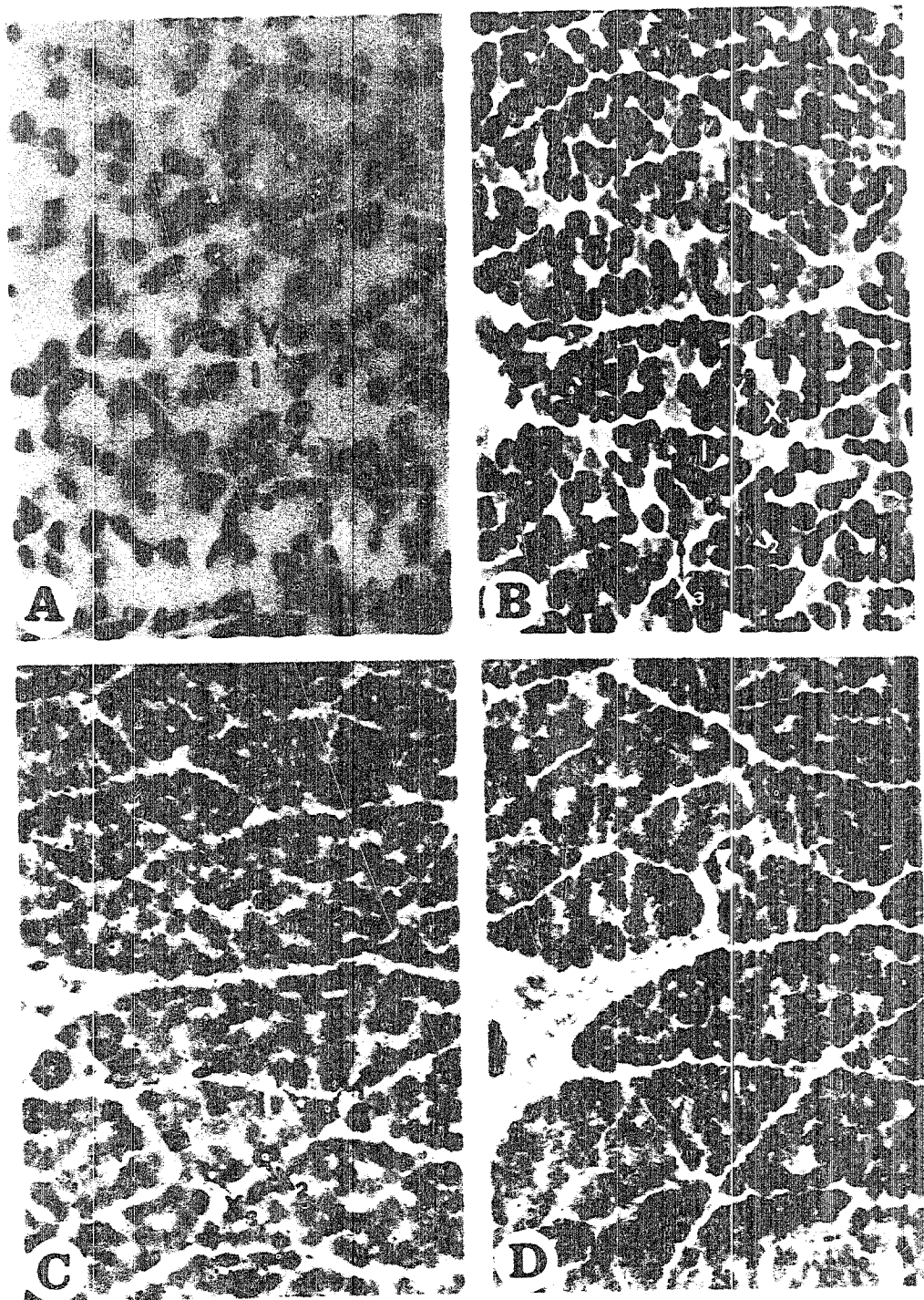
**FIGURA 16:** Secciones del M. flexor carporradial (cabeza radial) de cachorros con 1 día (A,B), 8 días (C), 15 días (D-F) y 22 días (G,H).

Técnica mATPasa: preincubación alcalina a pH 10'2 (A,C,D); preincubación ácida a pH 4'6 (E,G) y 4'3 (B,H).  
Técnica metabólica NADH-TR (F).

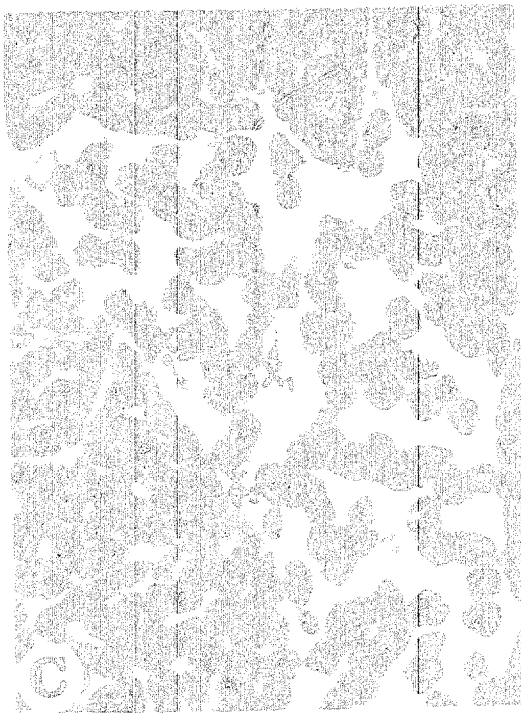
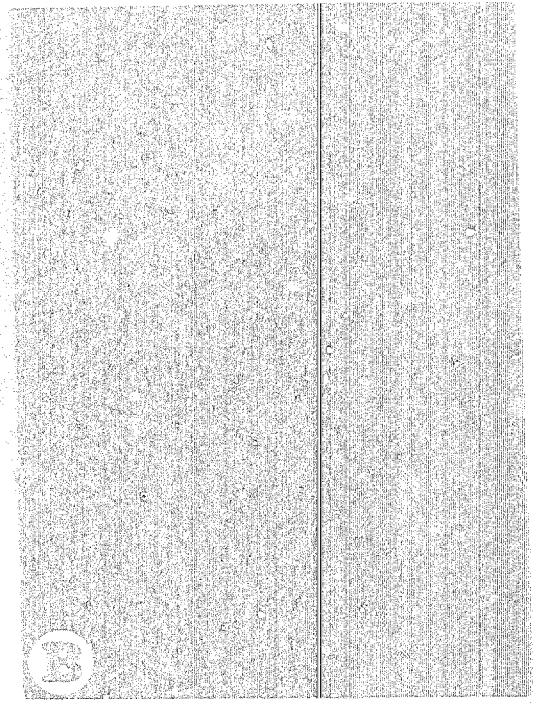
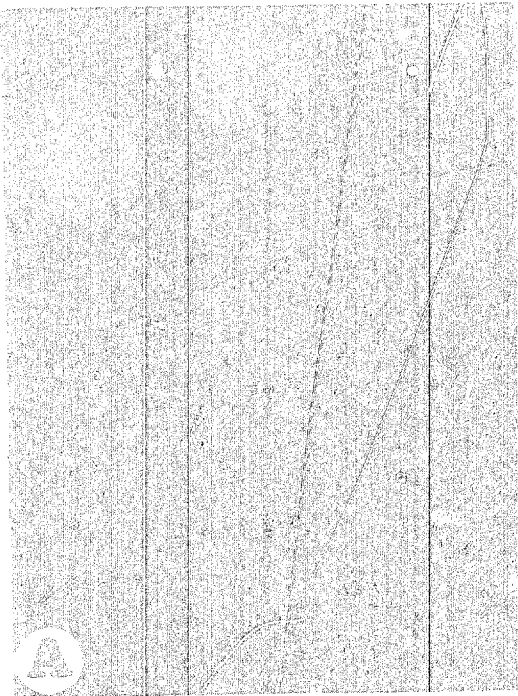
La barra se corresponde a 20 micras en A,B,D,E; a 40 en C,G,H y a 80 en F.

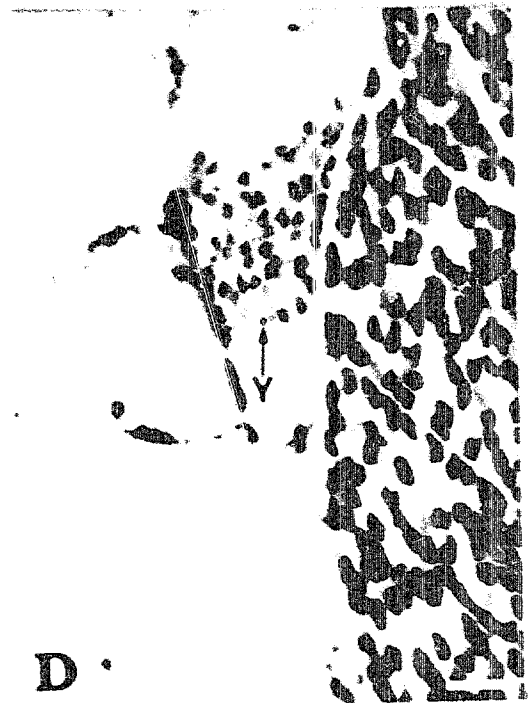
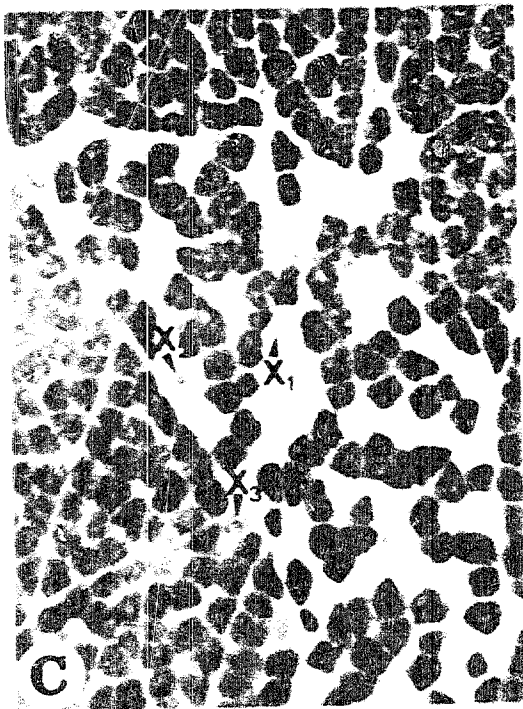
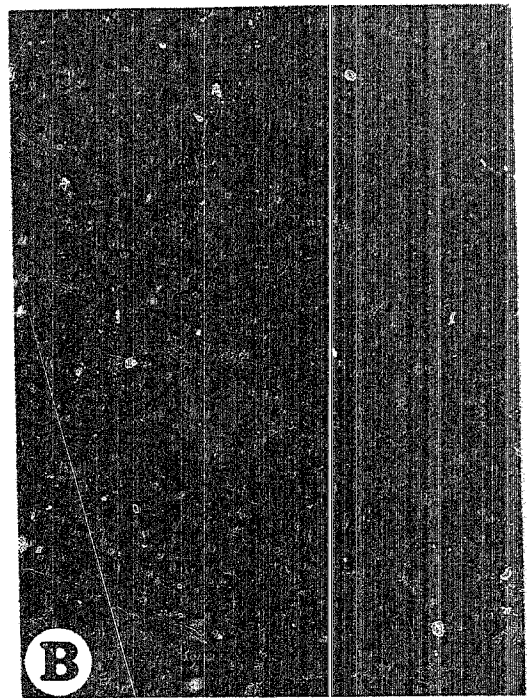
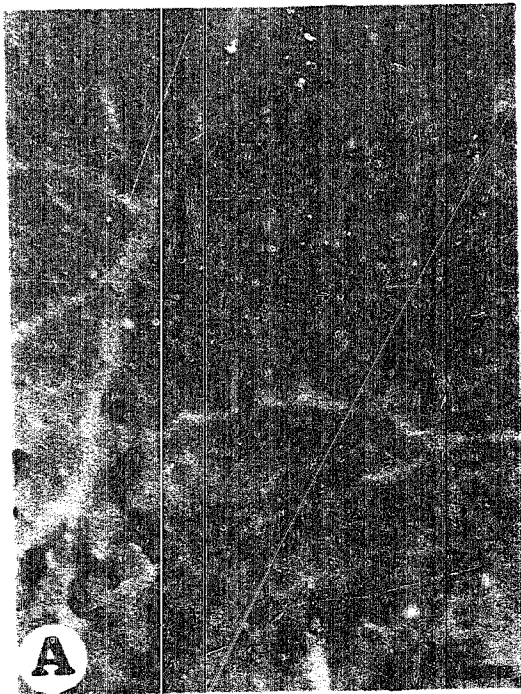


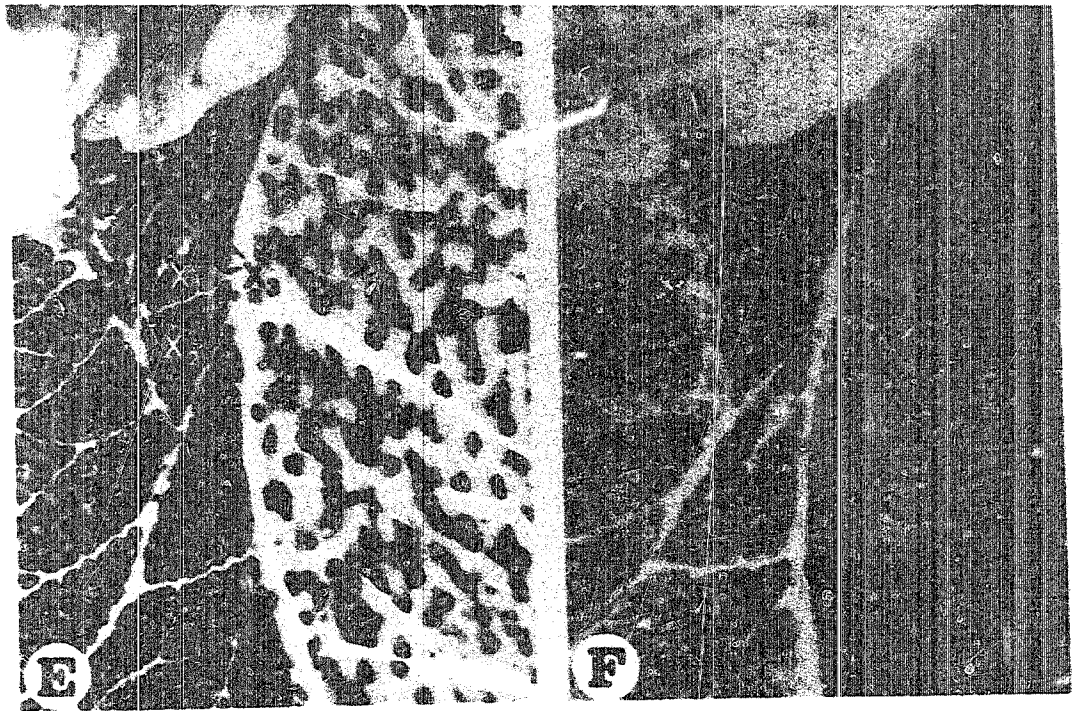
**FIGURA 17:** Secciones del *M. flexor carporradial* (cabeza radial) de perros con 30 días. Técnica mATPasa: preincubación alcalina con pH 10'3 (A) preincubación ácida con pH 4'55 (B). Técnicas metabólicas M-GPDH (C) y NADH-TR (D). La barra equivale a 40 micras.



**FIGURA 17:** Secciones del M. flexor carporradial (cabeza radial) de perros con 30 días. Técnica mATPasa: preincubación alcalina con pH 10'3 (A) preincubación ácida con pH 4'55 (B). Técnicas metabólicas M-GPDH (C) y NADH-TR (D). La barra equivale a 40 micras.





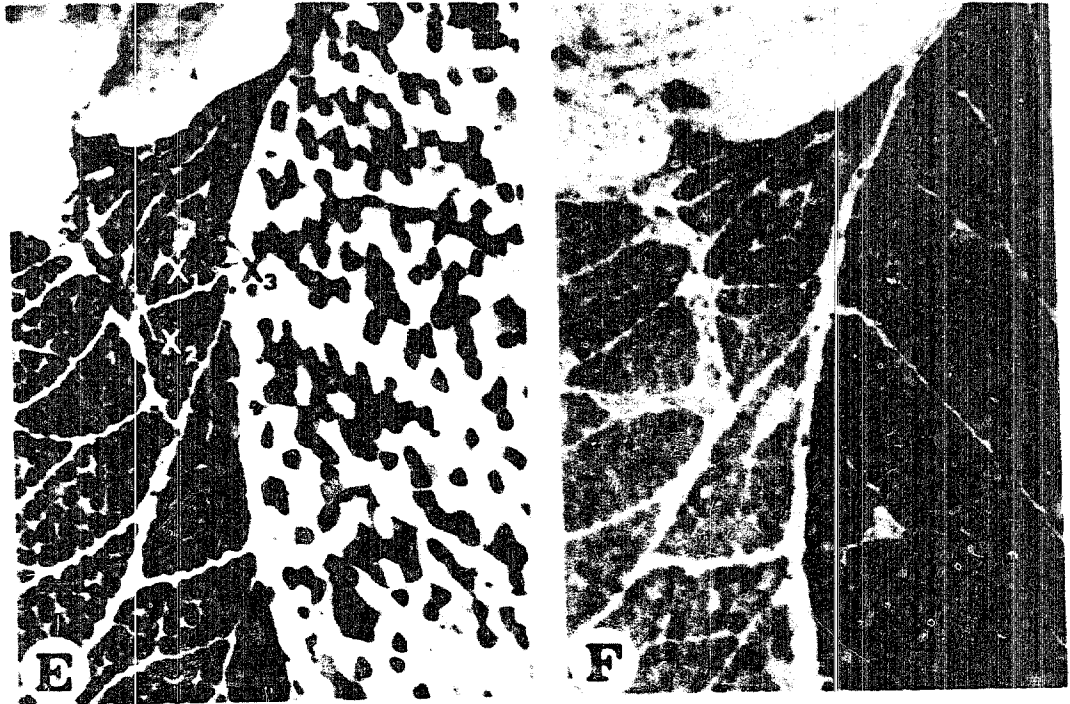


**FIGURA 18:** Secciones del músculo flexor carporradial (cabeza radial) de perros con 40 días (A), 60 días (B,C) 65 días.

Técnica mATPasa: preincubación alcalina a pH 10'2 (B), 10'3 (A) y 10'5 (D); preincubación ácida con pH 4'3 (C,E).

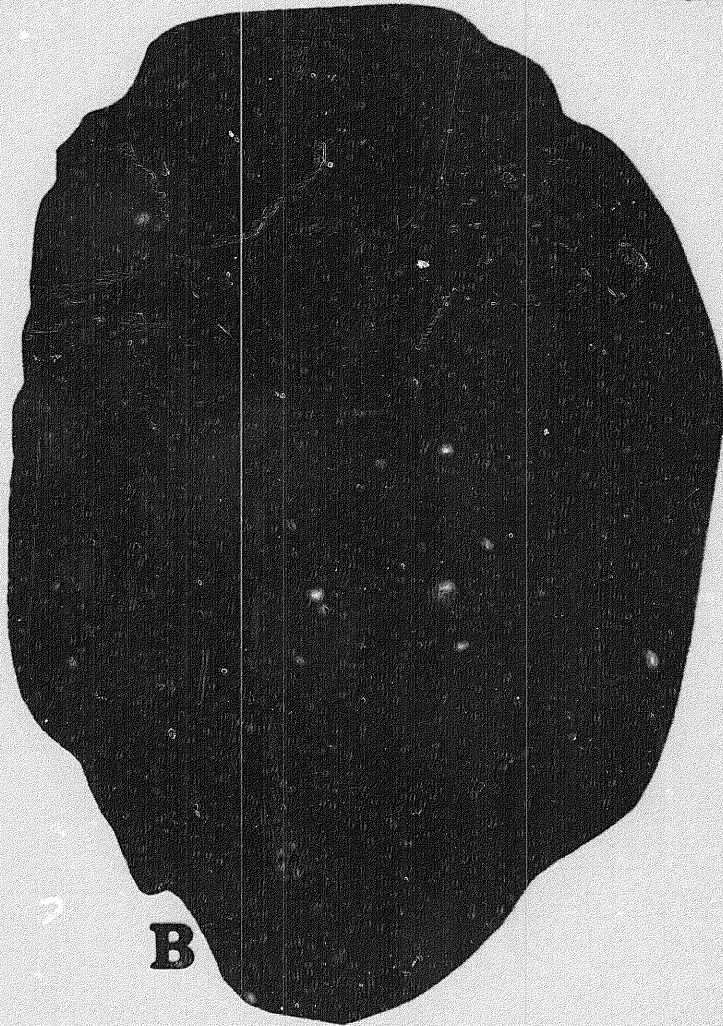
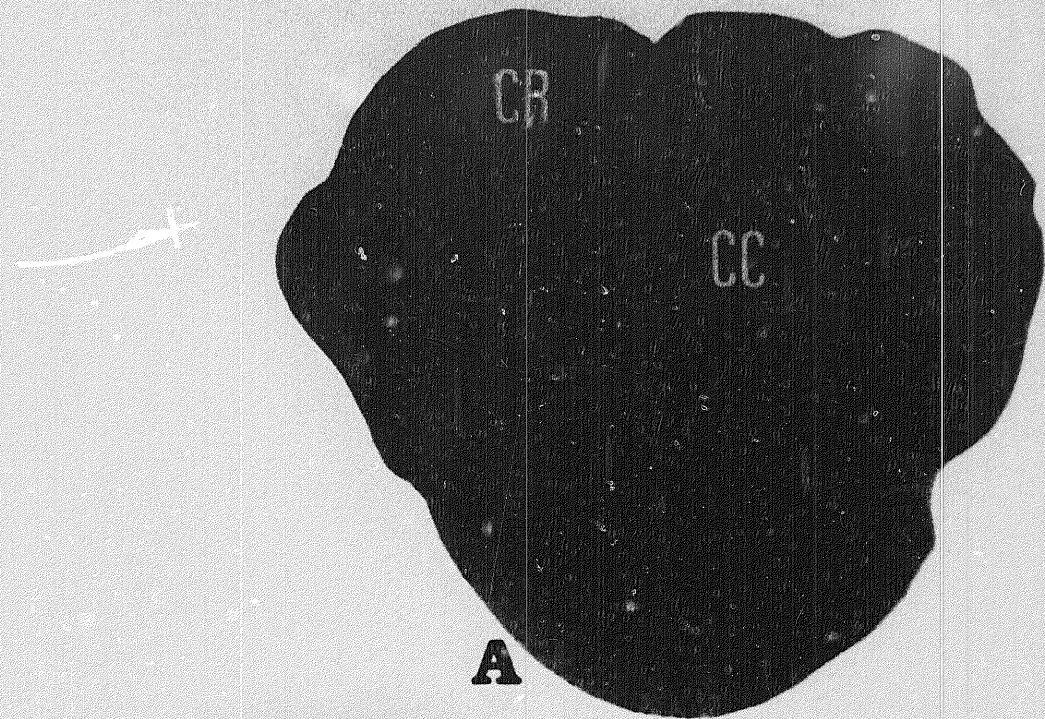
Técnica metabólica M-GPDH (F).

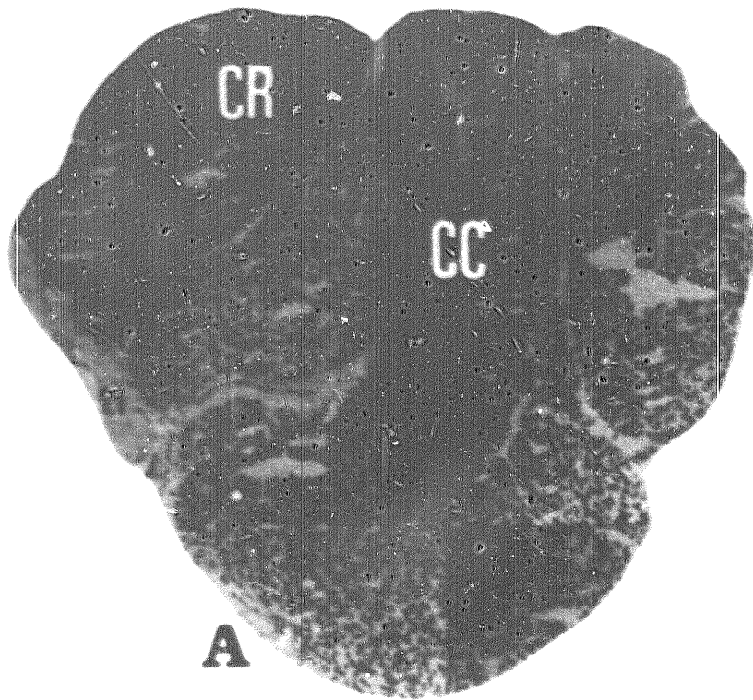
La barra equivale a 40 micras en A-C y a 80 micras en D-F.



**FIGURA 18:** Secciones del músculo flexor carporradial (cabeza radial) de perros con 40 días (A), 60 días (B,C) 65 días.  
 Técnica mATPasa: preincubación alcalina a pH 10'2 (B), 10'3 (A) y 10'5 (D); preincubación ácida con pH 4'3 (C,E).  
 Técnica metabólica M-GPDH (F).  
 La barra equivale a 40 micras en A-C y a 80 micras en D-F.









**FIGURA 19:** Secciones completas del M. flexor carporradial de perros con 40 días (A-C), 55 días (D) y 65 días (E-G).

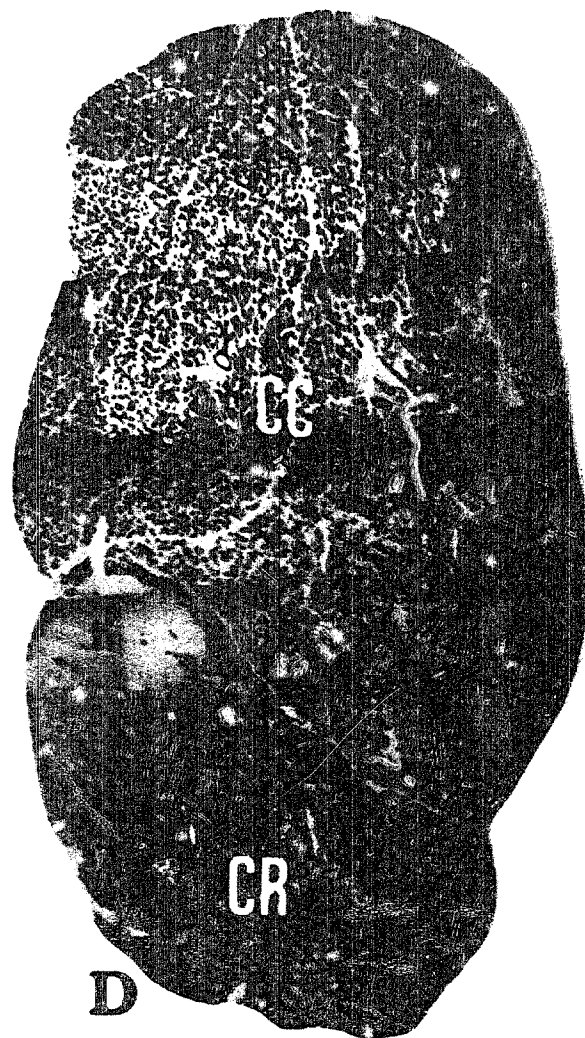
**CC:** cabeza cubital.

**CR:** cabeza radial.

**to:** tendón de origen.

**ti:** tendón de inserción.

**40X**



**FIGURA 19:** Secciones completas del M. flexor carporadial de perros con 40 días (A-C), 55 días (D) y 65 días (E-G).

CC: cabeza cubital.

CR: cabeza radial.

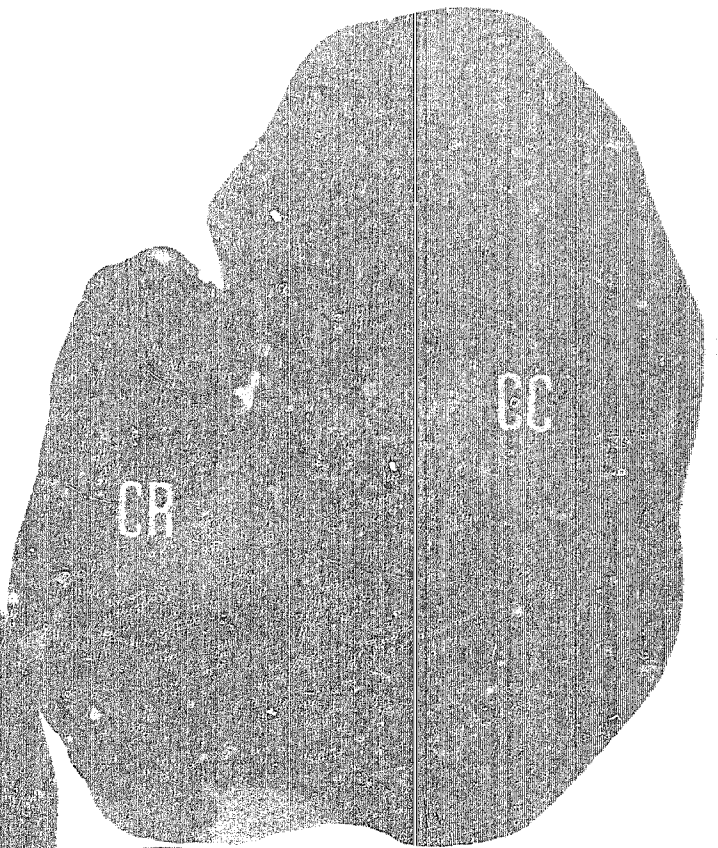
to: tendón de origen.

ti: tendón de inserción.

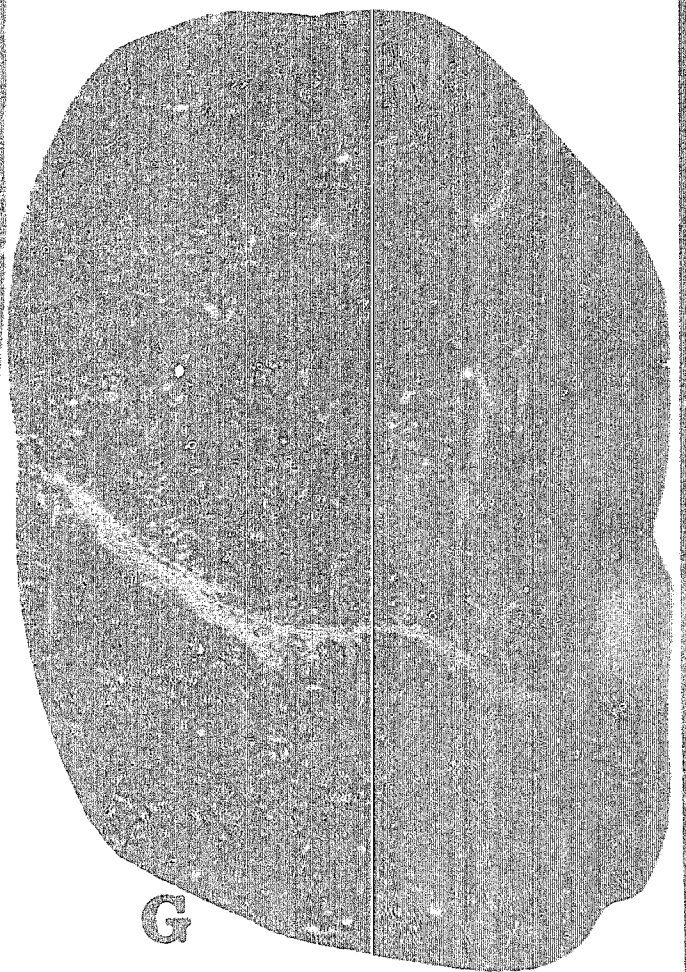
40X



F



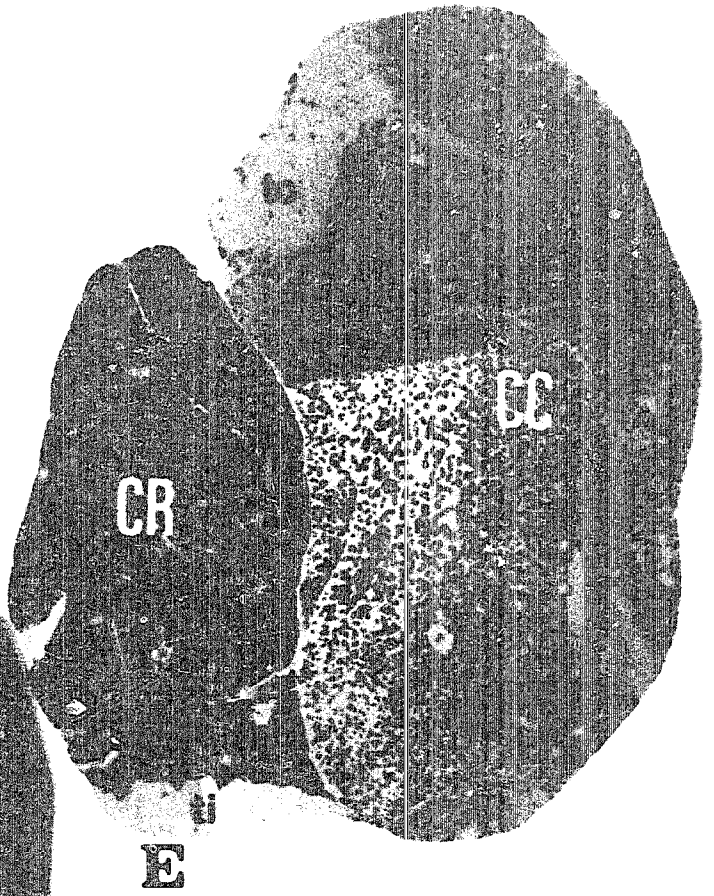
E



G



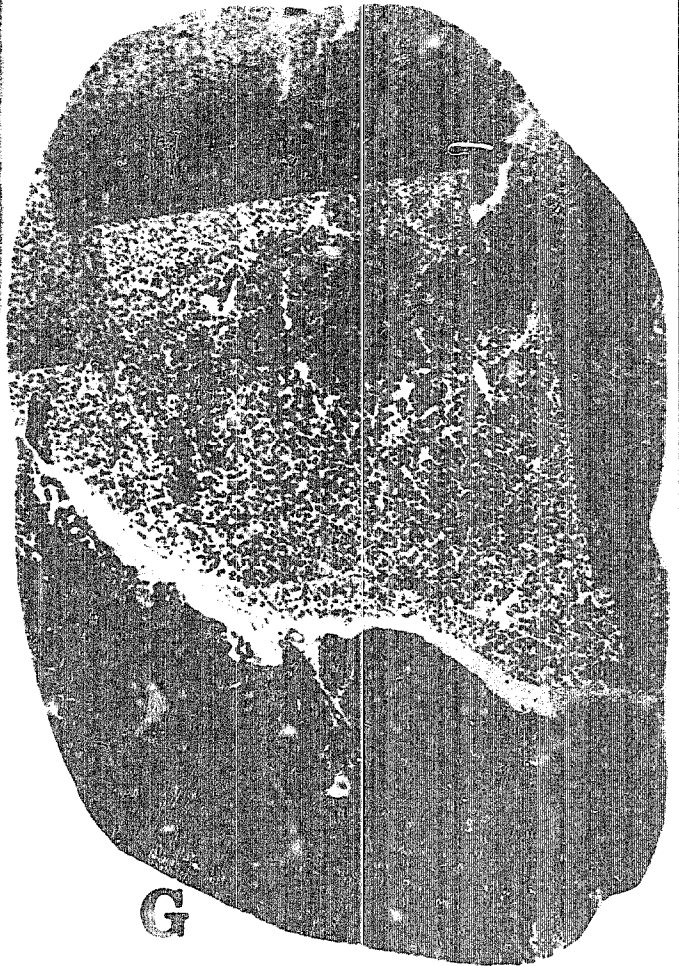
**F**



**CR**

**EC**

**E**



**G**

Días	10'2-10'3	10'4-10'5	4'6	4'55	4'3	NADH-TR	NaGFDE
Ncto.	++	-	+++	+++	++	+++	+++
8-10	-	-	+++	+++	++	+++	+/-
20-25	-	-	++++	++++	+++	+++	-
30-35	-	-	++++	++++	++++	+++	-

**TABLA IX:** N. Flexor carporradial (cabeza cubital). Análisis de los distintos grados de intensidad tintorial que presentan las fibras "Ib" durante el desarrollo postnatal.

Días		10'2-10'3	10'4-10'6	4'6	4'55	4'3	NADH-TR	NaGFDE
Ncto. (Ind.)		++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++
8-10	X2	++++	++++	++	++	++	+++	+++
	X3	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++
20-25	X1	++++	++++	-	-	-	+++	++++
	X2	++++	++++	++	++	++	+++	+++
	X3	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+/-
30	X1	++++	++++	-	-	-	+++	++++
	X2	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++
	X3	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+/-
55-60	X1	++++	++++	-	-	-	++/+++	++++
	X3	++++	++/+++	+++	+++	+++	++++	+/-
65	X1	++++	++++	-	-	-	++/+++	++++
	X3	++++	++/+++	+++	+++	++/+++	++++	++

**TABLA X:** M. Flexor Carporradial (cabeza cubital). Análisis de los distintos grados de intensidad tintorial que presentan las fibras "X" durante el desarrollo postnatal.

Días	10'2-10'3	10'4-10'6	4'6	4'55	4'3	RAMO-TR	RAM-TR
Nota. (ind.)	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++
8-10 Y	++	-	++++	+++	++	+++	+/-
15-22	Y	-	++++	+++	+++	+++	-
	Z	-	++++	+++	+++	+++	-
30	Y	-	++++	++++	++++	+++	-
	Z	-	++++	++++	++++	+++	-

**TABLA XI:** M. Flexor Carporradial (cabeza cubital). Análisis de los grados de intensidad tintorial presentados por las fibras "Y", "Z" durante el desarrollo postnatal.

Edad	Ib	Z	Y	X1	X2	X3	Y+Z	Z	X
Nota.	3.2%	96.8%							
8-10 d.	3.8%		17.1%		79%		17.1%		79%
15 d.	2.8%		5%		28.7%	63.2%	5%		91.9%
22 d.	2.6%	6.4%	9%	16.5%	23.6%	41.5%	15.4%	4.4%	81.9%
30 d.		16.3%	7%	39.7%	13.5%	23.4%	20.3%	13.3%	76.6%
35 d.		18.8%	9.4%	41%	9.4%	21.3%	25.2%	14.8%	71.7%
45 d.		33.9%	2.3%	37.2%	15.1%	11.4%	33.2%	30.9%	63.7%
55 d.		35.2%	2.6%	60.7%		1.5%	34.8%	31.2%	62.2%
60 d.		31.8%	2.2%	63.3%		2.5%	31%	29.8%	65.8%
65 d.		33%	5%	62%			35%	30%	62%

**TABLA XII:** M. flexor carporradial (cabeza cubital). Estudios por edades de los porcentajes que adquieren los distintos tipos de fibrilares durante el desarrollo postnatal.



Días	10'2-10'4	10'4-10'6	4'6	4'55	4'3	NADH-YR	NaGPDR
Ncto.	++	+/-	+++	+++	++	+++	+++
8-10	-	-	+++	+++	++	+++	+/-
15-20	-	-	++++	++++	++	+++	-/+
20-25	-	-	++++	++++	+++	+++	-/+
30	-	-	++++	++++	+++	+++	-/+

TABLA XIII: N. flexor carpometacarpal (cabeza radial). Análisis de los grados de intensidad tintorial presentados por las fibras "Ib" durante el desarrollo postnatal.

Días	10'2-10'3	10'4-10'6	4'6	4'55	4'3	NADH-YR	NaGPDR
Ncto. (Ind.)	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++
8-10 X3	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++
20-25	X2	++++	+++	+++	++	+++	+++
	X3	++++	++++	++++	++++	+++	+++
30-40	X1	++++	+	+	-	+++	++++
	X2	++++	++++	++	++	+++	++++
	X3	++++	++++	++++	++++	+++	+/-
55-65	X1	++++	++++	-	-	-	+
	X3	++++	++++	++++	++++	+++	+++

TABLA XIV: N. flexor carpometacarpal (cabeza radial). Análisis de los grados de intensidad tintorial presentados por las fibras "X" durante el desarrollo postnatal.

Días 10'2-10'3 10'4-10'6 4'6 4'55 4'3 NADR-TR MANGPDI

Neto. (Ind.)	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++
8-10	Y ++	-	+++	+++	++	+++	+++
	Z -	-	+++	+++	+++	+++	+++
15-20	Y ++	-	++++	++++	+++	+++	-/+
	Z -	-	++++	++++	+++	+++	-/+
30	Y ++	-	++++	++++	+++	+++	-/+
	Z -	-	++++	++++	+++	+++	-/+

TABLA XV: M. flexor carporradial (cabeza radial). Análisis de los distintos grados de intensidad tintorial que presentan las fibras "Y", "Z" durante el desarrollo postnatal.

Edad	lb	Z	Y	X1	X2	X3	Y+Z	Z	X
Neto.	5.2%	94.8%							
8 d.	5%	2.3%	24%			60%	26.3%	2.3%	60%
15 d.	6%	19.7%	28.5%			45.7%	48.2%	19.7%	45.7%
22-23 d.	6.6%	38.3%				55%	38.3%		55%
30 d.	46.2%		20%			33.7%	60.2%	40.2%	33.7%
40 d.	69.3%		17.3%			13.3%	80.6%	63.3%	13.3%
45 d.	66%		34%					66%	
55 d.	71%		29%					65%	
60 d.	86%		3%	8.7%	1.6%		83%	80%	10.3%

TABLA XVI: M. flexor carporradial (cabeza radial). Valores porcentuales de los distintos tipos de fibras presentes en cada edad, durante el desarrollo postnatal. Los datos de 40-60 días corresponden a la zona axila de esta cabeza, por lo cual se muestran muy variantes.

		22 d.		30 d.		40 d.		65 d.
CABEZA CUBITAL	Ib	19.35±0.13	I	15.57±0.19	I	18.01±0.18	I	19.87±0.19
	Z, Y	12.09±0.18	X1	17.21±0.18	X1	19.68±0.25	IIa	20.76±0.23
	X	13.62±0.17	X2, X3	13.56±0.20	X3	16.78±1.07		
CABEZA RADIAL	Ib	11.81±0.18	I	13.25±0.18	I*	14.97±0.21	I	20.09±0.22
	X, Y	10.02±0.11	X1	11.07±0.11	I	13.69±0.13		
			X2, X3	11.57±0.20	X1	13.41±0.15		
					X3	13.62±0.57		

TABLA XVII: M. flexor carporradial. Datos morfométricos correspondientes a medias ( $\bar{x}$ ) de los diámetros mínimos ± el error standard en los diferentes tipos fibrilares analizados en las edades más relevantes. Los valores presentados en la edad de 40 y 65 días para la cabeza radial se refieren a la población que constituye la zona mixta de esta cabeza. (\*) Valor correspondiente a las fibras tipo I de la zona tipo I.

**DISCUSION**

## V.- DISCUSION.

### V.1.- DE LOS TIPOS DE FIBRAS Y METODOLOGIA EMPLEADA (ANIMALES ADULTOS).

Los estudios llevados a cabo en el musculo esquelético del perro con objeto de investigar los distintos tipos de fibras, son algo contradictorios. Todos los autores coinciden en que son facilmente distinguibles las fibras tipo I y tipo II. El problema surge a la hora de evidenciar los diferentes subtipos dentro de estas últimas. Así, mientras MASCARELLO/VEGETTI (1979), CARDINET et al., (1982), BRAUND et al., (1978, 1982), BRAUND/LINCOLN (1981), ARMSTRONG et al., (1982) GREEN et al., (1982), RODRIGUEZ BARBUDO et al. (1983), MARTINEZ-LOPEZ (1987), manifiestan no haber encontrado fibras IIB (BROOKE/KAISER, 1970) en los músculos de la especie canina, otros autores (CARDINET et al., 1983; CASTLE/REYMAN, 1984; MORENO, 1986; GIL, 1986; GIL et al., 1987; DIZ, 1987), refieren este tipo, aunque con ligeras diferencias respecto a las IIB descritas en otros mamíferos (BROOKE/KAISER, 1970).

Las fibras FG (PETER et al., 1972), equiparables en cierta medida a las IIB, han sido reconocidas en el perro por AQUIN/BANCHERO (1981) y McCONATHY et al., (1983). También otros autores, ya sea mediante un control estricto de tiempos y pH de preincubación (GOLLNICK et al., 1983) o bien introduciendo cobre en las técnicas mATPasa (MATOBA/GOLLNICK, 1985), indican la presencia de tres subtipos de fibras II (IIA1, IIA2, IIA3) en músculos de diferentes mamíferos, incluido el perro. Mención especial merece el trabajo realizado en 1982 por SNOW et al., donde se pone de manifiesto la existencia en el M. semitendinoso de fibras IIA con un comportamiento ATPásico distinto al de otros mamíferos (gato, rata), y de otras fibras tipo II "propias del perro", que difieren de las anteriores no sólo por sus propiedades mATPásicas, sino también por la estructura de las cadenas pesadas de su miosina. Nuestro trabajo lo hemos desarrollado en base a estos hechos, aplicando las técnicas de mATPasa descritas por los autores citados, aunque con ligeras modificaciones (MASCARELLO, comunicaciones personales, 1987, 1989), y complementándolas con la metodología propuesta por MABUCHI/SRETER (1980) y por DUBOWITZ/BROOKE (1973), modificada para el perro (MORENO, 1986).

De los diversos sistemas utilizados para detectar la actividad de la ATPasa miosínica en las fibras del M. semitendinoso del perro (músculo patrón en nuestra experiencia), resultan especialmente útiles y fiables para una buena diferenciación fibrilar, los métodos de preincubaciones alcalinas (pH 10.2 a 10.6) y ácidas (sistemas 0.1 M.). Esta metodología nos permite reconocer

en este músculo hasta cuatro tipos de fibras, que optamos por denominar como I, IIA, IIp y IIC, de acuerdo con los criterios establecidos por SNOW et al., (1982). Al modelo típico de tinción de las fibras tipo I (mATPasa alcalinolábil y ácido-estable) y de las escasas fibras IIC (mATPasa alcalino y ácido estable), se suman dos subtipos encuadrados dentro de las fibras tipo II. Uno de ellos se tiñe de forma más intensa tanto a preincubaciones alcalinas como ácidas (0.1M). Su comportamiento mATPásico es inverso al que manifiestan las fibras IIA de otros mamíferos (gato, rata). Sin embargo, estudios realizados indican, que estas fibras, cuando se las enfrenta a sueros antimiosina IIA, reaccionan de forma intensa, por lo que se las denomina IIA (SNOW et al., 1982). El otro, subtipo se muestra menos alcalino estable y más ácido-lábil, siendo catalogado como fibra IIp (fibras tipo II propias del perro; SNOW et al., 1982). Sin embargo, cuando aplicamos la técnica de DUBOWITZ/BROOKE modificada, el comportamiento tintorial que se obtiene en las fibras IIA y IIp no difiere del que se consigue en las fibras IIA y IIB de otros mamíferos: hombre (BROOKE/KAISER, 1970), rata (BROOKE et al., 1971, MARTINEZ GALISTEO, 1989), caballo (LOPEZ RIVERO, 1988), gato (SNOW et al., 1982). Esta puede ser la razón por la cual CASTLE/REYMAN (1984), MORENO (1986), GIL (1986) Y DIZ (1987) indican en distintos músculos del perro la presencia de fibras IIB. Con preincubación ácida en buffer 0.2M, los resultados no son constantes, obteniéndose a veces unos matices tintoriales similares a los de la técnica anterior aunque con un peor grado de definición. No obstante, en la mayoría de ocasiones las

fibras IIA se manifestaron de forma más intensa que las IIp, pero en otras, la distinción entre ambos tipos fibrilares no fue posible. Estos resultados un tanto dispares, ya fueron advertidos por SNOW et al., (1982), quienes señalan que esta molaridad resulta crítica, por lo que dicha técnica no es recomendable para la especie por nosotros analizada. El método modificado de KABUCHI/SRETER (1980) para la detección de la Ca-Mg-ATPasa nos permite en una sola sección, y sin necesidad de preincubación, identificar en el M. semitendinoso las fibras I, IIA y IIp. Sin embargo, la diferenciación obtenida no es tan clara como la mostrada por las fibras I, IIA y IIB de otros mamíferos (gato, rata), por lo que debe ser empleada junto con otras técnicas.

Las técnicas NADH-TR y M-GPDH, aportan interesantes datos sobre el metabolismo predominante en la fibra muscular. En el M. semitendinoso del perro, por lo general, las fibras muestran un alto (fibras I, IIA y IIC) o moderado (fibras IIp) potencial oxidativo. La capacidad glicolítica es, sin embargo, baja en las tipo I y alta en las restantes. Estos resultados coinciden con lo referido en trabajos previos (MAXWELL et al., 1977; MASCARELLO/VEGGETTI, 1979; ARMSTRONG et al., 1982; SNOW et al., 1982; McCONATHY et al., 1983; GIL, 1986), donde se pone de manifiesto el elevado potencial oxidativo de las fibras musculares en esta especie, lo que se traduce en una mayor resistencia a la fatiga. Recordemos, que desde el punto de vista de la locomoción, el perro se corresponde con un "corredor de largas distancias por excelencia" (SNOW et al., 1982), debido a lo cual, sus



músculos disponen de un mayor contingente de este tipo de fibras. El no haberse evidenciado fibras glicolíticas no oxidativas (clásicas fibras IIB) refuerza la clasificación propuesta por SNOW et al., y por nosotros mismos. Por lo que respecta al músculo flexor carporradial, y basándonos en la diferenciación obtenida en el M. semitendinoso, resaltemos que no hemos constatado la presencia de fibras IIP. Sin embargo, desde el punto de vista metabólico, nos ha sido posible discernir tres tipos de fibras, aunque ninguno de ellos presentó potencial oxidativo negativo. En este sentido, AQUIN/BANCHERO (1981) y McCONATHY et al., (1983), basándose en la clasificación de PETER et al., (1972), catalogan a las fibras de este músculo como SO (de contracción lenta, oxidativas), FOG (de contracción rápida, oxidativas/glicolíticas), y FG (de contracción rápida, glicolíticas), si bien reconocen que estas últimas siempre tuvieron capacidad oxidativa. Se pone de manifiesto, por tanto, que no todos los músculos del perro presentan los mismos tipos de fibras, y que a la hora de su catalogación, el músculo analizado debe ser tenido en cuenta como un factor determinante (ARMSTRONG et al., 1982; RODRIGUEZ BARBUÑO et al., 1983; ARMSTRONG/PHELPS, 1984; DIZ, 1987).

## V.2.- DE LA DISTRIBUCION FIBRILAR EN EL M. FLEXOR CARPORRADIAL (ANIMALES ADULTOS).

El músculo flexor carporradial del perro representa un claro exponente de compartimentalización, al presentar en su sección transversal dos zonas

separadas por una banda de tejido conectivo y con una distribución fibrilar característica. Las hemos denominado cabezas "radial" y "cubital", de acuerdo con lo referido por McCONATHY et al., (1983). La cabeza radial, presenta un predominio claro de las fibras tipo I, siendo los porcentajes máximos a partir de la tercera sección (zona ecuatorial del vientre muscular). La técnicas histoquímicas proporcionan información acerca de las funciones que realizan los músculos (BOTTERMAN et al., 1978), y la actividad de la enzima mATPasa se ha correlacionado con la velocidad de acortamiento muscular (BARANY, 1967). Teniendo en cuenta que las fibras de baja actividad (mATPasa alcalino-lábil) integran unidades motoras de contracción lenta, resistentes a la fatiga (BURKE, 1973, 1981), se puede deducir, que la cabeza radial de este músculo en el perro participa activamente durante el aplomo del miembro torácico, mientras que la cabeza cubital, integrada de forma mayoritaria por fibras IIA (de contracción rápida), llevaría a cabo la función propia del músculo (flexión del carpo) durante la protracción. Un comportamiento similar ha sido descrito en el músculo bíceps braquial del caballo por HERMANSON/HURLEY (1990). El estudio porcentual y morfométrico que hemos llevado a cabo, aún dentro de sus limitaciones, indica que las variaciones dentro de un mismo músculo son importantes. Destacar en este sentido, el incremento de fibras tipo I en la cabeza radial a medida que nos alejamos del origen y la mayor concentración de estas fibras en las zonas centrales de la cabeza cubital, hecho advertido por GONYEA/ERICSON (1977) en el flexor carporradial del gato y por otros

investigadores en distintos músculos y especies (LEXELL et al., 1983; RODRIGUEZ BARBUDO et al., 1983; SCHWARTZ-GIBLIN et al., 1983; McINTOSH et al., 1985). Esto guarda relación con el uso selectivo de diferentes porciones del músculo ante distintos requerimientos funcionales (GUMN, 1978; ARMSTRONG et al., 1982). Resaltar también la presencia de un fascículo integrado por fibras tipo I en las inmediaciones de un huso neuromuscular en la cabeza cubital (sección tercera). Mayor presencia de husos neuromusculares con músculos o regiones ricas en fibras oxidativas (tipo I) ha sido demostrada en distintos mamíferos (MAIER et al., 1976; GONYEA/ERICSON, 1977). En relación a esto último, BOTTERMAN et al., (1978) han sugerido que dicha asociación tiene lugar en músculos cuyas contracciones intervienen en el ajuste postural. La presencia en la cabeza radial (secciones 1 a 3) de una zona mixta, integrada por fibras I y II, y la mayor presencia de fibras tipo I en el centro de la cabeza cubital, nos hace suponer que ambas cabezas intervienen en el aplomo y protracción del miembro torácico, aunque con las preferencias funcionales ya señaladas. Todas estas circunstancias, junto con el cambio de situación que experimenta la cabeza radial desde el origen a la inserción, deben ser consideradas si se elige este músculo para el estudio de procesos que impliquen cambios del porcentaje fibrilar (programas de entrenamiento, miopatías experimentales, etc...). El no tenerlas en cuenta puede dar lugar a errores de interpretación, como el de ARMSTROG et al., (1982), quienes en un estudio sobre la distribución fibrilar de los músculos del perro indican, que el flexor carporradial se compone de un 51%

de fibras tipo I. Los resultados morfométricos confirman que en la cabeza radial, las fibras tipo I superan en tamaño a todas las restantes, incluidas las de la cabeza cubital. Las fibras IIA de la cabeza radial son también de mayor diámetro que sus homónimas de la cabeza cubital, hecho también advertido por otros investigadores en músculos con claro predominio de este tipo de fibras (Mm. aplomadores), como el compartimento oxidativo del flexor carporradial del gato (GONYEA, 1979) ó la porción roja del gastronemio de la rata (ARMSTRONG/PHELPE, 1984; MORALES LOPEZ, 1989). La explicación parece radicar en el mayor grado de hipertrofia que soportan estas fibras (GONYEA/ERICSON, 1976), al quedar sometidas a contracciones lentas y prolongadas, como las que implica el aplomo del miembro torácico. La cabeza cubital se ajusta, en cambio, a un modelo más convencional, tanto en lo referente a distribución como a morfometría fibrilar (NEWSHOLME et al., 1988).

### V.3.- DEL COMPORTAMIENTO DE LAS FIBRAS DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL.

Las técnicas de mATPasa que hemos aplicado durante el desarrollo postnatal (método SNOW et al., preincubaciones alcalinas, y DUBOWITZ/BROOKE, preincubaciones ácidas) indican, que al nacimiento, ninguno de los tipos de fibras presentes en el músculo del perro reúne las características de las detectadas en el animal adulto. Sin embargo, dependiendo de la respuesta de la mATPasa ante el medio de preincubación, es posible reconocer dos tipos, diferenciables también

por sus rasgos morfológicos y morfométricos (BRAUND/LINCOLN, 1981; MORENO, 1986; GIL, 1986; GIL et al., 1987). De esta forma, las preincubaciones alcalinas nos permiten evidenciar fibras con moderada o baja actividad mATPasa (fibras Ib), que situadas normalmente en el centro de los fascículos, quedan rodeadas por las restantes, de alta actividad (fibras indiferenciadas). Las preincubaciones ácidas a pH 4.6 revelan que ambos tipos son de alta actividad, siendo inferior a pH 4.3 en las fibras Ib. Las características histoquímicas de estas últimas se ajustan a lo señalado por MORENO Y GIL (1986) en los Mm. tibial craneal y flexor digital lateral de perros neonatos, y similares a las fibras tipo I "de gran tamaño" observadas por BRAUND/LINCOLN (1981) en varios músculos de esta especie. Sus características morfológicas se corresponden con las descritas por WOHLFART (1937) en fetos y neonatos humanos (fibras b) y su presencia ha sido demostrada no sólo en el perro y hombre (PENICHEL, 1966; DUBOWITZ, 1965, 1968; FARRAS-BARGETON et al., 1977; SCHLOON/SCHLOTTMAN, 1979), sino también en otras especies, como el cerdo (DAVIES, 1972; HANZLIKOVA, 1980) y conejo (LOBLEY et al., 1977). La resistencia a pH 4.3 será alcanzada por estas fibras hacia la tercera semana de vida, tanto en el músculo semitendinoso (patrón) como en ambas cabezas del flexor carporradial, pasando entonces a ser consideradas desde el punto de vista de su mATPasa, como fibras tipo I adultas (MORENO Y GIL, 1986). Respecto a sus porcentajes, en el M. semitendinoso y cabeza cubital del M. flexor carporradial, las fibras Ib no superan el 3%, circunstancia también observada en los Mm. tibial craneal

y vasto lateral del perro (BRAUND/LINCOLN, 1981; GIL, 1986) y en distintos músculos de otras especies (NYSTRON, 1968; DAVIES, 1972; LOBLEY et al., 1977; HANSLIKOVA, 1980). Dichos porcentajes se mantienen constantes mientras son diferenciables de las restantes fibras (40 días). En la cabeza radial, en cambio, las fibras Ib representan un 6% del total. Valores muy próximos a estos (5%) obtienen BRAUND/LINCOLN (1981) en el tríceps braquial y GIL (1986) en el flexor digital lateral.

Las fibras indiferenciadas detectadas al nacimiento muestran actividad mATPasa alcalino y ácido estable. Numerosos autores optan por denominar a estas fibras como IIC (BROOKE et al., 1971; CURLESS/NELSON, 1976; BRAUND/LINCOLN, 1981; HUDSON et al., 1982; CARDINET et al., 1982, 1983) ó IIC' (MORENO, GIL, 1986). Pensamos que estas denominaciones no son del todo correctas, ya que las fibras IIC del adulto se caracterizan por tener miosina adulta de tipo lento y rápido (BILLETER et al., 1980), lo que se traduce en una peculiar tinción ante las técnicas mATPasa, diferente a la mostrada por las fibras indiferenciadas en nuestro trabajo. Según los estudios realizados por WHALEN et al., (1981), es más probable que a estas edades (neonatos) la miosina sea de tipo embrionario o neonatal, caracterizada histoquímicamente por la fuerte reacción que muestra su mATPasa ante preincubaciones alcalinas y ácidas.

Las fibras indiferenciadas pierden su condición cuando la miosina neonatal va siendo sustituida gradualmente por miosina adulta lenta o rápida (DHOOOT,

1986). La coexistencia de más de un tipo de miosina durante el desarrollo da lugar a los distintos matices tintoriales detectados con las técnicas de MATPasa. De esta forma, a partir de la primera (cabeza radial) o segunda semana (semitendinoso y cabeza cubital), observamos ya distintas tonalidades tintoriales en estas fibras al analizar su comportamiento MATPásico. A cada una de ellas las fuimos denominando con distintas letras: X (X1, X2, X3), Y, Z, nomenclatura que basamos en criterios objetivos de intensidad tintorial (MATPasa), y que facilita la comprensión de nuestros resultados. Se trata, en definitiva, de fibras de transición (CARDINET et al., 1983), que de forma gradual y progresiva irán adquiriendo la miosina característica de las fibras del músculo adulto. El modelo de desarrollo que hemos observado en el del M. semitendinoso (músculo patrón en nuestra experiencia) es el siguiente:

Desarrollo	Adulto
Fibras Ib.....	Fibras I
Fibras Z.....	Fibras I
Fibras y.....	Fibras IIC (I?)
Fibras X1.....	Fibras IIA
Fibras X2.....	Fibras Iip
Fibras X3.....	Fibras IIC (IIA?)

Este modelo es el apreciado también en el M. flexor carporradial, aunque con algunas diferencias en lo referente a tiempos de aparición y maduración fibrilar, así como en el comportamiento de las fibras X2. De esta forma, las fibras Y (posibles precursoras de las tipo I adultas, junto a las Z y Ib), hacen su aparición en ambas cabezas una semana antes que en el M. semitendinoso, es

decir, a partir de los 8 días. Incluso en la cabeza radial, a esta edad, ya están presentes también las fibras Z, cuyas características ATPásicas coinciden con las de las tipo I del músculo adulto. Recordemos que esta cabeza quedará integrada casi de forma exclusiva por fibras de este tipo. Destaquemos también en este músculo, que las fibras X2, a la vez que pierden su resistencia al pH 4.3, lo hacen a pH 4.6 (fibras X1 o IIA). Quiere esto decir, que en ambas cabezas, las fibras X2 no se transformarán en IIP, como sucede en el M. semitendinoso. Este dato corrobora el no haberlas diferenciado en el M. flexor carporradial del adulto. Las fibras X1, desde que aparecen (25-30 días), presentan ya las características de las IIA del adulto, siempre desde el punto de vista de su actividad mATPásica. Esta aparición, un tanto brusca, ha sido referida a estas edades por GIL (1986) y bastante antes (primera o segunda semana) en los Mm. tibial craneal (BRAUND/LINCOLN, 1981) y pectíneo (CARDINET et al., 1983), respectivamente.

En lo referente a las fibras Y, aún presentes en los animales de 65 días, decir que sus características histoquímicas coinciden con la de las fibras IC que han sido descritas por STARON/PETTE (1986) en el músculo soleo de conejos adultos, con las IIC' definidas en el hombre por JANSSON et al., (1978), y con las IB reseñadas por CARDINET et al., (1983), en el M. pectíneo del perro. Según estos autores, pueden tratarse de fibras IIC con características histoquímicas (mATPasa) muy próximas a las tipo I, por lo que con toda probabilidad terminarán



convertidas en fibras de este tipo, hecho que nosotros apoyamos.

Las fibras X3, que no se transforman en ninguno de los tipos descritos en el desarrollo, integrarán el grupo de las IIC del adulto, y ante una necesidad funcional podrán transformarse en fibras IIA, según lo señalado por JANSSON et al., 1978.

Nuestros resultados coinciden con los de BRAUND/LINCOLN (1981), CARDINET et al., (1983), y GIL (1986), ya que hacia los 60 días la mayor parte de las fibras encontradas al nacimiento alcanzan las características de las del adulto.

Los resultados morfométricos indican que las fibras musculares del perro experimentan un crecimiento progresivo conforme se incrementa la edad del animal (AQUIN/BANCHERO, 1981). Destacar el hecho del mayor diámetro que presentan las presuntas fibras tipo I (Ib + Y + Z) respecto a las restantes (fibras X). Estos tamaños se verán invertidos en el M. semitendinoso y cabeza cubital del flexor carporradial, a partir de los 30 días aproximadamente, momento en que aparecen las fibras X1 (futuras IIA). En la cabeza radial, en cambio, y como sucede en el adulto, las fibras tipo I siempre superarán en tamaño a las tipo II.

Por último, hacer unos breves comentarios sobre el empleo de técnicas metabólicas (NADH-TR y M-GPDM) a estas edades. Durante el primer mes de vida, no permiten

diferenciar los tipos detectados con las técnicas de MATPasa, por lo que no son aconsejables en esta especie (BRAUND/LINCOLN, 1981, GIL, 1986). El perfil metabólico de las fibras se va configurando a lo largo del desarrollo, y quedará definido una vez que la fibra posea la miosina adulta correspondiente.

**RESUMEN**

## VI.- RESUMEN.

Mediante diferentes técnicas histoquímicas, se analizan los tipos de fibras de la musculatura esquelética (Mm. semitendinoso y flexor carporradial) de perros adultos y cachorros (0-65 días). Tomando el músculo semitendinoso como patrón, se establecen los criterios para la correcta identificación de las distintas fibras. En base a la actividad mATPasa se reconocen 4 tipos diferentes, que denominamos: I, IIA, IIp y IIC. Con idéntica metodología y criterios de interpretación, se procede al estudio del M. flexor carporradial. Secciones transversales completas de este músculo obtenidas en criostato a  $-20^{\circ}\text{C}$ , fueron analizadas desde el punto de vista histoquímico, procediéndose al estudio de los tipos de fibras y distribución de las mismas. Los resultados obtenidos indican que el M. flexor carporradial presenta dos cabezas, radial y cubital, cuya funcionalidad puede ser diferente. La cabeza radial se integra, casi de forma exclusiva, por fibras tipo I; mientras que la cubital, muestra una distribución en mosaico con presencia de fibras I, IIA y IIC. Las fibras

Iip no fueron identificadas en ninguna de las dos cabezas. Los resultados parecen sugerir que el M. flexor carporradial del perro no sólo participa en la protracción del miembro torácico (flexión del carpo), sino que desarrolla un importante papel en el aplomo del mismo. Los estudios llevados a cabo durante el periodo postnatal (0-65 días), confirman la aparición gradual y progresiva de las fibras identificadas en animales adultos, aunque en distintos periodos de tiempo según el musculo y/o cabezas. Las técnicas de MATPasa permiten formular una nomenclatura específica para las fibras durante el desarrollo, que puede ser tomada como referencia para futuros estudios en estos periodos.

### SUMMARY

By means of different histochemical techniques, fibre types of skeletal muscle (Mm. semitendinosus and flexor carpi radialis) in adults and young dogs (10-65 days) were analysed. Histochemical criteria to the right identification of the different fibres were established by using the semitendinosus muscle as control. According to their m-ATPase activity, we observed four different fibre types designated as I, IIA, IIp, and IIC. To study the flexor carpi radialis muscle the same techniques and histochemical criteria were followed too. Cryostat whole cross serial sections were histochemically analysed, and the fibre types as well as their distribution studied.

The results showed that flexor carpi radialis muscle has two heads, radial and cubital, probably with different functionality. Radial head was almost exclusively constituted by type I fibres; on the other hand, cubital head exhibited mosaic pattern distribution, containing I, IIA and IIC fibres. None of the heads showed IIp fibre types. These findings suggest that flexor carpi radialis muscle in dog not only participates in the protraction of the forelimb (flexes carpal joint) but also takes an important part in its own aplomb. This study which was carried out throughout postnatal period (10-65 days) confirmed that occurrence of the different fibre types is gradual and progressive in time depending on muscle and/or head portion. m-ATPase techniques allow us the formulation of a specific nomenclature for the fibres during their development thus, it is recommended for further studies of muscle development.

## **CONCLUSIONES**

## VII.- CONCLUSIONES.

1º.- Para una correcta identificación de los tipos de fibras que integran el músculo esquelético del perro, proponemos la combinación de la técnica mATPasa (Método SNOW et al., 1982) a preincubaciones alcalinas (pH 10'2-10'6) y acidas (Sistemas "A-M" y "B-M"), con la técnica mATPasa a pH 4'6,4'55,4'3 (Método DUBOWITZ/BROOKE 1973; modificado).

2º.- Con las referidas técnicas, se evidencian cuatro tipos de fibras en el M. semitendinoso, que en base a su actividad mATPasa denominamos: I, IIA, IIP y IIC. En el M. flexor carporradial, en cambio, no se detectan las fibras IIP, lo que refuerza la hipótesis de que no todos los músculos tienen idéntica composición fibrilar.

3º.- El perfil metabólico de los tipos de fibras debe ser establecido mediante la aplicación conjunta de las técnicas NADH-TR y M-GPDH. El potencial oxidativo de las fibras del M. semitendinoso es moderado/alto, al



igual que su capacidad glicolítica, exceptuando las fibras I. En el M. flexor carporradial, sin embargo, las fibras IIA muestran una gran variabilidad de matices tintoriales con las referidas técnicas, desde muy intensos a moderados.

4'.- Las fibras I, IIA y IIC del M. flexor carporradial tienen una distribución muy variable, que depende del nivel de sección y de la zona muscular considerada. Se constituyen en él dos compartimentos ó cabezas, denominadas: radial y cubital, cuya topografía se va modificando a lo largo del vientre muscular.

5'.- La cabeza radial queda integrada casi exclusivamente por fibras tipo I, aunque presenta una zona próxima a la cabeza cubital con fibras tipo II, que denominamos "zona mixta". Esta zona no se advierte una vez que se rebasa el plano ecuatorial. La cabeza cubital, por el contrario, ofrece una distribución más homogénea, con un predominio de las fibras IIA en su zona periférica.

6'.- Desde un punto de vista funcional, y en base a la distribución fibrilar, el M. flexor carporradial del perro no sólo participa en la protracción del miembro torácico (flexión del carpo), sino también en el aplomo del mismo. Esta última función debe ser desarrollada por la cabeza radial (compartimento lento, fatigorresistente).

7).- Ninguno de los tipos de fibras detectados al nacimiento, Ib e indiferenciadas, presentan las características observadas en el adulto. Durante el desarrollo, las técnicas de MATPasa aplicadas, permiten el reconocimiento de diferentes subtipos fibrilares, que pueden ser denominados como fibras "Y, Z, X1, X2 y X3", de acuerdo con la intensidad tintorial que manifiestan. A partir de ellas, se conformarán los tipos presentes en el músculo adulto.

8).- Las fibras tipo I son las primeras en diferenciarse (20-25 días), seguidas de las IIA (30 días) y IIp (60 días). Este último tipo fibrilar no lo hemos observado en el M. flexor carporradial en estos periodos, lo que corrobora su ausencia en el adulto.

VIII.- BIBLIOGRAFIA.

- ABERLE, E.D., M.D. JUDGE, W.W. KIRHAM, E.H. PAGE and B.H. CRAWFORD, 1976: Fiber types and size in equine skeletal muscle. Am. J. Vet. Res., 37, 145-148.
- AHERNE, W.A., D.R. AYYAR, P.A. CLARKE and J.N. WALTON, 1971: Muscle fibre size in normal infants, children and adolescent. J. Neurol. Sci., 14, 171.
- AHERNE, W.A. and M.S. DUNNILL, 1982: "Morphometry". Edward Arnold, London.
- AL-AMOOD, W.S. and R. ROPE, 1972: A comparison of the structural features of muscle fibers from a fast and slow twitch muscle of the pelvic limb of the cat. J. Anat., 113, 49-60.
- ALLAM ALI, M., 1979: Myotube formation in skeletal muscle regeneration. J. Anat., 128, 553-562.
- ALLBROOK, D.B., 1962: An electron microscopic study of regenerating skeletal muscle. J. Anat., 96, 137-152.
- ALLBROOK, D.B., W. de C. BAKER and W.H. KIRKALDY-WILLIS, 1966: Muscle regeneration in experimental animals and in man. J. Bone T. Surg., 48, 153-169.
- ALLBROOK, D.B., M.F. HAN and A.E. HELLMUTH, 1971: Population of muscle satellite cells in relation to age and mitotic activity. J. Pathol., 3, 233-243.

VIII.- BIBLIOGRAFIA.

- ABERLE, E.D., M.D. JUDGE, W.W. KIRHAM, E.H. PAGE and B.H. CRAWFORD, 1976: Fiber types and size in equine skeletal muscle. Am. J. Vet. Res., 37, 145-148.
- AHERNE, W.A., D.R. AYYAR, P.A. CLARKE and J.N. WALTON, 1971: Muscle fibre size in normal infants, children and adolescent. J. Neurol. Sci., 14, 171.
- AHERNE, W.A. and M.S. DUNNILL, 1982: "Morphometry". Edward Arnold, London.
- AL-AMOOD, W.S. and R. ROPE, 1972: A comparison of the structural features of muscle fibers from a fast and slow twitch muscle of the pelvic limb of the cat. J. Anat., 113, 49-60.
- ALLAM ALI, M., 1979: Myotube formation in skeletal muscle regeneration. J. Anat., 128, 553-562.
- ALLBROOK, D.B., 1962: An electron microscopic study of regenerating skeletal muscle. J. Anat., 96, 137-152.
- ALLBROOK, D.B., W. de C. BAKER and W.H. KIRKALDY-WILLIS, 1966: Muscle regeneration in experimental animals and in man. J. Bone T. Surg., 48, 153-169.
- ALLBROOK, D.B., M.F. HAN and A.E. HELLMUTH, 1971: Population of muscle satellite cells in relation to age and mitotic activity. J. Pathol., 3, 233-243.

- ALNAQEEB, M.A., G. GOLDSPIK, 1986: Changes in fibre type, number and diameter in developing and ageing skeletal muscle. J. Anat., 153, 31-45.
- ANDERSEN, P. and J. HENRIKSSON, 1977: Training induced changes in the skeletal subgroups of human type II skeletal muscle fibers. Acta Physiol. Scand., 99: 123-125.
- AQUIN, L. and N. BANCHERO, 1981: The cytoarchitecture and capillary supply in the skeletal muscle of growing dogs. J. Anat., 132, 341-356.
- ARIANO, M.A., R.B. ARMSTRONG and V.R. EDGERTON, 1973: Hindlimb muscle fiber population of five mammals. J. Histochem. Cytochem., 21, 51-55.
- ARMSTRONG, R.B., 1980: "Properties distributions of the fiber types in the locomotory muscles of mammals". In: Comparative Physiology. Cambridge Univ. Press., Cambridge.
- ARMSTRONG, R.B., C.W. SAUBERT, H.J. SEEHERMAN and C.R. TAYLOR, 1982: Distribution of fiber types in locomotory muscles of dogs. Am. J. Anat., 163, 87-98.
- ARMSTRONG, R.B., and R.O. PHELPS, 1984. Muscle fiber type composition on the rat hindlimb. J. Anat., 171, 259-272.
- ASHMORE, C.R. and L. DOERR, 1971: Comparative aspects of muscle fiber types in different species. Exp. Neurol., 31, 408-418.

- ASHMORE, C.R., G. TOMPKINS and L. DOERR, 1972: Postnatal development of muscle fiber types in domestic animals. J. Anim. Sci., 34, 37-41.
- ASKANAS, V. and W.K. ENGEL, 1975: Distinct subtypes of type I fibers of human skeletal muscle. Neurology, 25, 58-67.
- BARANY, M., 1967: ATPase activity of miosin correlated with speed of muscle shortening. J. Gen. Physiol., 50, 197-216.
- BARNARD, R.J., V.R. EDGERTON and J.B. PETER, 1970: Effect of exercise on skeletal muscle. I. Biochemical and histochemical properties. J. Appl. Physiol., 28, 762-766.
- BARNARD, R.J., V.R. EDGERTON and J.B. PETER, 1970: Effect of exercise on skeletal muscle. II. Contractile properties. J. Appl. Physiol., 28, 767-770.
- BARNARD, R.J., V.R. EDGERTON, T. FURUKAWA and J.B. PETER, 1971: Histochemical, biochemical and contractile properties of red, white and intermediate fibers. Am. J. Physiol., 220, 410-414.
- BASS, A., D. BRDICZKA, P. EYER, S. HOFER and D. PETTE, 1969: Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organisation. Enr. J. Biochem., 10, 198-206.
- BEATTY, C.H., G.M. BASINGER and R.M. BOCEK, 1967: Differentiation of red and white fibers in muscle from fetal, neonatal and infant rhesus monkey. J. Histochem. Cytochem., 15, 93-103.

- BENDALL, J.R. and C.A. VOYLE, 1967: A study of the histological changes in the growing muscles of beef animals. J. Food. Sci. Technol., 2, 259-283.
- BENTITEZ-BIBRIESCA, L., C.H. HORWITZ and D.H. FAHIMI, 1966: Histochemical localization of lactate dehydrogenase isoenzymes. J. Histochem. Cytochem., 14, 763-764.
- BILLETTER, R., H. WEBER, H. LUTZ and HOWALDA, 1980: Myosin types in human skeletal muscle fibers. Histochemistry, 65, 249-259.
- BILLETTER, R., H. C.W. HEIZMANN, H. HOWALD and E. JENNY, 1981. Analysis of myosin light and heavy chain types in single human skeletal muscle fibres. Eur. J. Biochem., 116, 389-395.
- BIRGITTA, F.A. and J. THORNTON, 1980: Histochemical properties of muscle fibre types and enzyme activities in skeletal muscles of Standardbred trotters of different ages. Equine Vet. J., 12, 175-180.
- BISCHOFF, B., 1974: Enzymatic liberation of myogenic cells from adult rat muscle. Anat. Rec., 180, 645-662.
- BLANCHAER, M. and V. WIJHE, 1962: Distribution of lactic dehydrogenase in skeletal muscle. Nature, 193, 877-893.
- BLOMSTRAND, E. and B. EKBLÖM, 1982: The needle biopsy techniques for fibre type determination in human skeletal muscle. A methodological study. Acta Physiol. Scand., 116, 437-442.

- BODINE S. C., R.R. ROY, D.A. MEADOWS, R.F. ZERNICKE, R.D. SACKS, M. FOURNIER and V.R. EDGERTON, 1982: Architectural, histochemical, and contractile characteristics of a unique biarticular muscle: The cat semitendinosus. Am. Physiol., **48**, 192-201.
- BOTTERMAN, B.R., M.D. BINDER and D.G. STUART. 1978. Functional anatomy of the association between motor units and muscle receptors. Am. Zool., **18**, 135-152.
- BOTTERMAN, B.R., G.A. IWAMOTO and W.J. GONYEA, 1983: Anatomy of motor units in the flexor carpi radialis muscle. Soc. Neurosci. Abstr., **9**, 1226
- BOTTERMAN, B.R., G.A. IWAMOTO and W.J. GONYEA, 1985: Classification of motor units in flexor carpi radialis muscle of the cat. J. Neurophysiol., **54**, 676-689.
- BRAUND, K.G., 1989: Skeletal muscle biopsy. Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small animal), **4**: 108-115.
- BRAUND, K.G., E.J. HOFF and K.E. RICHARDSON, 1978: Histochemical identification of fiber types in canine skeletal muscle. Am. J. Vet. Res., **39**, 561-565.
- BRAUND, K.G., P.K. SHIRES and R.L. MIKEAL, 1980: Types I fiber atrophy in the vastus lateralis muscle in dogs with femoral fractures treated by hyperextension. Vet. Pathol., **17**, 164-176.



- BRAUND, K.G. and C.E. LINCOLN, 1981: Histochemical differentiation of fiber types in neonatal canine skeletal muscle. Am J. Vet. Res., 42, 407-415.
- BRAUND, K.G., J.A. MCGUIRE and C.E. LINCOLN, 1982: Observations on normal skeletal muscle of mature dogs: A cytochemical, histochemical, and morphometric study. Vet. Pathol., 19, 577-595.
- BRENDA, R.E. and A.M. KUDA, 1975: Stereological analysis of mammalian skeletal muscle. II. White vastus muscle of the adult guinea pig. J. Ultrastruct. Res., 51, 176-187.
- BRODY, I.A. and W.K. ENGEL, 1964: Isozyme histochemistry: The display of selective lactate dehydrogenase isozymes in sections of skeletal muscle. J. Histochem. Cytochem., 12, 687-695.
- BROOKE, M.H. and K.K. KAISER, 1969: Some comments on the histochemical characterisation of muscle adenosine triphosphatase. J. Histochem. Cytochem., 17, 431-432.
- BROOKE, M.H. and W.K. ENGEL, 1969: The histographic analysis of human muscle biopsies with regard to fiber types. 1. Adult male and female. Neurology, 19, 221-233.
- BROOKE, M.H. and W.K. ENGEL, 1969: The histographic analysis of human muscle biopsies with regard to fiber types. 2. Diseases of the upper and lower motor neuron. Neurology, 19, 378-393.

- BROOKE, M.H. and W.K. ENGEL, 1969: The histographic analysis of human muscle biopsies with regard to fiber types. 3. Myotonias, myasthenia gravis, and Hypokalemic periodic paralysis. Neurology, 19, 469-477.
- BROOKE, M.H. and W.K. ENGEL, 1969: The histographic analysis of human muscle biopsies with regard to fiber types. 4. Children's biopsies. Neurology, 19, 591-605.
- BROOKE, M.H. and K.K. KAISER, 1970: Muscle fibre types: How many and what kind?. Arch. Neurol., 23, 369-379.
- BROOKE, M.H., E. WILLIAMSON and K.K. KAISER, 1971: The behavior of four fiber types in developing and reinnervated muscle. Arch. Neurol., 25, 360-366.
- BROOKE, M.H. and K.K. KAISER, 1974: The use and abuse of muscle histochemistry. Ann. New Y. Acad. Sci., 228, 121-144.
- BRUMBACK, R.A. and R.W. LEECH, 1984: "Color Atlas of Muscle Histochemistry". PSG, Massachusetts.
- BUCHTHAL, I. and H. SCHMALBURCH, 1980: Motor units of mammalian muscle. Physiol. Rev., 60, 90-142.
- BULLER, A.J., J.C. ECCLES and R.M. ECCLES, 1960: Differentiation of fast and slow muscles in the cat hind limb. J. Physiol., 150, 399-416.
- BULLER, A.J., W.F.H. MOMMAERTS and K. SERAYDARIAN, 1971: Neural control of miofibrillar ATPase activity in rat skeletal muscle. Nat. New. Biol., 233, 31-32.

- BUÑO, W. and N.T. GERMINO, 1958. Distribution of succinic dehydrogenase in the organs of the adult albino rats. Acta anat., (Basel), 33, 161.
- BURKE, R.E., 1978: Motor units: Physiological, histochemical, profiles neural connectivity and functional specialization. Am. Zool., 18, 127-134.
- BURKE, R.E., 1981 Motor units: Anatomy, physiology and functional organization. In: Handbook of Physiology. The Nervous System. V.R. Loomis (ed). Am. Physiol. Soc., Bethesda, V D. pp: 345-422.
- BURKE, R.E. and P. TSAIRIS, 1973: Anatomy and innervation ratios in motor units of cat gastrocnemius. J. Physiol., 234, 749-765.
- BURKE, R.E., D.N. LEVINE, F.E. ZAJAC, P. TSAIRIS and W.K. ENGEL, 1971: Mammalian motor units: Physiological-histochemical correlation in three types in cat. Science, 174, 709-712.
- BURKE, R.E., D.N. LEVINE, P. TSAIRIS and F.E. ZAJAC, 1973: Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. J. Physiol., 234, 723-748.
- BURKE, R.E., D.N. LEVINE, M. SALOMAN and P. TSAIRIS, 1974: Motor units in cat soleus muscle: Physiological, histochemical and morphological characteristics. J. Physiol., 238, 506-514.

- CABRIC, M. and N.T. JAMES, 1981: Quantitative studies on the muscles of exercise trained dogs. J. Anat., 133, 696.
- CAMPBELL, A.M., G. ONAN, D. THOMAS, W. WEIRICH, J.A. WILL, R.G. CASSENS and E.J. BRISKEY, 1971: The effect of exercise on muscle ATPase. Histochemistry, 25, 372-375.
- CAMPION, D.R., S.P. FOWLER, G.J. HAUSMAN and J.O. REAGAN, 1981: Ultrastructural analysis of skeletal muscle development in the fetal pig. Acta Anat., 116, 277-284.
- CARDASIS, C. and G. COOPER, 1975: An analysis of nuclear numbers in individual muscle fibers during differentiation and growth: A satellite cell-muscle fiber growth unit. J. Exp. Zool., 191, 347-358.
- CARDINET, G.H., 1975: Myofiber type-grouping and type-predominance in canine pectineal muscles. Zbl Veterinarmed (Reihe C), Anat. Histol. Embryol., 4, 368-375.
- CARDINET, G.H., 1980: Neuromuscular disease: The diagnosis and classification of muscle disease in the dog. Proceedings of the 4th Kal Kan Symposium.
- CARDINET, G.H., L.J. WALLACE, M.R. FEDDE, M.M. GUFFY and J.W. BARDENS, 1969: Developmental myopathy in the canine with Type II muscle fiber hypotrophy. Arch. Neurol., 21, 620-630.
- CARDINET, G.H., G.L. TUNELL and M.R. FEDDE, 1971: A comparative study of contractile and histochemical properties in normal and hypotrophic muscle in the dog. Anat. Rec., 169, 288-289.

- CARDINET, G.H., M.R. FEDDE and B.S. TUNELL, 1972: Correlates of histochemical and physiologic properties in normal and hypotrophic pectineus muscles of the dog. Lab. Invest., 27, 32-38.
- CARDINET, G.H., C.L. LEONG and P.S. MEANS, 1982: Myofiber differentiation in normal and hypotrophied canine pectineal muscles. Muscle & Nerve, 5, 665-673.
- CARDINET, G.H., C.L. LEONG and P.S. MEANS, 1983: Differentiation of myofiber types in canine pectineal muscle. Reports of the W.A.V.A.
- CARDINET, G.H., M.M. GUFFY, L.J. WALLACE and R.C. LABEN, 1983: Canine hip dysplasia in german shepherd dog-greyhound crossbreeds. J. A. V. M. A., 182, 393-395.
- CARLSON, B.M., 1973: The regeneration of skeletal muscle: A review. Am. J. Anat., 137, 119-150.
- CARPENE, E., A. ROWLERSON, A. VEGGETTI and F. MASCARELLO, 1982: Preparation of type-specific antimyosin antibodies and determination of their specificity by biochemical and immunohistochemical methods. J. Biochem., 31, 329-341.
- CARRY, M.R., K. O'KEEFE and S.P. RINGEL, 1982: Histochemistry of mouse extraocular muscle. Anat. Embryol., 164, 403-412.
- CASTLE, M.E. and T.A. REYMAN, 1984: The effect of tenotomy and tendon transfer on muscle fiber types in the dog. Clin. Orthop., 186, 302-310.

- CHIAKULAS, J.J. and J.E. PAULY, 1965: A study of postnatal growth of skeletal muscle in the rat. Anat. Rec., 152, 55-62.
- CLOSE, R.I., 1972: Dynamic properties of mammalian skeletal muscles. Physiol Rev., 52, 129-197.
- CLOSE, R.I. and A.R. LUFF 1974: Dynamic properties of inferior rectus muscle of the rat. J. Physiol., 236, 259-270.
- COLLATOS, T.C., V.R. EDGERTON, J.L. SMITH and B.R. BOTTERMAN, 1977: Contractile properties and fiber type compositions of flexors and extensors of elbow joint in cat: Implication for motor control. J. Neurophysiol., 40, 1292-1300.
- COOPER, C.C., R.G. CASSENS, L.L. KASTENSCHMIDT and E.J. BRISKEY, 1970: Histochemical characterisation of muscle differentiation. Dev. Biol., 23, 169-184.
- COOPER, C.C., R.G. CASSENS, L.L. KASTENSCHMIDT and E.J. BRISKEY, 1971: Activity of some enzymes in developing muscle of the pig. Pediatr. Res., 5, 281-286.
- CORNELISSE, P.J., G.Th.A.M. BOTS, A.R. WINTZEN, J.S. PLOEM and K. VAN DEN BROEK, 1980: Real-time morphometric analysis of type I and type II fibers in cryostat of human muscle biopsies. Pathol. Res. Pract., 166, 218-221.
- CURLESS, R.G. and M. B. NELSON, 1976: Developmental patterns of rat muscle histochemistry. J. Embryol. Exp. Morphol., 36, 355-363.

- CURRY, C., 1976: Degenerative and regenerative changes within soleus muscle fibres of normal cats. J. Anat., 121, 424-429.
- DALLA LIBERA, L., S. SARTORE, S. PIEROBON-BORNIOLI and S. SCHIAFFINO, 1980: Fast-white and fast-red isomyosins in guinea pig muscles. Biochemical Biophys. Res Commun., 96, 1662-1670.
- DAVEY, D.F. and S.Y.P. WONG, 1980: Morphometric analysis of rat extensor digitorum longus and soleus muscles. Ajebak, 58, 213-230.
- DAVIES, A.S., 1972: Postnatal changes in the histochemical fibre types of porcine skeletal muscle. J. Anat., 113, 213-240.
- DAVIES, A.S. and H.M. GUNN, 1971: A comparative histochemical study of the mammalian diaphragm and semitendinosus. J. Anat., 110, 137-286.
- DAVIES, A.S. and H.M. GUNN, 1972: Histochemical fibre types in the mammalian diaphragm. J. Anat., 112, 41-60.
- DAWSON, D.M. and F.C.A. ROMANUL, 1964: Enzymes in muscle. II. Histochemical and quantitative studies. Arch. Neurol., 11, 369-378.
- DEKLEVA, A. and A. SIRKA, 1978: Histochemical type I fibres in the soleus of the rat. J. Anat., 127, 595-601.
- DHOOT, G.K., 1986: Selective synthesis and degradation of slow skeletal myosin heavy chains in developing muscle fibers. Muscle and Nerve, 9, 155-164.

- DHOOT, G.K. and S.V. PERRY, 1983: Effect of denervation at birth on the development of skeletal muscle cell types in the rat. Exp. Neurol., **82**, 131-142.
- DIZ, A, 1987: Diferenciación histoquímica y estudio morfométrico sobre algunos músculos de perros en razas de diferentes aptitudes dinámicas. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.
- DOW, J. and A. STRACHER, 1971: Changes in the properties of myosin associated with muscle development. Biochemistry, **10**, 1316-1321.
- DUBOWITZ, V., 1963: Enzymatic maturation of skeletal muscle. Nature, **197**, 1215-1222.
- DUBOWITZ, V., 1965: Enzyme histochemistry of skeletal muscle. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, **28**, 516-524.
- DUBOWITZ, V., 1967: Cross-innervated mammalian skeletal muscle: Histochemical, physiological and biochemical observations. J. Physiol., **193**, 481-496.
- DUBOWITZ, V., 1968: "Developing and Diseased Muscle. A Histochemical Study". Williams Heinerman, London.
- DUBOWITZ, V. and A.G. PEARSE, 1960a: A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle. Histochemie, **2**, 105-117.



- DUBOWITZ, V. and A.G. PEARSE, 1960b: Reciprocal relationship of phosphorylase and oxidative enzymes in skeletal muscle. Nature, 185, 701-702.
- DUBOWITZ, V. and M.H. BROOKE, 1973: "Muscle Biopsy: A Modern Approach". W.B. Saunders, London.
- DUBOWITZ, V., C.A. Sewry and R.B. Fitzsimons, 1985: "Muscle Biopsy: A Modern Approach". Baillière Tindall. W.B. Saunders, London.
- EDDINGER, T.J., R.L. MOSS and R.G. CASSENS, 1985: Myosin-ATPase fibre typing of chemically skinned muscle fibres. Histochem. J., 17, 1021-1026.
- EDDINGER, T.J., R.L. MOSS and R.G. CASSENS, 1985: Fiber number and type composition in extensor digitorum longus, soleus, and diaphragm muscles with aging in Fisher 344 rats. J. Histochem. Cytochem., 33, 1033-1041.
- EDGERTON, V.R., J.L. SMITH and D.R. SIMPSON, 1975: Muscle fibre type populations of human leg muscles. Histochem. J., 7, 259-266.
- EDJTEHADI, G.D., 1981: Histochemical properties of fast twitch muscle in the rat. Zbl. Veterinarmed (Reihe C), Anat. Histol. Embryol., 10, 118-124.
- EDJTEHADI, G.D. and D.M. LEWIS, 1979: Histochemical reactions of fibres in a fast twitch muscle of the cat. J. Physiol., 287, 439-453.

- EDSTROM, L. and E. Kugelberg, 1968: Histochemical composition, distribution of fibres and fatiguability of single motors units. Anterior tibial muscle of the rat. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 31, 424-433.
- EDSTROM, L. and K. TOLERGARD, 1969: Area estimation of transversally sectioned muscle fibres. Z. Wiss. Mikrosk. Mikrosk. Tech., 69, 166-178.
- EDSTROM, L. and B. NYSTROM, 1969: Histochemical types and sizes of fibres in normal human muscles. Acta Neurol. Scand., 45, 257-269.
- EISENBERG, B.R. and A.M. KUDA, 1976: Discrimination between fiber population in mammalian skeletal muscle by using ultrastructural parameters. J. Ultrastruct. Res., 54, 76-88.
- EISENBERG, B.R. and A.M. KUDA, 1977: Retrieval of cryostat sections for comparison of histochemistry and quantitative electron microscopy in a muscle fiber. J. Histochem. Cytochem., 25, 1169-1177.
- ELDER, G.C.B., K. BRADBURY and R. ROBERTS, 1982: Variability of fiber type distributions within human muscles. J. Appl. Physiol., 53, 1473-1480.
- ENGEL, W.K., 1962: The essentiality of histo- and cytochemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular disease. Neurology, 12, 778-790.

- ENGEL, W.K., 1963: Adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum triads and sarcolemma identified histochemically. Nature, 200, 588-589.
- ENGEL, W.K., 1970: Selective and nonselective susceptibility of muscle fiber types. Arch. Neurol., 22, 97-117.
- ENGEL, W.K., 1974: Fiber type nomenclature in human skeletal muscle for histochemical purposes. Neurology, 24, 344-348.
- ENGEL, W.K., M.H. BROOKE and P.G. NELSON, 1966: Histochemical studies of denervated and tenotomized cat muscle: Illustrating difficulties in relating experimental animal conditions to human neuromuscular diseases. Ann. N.Y. Acad. Sci., 138, 160-185.
- ENGEL, W.K. and R.L. IRWING, 1967: A histochemical-physiological correlation of frog skeletal muscle fibers. Am. J. Physiol., 213, 511-518.
- ENGEL, A.G. and B.Q. BANKER, 1986: "Miology. Basic and clinical". McGraw-Hill Book Company, New York.
- ENGLISH, A.W. and W.D. LETBETTER, 1982: A histochemical analysis of identified compartments of cat lateral gastrocnemius muscle. Anat. Rec., 204, 123-130.
- ENGLISH, A.W. and O.I. WEEKS, 1984: Compartmentalization of single muscle units in cat lateral gastrocnemius. Exp. Brain Res., 56, 361-368.

- ESSEN, B., E. JANSSON, J. HENRIKSSON, A.W. TAYLOR and B. SALTIN, 1975: Metabolic characteristic of fibre types in human skeletal muscle. Acta Physiol. Scand., 95, 153-165.
- FARDEAU, M., 1973: Caractéristiques cytochimiques et ultrastructurales des différents types de fibres musculaires squelettiques extrafusales. An. Anat. Pathol., 18, 7-34.
- FARKAS-BARGETON, E., M.F. DIEBLER, M.L. ARSENIO-NUNES, R. WEHRLE et B. ROSENBERG, 1977: Etude de la maturation histochemique, quantitative et ultrastructurale du muscle foetal humain. J. Neurol. Sci., 31, 245-259.
- FENICHEL, G.M., 1963: The B fiber of human fetal skeletal muscle. A study of fiber diameter size. Neurology, 13, 219-226.
- FENICHEL, G.M., 1966: A histochemical study of developing human skeletal muscle. Neurology, 16, 741-745.
- GARNETT, H.A.F., M.J. O'DONOVAN, J.A. STEPHENS and A. TAYLOR, 1978: Motor unit organization of human medial gastrocnemius. J. Physiol. (Lond), 287, 33-43.
- GAUTHIER, G.F., 1969: On the relationship of ultrastructural and cytochemical features to colour in mammalian skeletal muscle. Z. Zellforsch, 95, 462.
- GAUTHIER, G.F., 1980: "Distribution of myosin isoenzymes in adult and developing muscle fibers". In: Plasticity of muscle. Pette, D., De Gruyter, Berlin, 83-96.

- GAUTHIER, G.F. and H.A. PADYKULA, 1966: Cytochemical studies on fibre types in skeletal muscle. J. Cell Biol., 28, 333-354.
- GAUTHIER, G.F. and S. LOWEY, 1977: Polymorphism of myosin among skeletal muscle fiber types. J. Cell Biol., 74, 760-779.
- GAUTHIER, G.F., S. LOWEY and A.W. HOBBS, 1978: Fast and slow myosin in developing muscle fibres. Nature, 274, 25-29.
- GAUTHIER, G.F. and S. LOWEY, 1979: Distribution of myosin isoenzymes among skeletal muscle fiber types. J. Cell Biol., 51, 10-25.
- GIBSON, M.C. and E. SCHULTZ, 1982: The distribution of satellite cells and their relationship to specific fiber types in soleus and extensor digitorum longus muscles. Anat. Rec., 202, 329-337.
- GIL, F., 1986. Diferenciación postnatal de los tipos de miofibrillas de algunos músculos del perro. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.
- GIL, F., J.M. VAZQUEZ y F. MORENO, 1987a: Algunas consideraciones sobre los aspectos histoquímicos y morfométricos de las fibras "b de Wohlfart" en el músculo del perro. An. Vet.(Murcia) 2, 51-60.
- GIL, F., J.M. VAZQUEZ y F. MORENO, 1987b. Contribución al estudio histoquímico y morfométrico de las fibras tipo IIb en el músculo esquelético del perro. An. Vet. (Murcia) 2, 61-66.

- GODMAN, G.C., 1957: On the regeneration and redifferentiation of mammalian striated muscle. J. Morphol., 100, 27-82.
- GOLDSPINK, G., 1969: Succinic dehydrogenase content of individual muscle fibers at different ages and stages of growth. Life Sci., 8, 719-808.
- GOLDSPINK, G., 1972: "Studies of postembryonic growth and development of skeletal muscle". In: The structure and function of muscle. Vol. 1, Academic Press., New York.
- GOLLNICK, P.D., R.B. ARMSTRONG, C.W. SAUBERT IV, K. PIEHL and B. SALTIN, 1972: Enzyme activity and fiber composition in skeletal muscle of untrained and trained men. J. Appl. Physiol., 33, 312-319.
- GOLLNICK, P.D., R.B. ARMSTRONG, B. SALTIN, C.W. SAUBERT, W.L. SEMBROWICH and R.E. SHEPARD, 1973: Effect of training on enzyme activity and fiber composition of human skeletal muscle. J. Appl. Physiol., 34, 107-111.
- GOLLNICK, P.D., D. PARSONS and C.R. OAKLEY, 1983: Differentiation of fiber types in skeletal muscle from the sequential inactivation of myofibrillar actomyosin ATPase during acid preincubation. Histochemistry, 77, 543-555.
- GOLLNICK, P.D. and H. MATOBA, 1984: Identification of fiber types in rat skeletal muscle based on the sensitivity of myofibrillar actomyosin ATPase to cooper. Histochemistry, 81, 379-383.

- CONYEA, W.J., 1979: Fiber size distribution in the flexor carpi radialis muscle of the cat. Anat. Rec., 195, 447-454.
- CONYEA, W.J. and G.C. ERICSON, 1976: An experimental model for the study of exercised-induced skeletal muscle hypertrophy. J. Appl. Physiol., 40, 630-633.
- CONYEA, W.J. and G.C. ERICSON, 1977: Morphological and histochemical organization of the flexor carpi radialis muscle in the cat. Am. J. Anat., 148, 329-344.
- CONYEA, W.J. and F. BONDE-PETERSON, 1977: Contraction properties and fiber types of some forelimb and hindlimb muscles in the cat. Exp. Neurol., 57, 637-664.
- CONYEA, W.J., S.A. MARUSHIA and J.A. DIXON, 1981: Morphological organization and contractile properties of the wrist flexor muscles in the cat. Anat. Rec., 199, 321-339.
- GOTTSCHALL, J., 1981: The diaphragm of the rat and its innervation. Muscle fiber composition: Perikarya and axons of efferent and afferent neurons. Anat. Embryol., 161, 405-417.
- GORZA, L., 1990: Identification of a novel type 2 fiber population in mammalian skeletal muscle by combined use of histochemical myosin ATPase and anti myosin monoclonal antibodies. J. Cytochem. 30, 257-265.
- GORZA, L., S. SARTORE and S. SCHIAFFINO, 1982: Myosin types and fiber types in cardiac muscle. II. Atrial myocardium. J. Cell. Biol., 95, 838-847.

- GREEN, H.J., H. REICHMAN and P. PETTE, 1982: A comparison of two ATPase based schemes for histochemical muscle fibre typing in various mammals. Histochemistry, 76, 21-31.
- GRIMBY, G., B. DANNESKIOLD-SAMSOE and K. HVID, 1982: Morphology and enzymatic capacity in arm and leg muscles in 78-81 year old men and women. Acta Physiol. Scand., 115, 125-134.
- GUNN, H.M., 1973: Histochemical differences in the skeletal muscle of different breeds of horses and dogs. J. Anat., 114, 303.
- GUNN, H.M., 1975: A study of canine and equine skeletal muscle. Thesis, University of Edinburg.
- GUNN, H.M., 1978a: The mean fibre area of the semitendinosus, diaphragm and pectoralis transversus muscles in differing types of horse and dog. J. Anat., 127, 403-414.
- GUNN, H.M., 1978b: Differences in the histochemical properties of skeletal muscles of different breeds of horses and dogs. J. Anat., 127, 615-634.
- GUNN, H.M., 1979: Total fibre numbers in cross sections of the semitendinosus in athletic and non athletic horses and dogs. J. Anat., 128, 821-828.
- GUTH, L., 1973: Fact and artifact in the histochemical procedure for myofibrillar ATPase. Exp. Neurol., 41, 440-450.
- GUTH, L. and F.J. SAMAHA, 1969: Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. Exp. Neurol., 25, 138-152.



- GUTH, L. and F.J. SAMAHA, 1970: Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase. Exp. Neurol., 28, 365-367.
- GUTH, L. and H. YELLIN, 1971: The dynamic nature of the so-called "fiber types" of mammalian skeletal muscle. Exp. Neurol., 31, 277-300.
- GUTH, L. and F.J. SAMAHA, 1972: Erroneous interpretations which may arise from application of the "myofibrillar ATPase" histochemical procedure to developing muscle. Exp. Neurol., 34, 465-475.
- GUTMANN, E. and I. HAJEK, 1971: Differential reaction of muscle to excessive use in compensatory hipertrophy and in creased phasic activity. Physiol. Bohemoslov., 20, 205-212.
- GUY, P.S. and D.H. SNOW, 1977: A preliminary survey of skeletal muscle fiber types in equine and canine species. J. Anat., 124, 499-500.
- GUY, P.S. and D.H. SNOW, 1981: Skeletal muscle fibre composition in the dog and its relationship to athletic ability. Res. Vet. Sci., 31, 244-248.
- HALTIA, M., O. BERLIN, H. SCHUCHT and P. SOURANDER, 1978: Postnatal differentiation and growth of skeletal muscle fibres in normal and undernourished rats. A histochemical and morphometric study. J. Neurol Sci., 36, 25-39.

- HAMMARBERG, C., 1974: Histochemical staining patterns of muscle fibres in the gastrocnemius, soleus and anterior tibial muscles of the adult cat, as viewed in serial sections stained for lipids and succinic dehydrogenase. Acta Neurol. Scand., 50, 272-284.
- HANDEL, S.E. and N.C. STICKLAND, 1987: The growth and differentiation of porcine skeletal muscle fiber types and influence of birth weight. J. Anat., 152, 107-119.
- HANZLIKOVA, V., 1980: Histochemical patterns in normal and splaylegged piglet muscle fibers. Histochemistry, 67, 311-319.
- HARSON, J. and LENNERSTRAND, G., 1977: Contractile and histochemical properties of the inferior oblique muscle in the rat and in the cat. Acta Ophtha, 55, 88-102.
- HAUSMAN, G.J., D.R. CAMPION and G.B. THOMAS, 1985: Enzyme histochemical studies in an ontogeny study of muscle development in Ossabaw and decapitated fetuses: Cellular reactions. J. Anim. Sci., 60, 1553-1561.
- HAWKINS, R.R., W.G. and J.D. KEMP, 1985: Influence of genetic type, slaughter weight and sex on ovine muscle fiber and fast-cell development. J. Anim. Sci., 61, 1154-1163.
- HENNEMAN, E. and C.B. OLSON, 1965: Relations between structure and function in the design of skeletal muscles. J. Neurophysiol., 28, 581-598.

- HERBISON, G.J., M.M. JAWED and J.F. DITUNNO, 1980: Histochemical fiber type alterations secondary to exercise training of reinnervating adult rat muscle. Arch. Phys. Med. Rehabil., 61, 255-257.
- HERMANSON, S.W. and K.J. HURLEY, 1990: Architectural and histochemical analysis of the biceps brachii muscle of the horse. Acta Anat., 137, 146-156.
- HIKIDA, R.S., R.S. STARON, F.C. HAGERMAN, W.M. SHERMAN and D.L. COSTILL, 1983: Muscle fiber necrosis associated with human marathon runners. J. Neurol. Sci., 59, 185-203.
- HINTZ, C.S., E.F. COYLE, K.K. KAISER, M.Y. MAGGIE and O.L. LOWRY, 1984: Comparison of muscle fiber typing by quantitative enzyme assays and by myosin ATPase staining. J. Histochem. Cytochem., 32, 655-660.
- HOH, J.F.Y., P.A. McGRATH and R.I. WHITE, 1976: Electrophoretic analysis of multiple forms of myosin in fast-twitch and slow-twitch muscles of the chick. Biochem. J., 157, 87-95.
- HORAK, V., 1983: A successive histochemical staining for succinate dehydrogenase and "reversed" ATPase in a single section for the skeletal muscle fibre typing. Histochemistry, 78, 545-553.
- HUDSON, S.C., B.K. DYAS and J.E. RASH, 1982: Changes in number and distribution of orthogonal arrays during postnatal muscle development. Dev. Brain Res., 4, 91-101.

HULLAND, T.J., 1981: Histochemical and morphometric evaluation of skeletal muscle of cachectic sheep. Vet. Pathol., 18, 279-298.

IHEMELANDU, E.C., 1980: Decrease in fibre numbers of dog pectineus muscle with age. J. Anat., 130, 69-73.

IHEMELANDU, E.C. and G.H. CARDINET, 1975: Variations in the number of myofibers associated with type I myofiber predominance in canine pectineal muscles. Zbl. Veterinarmed. (Reihe C), Anat. Histol. Embryol., 4, 368-375.

IHEMELANDU, E.C., G.H. CARDINET and M.M. GUFFY, 1983: Canine hip dysplasia: Differences in pectineal muscles of healthy and dysplastic german shepherd dogs when two months old. Am. J. Vet. Res., 44, 411-416.

INGJER, F., 1978: Maximal aerobic power related to the capillary supply of quadriceps muscle in man. Acta Physiol. Scand., 104, 238-240.

ISHIKAWA, H., 1966: Electron microscopic observations of satellite cells with special reference to the development mammalian skeletal muscles. Z. Anat. Entwicklungsgesch., 125, 43-63.

JAMES, N.T., 1971: The distribution of type I and type II fibres in muscles. J. Anat., 108, 612-613.

JAMES, N.T., 1971: The distribution of muscle fibre types in fasciculi and their analysis. J. Anat., 110, 335-342.

- JAMES, N.T., 1978: Studies on the response of different types of muscle fibre during surgically induced compensatory hypertrophy. J. Anat., 129, 769-776.
- JAMES, N.T., 1979: Differential alterations in the sizes of muscle fibre types during compensatory hypertrophy. J. Anat., 128, 441-444.
- JAMES, N.T., 1980: Quantitative studies on the contiguity of muscle fibre types in normal and hypertrophic skeletal muscles. Acta Anat., 108, 132-136.
- JAMES, N.T. and M. CABRIC, 1982: Quantitative analyses of normal and hypertrophic extensor digitorum longus muscles in mice. Exp. Neurol., 76, 284-297.
- JANSSON, E., B. SJODIN and P. TESCH, 1978: Changes in muscle fiber type distribution in man after physical training. A sign of fiber type transformation ?. Acta Physiol. Scand., 104, 235-237.
- JANSSON, E. and C. SYLVEN, 1983: Myoglobin concentration in single type I and type II muscle fibres in man. Histochemistry, 78, 121-124.
- JENNEKENS, F.G.I., B.E. TOMLINSON and J.N. WALTON, 1971: Data on the distribution of fibre types in five human limb muscles: an autopsy study. J. Neurol. Sci., 14, 245-257.
- JENNEKENS, F.G.I., A.E.F.H. MELJER, J. BETHLEM and G. VAN WINGGAARDEN, 1974: Fibre hybrids in type groups. J. Neurol. Sci., 23, 337-352.

- JIMENES, A.S., G.H. CARDINET, J.E. SMITH and M.R. FEDDE, 1975: Evaluation of indirect method for estimation of myofibre number in transverse sections of skeletal muscle. Am. J. Vet. Res., **36**, 375-378.
- JOBSIS, A.C. and E.F. MELJER, 1973: Evaluation of enzyme histochemical observation for metabolic studies. A combined histochemical investigation of experimentally induced skeletal muscle changes. Histochemie, **36**, 51-61.
- JOHNSON, M.A., J. POLGAR, D. WEIGHTMAN and D. APPLETON, 1973: Data on the distribution of fibre types in thirty-six human muscles. An autopsy study. J. Neurol. Sci., **18**, 111-129.
- KAKULAS, B.A. and R.D. ADAMS, 1985: "Diseases of Muscle". Harper and Row, Philadelphia.
- KARPATI, G. and W.K. ENGEL, 1967: Neuronal trophic function. A new aspect demonstrated histochemically in developing soleus muscle. Arch. Neurol., **17**, 542-545.
- KARPATI, G., A. EISEN and S. CARPENTER, 1975: Subtypes of the histochemical type I muscle fibers. J. Histochem. Cytochem., **23**, 89-91.
- KHAN, M.A., 1976: Histochemical characteristics of vertebrate striated muscle: A review. Prog. Histochem. Cytochem., **8**, 1-48.
- KHAN, M.A. and J.M. PAPADIMITRIOV, 1972: A modified histochemical technique for sarcoplasmic reticular ATPase. Histochemie, **30**, 329-333.

- KUCERA, J., 1981: Histochemical profiles of cat intrafusal muscle fibers and their motor innervation. Histochemistry, 73, 397-418.
- KUCERA, J., 1981: Histochemical study of an unusual cat intrafusal muscle fiber. Histochemistry, 73, 469-476.
- KUCERA, J., 1982: Morphometric studies on tenuissimus muscle spindles in the cat. J. Morphol., 171, 137-150.
- KUCERA, J., 1985: Characteristics of motor innervation of muscle spindles in the monkey. Am. J. Anat., 173, 113-127.
- KUGELBERG, E. and L. EDSTROM, 1968: Differential histochemical effects of muscle contractions on phosphorylase and glycogen in various types of fibres: relation to fatigue. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 31, 415-423.
- KUGELBERG, E., 1973: Histochemical composition, contraction speed and fatiguability of rat soleus motor units. J. Neurol. Sci., 30, 177-198.
- KUGELBERG, E. and T. LARS-ERIC, 1983: Contraction time, histochemical type, and terminal cisternae volume of rat motor units. Muscle & Nerve, 6, 149-153.
- LARSSON, L. and A. FORSBERG, 1980: Morphological muscle characteristics in rowers. Can. J. Appl. Sport. Sci., 5, 239-244.
- LAYMAN, D.K., P.V. HEGARTY and P.B. SWAN, 1980: Comparison of morphological and biochemical parameters of growth in rat skeletal muscles. J. Anat., 130, 159-171.

- LESTER, J.M., D.I. SILVER, W.G. BRADLEY, M.H. COHEN, R.P. HIRSCH and J.F. BRENNER, 1982: Discrimination and consistency of five myosin ATPase stains in human normal and duchenne dystrophic muscle. Histochemistry, 75, 557-571.
- LEVINE, A.S. and P.V.J. HEGARTY, 1977: A re-examination of the biphasic theory of skeletal muscle growth. J. Anat., 123, 313-324.
- LEXELL, J., D. DOWNHAM and M. SJOSTROM, 1983: Distribution of different fibre types in human skeletal muscles. J. Neurol. Sci., 61, 301-314.
- LOBINZEV, K.S., 1960: Concerning the question of the postembryonic multiplication of muscular fibers. Dokl. Akad. Nauk. SSSR, 133, 1441-1443.
- LOBLEY, G.E., A.B. WILSON and A.S. BRUCE, 1977: An estimation of the fibre type composition of eleven skeletal muscles from New Zealand white rabbits between weaning and early maturity. J. Anat., 123, 501-503.
- LOPEZ-RIVERO, J.L., 1988: Patrones morfométricos e histoquímicos de la población fibrilar del músculo glúteo medio del caballo en razas de diferentes aptitudes dinámicas (caballo andaluz, Pura sangre inglés y árabe). Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.
- LOWEY, S. and D. RYSBI, 1971: Light chains from fast and slow muscle myosins. Nature (Lond.), 234, 81-85.



- LUTZ, H., H. WEBER, R. BILLETER and E. JENNY, 1979: Fast and slow myosin within single skeletal muscle fibres of adult rabbits. Nature, 281, 142-144.
- MABUCHI, K. and F.A. SRETER, 1980: Actomyosin ATPase II. Fiber typing by histochemical ATPase reaction. Muscle & Nerve, 3, 233-239.
- MAGON, D.K. et al., 1981: Histochemical patterns of dehydrogenase activity in the development of the muscle graft in the rat. Anat. Rec., 199, 341-347.
- MAHON, M., A. TOMAN, P.L.T. WILLAN and K.M. BAGNALL, 1984: Variability of histochemical and morphometric data from needle biopsy specimens of human quadriceps femoris muscle. J. Neurol. Sci., 63, 85-100.
- MAIER, A., D.R. SIMPSON and V.R. EDGERTON, 1976: Histological and histochemical comparisons of muscle spindles in three hind limb muscles of the guinea pig. J. Morph., 148, 185-192.
- MAILLET, M., 1980: "Histologia e Histofisiologia Humanas. 4. Tejido Muscular". AC, Madrid.
- MANN, W.S. and S. SALAFSKY, 1970: Enzymic and physiological studies on normal and disused developing fast and slow cat muscles. J. Physiol., 208, 33-47.

- MANZ, H.J., 1980: Pathology of skeletal muscle: principles of reaction patterns and histochemistry and experience with 195 biopsies. Virchow Arch. Pathol. Anat. Histol., 386, 1-19.
- MARTINEZ LOPEZ, J.F., 1987: Estudio citoquímico de las miopatías provocadas por inyección intraarticular de corticoides en el perro. Tesis Doctoral. Univ. Murcia.
- MARTINEZ GALISTEO, A. 1990: Desarrollo de la fibra muscular en potros: estudio histoquímico y morfométrico en algunas razas equinas. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.
- MASCARELLO., F. and A. VEGGETTI, 1979: A comparative histochemical study of intrinsic laryngeal muscles of ungulates and carnivores. Basic Appl. Histochemistry, 23, 103-125.
- MASCARELLO, F., G. AURELI and A. VEGGETTI, 1979: Muscoli masticatori. Determinazione istochimica dei tipi di fibre muscolari in mammiferi. Quaderni di anatomia pratica, 35, 193-213.
- MASCARELLO, F., A. VEGGETTI, E. CARPENE and A. ROWLERSON, 1983: An immunohistochemical study of the middle ear muscles of some carnivores and primates, with special reference to the IIM and slow-tonic fibre types. J. Anat., 137, 95-108.
- MASCARELLO, F., A. ROWLERSON, P.A. SCAPOLO, 1984: The fibre type composition of the striated muscle of the oesophagus in ruminants and carnivores. Histochemistry, 80, 277-288.

- MASCARELLO, F., M.G.ROMANELLO, and P.A.SCAPOLO, 1986: Histochemical and immunohistochemical profile of pink muscle fibres in some teleosts. Histochemistry 84, 251-255.
- MATOBA, H. and P.P. GOLLNICK, 1984: Influence of ionic composition, buffering agent, and pH on the histochemical demonstration of myofibrillar actomyosin ATPase. Histochemistry, 80, 609-614.
- MATOBA, H., J.R. ALLEN, W.M. BAYLY, C.R. OAKLEY and P.D. GOLLNICK, 1985: Comparison of fiber types in skeletal muscles from ten animal species based on sensitivity of the myofibrillar actomyosin ATPase to acid or copper. Histochemistry, 82, 175-183.
- MAURO, A., A.T. MILHORAT and S.A. SHAFIQ, 1970: Regeneration of striated muscle and myogenesis. Excerpta Med. Int. Congr. Ser., 4, 180-193.
- MAXWELL, L.C., J.A. FAULKNER and D.A. LIEBERMAN, 1973: Histochemical manifestation of age and endurance training in skeletal muscle fibers. Am. J. Physiol., 344, 356-361.
- MAXWELL, L.C., J.K. BARKLAY, D.E. MOHRMAN and J.A. FAULKNER, 1977: Physiological characteristics of skeletal muscles of dogs and cats. Am. J. Physiol., 233, 14-18.
- MAXWELL, L.C., D.S. CARLSON, J.A. McNAMARA and J.A. FAULKNER, 1981: Adaptation of the masseter and temporalis muscles following alteration in length, with or without surgical detachment. Anat. Rec., 200, 127-137.

- MAZHER, J.M., G.J. HERBILSON and J.F. DITUNNO, 1977: Myosin ATPase activity after strengthening exercise. J. Anat., 124, 371-381.
- McCONATHY, D., C.J. GIDDINGS and W.J. GONVEA, 1983: Structure-function relationships of the flexor carpi radialis muscle compared among four species of mammals. J. Morphol., 175, 279-292.
- McINTOSH, J.S., M. RINGQVIST and E.M. SCHMIDT, 1985: Fiber type composition of monkey forearm muscle. Anat. Rec., 211, 403-409.
- MIGNOT, J., D. BARRES and M. DURIGON, 1981: Méthodes histomorphométriques. I. Méthodes semi-automatiques: applications des tables à digitiser. Acta Pathol., 2, 152-155.
- MILLER, M.E., G.C. CHRISTENSEN and H.E. EVANS, 1979: "Anatomy of the dog". W.B. Saunders, Philadelphia.
- MOODY, W.G. and R.G. CASSENS, 1968: Histochemical differentiation of red and white muscle fibers. J. Anim. Sci., 27, 961-968.
- MORALES-LOPEZ, J.L., 1989: Influencia del entrenamiento sobre la población y morfometría fibrilar de algunos músculos de gran actividad en la rata. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.

MORENO, F., 1986: Estudio citoquímico del desarrollo de la fibra muscular del perro. Trabajo de investigación. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.

MORRISON, J.B., 1970: The mechanics of muscles function in locomotion. J. Biomech., 3, 431-451.

MUNTENER, M., 1979: Variable pH dependence of the myosin ATPase in different muscles of the rat. Histochemie, 62, 299-303.

NACHLAS, M.M. et al., 1956: Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new P-Nitrophenyl substituted Diterazole. J. Histochem. Cytochem., 5, 420-436.

NACHMIAS, V.T. and H.A. PADYKULA, 1958: A histochemical study of normal and denervated red and white muscles of the rat. J. Biophysic. Biochem. Cytol., 4, 47.

NAG, A.C. and J.D. FOSTER, 1981: Myogenesis in adult mammalian skeletal muscle in vitro. J. Anat., 132, 1-18.

NEMETH, P., H.W. HOFER and D. PETTE, 1979: Metabolic heterogeneity of muscle fibers classified by myosin ATPase. Histochemistry, 63, 191-201.

- NEMETH, P. and O.H. LOWRY, 1984: Myoglobin levels in individual human skeletal muscle fibers of different types. J. Histochem. Cytochem., 32, 1211-1216.
- NEMETH, P. and D. PETTE, 1981: Succinate dehydrogenase activity in fibres classified by myosin ATPase in three hind limb muscles of rat. J. Physiol (Lond), 320, 73-80.
- NEWSHOLME, S.J., J. LEXELL and D.Y. DOWNHAM, 1988: Distribution of fibre types and fibre sizes in the tibialis cranialis muscle of beagle dogs. J. Anat., 160, 1-8.
- NINOMIYA, J.G., O.M. ECHEVARRIA and G.H. VAZQUEZ-NIN, 1981: Morphological studies of fiber types of striated muscle fibers of the cremaster in the guinea pig. Acta Anat., 111, 240-246.
- NOLTE, J. and D. PETTE, 1972: Microphotometric determination of enzyme activity in single cells in cryostat sections. II. succinate dehydrogenase and triosephosphate activities in red, intermediate and white fibres of soleus and rectus femoris muscles of rat. J. Histochem. Cytochem., 20, 577-582.
- NOVIKOFF, A.B., W. SHIN and J. DRUKER, 1961: Mitochondrial localization of oxidative enzymes: Staining results with two tetrazolium salts. J. Biophys. Biochem. Cytol., 9, 47-61.
- NUNALLY, M.H. and S.T. STULL, 1984: Mammalian skeletal muscle myosin. J. Biol. Chemistry, 259, 1776-1780.

- NYGAARD, E. and J. SANCHEZ, 1982: Intramuscular variation of fiber types in the brachial biceps and the lateral vastus muscles of elderly men: how representative is a small biopsy sample?. Anat. Rec., 202, 451-459.
- NYSTROM, B., 1968: Histochemistry of developing cat muscles. Acta Neurol. Scand., 405-439.
- OGATA, T., 1958: A histochemical study of the red and white muscle fibers. Part. I. Activity of the succinoxidase system in muscle fibers. Acta Med. Okayama, 12, 216-227.
- OGATA, T., 1958: A histochemical study of the red and white muscle fibers. Part. II. Activity of the cytochrome oxidase in muscle fibres. Acta Med. Okayama, 12, 228-232.
- OGATA, T., 1958: A histochemical study of the red and white muscle fibers. Part. III. Activity of the diphosphoridine nucleotide diaphorase in muscle fibres. Acta Med. Okayama, 12, 233-236.
- OGATA, T. and M. MORI, 1964: Histochemical study of oxidative enzymes in vertebrate muscles. J. Histochem. Cytochem., 12, 171-182.
- OGATA, T. and F. MURATA, 1969: Cytological features of three fiber types in human striated muscle. Tohoku J. Exp. Med., 99, 225-245.
- OMMER, P.A., 1971: Histochemical differentiation of skeletal muscle fibre in the bovine fetus. Experientia, 27, 173-174.

- ONTPELL, M. and R.F. DUNN, 1978: Neonatal muscle growth: A quantitative study. Am. J. Anat., 152, 539-556.
- ORVIS, J.S. and G.H. CARDINET, 1981: Canine muscle fiber types and susceptibility of masticatory muscles to myositis. Muscle & Nerve, 4, 354-359.
- OVALLE, W.K., B.H. BRESSLER, L.G. JASCH and C.E. SLOVECKER, 1983: Abnormal distribution of fiber types in the slow-twitch soleus muscle of the C57BL/6J DY2J/DY2J dystrophic mouse during postnatal development. Am. J. Anat., 168, 291-304.
- PACHTER, B.R. and C. COLBJORNSEN, 1983: Rat extraocular muscle. 2. Histochemical fibre types. J. Anat., 137, 161-170.
- PADYKULA, H.A., 1952: The localization of succinic dehydrogenase in tissue sections of the rat. Am. J. Anat., 91, 107-145.
- PADYKULA, H.A. and E. HERMAN, 1955: Factors affecting the activity of adenosine triphosphatase and other phosphatase as measured by histochemical techniques. J. Histochem. Cytochem., 3, 161-169.
- PADYKULA, H.A. and E. HERMAN, 1955: The specificity of the histochemical method for adenosine triphosphatase. J. Histochem. Cytochem., 3, 170-195.
- PADYKULA, H.A. and G.F. GAUTHIER, 1963: Cytochemical studies of adenosine triphosphate in skeletal muscle fibers. J. Cell Biol., 18, 87-107.



- PADYKULA, H.A. and G.F. GAUTHIER, 1967: Morphological and cytochemical characteristics of fiber types in normal mammalian skeletal muscle. Excerpta Med. Int. Congr. Ser., 147, 117-131.
- PADYKULA, H.A. and G.F. GAUTHIER, 1970: The ultrastructure of the neurovascular junctions of mammalian red, white and intermediate skeletal muscle fibers. J. Cell Biol., 46, 27-41.
- PENNEY, R.K., P.F. PRENTIS, P.A. MARSHALL and G. GOLDSPIK, 1983: Differentiation of muscle and the determination of ultimate tissue size. Cell Tissue Res., 228, 375-388.
- PETER, J.B., V.R. BARNARD, V.R. EDGERTON, C.A. GILLESPIE and K.E. STEMPER, 1972: Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscles in guinea pigs and rabbits. Biochemistry, 11, 2627-2633.
- PEYRONNARD, J.M. and L. CHARRON, 1980: Muscle reorganization after partial denervation and reinnervation. Muscle & Nerve, 3, 509-518.
- PIEROBON-BORMIOLI, S., S. SARTORE, L. DALLA LIBERA, M. VITADELLO and S. SCHIAFFINO, 1980: Slow myosin in vertebrate skeletal muscle. An immunofluorescence study. J. Cell Biol., 65, 672-681.
- PIEROBON-BORMIOLI, S., S. SARTORE, L. DALLA LIBERA, M. VITADELLO and S. SCHIAFFINO, 1981: Fast isomyosins and fiber types in mammalian skeletal muscle. J. Histochem. Cytochem., 29, 1179-1188.

PULLEN, A.H., 1977: The distribution and relative sizes of three histochemical fibre types in the rat tibialis anterior muscle. J. Anat., 123, 1-2.

RICHMOND, F.J.R. and V.C. ABRAHAMS, 1975: Morphology and enzyme histochemistry of dorsal muscles of the cat neck. J. Neurophysiol., 38, 1312-1321.

RICHMOND, F.J.R., D.R.R. MacGILLIS and D.A. SCOTT, 1985: Muscle fiber compartmentalization in cat splenius muscle. J. Neurophysiol., 53, 868-885.

RILEY, D.A., 1973: Histochemical changes in ATPase activity during regeneration of adult skeletal muscle fibers. Exp. Neurol., 41, 690-704.

RILEY, D.A. and A.J. BERGER, 1979: A regional histochemical and electromyographic analysis of the cat respiratory diaphragm. Academic Press., New York.

RINGQVIST, M., I. RINGQVIST and L. TORNELL, 1977: Differentiation of fibers in human masseter, temporal and biceps brachii muscles. J. Neurol. Sci., 32, 265-273.

RODRIGUEZ BARBUDO, M.V., F. MORENO, S. FUENTES, J. VIVO, J.G. MONTERDE, F. MIRO, M. CARPIO y F. GIL, 1983: Distribución estratigráfica de las fibras en músculos de actividad funcional antagónica (Mm. tibial craneal y flexor digital largo) del perro mediante técnicas de ATPasa. Morf. Norm. Patol., 7, 1089-1094 .

- RODRIGUEZ BARBUDO, M.V., F. MORENO, M. CARPIO, S. FUENTES y E. AGJERA, 1984: Estudio histoquímico y morfométrico del m. tibial craneal en perros de diferentes aptitudes (galgo, fox terrier y pastor alemán). Zbl. Veterinarmed (Reihe C) Anat. Histol. Embryol., 3, 2-17.
- ROMANUL, F.C., 1964: Enzymes in muscle. I. Histochemical studies of enzymes in individual muscle fibres. Arch. Neurol., 11, 355-368.
- ROMANUL, F.C., 1965: Capillary supply and metabolism of muscle fibers. Arch. Neurol., 12, 497-505.
- ROMANUL, F.C. and E.L. HOGAN, 1966: Enzymatic changes in denervated muscle. Histochemical studies. Arch. Neurol., 13, 263-273.
- ROMANUL, F.C. and M. POLLOCK, 1969: "The paralelism of changes in oxidative metabolism and capillary supply of skeletal muscle fibers". Little Brown, Boston.
- RONEUS, B. and B. ESSEN-GUSTAVSSON, 1986: Muscle fiber types and enzyme activity in healthy foals and foals affected by muscular dystrophy. J. Vet. Med., 33, 1-12.
- ROWE, R.W., 1969: The effect of hypertrophy on the properties of skeletal muscle. Comp. Biochem. Physiol., 28, 1449-1453.
- ROWE, R.W. and G. GOLDSPINK, 1969: Muscle fibre growth in five different muscles in both sexes of mice. I. Normal mice.

- ROWLERSON, A., B. POPE, J. MURRAY, B. WHALEN, A.G. WEEDS, 1981: A novel myosin present in the cat jaw-closing muscles. J. Muscle Res Cell Motil, 2: 415-438.
- ROWLERSON, A., F. MASCARELLO, A. VEGGETTI and E. CARPENIE, 1983: The fibre type composition of the first branchial arch muscles in Carnivora and Primates. J. Musc. Res. Cell Motil., 4, 443-472.
- RUBINSTEIN, N.A., K. MABUCHI, F.A. PEPE, S. SALMONS, J. GERGELY and F. SRETER, 1978: Use of type-specific antimyosins to demonstrate the transformation of individual fibers in chronically stimulated rabbit fast muscles. J. Cell. Biol., 79, 252.
- RUBINSTEIN, N.A. and A.M. KELLY, 1981: Development of muscle fiber specialization in the rat hindlimb. J. Cell Biol., 90, 128-144.
- PUSHBROOK J.I. and A. STRACHER, 1979: Comparisson of adult, embryonic and dystrophic myosin heavy chains from chicken muscle by sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis and peptide mapping. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4331-4334.
- SAHGAL, V., S. BERNES, S. SAHGAL, C. LISCHWEY and V. SUBRAMANI, 1983: Skeletal muscle in preterm infants with congenital myotonic dystrophy. J. Neurol Sci., 59, 47-55.
- SALMONS, S. and G. VRBOVA, 1969: The influence of activity on some contractile characteristics of mammalian fast and slow muscles. J. Physiol., 201, 535-549.

- SAMAHA, F.J., L. GUTH and R.W. ALBERS, 1970: Phenotypic differences between the actomyosin ATPase of the three fiber types of mammalian skeletal muscle. Exp. Neurol., 26, 120-125.
- SAMAHA, F.J. and E.J. YUNIS, 1973: Quantitative and histochemical demonstration of a calcium activated mitochondrial ATPase in skeletal muscle. Exp. Neurol., 41, 431-439.
- SANDOW, A., 1970: Skeletal muscle. Annu. Rev. Physiol., 32, 87-138.
- SANDSTEDT P.E.R., 1981: Representativeness of a muscle biopsy specimen for the whole muscle. Acta Neurol. Scand., 64, 427-437.
- SARTORE, S., S. PIEROBON-BORMIOLI and S. SCHIAFFINO, 1978: Immunohistochemical evidence for myosin polymorphism in the chicken heart. Nature, 274, 82-83.
- SARTORE, S., L. GORZA, S. PIEROBON-BORMIOLI, S. DALLA LIBERA and S. SCHIAFFINO, 1981: Myosin types and fibers types in cardiac muscle. I. Ventricular myocardium. J.Cell. Biol., 88, 226-233.
- SCHIAFFINO, S. and V. HANZLIKOVA, 1970: On the mechanism of compensatory hypertrophy in skeletal muscles. Experientia, 26, 152-153.

- SCHIAFFINO, S., V. HANZLIKOVA and S. PIEROBON, 1970: Relations between structure and function in rat skeletal muscle fibers. J. Cell Biol., **47**, 107-119.
- SCHIAFFINO, S., S. PIEROBON and M. ALOISI, 1974: Compensatory hiperplasia of skeletal muscle. Exc. Médica, **334**, 141-147.
- SCHLOON, H. and J. SCHLOTTMAN, 1979: The development of skeletal muscle in premature infants: Fiber size and histochemical differentiation. Eur. J. Pediatr., **131**, 49-60.
- SCHMALBRUCH, H. and Z. KAMIENIECKA, 1974: Fiber types in the human brachial biceps muscle. Exp. Neurol., **44**, 313-328.
- SCHMALBRUCH, H. and U. HELLMAMER, 1976: The number of satellite cells in normal human muscle. Anat. Rec., **185**, 279-288.
- SCHULTZ, E., 1976: Fine structure of satellite cells in growing skeletal muscle. Am. J. Anat., **147**, 49-70.
- SCHWARTZ-GIBLIN, S., L. ROSELLO and D.W. PFAFF, 1983: A histochemical study of lateral longissimus muscle in rat. Exp. Neurol., **79**, 497-518.
- SCOTT, K.W. and J. HOY, 1976: the cross sectional area of diaphragmatic muscle fibres in emphysema, measured by an automated image analysis system. J. Pathol., **20**, 121-128.
- SCULLY, R.E. and C.W. HUGHES, 1956: The pathology of ischemia of skeletal muscle in man. Am. J. Pathol., **42**, 805-829.

- SELIGMAN, A.M. and A.M. RUTENBURG, 1951: The histochemical demonstration of succinic dehydrogenase. Science, 113, 317-321.
- SELYE, H., 1965: A muscular dystrophy induced by cold following restriction of the arterial blood supply. Experientia, 21, 610-611.
- SEMENOFF, W.E., 1935: Mikrochemische Bestimmung der Aktivität der Succinodhydrase in den Organen der Rana temporaria. Zeitschrift für Zellforschung, 22, 305.
- SHAFIQ, S.A., M.A. GORYSKI and A.T. MILHORAT, 1967: An electron microscopic study of regeneration and satellite cells in human muscle. Neurology, 17, 567-575.
- SHOREY, C.D. and K.W. CLELAND, 1983: Problems associated with the morphometric measurement of transverse skeletal muscle fibers. I. Analysis of frozen sections. Anat. Rec., 207, 523-531.
- SICKLES, D.W. and C.A. PIKSTAFF, 1981: Comparative histochemical study of prosimian primate hindlimb muscles. I. Muscle fiber types. Am. J. Anat., 160, 175-186.
- SIECK, G.C., R.R. ROY, P. POWELL, C. BLANCO, V.R. EDGERTON and R. M. HARPER, 1983: Muscle fiber type distribution and architecture of the cat diaphragm. J. Appl. Physiol., 55, 1386-1392.
- SIVACHELVAN, M.N. and A.S. DAVIES, 1986: Growth changes in the myofibres and connective tissue of ovine muscle before and after birth. Anat. Histol Embryol., 15, 49-57.

- SJOSTROM, M. et al., 1982: Morphometric analyses of human muscle fiber types. Muscle & Nerve, 5, 538-553.
- SLATON, D., 1981: Muscle fiber types and their development in the human fetus. Phys. Occup. Therap. Pediat., 3, 47-57.
- SLAVIN, G., M. FINBARR, P. WARD, J. LEVI and T. PETERS, 1983: Chronic alcohol excess is associated with selective but reversible injury to type 2B muscle fibres. J. Clin. Pathol., 36, 772-777.
- SMITH, B., 1975: Histochemical changes in necrosis and regeneration. J. Pathol. Bact., 89, 139-143.
- SNOW, M.H., 1977: Myogenic cell formation in regenerating rat skeletal muscle injured by mincing. I. A fine structural study. Anat. Rec., 188, 181-200.
- SNOW, M.H., R. BILLETER and F. MASCARELLO, 1982: No classical type IIB fibres in dog skeletal muscle. Histochemistry, 75, 53-65.
- SONG, S.K., N. SHIMADA and P.J. ANDERSON, 1963: Orthogonal diameters in the analysis of muscle fibre size and form. Nature (Lond.), 200, 1220.
- SPURWAY, N.C., 1981: Interrelationship between myosin-based and metabolism-based classifications of skeletal muscle fiber. J. Histochem. Cytochem., 29, 87-88.



- STARON, R.S., R.S. HIKIDA and F.C. HAGERMAN, 1983: Reevaluation of human muscle fast-twitch subtypes: Evidence for a continuum. Histochemistry, 78, 33-39.
- STARON, R.S., R.S. HIKIDA, F.C. HAGERMAN, G.A. DUDLEY and T.F. MURRAY, 1984: Human skeletal muscle fiber type adaptability to various workloads. J. Histochem. Cytochem., 32, 146-152.
- STARON, R.S. and D. PETTE, 1986: Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in rabbit muscle fibers. Histochem., 86, 19-25.
- STAUBER, W.T., V. FRITZ, B. DAHLMANN and H. REINAUER, 1983: Immunohistochemical localization of two proteinases in skeletal muscle. J. Histochem. Cytochem., 31, 827-830.
- STAUN, H., 1963: Various factors affecting number and size of muscle fibres in the pig. Acta Agric. Scand., 13, 293-322.
- STAUN, H., 1972: The genetic influence on number and size of muscle fibres. W. Rev. Anim. Prod., 8, 18-26.
- STEIN, J.M. and H.A. PADYKULA, 1962: Histochemical classification of individual skeletal muscle fibers of the rat. Am. J. Anat., 110, 103-123.
- SUE, H.C., B.K. DYAS and J.E. RASH, 1982: Changes in number and distribution of orthogonal arrays during postnatal muscle development. Develop. Brain Res., 4, 91-101.

- SULAIMAN, A.R., H.M. SWICK and D.S. KINDER, 1983: Congenital fibre type disproportion with unusual clinicopathologic manifestations. J. Neurol. Neurosurg. Psych., **46**, 175-182.
- SUZUKI, A., 1977: A comparative histochemical study of the masseter muscle of the cattle, sheep, swine, dog, guinea pig and rat. Histochemistry, **51**, 121-131.
- SUZUKI, A., T. TSUCHIYA, S. OHWADA and H. TAMATE, 1985: Distribution of myofiber types in thigh muscles of chickens. J. Morphol., **185**, 145-154.
- SWATLAND, H.J., 1979: Allometric radial growth in muscle, comparing fibres with strong and with weak adenosine triphosphatase activity. J. Anat., **129**, 591-596.
- SWATLAND, H.J., 1983: The histochemistry of very small muscle fibres in growing skeletal muscles. J. Neurol. Sci., **61**, 435-442.
- SWATLAND, H.J., 1985: Fibre-optic spectrophotometry of immature bovine skeletal muscles and the cellular distribution of myoglobin and succinate dehydrogenase. Histochem. J., **17**, 675-682.
- SZENT-GYORYI, A., 1950: "The Chemistry of Muscular Contraction". Academic Press., New York.
- TAKEUCHI, T., 1956: Histochemical demonstration of phosphorylase. J. Histochem. Cytochem., **4**, 84-89.

- TAKEUCHI, T. and H. KURIAKI, 1955: Histochemical detection of phosphorylase in animal tissues. J. Histochem. Cytochem., 4, 153-161.
- TALESARA, C.L. and P. MAHANT, 1983: Succinic-D and Myofibrillar ATP-A in the denervated gastrocnemius muscle of young, adult and middle-aged albino rat (*Rattus norvegicus*): A correlative histochemical and biochemical study. Cellular & Molecular Biol., 29, 531-537.
- TAYLOR, A., F.W. CODY and M.A. BOSLEY, 1973: Histochemical and mechanical properties of the jaw muscles of the cat. Exp. Neurol., 38, 99-109.
- TAYLOR, K. and T.N. CALVEY, 1977: Histochemical characteristics and contractile properties of the spinotrapezius muscle in the rat and the mouse. J. Anat., 123, 67-76.
- THOMAS, D., et al., 1984: The size of the myofibers in mature grafts of the mouse extensor digitorum longus muscle. Muscle & Nerve, 7, 226-231.
- THOMPSON, E.H., A.S. LEVINE, P.V. HEGARTY and C.E. ALLEN, 1979: An automated technique for simultaneous determinations of muscle cell number and diameter. J. Anim. Sci., 48, 328-337.
- TOMANEK, R.J., 1976: Ultrastructural differentiation of skeletal muscle fibers and their diversity. J. Ultrast. Res., 55, 212-227.

- TOMANEK, R.J. and Y.N. WOO, 1970: Compensatory hypertrophy of the plantaris muscle in relation to age. J. Gerontology, 25, 23-29.
- TREVINO, G.S., R.S. DEMAREE, B.V. SAUNDERS and T.A. O'DONNELL, 1973: Needle biopsy of skeletal muscle in dogs: Light and electron microscopy of resting muscle. Am. J. Vet. Res., 34, 507-515.
- TROTTER, J.A., A. SAMORA and J. BACA, 1985: Three-dimensional structure of the murine muscle-tendon junction. Anat. Rec., 213, 16-25.
- TSUKAMOTO, S. and M. MORI, 1966: Distribution of muscle fibers of three types differentiated by succinic dehydrogenase activity in the skeletal muscle. Arch. Histol. Jap., 26, 329-339.
- TUNNELL, G.L. and M.W. HART, 1977: Simultaneous determination of skeletal muscle fiber, types I, IIA and IIB by histochemistry. Arch. Neurol., 34, 171-173.
- VAN DER LAARSE, W.J., M. SUHARTI and P.C. DIEGENBACH, 1985: Relationship between myoglobin and succinate dehydrogenase in mouse soleus and plantaris muscle fibres. Histochem. J., 17, 1-11.

- VAN WINKLE, W.R. and A. SCHWARTZ, 1978: Morphological and biochemical correlates of skeletal muscle contractility in the cat. Histochemical and electron microscopic studies. J. Cell Physiol., 97, 99-120.
- VAN GHAN, H.S. and G. GOLDSPIK, 1979: Fibre number fibre size in a surgically overloaded muscle. J. Anat., 129, 293-303.
- VEGETTI, A., F. MASCARELLO and E. CARPENE, 1982: A comparative histochemical study of fibre types in middle ear muscles. J. Anat., 135, 333-352.
- VENABLE, J.H., 1966: Constant cell populations in muscle. Am. J. Anat., 119, 263-269.
- VENEMA, H.W. and J. OVERWEG, 1974: Analysis of the size and shape of cross-sections of muscle fibres. Med. Biol. Eng., 681-692.
- VINCELETTE, J. and G. JASMIN, 1969: On the heterogeneity of skeletal muscle fibers: The intermediate fibers. Experientia, 25, 288-290.
- WACHSTEIN, M. and E. MEISEL, 1955: The distribution of histochemically demonstrable succinic dehydrogenase and of mitochondria in tongue and skeletal muscles. J. Biophys. Biochem. Cytol., 1, 483-489.
- WATT, P.W. et al., 1984: Changes in fiber types composition in growing muscle as a result of dynamic exercise and static overload. Muscle & Nerve, 7, 50-53.

- WEEDS, A.G., 1976: Light chains from slow-twitch muscle myosin. Eur. J. Biochem., **66**, 157-173.
- WEEDS, A.G., 1980: Myosin light chains, polymorphism and fiber types in skeletal muscle. In: Plasticity of muscle, Pette, D., Walter de Gruyter, Berlin, New York, 55-68.
- WEEDS, A.G. and K. BURRIDGE, 1975: Myosin from cross-reinnervated cat muscles. Evidence for reciprocal transformation of heavy chains. F.E.B.S. Lett **57**, 203-208.
- WELT, K., W. SCHELLER, G. SCHIPPEL and K. SCHIPPEL, 1978: Licht- und Elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Skelettmuskelkapillaren (m. triceps brachii) weisser Ratten im Alter von 2 bis 20 Monaten. Z. Mikrosk. Anat. Forsch. (Leipz), **92**, 465-478.
- WHALEN, R.G., S.M. SELL, G.S. BUTLER-BROWNE, K. SCHWARTZ, P. BOUVERET and I. PINSET-HARSTROM, 1981: Three myosin heavy-chain isozymes appear sequentially in rat muscle development. Nature, (London) **295**, 805-809.
- WIRSEN, C. and K. LARSSON, 1964: Histochemical differentiation of skeletal muscle in fetal and newborn mice. J. Embryol. Exp. Morphol., **12**, 759-767.
- WIRTZ, P., H.M. LOERMANS, P.G.M. PEER and A.G.M. REINTJES, 1983: Postnatal growth and differentiation of muscle fibres in the mouse. I. A histochemical and morphometrical investigation of normal muscle. J. Anat., **137**, 109-126.

WIRTZ, P., H.M. LOERMANS, P.G.M. PEER and A.G.M. REINTJES, 1983:  
Postnatal growth and differentiation of muscle fibres in  
the mouse. II. A histochemical and morphometrical  
investigation of dystrophic muscle. J. Anat., 137,  
127-142.

WOHLFART, G., 1937: Über das Vorkommen verschiedener Arten von  
Skelfasern in der Skelettmuskulatur des Menschen und  
einiger Säugetiere. Act. Psychiatr. Neurol. Scand., 12,  
1-119.