

UNIVERSIDAD DE MURCIA



FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL

“ESTUDIO HISTOQUÍMICO E INMUNOHISTOQUÍMICO DE
LOS MÚSCULOS DE LA LENGUA, PALADAR Y FARINGE EN EL
PERRO (*Canis familiaris* L.)”

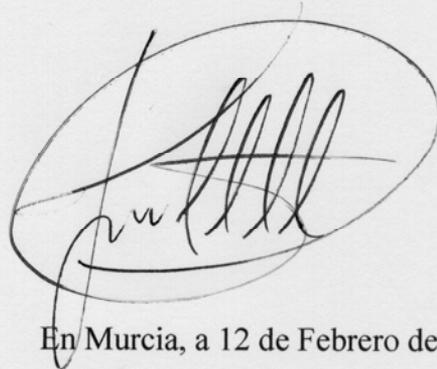
CAYETANO SÁNCHEZ COLLADO

2009

D. FRANCISCO GIL CANO, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD DEL ÁREA DE ANATOMÍA VETERINARIA EN EL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA COMPARADAS

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral “Estudio histoquímico e inmunohistoquímico de los músculos de la lengua, paladar y faringe en el perro (*Canis familiaris* L.)” realizada por **D. Cayetano Sánchez Collado**, bajo mi inmediata dirección y supervisión en el Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

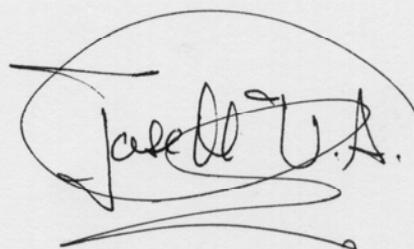
A handwritten signature in black ink, enclosed within a large, hand-drawn oval. The signature is stylized and appears to read 'Francisco Gil Cano'.

En Murcia, a 12 de Febrero de 2009

D. JOSÉ MARÍA VÁZQUEZ AUTÓN, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD
DEL ÁREA DE ANATOMÍA VETERINARIA EN EL DEPARTAMENTO DE
ANATOMÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA COMPARADAS

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral “Estudio histoquímico e inmunohistoquímico de los músculos de la lengua, paladar y faringe en el perro (*Canis familiaris* L.)” realizada por **D. Cayetano Sánchez Collado**, bajo mi inmediata dirección y supervisión en el Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

A handwritten signature in black ink, enclosed within a large, loopy oval shape. The signature appears to read 'José María Vázquez Autón'.

En Murcia, a 12 de Febrero de 2009



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

DPTO. DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL

Facultad de Veterinaria

D^a. Ana Maria Montes Cepeda, Profesora Titular de Universidad del Área de Medicina y Cirugía Animal y Director del Departamento de Medicina y Cirugía Animal, INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada “Estudio Histoquímico e Inmunohistoquímico de los músculos de la Lengua, Paladar y Faringe en el Perro (*Canis familiaris* L.)”, ha sido realizada por D. Cayetano Sánchez Collado, bajo la inmediata dirección y supervisión de D. Francisco Gil Cano y D. José M^a Vázquez Autón, y que el Departamento ha dado su conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

Murcia, a 19 de Febrero de 2009

AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento “al alimón” para los profesores D. Francisco Gil Cano y D. José María Vázquez Autón por sus conocimientos y enseñanzas transmitidas a lo largo de años. Bajo su tutela, y aunque nunca me consideré un alumno aventajado, han hecho sentirme un privilegiado. Gracias a su excelente dirección ha sido posible la Tesis Doctoral.

Gracias a Carmen Nieves por estar siempre a mi lado, aguantándome, sufriendome y permitiendo que me dedicara a lo que más me gusta. Siempre me animó y alentó, sin encontrar en sus palabras reproche alguno. Este trabajo va sin duda dedicado a ella, como pequeña muestra del amor que le profesó.

A mis padres, por la educación que me dieron y por no haberme negado nunca su ayuda. Gracias a su apoyo, a su fe ciega en mis posibilidades, a su esfuerzo, amor y plena dedicación he podido llegar hasta aquí.

A D. Francisco Martínez Gomariz, el mejor traumatólogo veterinario que conozco, y del que me enorgullece decir que es mi socio en la vida profesional y mi hermano fuera del ámbito laboral. Alguien que siempre está ahí cuando se le necesita, mucho de lo que aprendí dentro y fuera del ejercicio profesional se lo debo a él. Muchas gracias.

Al “jefe” del “mini-departamento” de Anatomía D. Gregorio Ramírez Zarzosa, por acoger a todos los profesores asociados y dejarnos compartir su despacho. Gracias por sus consejos (anatómicos e informáticos), por estar siempre tan dispuesto y por su generosidad.

A todos y cada uno de los integrantes de la Unidad Docente de Anatomía y Embriología Veterinaria de la Universidad de Murcia, lugar donde intento desarrollar

mi labor como profesor asociado desde hace siete años. Gracias por cubrirme ausencias, por facilitarme el trabajo en la Sala de Disección y por ayudarme de forma desinteresada en todo cuanto he necesitado. Sin sus apoyos no habría podido finalizar.

Al profesor D. Francesco Mascarello de la Universidad de Padua por sus recomendaciones, siempre acertadas, y por la desinteresada donación de una gran parte de los anticuerpos monoclonales utilizados.

A la Unidad Docente de Anatomía Patológica Veterinaria de la Universidad de Murcia y en particular al profesor D. Joaquín Sánchez Campillo, por su inestimable ayuda en la realización y puesta a punto de la técnica inmunohistoquímica.

A los veterinarios pertenecientes al Servicio Municipal de Control de Zoonosis del Excelentísimo Ayuntamiento de Murcia, por las facilidades dadas y la buena disposición siempre mostrada para poder obtener los animales de estudio.

Al técnico de laboratorio D. Mariano Orenes Hernández por su gran ayuda en el transporte y procesado de las muestras musculares.

Por último, dedicar unas líneas de agradecimiento a familiares, amigos y a todos aquellos que se han podido quedar en el tintero por mi mala memoria, pero que, de alguna manera, han aportado su granito de arena para realizar esta Tesis Doctoral. Gracias a todos.

A mi mujer Carmen Nieves

*Cualesquiera que hayan sido nuestros logros, alguien nos ayudó siempre a
alcanzarlos.*

Althea Gibson

*La ciencia apenas sirve más que para darnos una idea de la extensión de nuestra
ignorancia.*

Lamennais

En el punto donde se detiene la ciencia, empieza la imaginación.

Heyendhal

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
II.1. EL MIOCITO O FIBRA MUSCULAR	7
II.2. CLASIFICACIÓN DE LOS TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES	12
II.3. TIPOS DE FIBRAS Y FUNCIÓN MUSCULAR	29
II.4. TIPOS DE FIBRAS EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DEL PERRO	32
II.5. TIPOS DE FIBRAS EN LOS MÚSCULOS DEGLUTORES, MASTICADORES Y FARÍNGEOS DE MAMÍFEROS	39
II.6. TIPOS DE FIBRAS EN LOS MÚSCULOS DEGLUTORES, MASTICADORES Y FARÍNGEOS DE LA ESPECIE CANINA	47
III. MATERIAL Y MÉTODOS	54
III.1. ANIMALES, ENTIDADES MUSCULARES Y TOMA DE MUESTRAS	55
Músculos de la lengua	58
Músculos del paladar y fauces	61
Músculos de la faringe	64
III.2. CONGELACIÓN DE LAS MUESTRAS	67
III.3. CORTE DE LAS MUESTRAS	68
III.4. TINCIONES Y TÉCNICAS EMPLEADAS	68
III.4.1. Técnicas histológicas (no enzimáticas)	68
III.4.1.1. Hematoxilina-Eosina	68
III.4.1.2. Tricrómico de Gomori modificado	69
III.4.2. Técnicas histoquímicas	70

III.4.2.1.	Técnicas de ATPasa miosínicas	70
III.4.2.2.	Técnicas histoquímicas para la determinación del metabolismo fibrilar	73
III.4.3.	Técnica inmunohistoquímica	74
III.5.	FOTOGRAFIADO Y MICROFOTOGRAFIADO	77
IV.	RESULTADOS	79
IV.1.	TIPOS DE FIBRAS EN EL MÚSCULO SEMITENDINOSO (MÚSCULO CONTROL). <i>FIGURAS 21-25; TABLAS I Y II</i>	80
IV.2.	TIPOS DE FIBRAS EN LOS MÚSCULOS DE LA LENGUA. <i>FIGURAS 26-33; TABLAS III Y IV</i>	88
IV.3.	TIPOS DE FIBRAS EN LOS MÚSCULOS DEL PALADAR Y FAUCES. <i>FIGURAS 34-44; TABLAS V Y VI</i>	97
IV.4.	TIPOS DE FIBRAS EN LOS MÚSCULOS FARÍNGEOS. <i>FIGURAS 45-61; TABLAS VII Y VIII</i>	110
V.	DISCUSIÓN	125
V.1.	MÚSCULO SEMITENDINOSO (MÚSCULO CONTROL)	126
V.2.	MÚSCULOS DE LA LENGUA	130
V.3.	MÚSCULOS DEL PALADAR Y FAUCES	135
V.4.	MÚSCULOS DE LA FARINGE	140
VI.	RESUMEN	151
VII.	SUMMARY	154
VIII.	CONCLUSIONES	157
IX.	BIBLIOGRAFÍA	160

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

Las fibras musculares esqueléticas difieren en sus propiedades contráctiles y metabólicas. Durante años, la técnica histoquímica de la adenosín trifosfatasa miofibrilar (mATPasa), siguiendo la metodología y nomenclatura propuestas por Guth y Samaha (1969) y Brooke y Kaiser (1970), ha sido la más utilizada para determinar los tipos de fibras que integran la musculatura esquelética en mamíferos. Mediante dicha técnica se han podido diferenciar hasta cuatro tipos: fibras lentas tipo I y fibras rápidas tipos IIA, IIB y IIC, en base a su diferente actividad tras preincubaciones ácidas y alcalinas. En roedores y lagomorfos se ha descrito, además, otro tipo de fibra rápida denominado IIX (Schiaffino et al., 1989; Termin et al., 1989; Gorza, 1990). La actividad mATPasa y las propiedades fisiológicas de las fibras esqueléticas musculares guardan relación con la heterogeneidad de las proteínas miofibrilares, principalmente con las cadenas pesadas de miosina. En los mamíferos se expresan al menos ocho isoformas de cadenas pesadas de miosina (MyHC) (Schiaffino y Reggiani, 1996), aunque el patrón de la expresión de las MyHC parece ser específico de cada especie. En la musculatura esquelética adulta de diferentes

animales se ha podido demostrar la expresión de las isoformas I, IIA, IIB y IIX, isoformas que se corresponden con las descritas mediante la técnica de la mATPasa (Schiaffino et al., 1989; Smerdu et al., 1994; Pette y Staron, 1997; Graziotti et al., 2001a, b; Argüello et al., 2001). Asimismo, se ha comprobado que existe una alta correlación entre el contenido en MyHC y las propiedades contráctiles de la fibra muscular, observándose que la máxima velocidad de acortamiento se incrementa en el orden $I < IIA < IIX < IIB$ (Talmadge, 2000). En principio, las fibras que coexpresan más de una MyHC simultáneamente, denominadas fibras híbridas, se pensó que eran poco frecuentes (Hämäläinen y Pette, 1995). Solamente en las fibras clasificadas como IIC se demostró que coexpresaban MyHC-I y MyHC-IIa. Por otra parte, se consideraba que el número de estas fibras podía aumentar en los procesos de transformación fibrilar. Sin embargo, estudios más recientes han evidenciado que diferentes MyHC rápidas ya desarrolladas se coexpresan regularmente en los músculos adultos normales, y no exclusivamente durante el desarrollo, regeneración y denervación muscular, en las transformaciones inducidas eléctricamente, en los cambios hormonales o mediante el entrenamiento físico (Schiaffino y Reggiani, 1996; Talmadge, 2000).

La mayoría de los estudios sobre la musculatura del perro se han llevado a cabo en músculos apendiculares y del tronco (Braund et al., 1978; Snow et al., 1982; Gil, 1986; Diz, 1987; Gil et al., 1987a, b; Latorre, 1990; Latorre et al., 1993a, b, c; Štrbenc et al., 2004; Smerdu et al., 2005; Acevedo y Rivero, 2006; Maccatrozzo et al., 2007; Toniolo et al., 2007). Los primeros establecieron una clasificación basada en la reacción histoquímica frente a la mATPasa. Así se pudieron evidenciar fibras tipo I y los subtipos IIA y IIC, mientras que la presencia de las fibras tipo IIB generó cierta controversia (Braund et al., 1978; Snow et al. 1982; Gil, 1986; Diz, 1987; Gil et al., 1987a, b). En este sentido, Latorre et al. (1993b), siguiendo la línea de investigación de Snow et al. (1982), detectaron un tipo fibrilar en el perro de características tintoriales similares a las fibras IIB de la rata, a las que denominaron fibras II propias del perro. Actualmente, la combinación de técnicas histoquímicas clásicas con técnicas inmunohistoquímicas, marcado electroforético, hibridación *in situ* y análisis de la expresión del ARN (Štrbenc et al., 2004; Smerdu et al., 2005;

Acevedo y Rivero, 2006; Maccatrozzo et al., 2007; Toniolo et al., 2007) ha permitido diferenciar en la especie canina los mismos tipos fibrilares que se observan en el resto de mamíferos. De este modo, los músculos apendiculares y del tronco de perros adultos poseen fibras tipos I, IIA, IIC y IIX; siendo este último tipo fibrilar el que se corresponde con las denominadas fibras II propias del perro. También se han descrito formas híbridas con mucha variedad de combinaciones, así como la aparición de isoformas menos habituales, en determinados músculos muy especializados: la isoforma cardíaca en la musculatura del corazón, las fibras IIB en los músculos oculares y laríngeos, las fibras IIM en los músculos masticadores, las fibras IIEO en los músculos extraoculares o las isoformas neonatal y embrionaria, descritas durante el desarrollo muscular (Štrbenc et al., 2004; Smerdu et al., 2005; Acevedo y Rivero, 2006; Maccatrozzo et al., 2007; Toniolo et al., 2007).

A pesar de lo expuesto, la composición fibrilar de determinados músculos esqueléticos, con funciones muy específicas o complejas, ha sido escasamente referenciada en esta especie. Entre ellos se encuentran los músculos que son objeto de estudio en la Tesis Doctoral. Los músculos de la lengua (músculos geniogloso, hiogloso, estilogloso y lingual propio), del paladar y fauces (músculos palatino, elevador del velo palatino, tensor del velo palatino y palatofaríngeo) y de la faringe (músculos estilofaríngeo caudal, terigofaríngeo, hiofaríngeo, tirofaríngeo y cricofaríngeo) intervienen, de manera decisiva, en las fases voluntaria y refleja de la deglución, además de colaborar en mecanismos tan importantes como el mantenimiento de la permeabilidad en las vías respiratorias superiores, el eructo, la regurgitación, el vómito y la emisión de sonidos.

Los músculos referidos presentan características especiales que podrían hacerlos diferentes al resto de músculos estriados esqueléticos. Los escasos estudios publicados en el perro revelan la existencia de una amplia heterogeneidad de tipos fibrilares y la reacción atípica en muchos de estos miocitos. (Ryu, 1981; Mascarello et al., 1982; Rowleron et al., 1983; Mu y Sanders, 1998, 2000; Hyodo et al., 1998, 1999; Wu et al. 1998, 2000).

Otro aspecto interesante a considerar es el relativo a la peculiar distribución que presentan las fibras en algunos de estos músculos. Así por ejemplo, el músculo geniogloso se encuentra dividido en compartimentos con distinta composición fibrilar en cada uno de ellos (Mu y Sanders, 2000). Algo parecido acontece en el músculo cricofaríngeo de la especie humana (Mu y Sanders, 2001 y 2002; Mu et al., 2007a, b). Otros músculos dispuestos topográficamente próximos, evidencian composiciones de miocitos completamente opuestas. Así se observa en los músculos constrictores caudales de la faringe, tanto en la especie canina como en otras especies (Ibebunjo, 1993; Immamura et al., 1998; Hyodo et al., 1998 y 1999; Mu y Sanders, 2001 y 2002; Mu et al., 2007a, b).

El **objetivo principal** de la Tesis Doctoral que presentamos consiste en la catalogación y descripción histo e inmunohistoquímica de los tipos de fibras que integran los músculos de la lengua, paladar, fauces y faringe del perro. Con ello intentamos mejorar el conocimiento que sobre estas entidades musculares se tiene, no sólo desde las ópticas histológica y fisiológica sino también desde el punto de vista anatomopatológico, dado el especial interés que suscita esta especie como modelo biológico para la comprensión de mecanismos patogénicos y para el estudio de terapias aplicadas a la especie humana (Kornegay et al., 1988; Cooper et al., 1988; Sampaolesi et al., 2006). Del mismo modo que en esta especie, el estilo de vida, las adaptaciones del músculo esquelético al desuso y a la vida sedentaria, así como al entrenamiento y al envejecimiento, tienen su equivalencia en la especie canina. La publicación de numerosos artículos sobre estas temáticas durante los últimos años (Štrbenc et al., 2004; Smerdu et al., 2005; Childers et al., 2005; Acevedo y Rivero, 2006; Bergrin et al., 2006; Maccatrozzo et al., 2007; Toniolo et al., 2007) corrobora este creciente interés, siendo otro de los motivos que hemos tenido en consideración para el planteamiento del trabajo.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. EL MIOCITO O FIBRA MUSCULAR

El **miocito** o fibra muscular constituye la unidad celular básica del tejido muscular estriado esquelético. Los miocitos individuales se unen integrando **haces o fascículos primarios**. Dichos fascículos primarios a su vez se asocian para constituir el músculo, que queda envuelto por tejido conjuntivo de considerable grosor y densidad, con abundante colágeno, denominado **epimisio**. Los fascículos primarios también aparecen rodeados por fibras densas de colágeno, el **perimisio**, que concede fijación a los haces adyacentes (tejido conjuntivo interfascicular) y porta la irrigación e inervación de los mismos. Dentro de estos fascículos primarios, los miocitos se ven rodeados por una fina red de tejido conjuntivo con fibras de colágeno y de reticulina, así como de capilares sanguíneos y fibras nerviosas terminales. A esta última envoltura se le denomina **endomisio**. El tamaño de los haces primarios está íntimamente relacionado con la funcionalidad del músculo. Así, los músculos que intervienen en movimientos delicados y altamente especializados (por ejemplo, los

músculos del globo ocular) presentan fascículos de pequeño tamaño con una alta proporción de perimio (Figura 1). Por el contrario, los músculos implicados en movimientos de mayor recorrido y menor especialización, como pueden ser los músculos locomotores, tienen menor proporción de perimio y sus fascículos son de gran tamaño (Figura 2).

La unidad celular básica del músculo esquelético, la fibra muscular, es una célula de gran longitud (1-40 mm) y diámetro variable (10-120 μm), formada a partir de la fusión de numerosas células mononucleares, los **mioblastos**, constituyendo un sincitio continuo dentro del cual se encuentran aislados multitud de núcleos (Dellmann y Brown, 1980; Dellmann, 1994). La membrana del miocito recibe el nombre de **sarcolema**, mientras que su citoplasma se denomina **sarcoplasma**. En el sarcoplasma se disponen los elementos contráctiles del músculo, los **miofilamentos** agrupados en **miofibrillas**, además de otras estructuras citoplasmáticas tales como mitocondrias, aparato de Golgi, retículo sarcoplásmico, mioglobina, glucógeno y vacuolas lipídicas (Figura 3). La mioglobina es la que confiere la coloración rojiza típica al tejido muscular, interviniendo también en la captación y fijación del oxígeno sanguíneo, para cederlo después a las mitocondrias. Las miofibrillas son las unidades contráctiles de la fibra muscular. Resultan de la asociación ordenada de miofilamentos: proteínas contráctiles de diámetro y estructura bioquímica diferentes. Existen dos tipos de miofilamentos. Por un lado, los **miofilamentos gruesos** o **tipo A** constituidos fundamentalmente por **miosina**, molécula lineal con forma de “bastón de golf” cuya longitud es de unos 200 nm y 2-3 nm de diámetro, provista de una doble cabeza, que en situaciones óptimas se agrega en filamentos gruesos. Esta doble cabeza presenta actividad enzimática adenosín trifosfatasa miofibrilar (**mATPasa**), aspecto importante al considerarse como criterio para establecer determinadas clasificaciones histoquímicas de la fibra muscular. Por otro lado, los **miofilamentos finos** o **tipo I** en los que predomina la **actina**, proteína globular de bajo peso molecular (42 kd), que a pH fisiológico polimeriza formando una hélice de doble filamento. Para constituir la miofibrilla ambos miofilamentos se disponen paralelos entre sí y al eje de contracción del miocito, de forma ordenada y alternante,

ocupando gran parte del sarcoplasma y confiriendo el aspecto estriado típico a la fibra muscular (**Figura 4**).

Los miocitos o fibras musculares se pueden clasificar en dos tipos:

a) **Fibras extrafusales**. Representan el componente mayor del tejido muscular. Se distribuyen de forma uniforme por el fascículo primario y responden a la descripción general referida para el miocito. Tienen la particularidad de que sus núcleos se sitúan en la periferia, próximos al sarcolema (posición subsarcolémica), de forma ovalada, una longitud media entre 8 y 10 μm y su número suele superar varios centenares. Estas fibras extrafusales, según el recorrido dentro del músculo, las agrupamos en:

-**fibras cilíndricas**, recorren toda la longitud del músculo desde el origen a la inserción.

-**fibras cónicas**, sólo se unen por un extremo al punto de inserción. Su otro extremo termina en el propio músculo, adherido con fuerza a los tabiques de tejido conjuntivo.

-**fibras fusiformes**, se disponen en el vientre muscular, sin asociarse a ninguno de sus extremos (Maillet, 1980).

b) **Fibras intrafusales**. Están en menor número y no responden a la descripción general del miocito. Los núcleos en estas fibras no se sitúan a nivel subsarcolémico sino en el interior de ellas, ya sea en cadena (**núcleos en cadena**) o concentrados en una dilatación de la fibra (**saco nuclear**). Este tipo de fibras se dispone en los denominados **husos neuromusculares**, mecanorreceptores que responden de forma específica a las variaciones activas o pasivas de la longitud muscular (Maillet, 1980). Los husos lo integran también gran cantidad de tejido conjuntivo que rodea a las fibras, así como terminaciones nerviosas sensoriales o aferentes y motoras o eferentes.

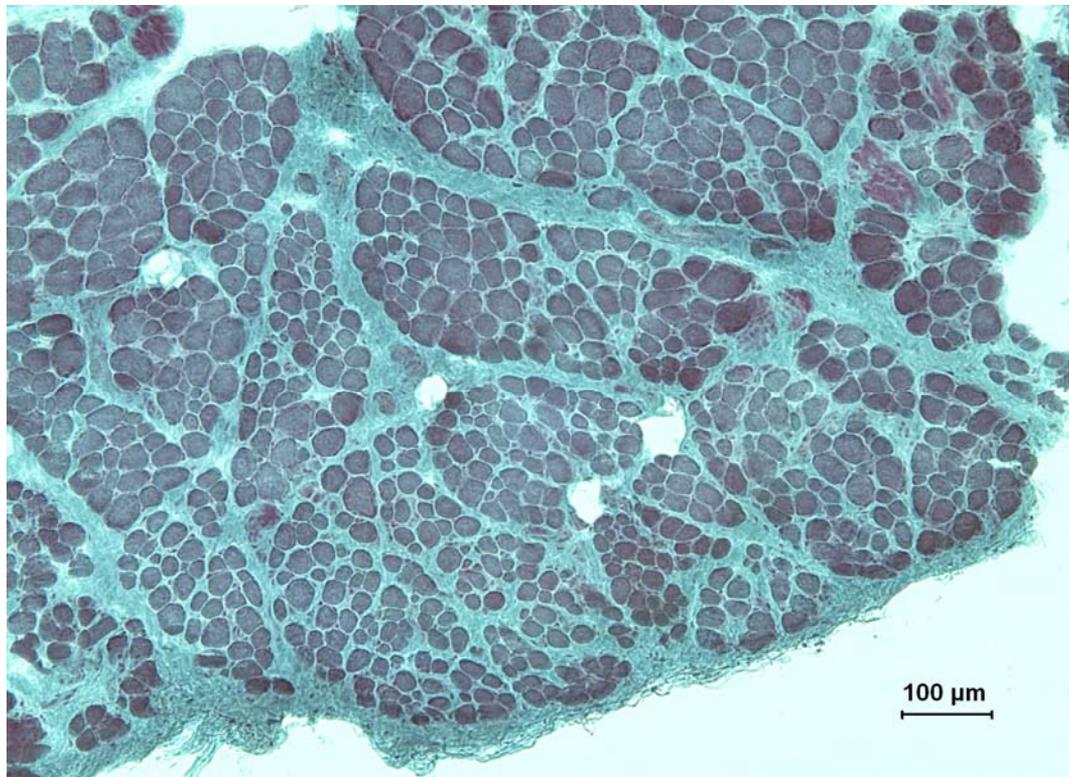


Figura 1. Sección transversal del *m. oblicuo dorsal* del perro. Técnica Tricrómico de Gomori modificado. Las fibras musculares se agrupan en **fascículos primarios**. El tejido conjuntivo se diferencia en **epimisio, perimisio y endomisio**.

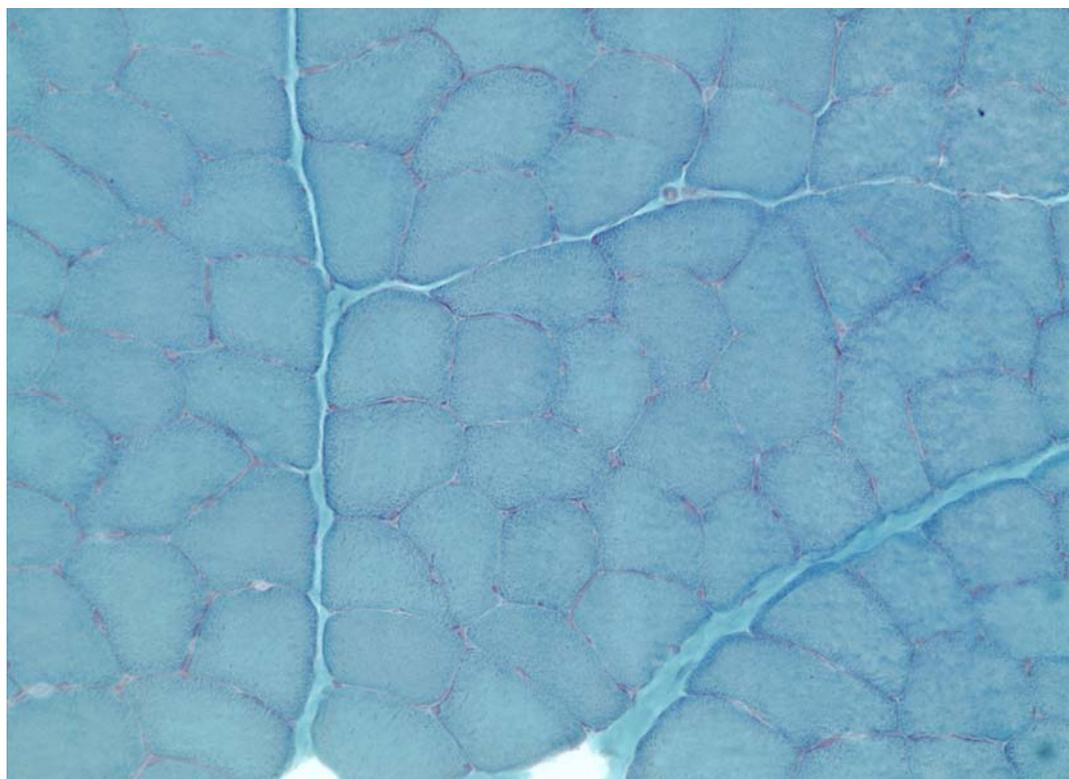


Figura 2. Sección transversal del *m. vasto lateral* del perro. Técnica Tricrómico de Gomori modificado. Fascículos de gran tamaño y menor proporción de perimisio.

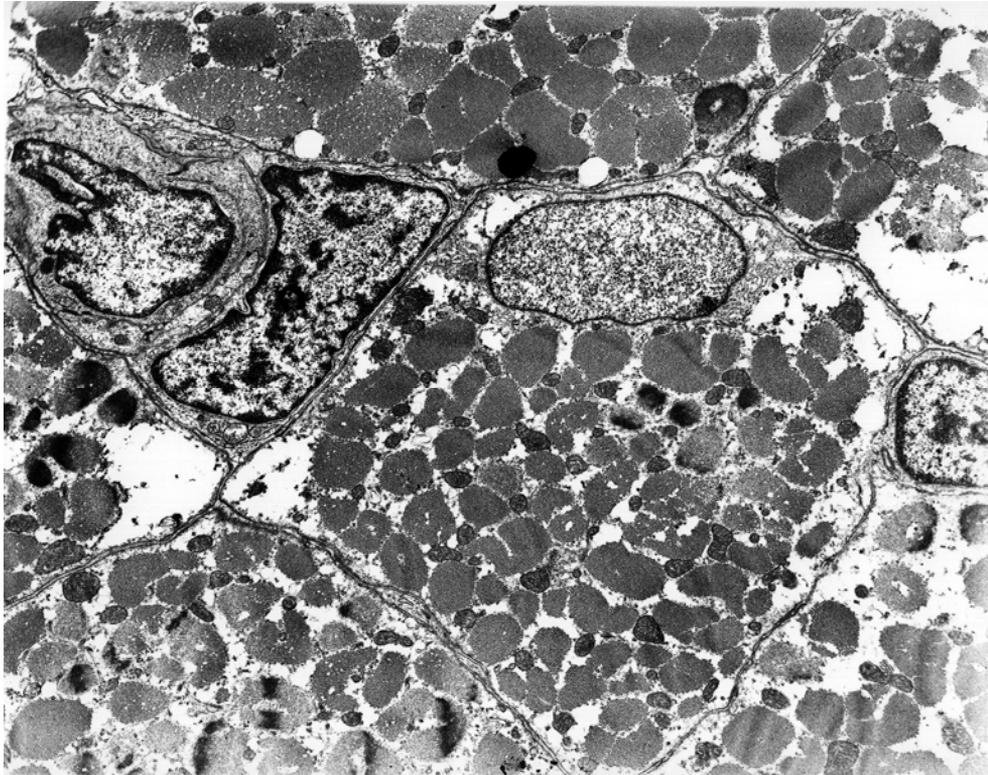


Figura 3. Sección transversal de una fibra muscular **extrafusal** observada al microscopio electrónico. Se puede apreciar el **núcleo** periférico, el **sarcolema**, las **miofibrillas**, y otras estructuras sarcoplasmáticas como las **mitocondrias**.

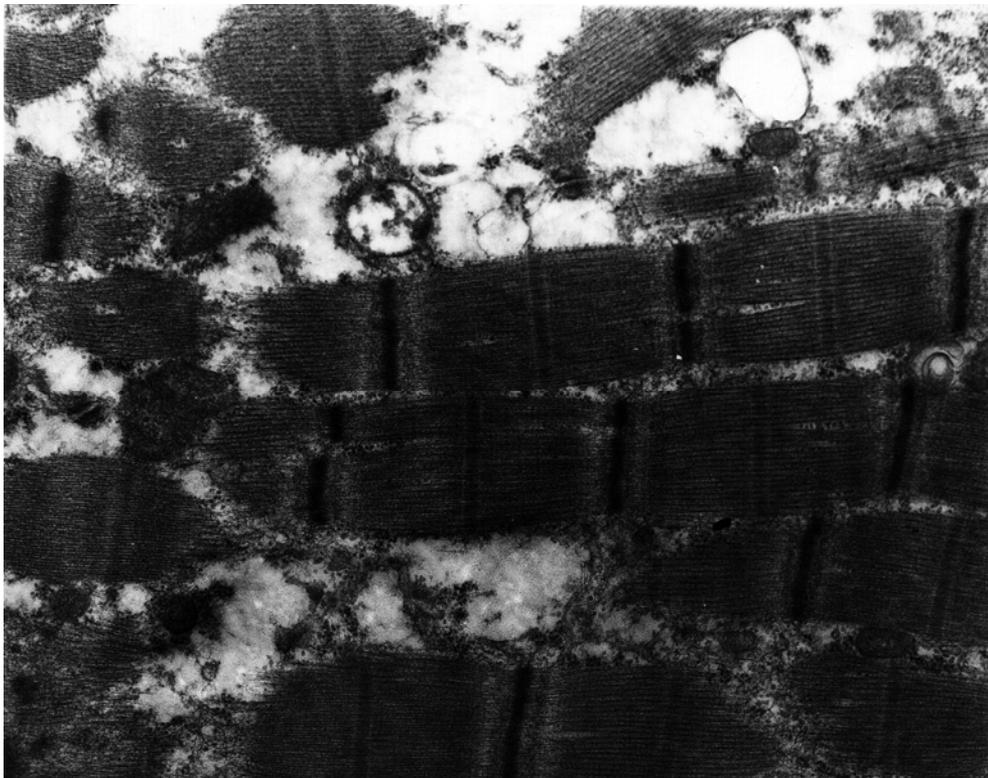


Figura 4. Sección longitudinal de varias miofibrillas observadas al microscopio electrónico. Se distinguen los **sarcómeros**, así como el solapamiento entre miofilamentos de **miosina** y **actina**.

Respecto a la innervación motora de los miocitos, referir que los somas de las **neuronas motoras** que alcanzan las fibras musculares se localizan en el asta ventral de la médula espinal y en el tronco del encéfalo. Cada neurona motora inerva a un número determinado de fibras musculares del mismo músculo. El grupo de fibras musculares innervado por una sola neurona se denomina **unidad motora**. En la unión neuromuscular, el axón constituye una **ramificación terminal** que con frecuencia presenta terminaciones bulbosas. Esta ramificación terminal asienta sobre una elevación del sarcoplasma o **montículo de Doyère**. La unión de la ramificación y el montículo determina la **placa motora terminal**. La mayoría de las fibras musculares presentan una placa motora terminal hacia la mitad de su eje longitudinal. Las uniones neuromusculares se establecen en las fases iniciales del desarrollo embrionario, con posterioridad cada extremo de la fibra recibe una cantidad considerable de material contráctil nuevo, quedando la placa motora terminal en el centro de la misma. Generalmente, se considera que el número de fibras en una unidad motora depende de la precisión con la que deba contraerse el músculo para ejecutar su función normal. Según este principio, las unidades motoras resultan pequeñas en músculos muy precisos y al contrario en músculos menos especializados, que, por otra parte, poseen fascículos de gran tamaño.

II.2. CLASIFICACIÓN DE LOS TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES

II.2.1. Antecedentes históricos

Stefano Lorenzini¹ en 1678 clasificó, por vez primera, los músculos de los mamíferos en **rojos** y **blancos**. A partir de esta publicación, diversos investigadores comenzaron una serie de trabajos, tratando de correlacionar el color muscular con las características fisiológicas y estructurales propias del miocito. En el siglo XIX Ranvier¹ (1873, 1874, 1880), al estudiar diferentes músculos del conejo, confirmó el mayor aporte sanguíneo en el músculo rojo y estableció una relación entre el color

muscular y la velocidad de contracción. Así, comprobó que las fibras rojas poseían una velocidad de contracción **lenta** y las fibras blancas **rápida**.

Kolliker¹ (1857) tipificó las fibras en función de su contenido en gránulos, relacionándolo con el metabolismo fibrilar. Dicho hallazgo fue contrastado más tarde por Srutzner¹ (1884), quien indicó que el color rojo de los miocitos dependía de la presencia de gránulos sarcoplásmicos, que predominaban en las fibras de pequeño tamaño. Seis años más tarde Retzius¹ (1890), propone denominar a estos gránulos como “sarcosomas” (mitocondrias) y Knoll¹ (1891) cataloga a las fibras según la cantidad de citoplasma en fibras **oscuras** (ricas en citoplasma) y fibras **claras** (pobres en citoplasma). Este último autor, también observó que los músculos implicados en actividades constantes (por ejemplo los músculos oculomotores, respiratorios y masticadores) poseían una mayor cantidad de fibras oscuras con gránulos de naturaleza lipídica. Por último, refirió que los músculos podían estar únicamente formados por fibras oscuras o claras, según el mayor o menor contenido en grasa, respectivamente, o bien ser de naturaleza mixta.

Mediante la técnica selectiva de tinción lipídica del Sudán III, Bullard¹ (1919) diferencia por vez primera tres tipos fibrilares en músculos de gato. En consonancia con la catalogación de Knoll¹ (1891), clasifica las fibras en **oscuras**, **intermedias** y **claras** acorde con su mayor o menor contenido en grasa. Estudia la proporción y tamaño de estas fibras, refiriendo su variabilidad en función del músculo analizado. Más tarde Denny y Brown¹ (1929), siguiendo la hipótesis de Bullard¹ (1919), intentan correlacionar las características histológicas de los tipos de fibras con la velocidad de contracción en músculos del gato, aunque no lo consiguen.

Por último, Bensley y Hoerr¹ (1934) establecen relación entre la densidad mitocondrial y la actividad respiratoria, mediante centrifugación para localizar determinadas enzimas en distintas fracciones musculares. Paul y Sperling¹ (1952), además de confirmar dicha correlación, evidenciaron que en músculos pobres en

¹ Autores citados por Dubowitz (1985)

mitocondrias, músculos blancos, la actividad respiratoria era menor que en músculos rojos ricos en mitocondrias.

II.2.2. Clasificación fibrilar mediante técnicas histoquímicas

Las técnicas histoquímicas aplicadas al estudio de las fibras musculares durante la segunda mitad del siglo XX, que possibilitaban localizar diversos enzimas entre otros componentes químicos a nivel celular, representaron una gran ayuda para su clasificación. Al aplicar dichas técnicas se pudo evidenciar las diferencias funcionales y metabólicas de los diversos tipos fibrilares, demostrándose definitivamente la existencia de una relación directa entre su morfología y actividad funcional.

Fundamentalmente existen dos métodos histoquímicos para diferenciar los distintos tipos fibrilares en el músculo esquelético. Por un lado, los basados en detectar la actividad de la **enzima adenosin trifosfatasa miofibrilar** o **miosínica (mATPasa)** y, por otro, los basados en la detección de **enzimas mitocondriales**, directamente relacionadas con el tipo de metabolismo (aerobio o anaerobio) de los miocitos.

Antes del auge de la histoquímica muscular, Semenoff (1935) mediante la técnica clásica del azul de metileno, que posibilita detectar la actividad del **enzima succínico deshidrogenasa (SDH)**, halló diferencias entre las fibras musculares de los anfibios. Asimismo, Seligmang y Rutenburg (1951) y Padykula (1952) encontraron variaciones fibrilares en el músculo esquelético de la rata, mediante técnicas enzimáticas más depuradas que las utilizadas por Semenoff (1935). De hecho, Padykula y Herman (1955), establecieron el método original de detección de la actividad de la enzima mATPasa. Con posterioridad, Wachstein y Meisel (1955) y Buño y Germino (1958), estudiando la actividad SDH en distintos músculos, indicaron que en músculos como el diafragma y el masetero, la actividad era mucho más elevada que en músculos apendiculares. A su vez, Nachmias y Padykula (1958)

denotaron la existencia de una mayor actividad SDH en las fibras de menor tamaño, que, además, poseían mayor número de mitocondrias por unidad de área.

Ogata (1958), analizando músculos de peces, aves, mamíferos y anfibios, en base también a la actividad SDH, estableció una diferenciación fibrilar en tres tipos. Fibras de gran tamaño y escasa actividad enzimática, las fibras **blancas**; fibras de pequeño tamaño y con una actividad enzimática elevada, las fibras **rojas**; y, por último, fibras a las que denominó **intermedias**, cuyos parámetros de tamaño y actividad enzimática se encontraban entre los referidos anteriormente.

Dubowitz y Pearse (1960 a, b), mediante la detección de diversos enzimas mitocondriales oxidativos relacionados con la actividad glucolítica de la fosforilasa en músculos de diferentes especies (rata, paloma y hombre), encontraron una actividad recíproca entre la actividad de los enzimas oxidativos respecto al enzima de actividad glucolítica. De este modo, establecieron una nueva clasificación de las fibras solo en dos tipos, siguiendo criterios enzimáticos y morfológicos:

Fibras tipo 1: pequeño diámetro, alta actividad oxidativa y baja actividad glucolítica.

Fibras tipo 2: gran diámetro, baja actividad oxidativa y alta actividad glucolítica.

En este trabajo se puso de manifiesto que los miocitos utilizaban, fundamentalmente, dos fuentes principales de energía en la contracción muscular. Así, las fibras tipo 1 utilizarían los lípidos para obtener energía, mientras que las fibras tipo 2 recurrirían al glucógeno intracelular. Se sugiere, en base a ello, que las fibras tipo 1 estarían implicadas en contracciones prolongadas y sostenidas en el tiempo, y se corresponderían con las fibras “rojas” descritas en publicaciones anteriores. En contraposición, las fibras tipo 2, que se asimilarían a las fibras “blancas”, actuarían en movimientos rápidos y de corta duración.

En 1962 Engel, analizando biopsias de músculo humano, clasificó las fibras en dos tipos, aunque el criterio fue la actividad de los miocitos frente a la enzima ATPasa miofibrilar. Las fibras con una baja actividad frente a esta enzima fueron clasificadas como tipo 1, y las que tenían alta actividad como tipo 2 (**Figuras 5 y 6**).

Ese mismo año, Stein y Padykula (1962), combinando técnicas en las que enfrentaban los miocitos del músculo gastronemio de la rata a la actividad SDH, ATPasa miofibrilar y esterasas, clasificaron las fibras en tres tipos. El criterio fue principalmente el de la actividad SDH, concluyendo que tal actividad estaba en relación muy estrecha con el número de mitocondrias, y observando también comportamientos distintos de las denominadas fibras de contracción rápida en su actividad ATPasa, al realizar diferentes preincubaciones con formaldehído. Esta clasificación fue similar a la propuesta por Ogata (1958). Los tipos fibrilares los denominaron como **fibras tipo "A"**, que serían las clásicas fibras blancas de gran tamaño y escaso contenido mitocondrial, en tanto que las **fibras tipo "B"** y **"C"**, correspondientes a las clásicas fibras rojas, se diferenciaban por el número mitocondrial. Las fibras tipo "B" con un valor intermedio y las fibras tipo "C" con un número muy alto.

Romanul (1964), mediante una combinación de técnicas bioquímicas e histoquímicas, aplicando una serie de cambios en las actividades relativas de gran número de reacciones enzimáticas, entre las que se incluían las citocromo oxidadasas, diaforasas, fosforilasas, esterasas y diversas deshidrogenasas, identificó hasta ocho perfiles histoquímicos en los músculos gastronemio y plantar de la rata. Dichos perfiles los hizo corresponder con otros tantos tipos fibrilares, a su vez dentro de tres grupos principales: **fibras tipo I**, que se corresponderían con las clásicas fibras blancas, con escasez de lípidos y mioglobina y un metabolismo, fundamentalmente, anaerobio (bajo metabolismo oxidativo y alta capacidad de glucólisis); **fibras tipo II**, que se caracterizaban por tener elevado ambos metabolismos (oxidativo y glucolítico), gran cantidad de mioglobina y bajo contenido lipídico; y **fibras tipo III**, con un metabolismo básicamente aeróbico (alto metabolismo oxidativo y escaso o nulo lipídico) que, como las fibras tipo II, tienen bajo contenido en grasas y alto en

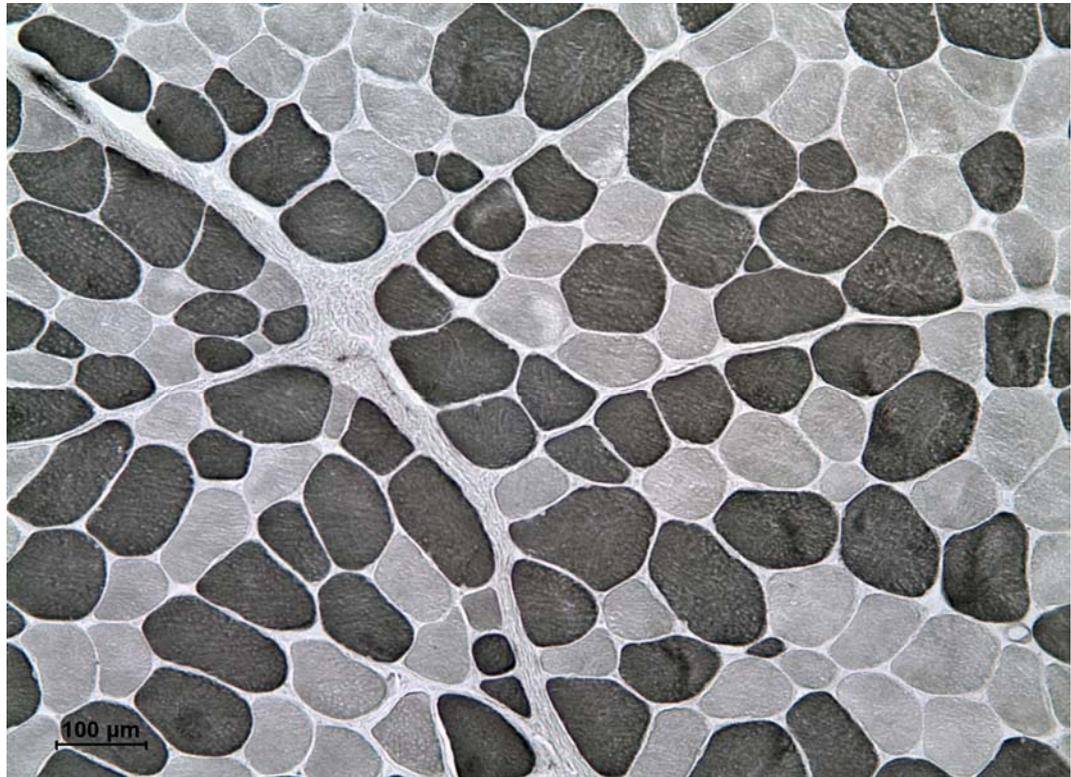


Figura 5. Sección transversal del *m. extensor digitorum común* bovino. Técnica mATPasa alcalina a pH 10,8. Se diferencian dos tipos de miocitos: fibras que reaccionan frente a la mATPasa (tonalidad oscura) y fibras que no reaccionan (tonalidad clara).



Figura 6. Sección transversal del *m. tríceps braquial* bovino. Técnica mATPasa alcalina a pH 10,8. Se evidencian dos tipos fibrilares: miocitos que reaccionan frente a la mATPasa (tonalidad oscura) y miocitos que no reaccionan (tonalidad clara).

mioglobina. Estos dos últimos tipos fibrilares quedarían encuadrados dentro de las fibras rojas clásicas.

En años posteriores continuaron las publicaciones con distintas clasificaciones y denominaciones fibrilares, lo que originó cierta confusión al no concretarse un sistema único de nomenclatura y emplearse criterios diferentes para la tipificación fibrilar. En este sentido, Gauthier y Padykula (1966) y Gauthier (1969), en estudios sobre el músculo diafragma de mamíferos y el músculo semitendinoso del gato, respectivamente, clasificaron las fibras en tres tipos y con la misma nomenclatura que Ogata (1958), si bien en base a la ultraestructura mitocondrial y a la relación entre color muscular y proporción de cada una de estas fibras: **fibras “rojas”**, las de menor tamaño, con grandes mitocondrias de abundantes crestas, distribuidas entre las miofibrillas en posición subsarcolémica; **fibras “blancas”**, las de mayor tamaño, también con mitocondrias grandes, aunque con pocas crestas y situadas en relación con el sarcolema; y **fibras “intermedias”**, similares a las fibras rojas pero con menor número de mitocondrias.

Sréter et al. (1966) y Seidel (1967) observaron la variabilidad frente al pH de la enzima ATPasa, similar a lo publicado por Stein y Padykula en 1962 a distintas preincubaciones con formaldehído. Esta variabilidad sirvió para elaborar técnicas que determinaron, con mayor precisión y fiabilidad, la actividad de las fibras musculares frente a la ATPasa miofibrilar. Así, Guth y Samaha (1969) y Samaha et al. (1970), empleando combinaciones de diferentes pH y la sensibilidad al formaldehído de la actividad mATPasa, diferenciaron tres tipos de fibras musculares que denominaron como **tipo α** , fibras rápidas con una actividad mATPasa alcalino-estable y ácido-lábil; **tipo β** , fibras lentas con actividad alcalino-lábil y ácido-estable, y **tipo $\alpha\beta$** , fibras rápidas, como las primeras, pero con características de acidez y alcalinidad intermedias entre las dos anteriores.

En la misma línea que estos últimos autores Brooke y Kaiser (1970), realizando preincubaciones y variaciones de pH (9,4 4,6 y 4,3) en la técnica de la

mATPasa aplicada a las fibras musculares humanas, llegaron a conclusiones parecidas, variando algo la nomenclatura. Así establecieron dos tipos principales de fibras musculares y, dentro de cada uno de ellos, dos y hasta tres subtipos (**Figuras 7 y 8**), con las siguientes características:

Fibras tipo I: poseen una actividad mATPasa alcalino-lábil y ácido-estable (como las fibras β de la clasificación de Samaha et al. en 1970). Tinción fuerte con preincubaciones ácidas y ausencia de tinción con preincubaciones alcalinas.

Fibras tipo II: poseen una actividad mATPasa alcalino-estable y su estabilidad a pH ácido varía, lo que determina que aparezcan tres subtipos:

Fibras tipo IIA: fibras lábiles frente a pH ácido (como las fibras α de la anterior clasificación). Al contrario que las fibras tipo I, se tiñen con preincubaciones alcalinas y no lo hacen con preincubaciones ácidas.

Fibras tipo IIB: fibras parcialmente estables a pH ácido. Tinción fuerte con preincubaciones alcalinas, algo de tinción en rangos de pH ácidos hasta el valor de 4,6 y ausencia de tinción por debajo de este pH.

Fibras tipo IIC: fibras ácido-estables. Se tiñen en los dos rangos de pH, dejando de hacerlo a pH ácido cuando su valor está por debajo de 3,9.

Estos dos últimos subgrupos se corresponderían con el tipo $\alpha\beta$ propuesto por Samaha et al. (1970). En publicaciones posteriores (Brooke et al., 1971) observaron que las fibras tipo IIC eran escasas en músculos de adulto, pudiendo tratarse de fibras en evolución hacia los otros dos subtipos de fibras tipo II (fibras tipo IIA y IIB).

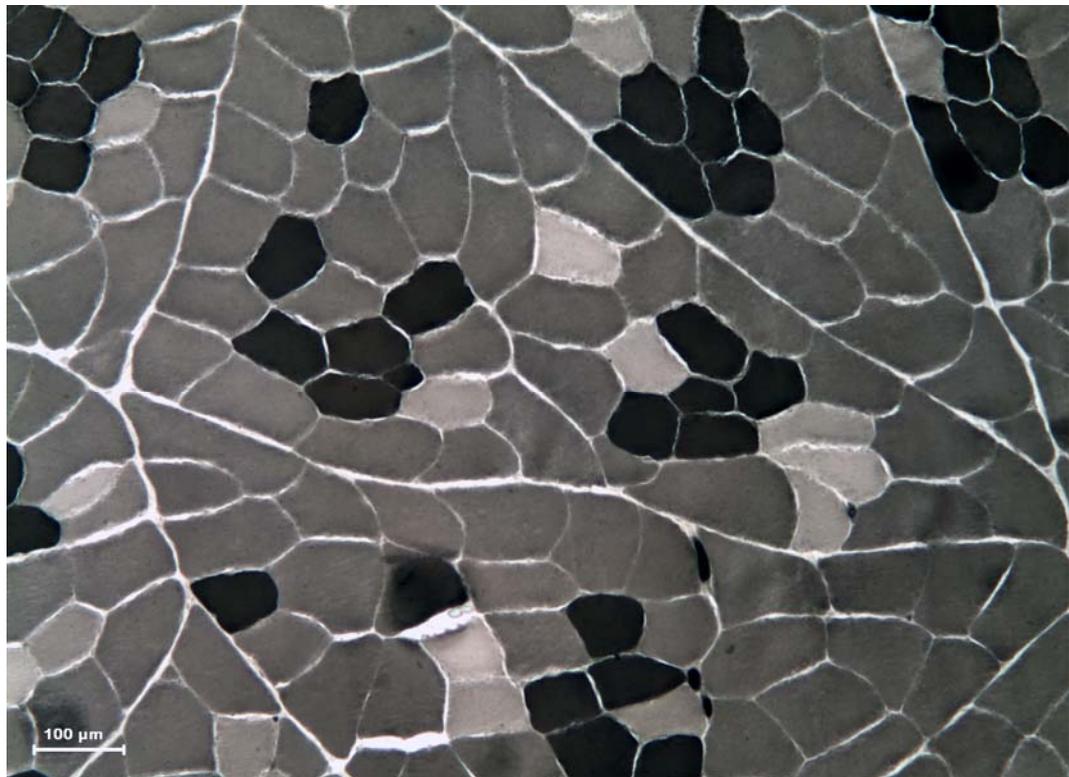


Figura 7. Sección transversal del *m. longissimus lumbar* porcino. Técnica mATPasa ácida a pH 4,6. Se diferencian tres tipos de fibras: tipo I (oscuras), IIA (claras) y IIB (intermedias).

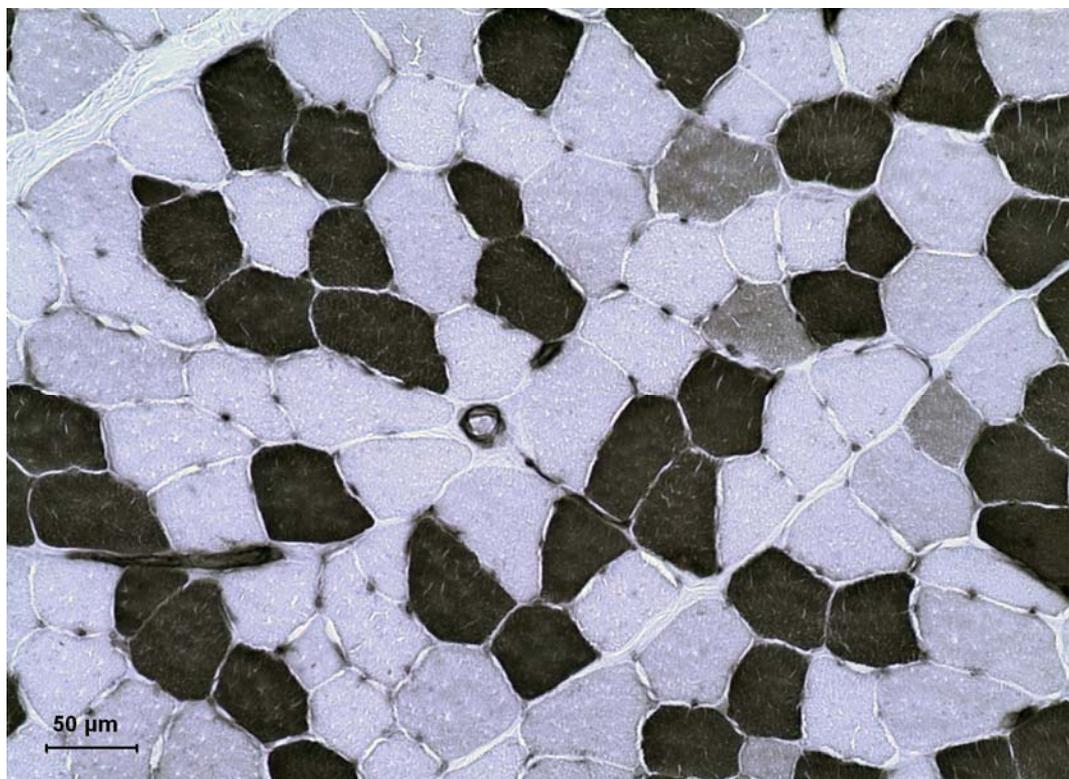


Figura 8. Sección transversal del *m. pectineo* canino. Técnica mATPasa ácida a pH 4,3. Esta técnica permite diferenciar las fibras tipo IIC (tinción intermedia) de las restantes fibras: tipo II (claras) y tipo I (oscuras).

Ashmore y Doerr (1971), en estudios realizados sobre musculatura esquelética de ratones, cerdos, pollos y bovinos, al comparar la actividad glucolítica de la fosforilasa con la actividad oxidativa de la SDH, establecen tres tipos de fibras. Siguiendo la nomenclatura, con algunas variaciones, propuesta por Samaha et al. (1970) las denominan como: fibras **tipo α W**, blancas (“white”) con actividad mATPasa ácido-lábil; fibras **tipo β R**, rojas (“red”) con actividad alcalino-lábil y fibras **tipo α R**, rojas (“red”) con actividad ácido-lábil como las primeras.

Otro tipo de clasificación, basado en la capacidad oxidativa y/o glucolítica de las fibras y en su velocidad de contracción, fue la establecida por Peter et al. (1972) al analizar músculos del miembro pelviano del cobaya y conejo (**Figuras 9 y 10**). Estos autores diferenciaron las siguientes fibras:

Fibras SO (“slow-oxidative” o lenta-oxidativa), con metabolismo aeróbico (oxidativo) y velocidad de contracción lenta.

Fibras FG (“fast-glycolytic” o rápida-glucolítica), con metabolismo anaeróbico (glucolítico) y velocidad de contracción rápida.

Fibras FOG (“fast-oxidative-glycolytic” o rápida-oxidativa-glucolítica), con una velocidad de contracción rápida y ambos tipos de metabolismo.

Diversos autores (Meijer, 1970; Khan et al., 1972; Müntener, 1979; Mabuchi y Sréter, 1980; Gollnick et al., 1983; Staron et al., 1983; Gollnick y Matoba, 1984; Matoba y Gollnick, 1984), realizando variaciones en el método original establecido por Padykula y Herman (1955) para la clasificación fibrilar según su actividad mATPasa, sugirieron la existencia de nuevos subtipos de fibras rápidas e identificaron también subtipos dentro de las fibras lentas. Se describieron los subtipos **IA** y **IB** dentro de las fibras tipo I (Jenekens et al., 1974; Khan et al., 1974; Askanas y Engel, 1975; Karpati et al., 1975; Dekleva y Sirca, 1978; Khan, 1978;

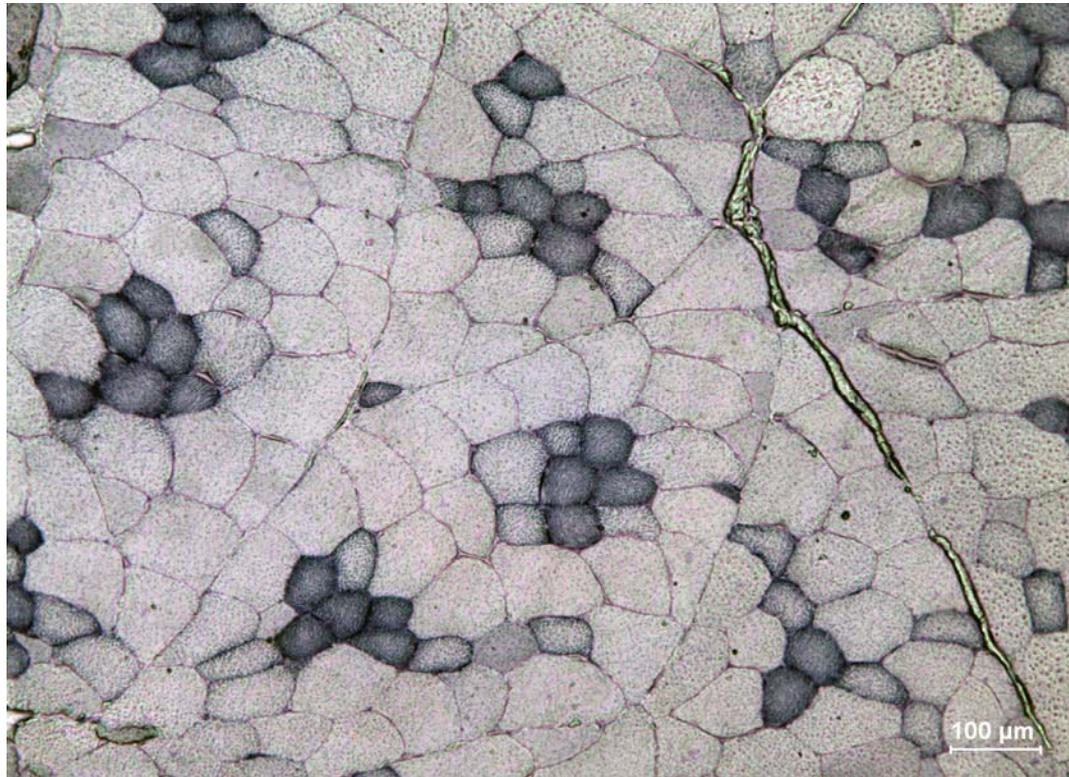


Figura 9. Sección transversal del *m. longissimus lumbar* porcino. Técnica NADH-TR. Se pueden evidenciar tres tipos de miocitos: los que demuestran una alta capacidad oxidativa (tonalidad oscura), intermedia (tonalidad clara) y escasa o nula (ausencia de tinción).

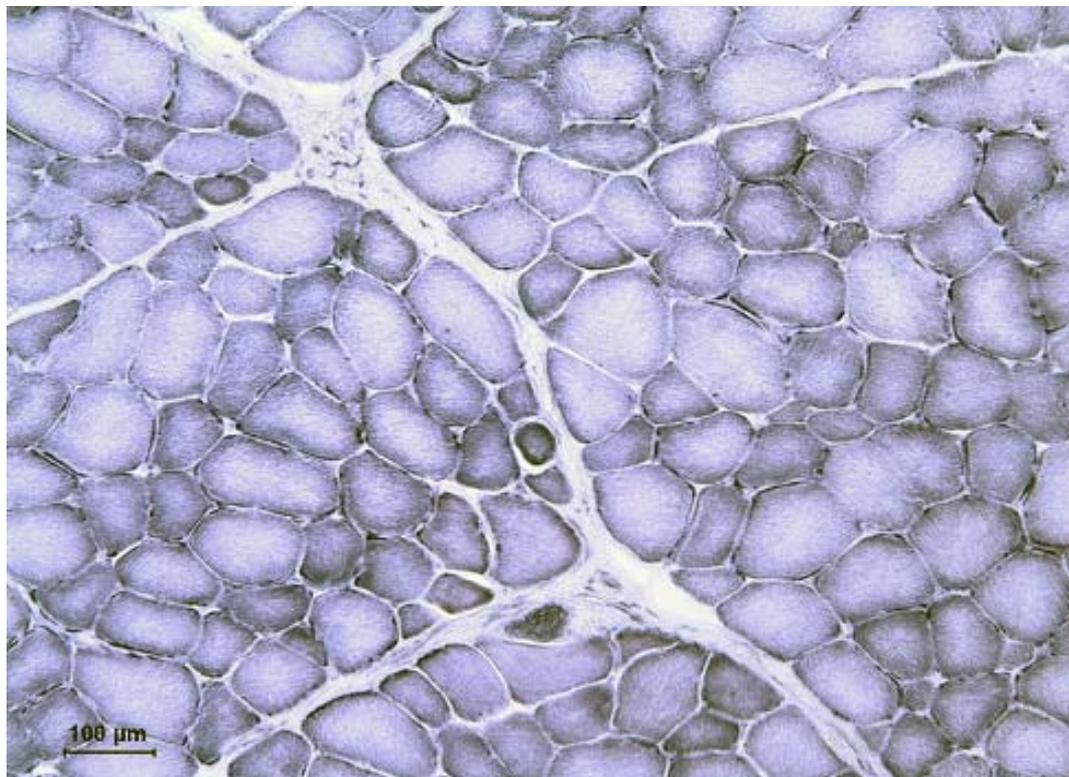


Figura 10. Sección transversal del *m. triceps braquial* bovino. Técnica NADH-TR. Tres tipos de fibras pueden ser reconocidos: oxidativas (tinción fuerte); glicolíticas (tinción débil); oxidativas/glicolíticas (tinción intermedia).

Gollnick et al., 1983; Smith et al., 1987). Asimismo subtipos de las fibras IIC (Jansson et al., 1978; Staron y Pette, 1986) y fibras **tipo IIAB** y **tipo IIAC**, que poseían características intermedias entre las fibras tipo IIA y IIB y entre las IIA y IIC, respectivamente (Andersen y Henriksson, 1977; Ingjer, 1978; Staron et al., 1983; Gil et al., 2001a, b).

Por su parte, Edjtehadi y Lewis (1979) establecieron, como Romanul (1964), ocho perfiles histoquímicos diferentes al analizar el músculo flexor digital largo del gato.

El número de clasificaciones y la disparidad de criterios para elaborarlas, siendo la propuesta de Brooke y Kaiser (1970) la más aceptada, seguida por la de Ashmore y Doerr (1971) y la de Peter et al. (1972), creó bastante confusión al tratar de dilucidar definitivamente los tipos fibrilares del músculo esquelético. Por ello la investigación, de manera general, derivó hacia establecer un único método de clasificación o a tratar de correlacionar las distintas denominaciones utilizadas en la determinación fibrilar.

En esta línea Dubowitz y Brooke (1973) establecen una clasificación fibrilar basándose en la reacción oxidativa con las enzimas deshidrogenasa SDH y diaforasa **NADH-TR** (nicotinamida adenina dinucleótido tetrazolium reductasa) o en la reacción mATPasa. Con esta última técnica histoquímica evidenciaron los cuatro tipos de fibras descritos por Brooke y Kaiser en 1970. Es decir, los tipos I, IIA, IIB y IIC, que se complementarían con el perfil metabólico que marca su reacción frente a los enzimas oxidativos. De esta manera, las fibras tipo I y IIC poseerían una alta capacidad oxidativa, las fibras IIA una capacidad moderada y las fibras IIB baja. Estos autores refirieron también que las extrapolaciones entre especies o diferentes musculaturas debían quedar entre interrogantes, ya que hasta el momento únicamente se habían realizado estudios parciales en determinadas entidades musculares, correlacionando propiedades histológicas, histoquímicas y funcionales.

En cuanto a las comparaciones entre las distintas clasificaciones propuestas por los autores citados, inicialmente se creyó que las fibras β , α y $\alpha\beta$ de Samaha et al. (1970) equivalían a los tipos de fibras I, IIA y IIB de Brooke y Kaiser (1970) y a las fibras SO, FOG y FG, respectivamente, de Peter et al. (1972). Después se comprobó que realmente no eran compatibles los sistemas aplicados para establecer estas clasificaciones. Es decir, no se podía asumir que la diferente actividad fibrilar en la reacción mATPasa se correspondiera con sus propiedades metabólicas, siendo además estudios realizados en pocos músculos y en un número de especies relativamente reducido. En este sentido, Nemeth et al. (1979) y Nemeth y Pette (1980, 1981a, b) señalaron la incompatibilidad de ambos sistemas. Green et al. (1982), demostraron variaciones significativas al comparar los subtipos IIA y IIB con los tipos α y $\alpha\beta$, aunque sí observaron una correspondencia total al equiparar las fibras tipo I con las fibras β . Estos últimos autores refirieron que esta incompatibilidad se debía a la existencia de subpoblaciones adicionales de fibras rápidas, que se expresaban según el músculo o la especie estudiada.

II.2.3. Clasificación fibrilar mediante inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es, a rasgos generales, una metodología que permite la localización y visualización de antígenos en un tejido por medio de anticuerpos específicos. Las técnicas más comunes emplean un anticuerpo secundario, dirigido contra el anticuerpo primario, que se conjuga con un marcador visual (fluorocromo, enzima con un producto de reacción coloreado insoluble o complejo metálico). A nivel del tejido muscular, Kesztyus et al.² (1949) prepararon por vez primera anticuerpos específicos frente a las dos proteínas musculares principales (actina y miosina). Años después Finck et al.² (1956), empleando la metodología de marcado con anticuerpos propuesta por Coons et al.² (1941), localizaron las proteínas musculares en el músculo estriado embrionario. Publicaciones posteriores llevaron a cabo un minucioso estudio de la miogénesis mediante el anticuerpo antimiosina fluorescente en el pollo (Holtzer et al.², 1957) y en el hombre (Engle y Horvath²,

² Autores citados por Allen (1973)

1960). Los avances en las técnicas de hibridación (Kohler y Milstein³, 1975) y la producción de anticuerpos monoclonales específicos frente a las proteínas musculares, así como la gran sensibilidad de la inmunohistoquímica, abrieron una nueva vía, aún vigente, para dilucidar los tipos fibrilares que integran el músculo esquelético en las distintas especies. En el tipificado fibrilar a través de la inmunohistoquímica se identificaron las diferentes formas moleculares (**isoformas**) de las principales proteínas musculares. La proteína más ampliamente analizada con esta metodología ha sido la miosina, molécula que consta de dos cadenas pesadas (**MyHC**) y cuatro cadenas ligeras (**MyLC**). Estas miosinas se diferencian por el modelo electroforético de sus cadenas ligeras (Lowey y Risby, 1971; Hoh et al., 1976; Weeds, 1980) y de sus cadenas pesadas (Weeds y Burridge, 1975; Rushbrook y Stracher, 1979; Billeter et al., 1981). El poder antigénico de la molécula de miosina permitió la incorporación de técnicas inmunohistoquímicas, mucho más específicas, al estudio del músculo esquelético (**Figuras 11 y 12**).

Las cadenas pesadas de miosina determinan la proporción de reacciones de sobrecruzamiento con los filamentos de actina y, por tanto, la velocidad de acortamiento muscular (Reiser et al.⁴, 1985). También controlan la sensibilidad, en las variaciones de pH, de la reacción de rotura de la molécula de ATP por la mATPasa. Son pues las responsables de la intensidad de la tinción histoquímica a diversos pH, tal y como se ve con el procedimiento propuesto por Brooke y Kaiser (1970). Es decir, se comprobó que el grado de tinción mediante la técnica de la mATPasa, con variaciones de pH, estaba relacionado con el tipo y la cantidad de isoforma de miosina que presentaba la fibra (Staron y Pette, 1986, 1987a, b; Termin et al., 1989). Los miocitos que tenían actividades diferentes frente a la mATPasa, contenían distintos isómeros de la molécula de miosina (Weeds, 1980).

Las isoformas de miosina se distribuían de distinta manera, según el tipo de fibra analizado. En primer lugar, tras la aplicación de anticuerpos monoclonales, se identificaron las miosinas existentes en los tipos fibrilares descritos mediante

³ Autores citados por Dubowitz (1985)

⁴ Autores citados por McComas (1996)

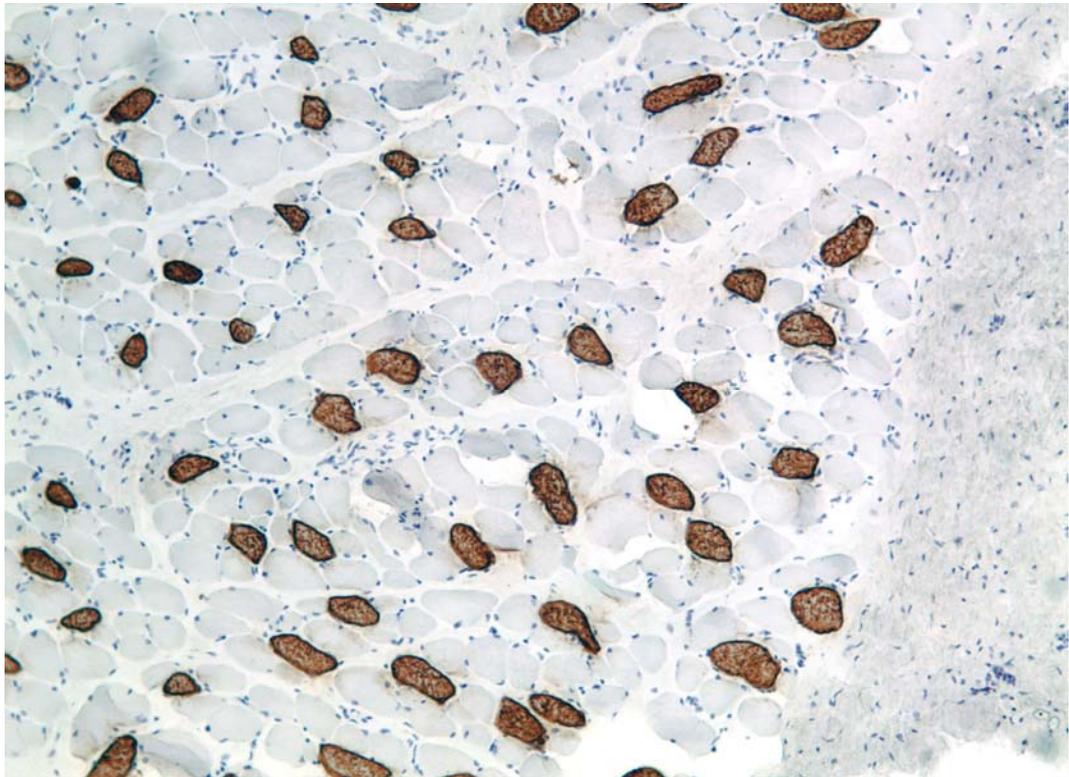


Figura 11. Sección transversal del *m. recto dorsal* del perro. Aplicación del anticuerpo “Anti-Myosin Skeletal Slow”. Marca exclusivamente de tonalidad marrón las fibras que contienen MyHC-I.

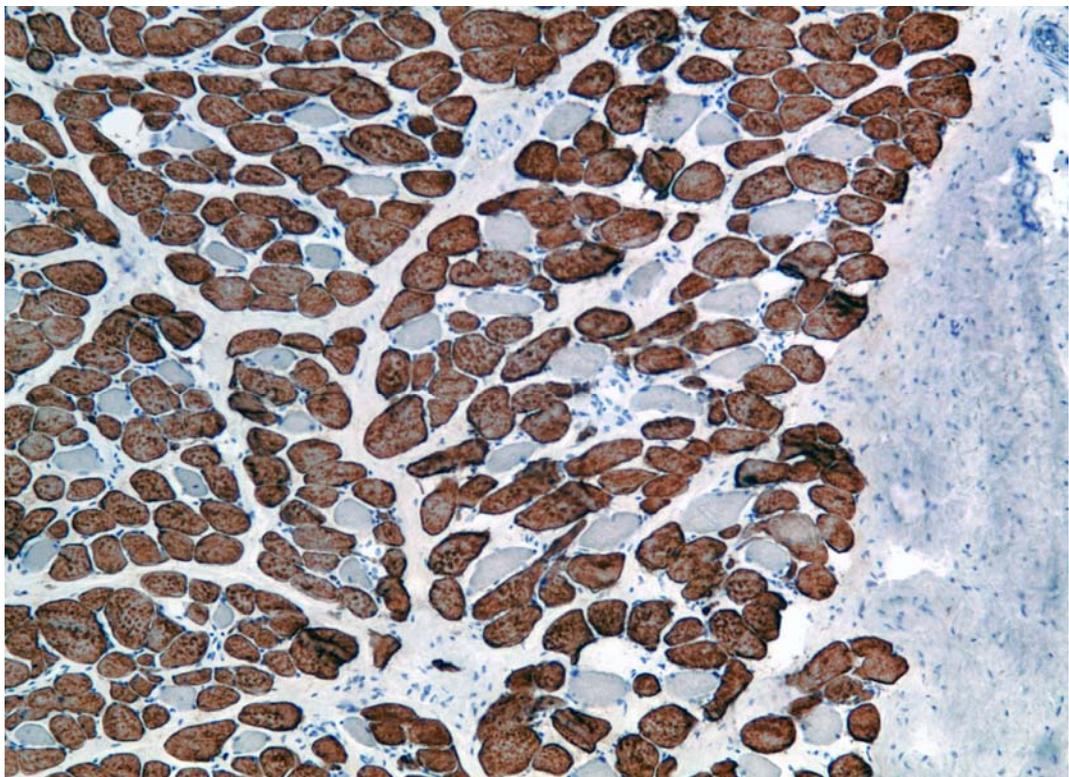


Figura 12. Sección transversal del *m. recto dorsal* del perro. Aplicación del anticuerpo “Anti-Myosin Skeletal Fast”. Marca con un tono marrón todas las fibras que contienen MyHC-II, independientemente del subtipo fibrilar de que se trate.

técnicas histoquímicas. Así, en las fibras tipo I y tipo II se encontraron una miosina tipo lento o “**slow-twitch**” (**MyHC-I**) y dos miosinas de tipo rápido o “**fast-twitch**”, **MyHC-IIa** y **MyHC-IIb**. Estudios que combinaron anticuerpos monoclonales con preincubaciones a distintos pH (ácidos y alcalinos) para la técnica de la mATPasa, permitieron localizar, en algunas especies de mamíferos (cobaya, conejo, rata, ratón), un nuevo tipo de fibra rápida constituida por una cadena rápida de miosina diferente (**MyHC-IIx**), que fue denominada **tipo IIX** (Schiaffino et al., 1989 y Gorza, 1990) o **tipo IID** (Hämäläinen y Pette, 1993). Este nuevo tipo fibrilar, descubierto gracias a la inmunohistoquímica, presentaba características que la situaban entre las de las fibras tipos IIA y IIB, respecto a los enzimas oxidativos (Schiaffino et al., 1986; Schiaffino et al., 1989), la actividad frente a la mATPasa (Gorza, 1990), la resistencia a la fatiga (Larsson et al., 1991) y la velocidad de contracción (Botinelli et al., 1994). Estos últimos autores demostraron que los dos tipos principales de cadena de miosina tenían un papel fundamental en las propiedades contráctiles del músculo. Por último, se comprobó que este nuevo tipo de miosina se correspondía con la encontrada mediante técnicas electroforéticas (Bär y Pette, 1988; Termin et al., 1989; Aigner et al., 1993) en estudios sobre el músculo de rata y conejo, y que había sido denominada como tipo IID.

El aumento de la resolución y el refinamiento de las técnicas empleadas permitieron descubrir nuevas isoformas de cadenas pesadas y ligeras de miosina en el músculo esquelético de los mamíferos domésticos. En concreto, se encontraron dos tipos diferentes de miosina lenta, denominadas “**slow-twitch**” y “**slow-tonic**” o “**tónico-lenta**” en los músculos de aves, reptiles, peces, anfibios y también en los músculos extraoculares de los mamíferos (Ovalle, 1978; Pierobon-Bormioli et al., 1979, 1980; Franzini-Armstrong, 1984; Sartore et al., 1987). Por su parte, Narusawa et al. (1987) describieron dos tipos de miosina en el músculo cardíaco, **atrial** y **ventricular**, aunque estudios posteriores (Schiaffino y Reggiani, 1996) las resumieron en un solo tipo, la atrial. Asimismo, dos tipos de miosina se demostraron durante el desarrollo prenatal: miosinas **embrionaria** y **neonatal** (Whalen et al., 1981). Un tipo de fibra rápida especial se identificó en los músculos de los miembros del perro (fibras tipo **IIDOG**) (Snow et al., 1982), que no se correspondía con las

clásicas fibras IIB glucolíticas, y que poseía una marcada actividad oxidativa y unas características inmunohistoquímicas y mATPásicas que las hacían diferentes de las fibras IIA. Posteriormente, se describieron miosinas rápidas en determinados músculos esqueléticos especializados como los masticadores (fibras **tipo IIM**), músculos estriados del esófago (fibras **tipo IIOES**) y músculos del globo ocular (fibras **tipo IIEO**) (Wieczorek et al., 1985; Sartore et al., 1987). En definitiva, tal y como propusieron Mascarello et al. (1986), un amplio rango de fibras de contracción rápida con diferentes isoformas de miosina, que podrían ser una respuesta del músculo a la diversidad y variedad funcional del mismo. Por otra parte, se estableció la diferenciación entre las fibras que contenían exclusivamente un determinado tipo de miosina, **fibras “puras”**, en contraposición a las denominadas **fibras “híbridas”** que coexpresaban más de un tipo de cadena pesada de miosina (Danieli-Betto et al., 1986; Biral et al., 1988; Gorza, 1990; Lefaucheur et al., 1998). En este sentido, Staron y Pette (1987a, b), combinando técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas, advirtieron que el tipo fibrilar histoquímico IIC coexpresaba las miosinas MyHC-I y MyHC-IIa, en tanto que Schiaffino et al. (1986) también encontraron miosinas embrionaria y neonatal (descritas por Whalen et al., 1981) en la composición de esta fibra. Termin et al. (1989), detectaron fibras “híbridas” en estudios sobre músculos sometidos a estimulaciones crónicas de baja frecuencia, que conseguían la transformación de músculos rápidos en músculo lentos. Este hecho indicaría la presencia de grupos estables de este tipo fibrilar en músculos “normales” (no sometidos a estimulaciones artificiales), lo que denotaría, en consonancia con lo expresado por Mascarello et al. (1986), las necesidades de transformación muscular para poder adaptarse continuamente a diferentes demandas funcionales.

En 1994, Smerdu et al. localizaron la miosina MyHC-IIx, observada con anterioridad en pequeños mamíferos, al estudiar músculos de la especie humana. Serrano et al. (1996) la hallaron en el caballo y Lefaucheur et al. (1998, 2002) en el cerdo. Estos últimos autores, indicaron también la presencia de cuatro isoformas adultas de MyHC descritas por Chang y Fernandez (1997), así como la existencia de un 25% de fibras híbridas tipo IIX/IIB en el músculo longísimo de dicha especie. Otros autores que llegaron a los mismos resultados fueron Chang et al. (2003) y

Toniolo et al. (2004). Por su parte, Gil et al. (2001a) localizaron histoquímicamente un tipo de fibra en el cerdo que podría corresponderse con las referidas IIX. Las conclusiones a las que llegaron Lefaucheur et al. (2002) y Toniolo et al. (2004) fueron que las fibras que habían sido catalogadas como tipo IIB, mediante la técnica histoquímica de la mATPasa, serían en realidad una población heterogénea integrada por fibras “puras” tipo IIX y IIB y fibras “híbridas” tipo IIBX y tipo IIAX.

En resumen, hasta la fecha, nueve isoformas de MyHC han sido descritas en el tejido muscular de los mamíferos (Schiaffino y Reggiani, 1996):

Dos isoformas que aparecen durante el desarrollo del tejido muscular (**embrionaria** y **neonatal**).

Cuatro isoformas del tejido muscular esquelético adulto (**β /lenta** o **tipo I**, y rápidas **tipo 2A, 2B y 2X o 2D**).

Una isoforma específica del músculo cardíaco (**atrial α ó α -cardíaca**).

Una isoforma específica de los músculos extraoculares (**isoforma EO**).

Una isoforma específica de los músculos masticadores (**isoforma M**).

II.3. TIPOS DE FIBRAS Y FUNCIÓN MUSCULAR

Durante todos estos años, los estudios tendentes a dilucidar y clasificar, en base a criterios y metodologías diversas, las distintas fibras musculares siempre han tratado de relacionar el tipo de fibra con algún aspecto funcional del músculo esquelético. El primer término acuñado en los libros de texto generalistas, intentando comprender la entidad muscular como un todo, fue el de “**mosaico fibrilar**”. Es

decir, los distintos miocitos de los mamíferos no tenían por qué estar necesariamente agrupados, sino que se encontraban entremezclados de forma más o menos homogénea. Guth y Yellin⁵ (1971), concluyeron que las fibras musculares experimentaban una alteración continua durante toda su vida como adaptación a demandas funcionales cambiantes y que el “tipo de fibra”, en definitiva, reflejaba exclusivamente su constitución en un momento determinado. En esta línea de pensamiento, para algunos investigadores la categorización histoquímica de las fibras musculares por cualquier método era simplemente una subdivisión útil, aunque artificial, de una variable continua (Billeter et al.⁵, 1980; Hintz et al.⁵, 1980). Dicho en otros términos, las clasificaciones fibrilares simplificaban la realidad, sobre todo al considerar la capacidad de la fibra para adaptarse al trabajo muscular requerido en cada situación. En este sentido, Pette y Staron (1988) propusieron la hipótesis de la “**plasticidad muscular**”, que reflejaba lo expuesto por los anteriores autores. Asimismo, Chang et al. (2003), al estudiar el músculo del cerdo, expusieron que no debería asumirse que un mismo tipo de fibra identificado en distintos músculos o en razas porcinas diferentes tuviera propiedades bioquímicas, biofísicas o funcionales idénticas.

Respecto a la asociación entre tipo de miocito y función muscular, Schiaffino et al. (1970) indicaron que las clasificaciones musculares debían tener en cuenta diversos aspectos. Entre ellos los histoquímicos, funcionales y morfológicos, señalando, por otro lado, que la estructura de la fibra muscular resultaba de la expresión de dos parámetros funcionales, **velocidad de contracción** y **resistencia a la fatiga**.

La velocidad de contracción está relacionada directamente con la actividad fibrilar frente a la mATPasa (Bárány, 1967), determinada mediante técnicas histoquímicas (Guth y Samaha, 1969; Brooke y Kaiser, 1970). Se comprobó así que las fibras tipo I, con baja actividad mATPasa a preincubaciones alcalinas de pH, eran de contracción lenta, mientras que las fibras tipo II, con alta actividad frente a la

⁵ Autores citados por Swatland (1984)

mATPasa a pH alcalinos, eran de contracción rápida. La resistencia a la fatiga, en cambio, depende de la capacidad oxidativa del músculo y de la presencia de glucógeno. De hecho, en base a técnicas de depleción de glucógeno (estimulaciones repetidas a diversas frecuencias de determinadas neuronas motoras), se confirmó que los miocitos que integraban una unidad motora poseían unas características histoquímicas uniformes (Kugelberg y Edström, 1968; Burke et al., 1971, 1973 y 1974), siendo más resistentes las fibras con mayor capacidad oxidativa y menor cantidad de glucógeno intracelular.

Burke et al. (1971, 1973), en estudios sobre el músculo gastronemio del gato, clasificaron las fibras según su velocidad de contracción y resistencia a la fatiga en tres tipos de unidades motoras principales:

Unidad motora tipo S. Integrada por fibras musculares con actividad mATPasa baja (ácido-resistente y alcalino-lábil) y un alto metabolismo oxidativo (fuerte reacción frente a la NADH-TR). Se trata de fibras de contracción lenta y resistentes a la fatiga, capacitadas para una actividad sostenida durante largos períodos de tiempo. En base a ello, se concluyó que dichas unidades motoras intervenían en funciones posturales o de aplomo. Asimismo, se precisó que no desarrollaban una fuerza excesiva y eran muy eficientes desde el punto de vista energético. Histoquímicamente se correspondían con las fibras descritas en otros trabajos como tipos I, ST (“slow-twitch”) o SO (“slow-oxidative”).

Unidad motora tipo FR. Constituida por fibras con metabolismo oxidativo y glucolítico y, además, una alta actividad frente a la mATPasa (ácido-lábil y alcalino-resistente). Estas fibras son resistentes a la fatiga, como las que integran la unidad motora tipo S, pero de contracción rápida. Son muy eficaces en movimientos que implican acortamiento muscular. Histoquímicamente se correspondían a las fibras musculares denominadas por otros autores como tipos IIA, FOR (“fast-oxidative-red”) o FOG (“fast-oxidative-glycolytic”).

Unidad motora tipo FF. Sus fibras tienen básicamente un metabolismo glucolítico y una alta actividad frente a la mATPasa (ácido-resistente a pH 4,6, ácido-lábil a pH 4,3 y alcalino-estable). Son las fibras de mayor tamaño, se contraen rápidamente y con la misma rapidez se fatigan, por lo que son ineficaces desde el punto de vista energético. Se relacionan con movimientos rápidos y vigorosos. Histoquímicamente se correspondían con las fibras tipos IIB o FG (“fast-glycolytic”).

Junto a estos tres tipos de unidad motora, Larsson et al. (1991), y posteriormente Botinelli et al. (1994), propusieron un cuarto tipo integrado por fibras resistentes a la fatiga y de contracción rápida con máxima velocidad de acortamiento, fibras que histoquímicamente se correspondían con los tipos IIX o IID. No obstante, excepto estas dos referencias bibliográficas, no tenemos constancia de más publicaciones en las que se refiera o se le de una denominación específica a este último grupo.

II.4. TIPOS DE FIBRAS EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DEL PERRO

La mayoría de los estudios realizados sobre la musculatura esquelética del perro se han centrado en entidades musculares del tronco y de los miembros. Los primeros trabajos se basaron casi exclusivamente en la actividad de sus fibras frente a reacciones histoquímicas, principalmente ante la mATPasa. Sin embargo, sus resultados no pudieron establecer clara y definitivamente la catalogación de los miocitos en esta especie. Las controversias surgieron al intentar verificar la existencia de fibras IIB. Mientras que las fibras tipo I y tipo II pudieron ser fácilmente identificadas, la diferenciación de las subclases de fibras tipo II resultó bastante problemática. Así, mientras autores como Braund et al. (1978), Braund y Lincoln (1981), Braund et al. (1982), Cardinet et al. (1982), Green et al. (1982), Snow et al. (1982), Rodríguez Barbudo et al. (1983), Martínez López (1987) y Braund (1989) no lograron diferenciar las fibras tipo IIB, en base a la reacción

mATPasa, sí que distinguieron las fibras tipo IIA y IIC. Otros autores, por el contrario, tales como Castle y Reyman (1984), Gil (1986), Moreno (1986), Gil et al. (1987a, b) y Diz (1987) identificaron los cuatro tipos fibrilares descritos en otras especies, denominándolos según los criterios establecidos por Brooke y Kaiser (1970), como fibras tipos I, IIA, IIB y IIC. Frente a estos resultados, y haciendo modificaciones a la técnica mATPasa (por ejemplo, fijaciones previas de las secciones musculares con formaldehído, control riguroso de los medios y tiempos de preincubación ácidos o preincubaciones en medios con cobre), Trevino et al. (1973), Gollnick et al. (1983) y Matoba et al. (1985) consiguieron diferenciar tres subpoblaciones dentro de las fibras tipo II, aunque las denominaron de otra manera, en este caso **tipo IIA1, IIA2 y IIA3**.

Respecto al potencial oxidativo de los miocitos de los músculos del perro, al aplicar las técnicas de NADH-TR y SDH, numerosos autores observaron que todas las fibras musculares descritas poseían una alta actividad (Maxwell et al., 1977; Gunn, 1978; Mascarello y Veggetti, 1979; Braund et al., 1982; Armstrong et al., 1982; Gil, 1986). En este sentido, y aunque algunos trabajos demostraron una baja capacidad oxidativa de las fibras tipo II, siempre fue mayor que la observada para este tipo fibrilar en otras especies (Guy y Snow, 1981; McConathy et al., 1983; Latorre et al., 1993b). En definitiva, que los datos publicados sobre las propiedades metabólicas de los miocitos eran también controvertidos, si bien la mayor parte de los estudios concluyeron que todas las fibras tipo II eran moderada o altamente oxidativas.

De los trabajos referidos en este apartado, destacar el de Snow et al. (1982). Dichos autores combinaron la técnica mATPasa, a distintas preincubaciones ácidas y alcalinas, con técnicas inmunohistoquímicas mediante anticuerpos específicos para las miosinas IIA y IIB. Lograron identificar dos poblaciones de fibras tipo II, una de ellas que se correspondía con las fibras tipo IIA descritas en otras especies y, otra población, que no respondía a ninguno de los parámetros definidos para el resto de fibras tipo II descritas. Sugirieron que no existían como tales las “clásicas” fibras

tipo IIB en la especie canina, sino que había un tipo nuevo, exclusivo del perro, con una miosina específica y una alta capacidad oxidativa.

Mención aparte merece también el trabajo de Mascarello et al. (1982), quienes al estudiar los tipos fibrilares, mediante técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas, del músculo tensor del tímpano del perro y gato descubrieron la presencia de fibras tipos IIM y “tónico-lentas” en una alta proporción, así como algunas fibras tipo I; no observando, por el contrario, las tipo IIA y IIB. Los dos primeros tipos fibrilares son muy poco frecuentes en mamíferos. Las fibras IIM sólomente habían sido descritas en músculos masticadores (Bosley y Rowleron, 1980; Rowleron et al., 1981), en tanto que las fibras “tónico-lentas” (diferentes a las tipo I clásicas) lo habían sido en los músculos extraoculares (Hess y Pilar, 1963; Miller, 1967; Harker, 1972; Peachey et al., 1974; Pierobon-Bormioli, 1979, 1980). Mascarello et al. (1982) comprobaron una correlación elevada entre las técnicas histoquímicas y la inmunohistoquímica basada en anticuerpos específicos frente a cadenas pesadas de miosina. Sin embargo, no pudieron explicar el motivo de estas peculiaridades fibrilares, aunque hipotetizaron que tal vez su mayor agudeza auditiva podría relacionarse con esta composición tan particular.

Latorre et al. (1993b) utilizando la metodología propuesta por Snow et al. (1982) en cuanto a la determinación de la actividad mATPasa de las fibras, y realizando modificaciones (Gil, 1986) a la técnica descrita por Dubowitz y Brooke (1973), detectaron en el músculo semitendinoso del perro los tipos fibrilares I, IIA y IIC, así como un tipo de fibra II con parecidas características a las fibras IIB de la rata. Para ello, el músculo tibial craneal de esta especie se utilizó como control, detectándose los tipos de fibras I, IIA, IIB, IIC y IIX. Acorde con los criterios establecidos por Snow et al. (1982), propusieron que este nuevo tipo fibrilar debía ser denominado como fibra **tipo II propia del perro**. Asimismo, concluyeron que su diferenciación óptima se obtenía con preincubaciones alcalinas a pH 10,4, ya que en determinados medios ácidos las fibras tipo IIA se teñían de forma diferente a como la hacían en otras especies.

Amann et al. (1993) realizaron un estudio histoquímico de la actividad fibrilar mATPasa y de la capacidad oxidativa con la NADH-TR en los músculos gracilis, recto femoral y tríceps braquial en perros y hurones. En los primeros detectaron los subtipos IIA y IIC, pero no el subtipo IIB, si bien comentaron la subjetividad de la tinción de la mATPasa y la dificultad para la comparación interespecífica con dicha técnica. Asimismo, apuntaron la necesidad de aplicar técnicas electroforéticas y de inmunomarcado para poder tipificar de forma resolutive los miocitos de los músculos esqueléticos caninos.

A pesar de los numerosos estudios histoquímicos publicados, apenas si existían datos conclusivos sobre el patrón de expresión de las isoformas MyHC en las fibras de los músculos del tronco y miembros del perro. La generalización en el empleo y la estandarización de las técnicas inmunohistoquímicas, en esta como en otras especies algunos años después, supuso un gran avance para la determinación fibrilar de los miocitos caninos. Amann y Fraga en 1992, y posteriormente Zhang et al. en 1996, caracterizaron tres isoformas en los músculos del perro, no mediante técnicas de inmunomarcado sino con la técnica de la electroforesis en gel de dodecil sulfato sódico (**SDS**) de poliacrilamida. Sugirieron que, de acuerdo a la movilidad en el gel, las bandas MyHC de los perros se correspondían con la MyHC-I, MyHC-IIa y MyHC-IIx de las ratas. Años después, Štrbenc et al. (2004) demostraron inmunohistoquímicamente, por vez primera, el patrón de expresión de las isoformas MyHC en diversos músculos apendiculares y del tronco de la especie canina. Según estos autores, que combinaron los anticuerpos monoclonales, específicos para otras especies, con las clásicas técnicas histoquímicas de mATPasa, SDH y α -glicerolfosfato deshidrogenasa (**α -GPDH**) determinantes de la actividad metabólica fibrilar, en el perro se expresaban tres isoformas MyHC: MyHC-I, MyHC-IIa y MyHC-IIx. De estas tres isoformas, sólo existían dos puras, la lenta MyHC-I y la rápida MyHC-IIa, que se correspondían con las fibras tipo I y IIA demostradas histoquímicamente, y una isoforma híbrida que podía coexpresar las isoformas MyHC-I/IIa (tipo IIC histoquímico) o la isoforma MyHC-IIa/x que se comportaba histoquímicamente como las fibras II propias del perro, descritas por Latorre et al. (1993a, b, c). Respecto al perfil metabólico, advirtieron que las fibras rápidas

manifestaban principalmente un metabolismo oxidativo-glucolítico, mientras que las fibras lentas eran marcadamente oxidativas. Además, sugirieron que las discrepancias al clasificar los miocitos mediante técnicas histoquímicas en el perro se debían al contenido variable de isoformas MyHC-IIa y MyHC-IIx en las fibras híbridas MyHC-IIa/x, y a la deficiente resolución de esta metodología para separar objetivamente las mismas.

Smerdu et al. (2005) publicaron un artículo sobre los músculos apendiculares del perro en la línea del de Štrbenc et al. (2004), completando las citadas técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas con la electroforesis en gel de poliacrilamida y el inmunomarcado. Confirmaron la existencia de las isoformas MyHC-I, MyHC-IIa y MyHC-IIx, además de las formas híbridas MyHC-I/IIa y MyHC-IIa/x. La isoforma MyHC-IIb, detectada en otras especies, no la advirtieron, aunque no excluyeron su presencia en otros músculos del perro más especializados y con propiedades de contracción más fásicas (por ejemplo, los músculos laríngeos). Concluyeron, por último, que las fibras tipo II propias del perro (Latorre et al., 1993a, b, c) se correspondían con las fibras tipo IIX descritas en otras especies, y que la alcalino-estabilidad y la tinción a pH 4,6 de las fibras tipo IIA en el perro era superior a la de las fibras tipo IIX. Al contrario de lo que sucede en el resto de mamíferos, donde las fibras tipo IIA son ácido lábiles a cualquier rango de pH ácido. Estos resultados los atribuyeron a una más que probable variación interespecífica, respecto a las técnicas histoquímicas de tinción basadas en la reacción frente a la mATPasa.

Un año después, Acevedo y Rivero (2006) realizaron una aproximación cuantitativa a nivel inmunohistoquímico para caracterizar definitivamente las fibras híbridas caninas. Analizaron diversos músculos del tronco y miembros del perro mediante técnicas electroforéticas, histoquímicas, inmunohistoquímicas y de inmunomarcado, incluido un estudio de las isoformas de la ATPasa-Ca²⁺ del retículo sarcoendoplásmico (**SERCA**), a fin de correlacionar las propiedades contráctiles con las metabólicas y morfológicas. Los autores refirieron que la histoquímica basada en la reacción fibrilar frente a la mATPasa representaba una simplificación excesiva de la realidad, ya que con esta técnica existía un amplio espectro de fibras no

cuantificadas, y difícilmente cuantificables, entre las que se consideraban visualmente positivas, y las que eran clasificadas como negativas. Indicaron las tres isoformas ya descritas en publicaciones anteriores (MyHC-I, MyHC-IIa y MyHC-IIx) que aparecían en estado puro, homólogas a las encontradas en otros mamíferos, y una gran cantidad de isoformas híbridas resultado de la combinación de las isoformas anteriores. Por un lado, el tipo lento I con el rápido IIa (MyHC-I/IIa) y, por otro, los dos subtipos de isoformas tipo II, es decir el tipo IIa con el tipo IIx (MyHC-IIa/x). En el momento de la tipificación fibrilar, subdividieron estos dos tipos híbridos a su vez en MyHC-I/IIa1 (denominadas por estos autores como fibras tipo IC) y MyHC-I/IIa2 (clasificadas como fibras tipo IIC) para la primera isoforma híbrida, según predominara el fenotipo I sobre el IIa o viceversa, respectivamente. Asimismo, catalogaron para la isoforma MyHC-IIa/x tres tipos diferentes: la isoforma MyHC-IIa/x1 donde prevalecía el fenotipo IIa, la isoforma MyHC-IIa/x2 con un contenido similar en ambas isoformas (IIa y IIx) y la isoforma MyHC-IIa/x3 en la que se encontraba más cantidad de la isoforma MyHC-IIx. Sin embargo, no observaron la isoforma MyHC-IIb en los músculos estudiados, aunque precisaron que para confirmarlo con certeza era necesario un análisis a nivel molecular.

Štrbenc et al. en 2006, completaron sus investigaciones sobre las isoformas de la especie canina en músculos del tronco y miembros. Caracterizaron y describieron el perfil de las isoformas de miosina de transición postnatales, mediante anticuerpos monoclonales específicos y técnicas histoquímicas de estabilidad fibrilar frente a la mATPasa, complementadas con la determinación de los perfiles metabólicos fibrilares por medio de la SDH y la α -GPDH. En este estudio los autores catalogaron las isoformas del desarrollo MyHC-emb y MyHC-neo en músculos esqueléticos de fetos y cachorros. Observaron la MyHC-I en fetos de 55 días y el declinar de las dos isoformas del desarrollo, así como la aparición de la MyHC-IIa del adulto, a partir de la segunda y tercera semana del nacimiento. La isoforma MyHC-IIx se evidenció entre las seis semanas y los dos meses postnatales. Concluyeron que el patrón de desarrollo de los músculos esqueléticos caninos era similar al encontrado en otras especies, y que el tiempo de maduración muscular dependía de sus funcionalidades (maduraba primero el diafragma y después los músculos considerados “rápidos”) y

de la actividad física de los cachorros. Hacia las cuatro o seis semanas de edad ya estaban presentes las isoformas adultas, momento en que los animales solían destetarse y comenzar a relacionarse con el entorno, habiendo desaparecido prácticamente las isoformas del desarrollo (MyHC-emb y MyHC-neo) a los dos meses.

Por último, referir en este apartado de la Revisión Bibliográfica, dos trabajos publicados recientemente por Maccatrozzo et al. (2007) y por Toniolo et al. (2007). En el primero de ellos secuenciaron de forma completa las diferentes isoformas de cadena pesada de miosina sarcomérica en el perro. Identificaron las nueve isoformas MyHC ya descritas en otras especies de mamíferos: la 2A, 2B, 2X (expresadas en los miocitos de los músculos esqueléticos rápidos adultos), la embrionaria y peri o neonatal, la EO (específica de los músculos extraoculares), la $\beta/1$ y la α -cardíaca (isoformas lenta y rápida, respectivamente, de la musculatura cardíaca estriada) y la isoforma 2M específica de los músculos mandibulares de determinadas especies, tales como los carnívoros y algunos primates, exceptuando al hombre. Al comparar las isoformas MyHC halladas en el perro con las isoformas ortólogas de otras especies de mamíferos (hombre, cerdo, vaca, caballo, ratón, rata, conejo y gato) observaron una alta similitud entre ellas, tal y como esperaban, superior normalmente al 94%; mientras que, en general, las isoformas parálogas expresaban mayores diferencias, con algunas excepciones. En el trabajo de Toniolo et al. (2007) se estudiaron los tipos fibrilares de determinados músculos caninos (tronco, miembros, laríngeos y extraoculares) mediante el uso de la expresión de las isoformas de miosina junto con la electroforesis y la histo e inmunohistoquímica, con el fin de intentar dilucidar definitivamente determinadas cuestiones planteadas en trabajos anteriores. Por un lado, si la isoforma MyHC-IIx se correspondía con la que se denominaba II del perro, tal y como ya propusieron Smerdu et al. (2005). Confirmar si la presencia abundante de fibras híbridas (Acevedo y Rivero, 2006) era un hecho cierto o la consecuencia de una especificidad insuficiente de los anticuerpos monoclonales. Verificar la presencia de fibras con la isoforma MyHC-IIb, y, por último, realizar un análisis riguroso de las propiedades funcionales de las fibras sencillas y de las isoformas de miosina purificadas. Observaron las isoformas

MyHC-I, MyHC-IIa (que era la más abundante) y MyHC-IIx (que se correspondía con la denominada II propia del perro) en los músculos del tronco y miembros, mientras que la isoforma MyHC-IIb estaba restringida a los músculos extraoculares y laríngeos. Advirtieron la presencia de fibras híbridas con las isoformas de miosina MyHC-IIa y MyHC-IIx, apareciendo en menor medida la isoforma MyHC-IIx en estado puro. Relacionaron la velocidad máxima de acortamiento de las fibras sencillas con la diferente composición de isoformas de miosina, concluyendo que aumentaba progresivamente en el orden de I<IIa<IIx<IIb.

En resumen, la tendencia actual consiste en analizar a nivel molecular la miosina miofibrilar de los músculos estriados. Concretamente, las cadenas pesadas y sus isómeros, complementando dichos estudios con las técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas, desarrolladas durante los últimos años, ya que son las determinantes de las propiedades contráctiles de la molécula de miosina y consideradas también marcadores moleculares de los tipos de fibras.

II.5. TIPOS DE FIBRAS EN LOS MÚSCULOS DEGLUTORES, MASTICADORES Y FARÍNGEOS DE MAMÍFEROS

Las publicaciones referentes a los tipos de miocitos que conforman estos músculos no son muy numerosas. Si bien, durante los últimos años, debido al auge de las técnicas inmunohistoquímicas y a la complejidad funcional de los referidos sistemas neuromusculares, se han abierto nuevas vías de estudio para intentar clarificar la tipificación fibrilar de los mismos y relacionarlos con su particular idiosincrasia.

En 1987, Bonington et al. realizaron un estudio histológico e histoquímico del músculo cricofaríngeo del cobaya. Se trata de un músculo en permanente contracción tónica, excepto durante el vómito, el eructo o la deglución, y es considerado como el principal componente del esfínter esofágico superior. Siguiendo los métodos de clasificación propuestos por Brooke y Kaiser (1970) y Peter et al. (1972), observaron

que contenía un 85% de fibras histoquímicamente “rápidas” y un 10% de fibras “lentas”. Todas las fibras cricofaríngeas fueron referidas como oxidativas, teniendo además un 72% de ellas actividad glucolítica. También apreciaron algo menos del 1% de fibras tipo IIC y alrededor de un 5% de fibras que no pudieron clasificar según la metodología aplicada (fibras híbridas). De acuerdo con estos resultados, concluyeron que este músculo era idóneo para mantener la contracción tónica y para desarrollar un papel importante en el esfínter esofágico superior.

Un año más tarde, Bonington et al. (1988) publicaron otro estudio sobre el músculo cricofaríngeo en la especie humana. Las fibras que describieron poseían una capacidad oxidativa alta-intermedia, en consonancia con los hallazgos descritos en el cobaya, aunque con un predominio del tipo “slow-twitch”, no llegando a explicar la causa de esta aparente contradicción entre las dos especies. Estas características indicaban la adaptación estructural de este músculo para mantener el tono durante períodos prolongados y realizar su función como esfínter en la deglución, vómito, eructo y control de la aerofagia.

En 1993, Ibebunjo analizó las propiedades histoquímicas de los músculos que en la especie caprina contribuían al mantenimiento de la permeabilidad en las vías respiratorias superiores, aplicando para ello técnicas de mATPasa y de NADH-TR. Concretamente los músculos geniogloso, genihioideo, lingual propio, estilgloso, milohioideo, cricoaritenideo dorsal, aritenideo transverso, cricotiroideo, cricoaritenideo lateral, tiroaritenideo, hiofaríngeo, tirofaríngeo y cricofaríngeo. Entre sus conclusiones indicó que los músculos linguales, hioideos y faríngeos poseían los tipos fibrilares I, IIA, IIB y IIC, como los músculos laríngeos, aunque precisando que en estos últimos no existía una diferenciación clara entre los subtipos IIA y IIB. Según este autor, las fibras tipo II predominaban en los músculos objeto de estudio y, excepto en el músculo genihioideo, existía una alta proporción de fibras tipo IIC. En cuanto a su capacidad oxidativa, Ibebunjo observó que, aunque determinados músculos se tiñeron de forma débil al enfrentar los miocitos tipo II a la NADH-TR, esta reacción era más intensa a la apreciada en los músculos control de las extremidades. Sugirió que eran músculos de contracción rápida y relativamente

resistentes a la fatiga, propiedades ambas consideradas fundamentales para la funcionalidad de las vías aéreas superiores en cuanto a su protección y apertura. Asimismo, el tamaño de las fibras tipo II era superior al de las fibras tipo I, y el diámetro medio de las fibras menor que el de los músculos de otras regiones. Con respecto a los músculos individualmente considerados, Ibebunjo advirtió que de los músculos laríngeos, el cricoaritenideo dorsal y el cricotiroideo poseían una mayor proporción de fibras tipo I que el resto, correlacionando este hallazgo con su función como principales abductores de la glotis y tensores de los pliegues vocales. En los músculos constrictores de la faringe, la composición en fibras tipo I y el diámetro medio de cada tipo de miocito aumentaba de manera progresiva caudalmente, desde el músculo hiofaríngeo al cricofaríngeo, en tanto que la composición en fibras tipo IIB seguía un orden inverso. Por último, los músculos hioideos y de la lengua, excepto el músculo genihioideo, contenían una proporción relativamente alta de fibras tipo IIC.

Imamura et al. (1998) publicaron un estudio sobre la distribución de la parvoalbúmina en la musculatura del segmento faringo-esofágico del gato, integrado por los músculos hiofaríngeo, tirofaríngeo, cricofaríngeo y esofágico cervical. La parvoalbúmina, propuesta por Celio y Heizmann en 1982 como técnica sensitiva para clasificar las fibras musculares en subtipos, es una proteína citosólica ligada al calcio que se encuentra en un número limitado de tejidos tales como la musculatura esquelética, una subpoblación de neuronas del sistema nervioso central y en las células de Leydig testiculares (Heizmann y Celio, 1987). Se creía que esta proteína influía en la velocidad de relajación muscular (Heizmann et al., 1982), encontrándose así altos niveles en las fibras musculares de contracción rápida (Celio y Heizmann, 1982; Heizmann, 1984; Heizmann y Celio, 1987 y Fúchtbauer et al., 1991). Se observó que el modelo de inmunotinción con parvoalbúmina se correlacionaba con la tipificación fibrilar histoquímica basada en la reacción de la mATPasa en estudios realizados en rata (Heizmann, 1984; Heizmann y Celio, 1987 y Annoh et al., 1995). Por otra parte, el suero anti-parvoalbúmina permitía teñir las fibras musculares con al menos cinco grados de intensidad, correspondientes con las fibras tipo IIB, en tanto

que las fibras tipo IIA se teñían moderadamente con tres grados de intensidad y las fibras tipo I no reaccionaban.

En su estudio Imamura et al. (1998) detectaron cinco intensidades de tinción en los músculo hiofaríngeo y tirofaríngeo, correspondientes a los tipos I, IIA y IIB clásicos y a los tipos de fibra clasificados como IIX o IID y IIAB. Había pues una clara predominancia de las fibras tipo II, hecho en consonancia con las características funcionales de dichos músculos (contracciones rápidas y cortas para encauzar el bolo alimenticio caudalmente hacia el esófago). En el músculo cricofaríngeo predominaban las fibras tipo I acorde con su funcionalidad, contraído la mayor parte del tiempo para evitar aerofagias y el reflujo supraesofágico, relajándose temporalmente unas milésimas de segundo durante la deglución. Encontraron también una subpoblación de fibras tipo II (aproximadamente el 30%), que sería la responsable de su contracción rápida tras la deglución y jugaría un importante papel en el mantenimiento y refuerzo del cierre del esfínter esofágico superior por medio de aumentos de presión de corta duración. La distribución de los tipos fibrilares en el músculo esofágico cervical era muy similar a la del músculo cricofaríngeo, con un ligero predominio de las fibras tipo I y menor cantidad de fibras tipo II. Esta musculatura, en conjunto, aumentaba el porcentaje de fibras tipo I caudalmente desde los músculos constrictores faríngeos más rostrales hasta el esófago. En cuanto al tamaño fibrilar, observaron que las fibras tipo II eran de mayor tamaño que las tipo I, aunque no advirtieron un aumento progresivo del diámetro medio fibrilar en dirección caudal, tal y como Ibebunjo (1993) había referido en cabras.

En el año 2001, Mu y Sanders llevaron a cabo un estudio en profundidad del músculo constrictor faríngeo inferior en la especie humana, utilizando, entre otras técnicas, las histoquímicas de mATPasa, NADH-TR y SDH. Los autores hipotetizaron que, dado que este músculo tenía importantes funciones en las vías aéreas superiores durante los mecanismos de deglución, respiración y vocalización, debería ser estructuralmente complejo. Observaron que se trataba de un músculo regionalizado, con al menos dos compartimentos, uno rostral y otro caudal cada uno de ellos inervado por un ramo nervioso independiente derivado del ramo faríngeo del

nervio vago. Asimismo, los tipos fibrilares estaban regionalizados, pudiéndose diferenciar una zona interna lenta con un predominio de fibras tipo I y una zona externa rápida con un predominio de fibras tipo II, de dimensiones y composición fibrilar diferentes según el compartimento analizado. Concluyeron que el compartimento caudal, con una zona interna lenta más desarrollada que compartía características histoquímicas con el músculo cricofaríngeo, contribuía a la funcionalidad del esfínter esofágico superior. Su adaptación histoquímica intrínseca ayudaba a mantener el tono muscular durante períodos prolongados. La gran población de fibras de contracción rápida en el compartimento rostral, cuya proporción entre la zona interior lenta y la exterior rápida era inversa a la del compartimento caudal, sería la responsable de la contracción energética durante el proceso de deglución. Además, la zona interior lenta de este compartimento colaboraría a la rigidez y estabilidad del tubo faríngeo para mantener la apertura de las vías aéreas, por lo que podría considerarse “tensor de la pared muscular faríngea”. Su activación se asociaría al proceso de vocalización en la especie humana, mecanismo que requería ajustes delicados de tensión muscular en las paredes faríngeas.

Este mismo año, Cobos et al. (2001) realizaron un trabajo sobre los tipos de fibras en los músculos suprahioides de la rata (milohioideo, genihiioideo y vientres rostral y caudal del digástrico). Emplearon para ello técnicas histoquímicas (mATPasa y SDH) e inmunohistoquímicas frente a anticuerpos específicos tales como NOQ7.5.4D, A4.951, F8812F8.1 y MY-32. Entre sus hallazgos refirieron la existencia de cinco tipos de fibras musculares (fibras tipo I, IIC, IIA, IIX y IIB). De ellas, los músculos analizados tenían aproximadamente un 90% de fibras de contracción rápida, siendo los músculos genihiioideo y el vientre rostral del digástrico los que presentaban mayor porcentaje de fibras tipo IIB. El músculo milohioideo, en cambio, estaba integrado casi exclusivamente por fibras aeróbicas y el vientre caudal del digástrico poseía un mayor porcentaje de fibras aeróbicas que el vientre rostral. Observaron también una regionalización, bastante evidente, en el músculo digástrico. En el vientre rostral existía una región central compuesta casi exclusivamente por fibras aeróbicas (fibras tipo I y IIC) y una región periférica donde predominaban las

fibras tipo IIB. En el vientre caudal advirtieron una región profunda aeróbica y una superficial con fibras tipo IIX y IIB. Los músculos genihiodeo y milohioideo presentaban una distribución en mosaico, con un mayor porcentaje de fibras tipo I y IIC en la zona rostral. Por último, asociaron estos resultados con sus actividades funcionales, en el sentido de que no intervenían únicamente en la apertura de la mandíbula sino que estaban implicados en la fase de pulverización de los alimentos durante el ciclo masticador. Asimismo, el alto número de fibras aeróbicas del músculo milohioideo podría estar relacionado con su función protractora del aparato hioideo y elevadora del suelo de la cavidad oral, en tanto que la regionalización de los vientres del digástrico tendría relación con los procesos de cierre y estabilización de la mandíbula, fijación del aparato hioideo y alineamiento de los músculos suprahioideos anteriores para desplazar este aparato rostralmente durante el proceso deglutor.

Un año después, Mu y Sanders (2002) publicaron un estudio sobre los tipos de fibras en el músculo cricofaríngeo de la especie humana, como continuación del trabajo llevado a cabo en el año 2001 sobre el músculo constrictor faríngeo inferior de esta misma especie. Describieron igualmente una división del cricofaríngeo en compartimentos. Uno oblicuo más cercano al constrictor faríngeo inferior y uno horizontal. A su vez, cada compartimento estaba dividido histoquímicamente en una capa interna lenta, que tenía mayor grosor en el compartimento horizontal, con un predominio de fibras tipo I y una capa externa rápida donde predominaban las fibras tipo II, que estaba más desarrollada en el compartimento oblicuo. También advirtieron una mayor actividad metabólica NADH-TR y SDH en las fibras tipo I con respecto a las tipo II, y sugirieron que la complejidad y la distribución tan peculiar de este músculo se daba exclusivamente en la especie humana, porque su función estaba más especializada que en otros mamíferos.

Abe et al. (2002) analizaron la musculatura intrínseca de la lengua del ratón adulto mediante técnicas inmunohistoquímicas, utilizando anticuerpos monoclonales específicos para los distintos tipos fibrilares, técnicas de reacciones de cadena de polimerasa (PCR) y electroforesis en gel de agarosa, al objeto de determinar las

distintas MyHC. Los autores encontraron un predominio de la MyHC-IIb en la porción longitudinal dorsal, hipotetizando que ya que esta isoforma era la más rápida, contribuiría a la movilidad lingual, dentro y fuera de la cavidad bucal, sagitalmente. La isoforma MyHC-IIa predominaba en la porción transversa de la musculatura intrínseca de la lengua, en consonancia con la funcionalidad de este compartimento en la retención morfológica de la misma.

Korfage y Van Eijden (2003) realizaron un estudio comparativo entre las técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos monoclonales específicos y la electroforesis en gel, sobre los vientres rostral y caudal del músculo digástrico de la especie humana. Concluyeron que con ambas técnicas se obtenían unos resultados comparables. Hallaron fibras tipos I, IIA y IIX, estas últimas en mayor proporción en el vientre rostral del músculo digástrico, seguido de los tipos I y IIA. En el vientre caudal, en cambio, el mayor porcentaje correspondía a las fibras tipo IIA, seguido de las fibras tipo I y de las IIX. Dichos resultados, obtenidos mediante inmunohistoquímica, se correlacionaban bastante bien con los de electroforesis, excepto para las fibras tipos IIA y IIX en el vientre rostral del músculo digástrico, donde se invertían las proporciones de ambos. Estas diferencias las achacaron básicamente a la presencia de fibras híbridas que coexpresaban más de una isoforma MyHC, erróneamente clasificadas por medio de la inmunohistoquímica, incapaz de detectarlas al no utilizar anticuerpos que pudieran marcarlas.

Rhee et al. (2004) analizaron los tipos fibrilares en algunos músculos laríngeos de la rata. Concretamente, en los músculos intrínsecos cricotiroideo (inervado por el nervio laríngeo craneal) y tiroaritenideo (inervado por el nervio laríngeo recurrente) mediante técnicas inmunohistoquímicas. Asimismo, evaluaron las transformaciones que sufrían tras su denervación y reinervación. Describieron la presencia de fibras tipos I, IIA, IIX y IIB en el músculo cricotiroideo, con un mayor porcentaje de fibras tipo IIX, seguido de los tipos I, IIA y IIB. Es decir, observaron idénticos tipos fibrilares a los descritos en músculos apendiculares. El músculo tiroaritenideo estaba dividido en dos porciones o compartimentos: por un lado, uno vocal, relacionado con el ligamento vocal y, por otro, una porción externa que

representaba el grueso de dicho músculo. La porción vocal, a su vez, estaba subdividida en dos zonas: rostral y caudal. La composición en tipos de fibras variaba significativamente respecto al primer músculo estudiado. Concretamente, no aparecieron fibras tipos I y IIA en los compartimentos del músculo tiroaritenoido. En la porción externa únicamente se encontraron fibras híbridas tipo IIB/EO, mientras que en la zona rostral de la porción vocal aparecieron fibras híbridas tipo IIB/EO en mayor porcentaje, seguido de las fibras tipo IIX, como componentes principales. También describieron fibras híbridas IIX/B, fibras tipos IIB, EO y fibras tipo IIX/B/EO. En la zona caudal detectaron los mismos tipos fibrilares que en la zona rostral, pero mayoritariamente fibras IIX y IIB/EO (estas últimas en menor cantidad). La denervación y reinervación se practicó sobre el nervio laríngeo recurrente, observándose los cambios acaecidos en los tipos fibrilares del músculo tiroaritenoido, que fueron aparentes al cabo de unas semanas. En concreto, se produjo un aumento de las fibras tipo IIX y una disminución de los tipos IIB y EO. Tras estos hallazgos, concluyeron que tanto el músculo cricotiroideo como el tiroaritenoido eran alotípicamente diferentes, y que las fibras musculares laríngeas estaban sujetas a regulación neuronal.

Sundman et al. publicaron en 2004 un trabajo sobre los tipos fibrilares de los músculos cricofaríngeo y constrictor faríngeo en la especie humana, aplicando inmunohistoquímica, con anticuerpos específicos frente a las cadenas pesadas de miosina lenta y rápida, y técnicas histoquímicas de mATPasa y de NADH-TR. Trataban de dilucidar la diferente respuesta farmacológica de estos músculos a la acción de los bloqueantes neuromusculares. Hallaron seis patrones diferentes de tinción en ambos músculos, pero con una gran variabilidad interindividual. Asimismo, observaron una composición similar en ambos músculos y un alto porcentaje de fibras híbridas, no pudiendo diferenciar los compartimentos que Mu y Sanders (2001) habían referido en el músculo constrictor faríngeo. Concluyeron que la diferente respuesta de ambos músculos a la acción de los fármacos bloqueantes neuromusculares se debía más a la diferencia de tamaño fibrilar (menor tamaño de las fibras del músculo cricofaríngeo) que a la composición fibrilar.

Por último reseñamos dos artículos recientes publicados por Mu et al. (2007a, b) en los que se analizaron los músculos que conformaban el esfínter esofágico superior de la especie humana, profundizando en una de las publicaciones en la composición fibrilar del músculo cricofaríngeo. Emplearon una combinación de anticuerpos monoclonales, inmunofluorescencia e inmunomarcado electroforético. Según estos autores, en el esfínter esofágico superior aparecían unas isoformas de miosina inusuales (“tónico-lenta”, α -cardíaca, embrionaria y neonatal) que se coexpresaban con isoformas principales (MyHC-I, MyHC-IIa, y MyHC-IIx). Describieron a su vez la aparición de dos capas en todos los músculos o porciones musculares que conformaban este esfínter: una capa interna con un predominio de fibras lentas, que se coexpresaban con las isoformas “tónico-lenta” y α -cardíaca; una capa externa, de mayor cantidad de fibras rápidas tipo II, con la que se coexpresaban las isoformas neonatal y embrionaria. Advirtieron también la presencia de otros tipos fibrilares híbridos que contenían hasta seis isoformas MyHC diferentes, y escasa cantidad de miocitos puros. Sospecharon que esta complejidad era debida a sus requerimientos funcionales.

II.6. TIPOS DE FIBRAS EN LOS MÚSCULOS DEGLUTORES, MASTICADORES Y FARÍNGEOS DE LA ESPECIE CANINA

Ryu (1981) analizó histoquímicamente la porción proximal del tracto alimentario en el perro, observando que el músculo cricofaríngeo presentaba, aproximadamente, un 57% de fibras musculares tipo I, con una alta capacidad oxidativa frente a la NADH-TR y la SDH. Las restantes fibras eran tipo II con una demostrada baja capacidad oxidativa. El músculo tirofaríngeo y los músculos esofágicos superiores presentaban un 20% y un 16%, respectivamente, de fibras tipo I. El autor concluyó que el predominio de fibras tipo I en el músculo cricofaríngeo se debía a su importante papel funcional.

Rowlerson et al. (1983) analizaron la composición fibrilar de los músculos derivados del primer arco branquial en carnívoros y primates (músculos masetero,

temporal, terigoideos medial y lateral, tensor del velo palatino, tensor del tímpano, vientre rostral del músculo digástrico y milohioideo), en base a que estudios previos (Mascarello et al., 1982) ya habían observado, en alguno de ellos, un patrón fibrilar bastante peculiar respecto a los músculos del tronco y miembros, así como a los de otras especies. Aplicando técnicas histoquímicas tradicionales e inmunohistoquímica con anticuerpos específicos para las distintas cadenas de miosina, describieron su composición fibrilar. En los músculos masetero, temporal y terigoideo medial, así como en el terigoideo lateral, tensor del tímpano y tensor del velo palatino del perro predominaban las fibras tipo IIM, encontrándose, además, solamente fibras tipos I y “tónico-lentas”, ya descritas por Mascarello et al. (1982). Todas estas fibras poseían una actividad moderada frente a la SDH. En los músculo milohioideo y en el vientre rostral del digástrico no observaron fibras tipo IIM, apareciendo, en cambio, fibras tipos I y IIA oxidativas. Es decir, una composición similar al de los músculos control (músculos de los miembros), y presentes de forma constante en todas las especies objeto de estudio. Lo expuesto refleja probablemente el hecho, en lo que respecta al músculo milohioideo, de que no está implicado directamente en la masticación y sí en la deglución, mecanismo muy parecido en todas las especies. En cambio, el vientre rostral del músculo digástrico resultaba más variable, probablemente porque su función difiere según la especie. En los carnívoros interviene básicamente en la depresión mandibular, mientras que en los primates también lo hace en la elevación del aparato hioideo; esto es, está implicado en el mecanismo de la deglución. Los autores concluyeron que las fibras tipo IIM no podían diferenciarse con fiabilidad utilizando exclusivamente técnicas histoquímicas tradicionales, ya que era fácil confundirlas con el tipo IIC detectado con la mATPasa a diversos pH. No existía por entonces estudio alguno que describiera su actividad oxidativa, evidenciando Rowleron et al. (1983) una gran variabilidad interespecífica al compararla con la de otros tipos fibrilares presentes en los músculos control. Hipotetizaron también que esta composición, tan singular en cuanto a tipos de fibras en los músculos masticadores, podría tener relación con el particular tipo de mordisco agresivo, mas que con su origen filogenético.

En 1998, Mu y Sanders publicaron un trabajo sobre el músculo genihiodeo del perro. Se trata de un músculo dilatador de la faringe que adquiere gran relevancia en la deglución, al ser una de las entidades musculares suprahiodeas encargadas de desplazar el aparato hiodeo durante la misma, así como en la masticación y respiración. Aplicaron diversas técnicas, entre ellas las técnicas histoquímicas clásicas de tipificación fibrilar, advirtiendo una división en compartimentos musculares con diferente inervación y composición fibrilar. Comprobaron, que a pesar de que macroscópicamente parecía un músculo sencillo, tenía dos compartimentos, dispuestos en serie y separados estructuralmente por un septo fibroso transversal: compartimentos rostral y caudal. El compartimento rostral recibía una inervación bilateral, mientras que la del caudal era ipsilateral, con terminaciones independientes derivadas del nervio hipogloso. Asimismo, la proporción de fibras tipo I respecto a las tipo II era muy superior en el compartimento rostral. Hipotetizaron que esta distribución podría hacer que el músculo funcionara independientemente bajo diferentes condiciones fisiológicas. Concretamente, el compartimento rostral, al poseer fibras musculares de contracción lenta resistentes a la fatiga, podría estar implicado principalmente en procesos respiratorios durante la fase de inspiración. Por su parte, el compartimento caudal se activaría básicamente durante la deglución, al tratarse de un mecanismo que requiere movimientos mediante fibras de contracción más rápida, menos relevante su fatigabilidad para el resultado funcional.

Wu et al. (1998) realizaron un estudio sobre los tipos fibrilares del músculo cricoaritenideo lateral del perro por medio de técnicas inmunohistoquímicas, de electroforesis y “western blot”. Catalogaron el músculo como rápido, con un alto porcentaje de fibras híbridas (41%), entre las que destacaba mayoritariamente el tipo IIA/IIX, seguido del tipo IIA/I y el tipo IIA/IIX/I. Entre las fibras puras, las fibras tipo IIA estaban en un alto porcentaje (71,3%), seguidas de los tipos I, IIX y IIB. Había un número elevado de fibras tipo IIX, pero casi totalmente de forma híbrida y en muy pequeña proporción expresadas individualmente (10,4%).

Este mismo año, Hyodo et al. (1998) analizaron la musculatura constrictora faríngea inferior del perro (músculos tirofaríngeo y cricofaríngeo) que tienen un papel importante durante la deglución. Emplearon para ello técnicas histoquímicas clásicas (reacción mATPasa), observando un predominio de las fibras tipo II, concretamente del tipo IIB, en el músculo tirofaríngeo. En el músculo cricofaríngeo predominaban las fibras tipo I, en consonancia con los hallazgos de Ryu (1981), así como un mayor porcentaje de fibras tipo IIC. La proporción entre las fibras tipos I y II era aproximadamente inversa entre ellos. Los autores indicaron que la composición fibrilar del músculo tirofaríngeo era la idónea para su función de conducción del bolo alimenticio hacia el esófago. Igualmente concluyeron que el predominio de las fibras tipo I en el músculo cricofaríngeo suponía una gran ventaja para mantener la contracción tónica sostenida de este músculo en los períodos de descanso, ejerciendo de “abrazadera” esofágica superior. La menor proporción de fibras tipo II en este último músculo contribuiría a mantener el cierre del esfínter, aumentando la presión nuevamente por un corto período de tiempo durante la inspiración o el vómito. Sin embargo, no definieron un límite histoquímico evidente entre ambos músculos, indicativo de que los límites funcionales entre ellos podrían ser también indistintos. En cuanto al contenido de fibras tipo IIC, el hecho de que el músculo cricofaríngeo mostrara un mayor número de ellas (debido a un alto grado de diferenciación fibrilar o a una gran capacidad de regeneración), ayudaría a mantener con precisión su función reguladora como esfínter faringo-esofágico.

Un año después, en 1999, Hyodo et al. profundizaron en el análisis fibrilar de la musculatura constrictora faríngea inferior del perro. Llevaron a cabo un trabajo sobre los cambios postnatales en la tipología de sus fibras mediante la técnica mATPasa. Intentaron comprender el desarrollo funcional de los músculos implicados en la deglución, al ser éste un mecanismo rudimentario en edades postnatales con el consiguiente aumento de las aspiraciones, vómitos y eructos, y que madura a lo largo del desarrollo del animal. Observaron que las fibras tipo I estaban ya presentes en la primera semana postnatal. En el músculo cricofaríngeo, que presentaba en el adulto un predominio de fibras tipo I, aumentaba inicialmente el porcentaje de fibras tipo IIA+IIB y disminuía el porcentaje de fibras tipo IIC. Dichas fibras, en una alta

proporción en el feto y recién nacido, eran consideradas primitivas. No participaban de ninguna de las propiedades fisiológicas de las fibras IIA o IIB del adulto y se diferenciaban posteriormente en fibras tipos I, IIA o IIB durante el proceso de maduración. Más avanzado el desarrollo aumentaba el porcentaje de fibras tipo I a la vez que disminuía el de las fibras tipo II. En el músculo tirofaríngeo describieron una disminución temprana de la proporción de fibras tipo IIC, en comparación con la del músculo cricofaríngeo. Sugirieron que maduraba antes, hecho necesario para el comienzo de la alimentación oral tras el nacimiento, pues este músculo funciona como conductor del bolo alimenticio. Indicaron también que la contracción sostenida proporcionada por las fibras tipo I en el músculo cricofaríngeo, durante el período postnatal, podría causar resistencias indeseables para el tránsito del bolo alimenticio, dado que la inmadurez de los músculos faringo-laríngeos los hacía relativamente débiles y de contracciones no armónicas. Al mismo tiempo, manifestaron que una pequeña proporción de fibras IIA y IIB, en este último músculo, sería beneficiosa para contribuir a la protección de las vías aéreas, manteniendo cerrada la unión faringo-esofágica y aumentando la presión durante la regurgitación o el vómito en el neonato. Por consiguiente, concluyeron que los cambios acaecidos en la composición fibrilar de los músculos objeto de estudio estaban relacionados con el correcto desarrollo de la función deglutora.

Wu et al. (2000), en la línea de anteriores publicaciones (Wu et al., 1998), realizaron un estudio sobre los músculos cricoaritenideo caudal, cricotiroideo y tiroariteonideo, a fin de contrastar la hipótesis de su primer trabajo sobre el alto porcentaje de hibridismo que observaron en el músculo cricoaritenideo lateral y comprobar si esta premisa se cumplía en el resto de los músculos laríngeos del perro. Para ello emplearon la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida. En el músculo cricotiroideo describieron una mayoritaria presencia de fibras puras tipos I y IIA. Concretamente, un mayor porcentaje de fibras tipo IIA en las regiones oblicua y recta, y una proporción similar de ambos tipos en la región horizontal de dicho músculo. Existían también fibras híbridas en todas las regiones pero no llegaban al 10% de la población estudiada. En cuanto al músculo cricoaritenideo caudal (dividido en regiones horizontal, oblicua y vertical, según la descripción anatómica

de Sanders et al., 1993), observaron un perfil lento en la región horizontal con una alta proporción de fibras tipo I; la región vertical poseía un perfil más rápido, con proporciones similares de fibras tipos I, IIA y IIX, y en la región oblicua la proporción fibrilar era similar a la que apareció en la vertical, aunque con menor cantidad de fibras tipo IIX. Además, en todas las regiones del músculo existía una cantidad regular de fibras híbridas tipo IIA/X. Por último, en el músculo tiroaritenoides describieron un alto porcentaje de fibras rápidas tipo IIX en la región medial y una proporción elevada de fibras tipo IIB en la región lateral. Ambas regiones poseían entre el 30% y 40% de fibras híbridas. En la región medial coexistían hasta cinco tipos de fibras híbridas, con un significativo contenido en fibras tipos IIA/X y IIX/B. En la región lateral denotaron siete tipos de fibras híbridas, con una mayor cantidad del tipo IIX/B. En resumen, el músculo cricotiroides era el que menos hibridismo mostraba y el músculo tiroaritenoides el que tenía un mayor porcentaje de fibras híbridas. Los autores lanzaron la hipótesis que no solamente este hibridismo parecía ser común a estos músculos tan especializados, sino que aparecía de forma regular en un gran espectro de músculos. Descartaban así que fuera únicamente el patrón de innervación, tan particular de los músculos laríngeos, la causa de esta peculiaridad fibrilar.

Finalmente, Mu y Sanders (2000) publicaron un estudio completo anatómico e histoquímico del músculo geniogloso canino. Al tratarse de uno de los principales protrusores y depresores de la lengua, es un músculo fundamental en procesos tales como la deglución, la dilatación inspiratoria de la faringe y, en el ser humano, la vocalización. Indicaron que estaba compartimentalizado, hecho que se advertía macroscópicamente pero que no había sido demostrado histoquímicamente. Un compartimento horizontal en la parte ventral del músculo que se insertaba dentro de la base de la lengua y en el aparato hioideo, y otro oblicuo, en forma de abanico, insertado en la porción media del cuerpo de la lengua, de mayores dimensiones. A su vez, este compartimento oblicuo estaba subdividido en dos grupos de fibras de diferente dirección: fibras “transversas” y fibras “verticales”. En cuanto a la composición fibrilar, en el compartimento horizontal predominaban las fibras tipo I sobre las tipo II, mientras que en el compartimento oblicuo se invertía la proporción

con una regionalización en cuanto a su composición. De este modo, el tercio rostral del compartimento oblicuo contenía un alto porcentaje de fibras tipo I, una cantidad algo menor de fibras intermedias y un escaso porcentaje de fibras tipo II. El tercio medio presentaba una mayoría de fibras tipo II y un escaso porcentaje de fibras tipo I, como el tercio posterior. Si bien, en este último había menos cantidad de fibras tipo II y más de tipo I que en el tercio medio. Esta subdivisión del compartimento oblicuo se observaba dispuesta a lo largo del eje longitudinal del músculo. Se hipotetizó que la organización compartimental del músculo geniogloso permitiría que sus regiones funcionaran independientemente al realizar diferentes actividades motoras. Con estos resultados, los autores concluyeron que el compartimento horizontal era un componente potencial en el mantenimiento de la apertura de las vías aéreas superiores, mientras que el compartimento oblicuo sería más activo durante los mecanismos de deglución y vocalización, fenómenos que normalmente requerían movimientos rápidos de la lengua y cambios de forma en la misma. Sin embargo, no pudieron relacionar las divisiones del compartimento oblicuo con las distintas funciones del músculo.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. ANIMALES, ENTIDADES MUSCULARES Y TOMA DE MUESTRAS

Para este trabajo de Tesis Doctoral hemos analizado diez perros adultos mestizos (seis machos y cuatro hembras), clínicamente sanos y con pesos medios comprendidos entre 20 y 25 Kg. Los animales procedentes del Servicio Municipal de Control de Zoonosis del Excelentísimo Ayuntamiento de Murcia, fueron sacrificados de forma humanitaria, según la legislación vigente. Se les inyectó intramuscularmente maleato de acepromacina (CalmoNeosán[®]) a dosis de 1,5 mg/Kg p.v. como tranquilizante, y por vía intravenosa pentobarbital sódico (Dolethal[®]) a dosis de 60 mg/Kg p.v. como agente eutanásico.

Tras el sacrificio, los cadáveres se trasladaron inmediatamente a la sala de disección de la Unidad Docente de Anatomía y Embriología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, donde se procedió a la correspondiente

toma de muestras dentro de las dos primeras horas que siguen a la muerte del animal, evitándose así alteraciones musculares post mortem morfológicas y morfométricas (Braund, 1989).

Para obtener las muestras fue necesario, en primer lugar, resecar la mandíbula a nivel de las articulaciones intermandibular y temporomandibular. Asimismo, hubo que disecar, desinsertar y resecar los músculos temporal, masetero, milohioideo, digástrico y terigoideos (lateral y medial), lo que nos permitió exponer y acceder a los músculos que seguidamente detallaremos (**Figuras 13 y 14**). De dichas entidades musculares se obtuvieron secciones a nivel de su tercio medio o bien el músculo completo. Adicionalmente, se tomó una muestra del músculo semitendinoso que fue utilizada como control durante la aplicación de las diferentes técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas.

Los músculos de la lengua, paladar blando y faringe de los que se tomaron muestras fueron los siguientes:

Músculos de la lengua:

- Músculo geniogloso.*
- Músculo hiogloso.*
- Músculo estilogloso.*
- Músculo lingual propio.*

Músculos del paladar y fauces:

- Músculo palatino.*
- Músculo elevador del velo palatino.*
- Músculo tensor del velo palatino.*
- Músculo palatofaríngeo.*

Músculos de la faringe:

- Músculo terigofaríngeo (m. constrictor rostral de la faringe).*
- Músculo estilofaríngeo caudal.*



Figura 13. Imagen lateral izquierda del plano superficial de disección de la cabeza del perro, tras haber retirado la piel y el *m. cutáneo de la cara*.

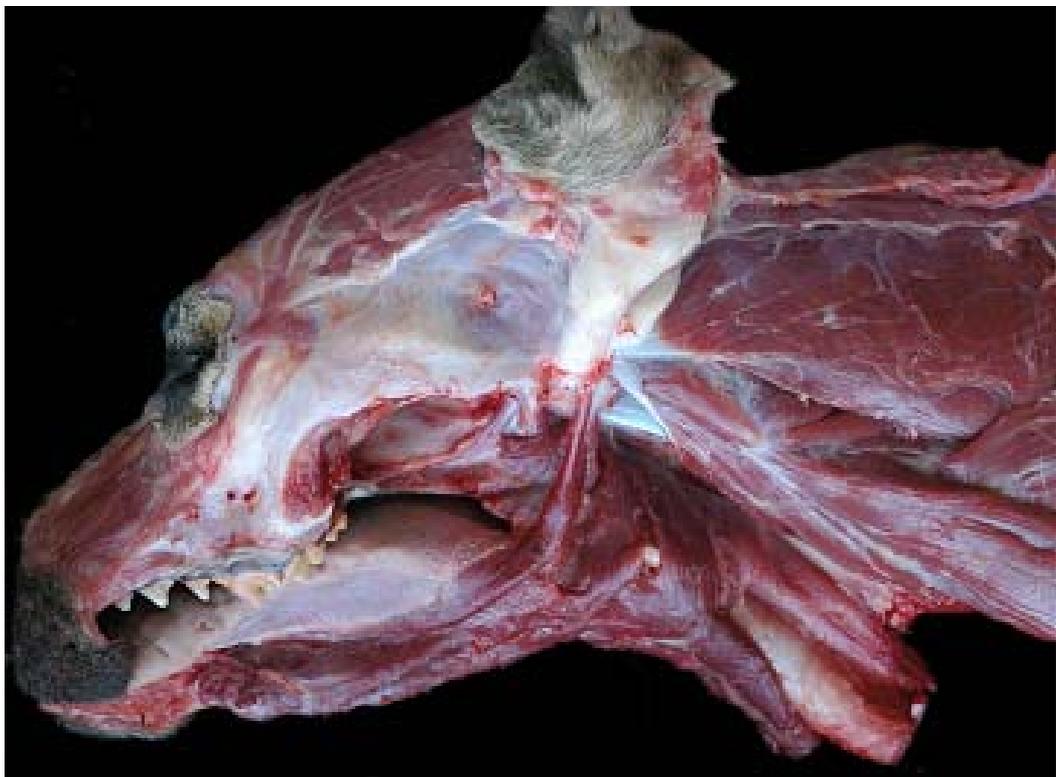


Figura 14. Imagen lateral izquierda del plano de disección profundo de la cabeza del perro. Se ha procedido a la resección de la mandíbula y se han desinsertado y retirado los *mm. temporal, masetero, milohioideo, digástrico y terigoideos (lateral y medial)*.

-*Músculo hiofaríngeo* (m. constrictor faríngeo medio).

-*Músculo tirofaríngeo* (m. constrictor caudal de la faringe).

-*Músculo cricofaríngeo* (m. constrictor caudal de la faringe).

A continuación, realizamos una breve descripción anatómica de las referidas entidades musculares.

MÚSCULOS DE LA LENGUA

Músculo geniogloso. Es un músculo delgado, de morfología triangular, que se dispone sagitalmente en el espesor de la lengua, dorsalmente al músculo genihioideo, a modo de abanico. Sus fibras se originan en la superficie medial de la porción incisiva del cuerpo de la mandíbula y en la sínfisis mandibular. Queda integrado por tres haces musculares, evidenciables mejor por su cara medial. El haz vertical se localiza en la mitad rostral hacia el vértice lingual, donde se inserta caudalmente a la lissa, para intervenir en su depresión y retracción. El haz oblicuo se dispone caudalmente al haz vertical con el que entremezcla algunas de sus fibras, dirigidas ventrodorsalmente. Se inserta en la mitad caudal de la lengua, colaborando en su protrusión. El haz recto discurre lateral a los haces vertical y oblicuo, paralelo al cuerpo mandibular. Se inserta en el tercio caudal de la lengua, así como en el aparato hioideo (basihioides y queratohioides). Caudalmente los haces rectos de ambos genioglosos están separados por los músculos hioepiglóticos. En conjunto, el músculo geniogloso protruye y deprime la lengua, retrayendo también el vértice lingual. Recibe impulso motor a partir del nervio hipogloso (**Figuras 15 y 16**).

Músculo hiogloso. Se dispone lateralmente a los músculos genihioideo y geniogloso, interviniendo en la retracción y depresión de la lengua. Tiene su origen en el extremo distal del tirohioides y en el basihioides (cara ventrolateral) y se inserta hacia el techo lingual, entremezclando sus fibras con las del músculo lingual propio. Queda inervado también por los ramos linguales del nervio hipogloso (**Figuras 15 y 16**).

Músculo estilogloso. Es el más lateral de los músculos extrínsecos de la lengua. Se extiende desde el estilohioides (aparato hioideo) hasta el vértice lingual. Presenta tres cabezas musculares que se insertan en la lengua, a diferentes niveles, siguiendo su eje longitudinal. Actuando como una unidad, las tres cabezas musculares desplazan caudalmente (retracción) y lateralizan (diducción) dicho órgano. Independientemente, cada cabeza deprime la parte lingual sobre la que se inserta. En secuencia caudorrostral estas cabezas se denominan: corta, larga y rostral. La cabeza corta se origina en la mitad distal de la superficie caudal del estilohioides. Sus fibras incurvadas ventral y rostralmente, transitan por la cara lateral del epihioides para insertarse en la base de la lengua, entre las fibras del músculo hiogloso. La cabeza larga se origina dorsal y lateralmente a la cabeza corta. Sus fibras tras cruzar el estilohioides se incurvan también ventrorrostralmente, en relación con el borde ventral de la cabeza rostral, cruzan la cara lateral del músculo geniogloso y se insertan en la cara ventral de la mitad rostral de la lengua, cerca del plano medio. La cabeza rostral emerge desde la mitad proximal del estilohioides. Sus fibras se incurvan, como las de las dos cabezas anteriores, cruzan en superficie parte de las fibras de inserción de la cabeza corta, se entremezclan con las del músculo hiogloso y se insertan en la lengua, a lo largo de su cara ventrolateral. La inervación de este músculo, como la de todos los músculos extrínsecos e intrínsecos de la lengua, corresponde al nervio hipogloso (**Figuras 15 y 16**).

Músculo lingual propio. El músculo lingual constituye el almacén muscular intrínseco de la lengua. Consta de varios haces musculares situados entre los fascículos de inserción de los músculos extrínsecos. Estos haces musculares se disponen ordenados bilateralmente en cuatro grupos pobremente delimitados: longitudinal dorsal o superficial, longitudinal ventral o profundo, fascículo lingual transversal y fascículo lingual vertical. Las fibras longitudinales superficiales se disponen bajo la mucosa dorsal del órgano y están más desarrolladas en su mitad caudal, donde constituyen una masa compacta a cada lado del septo lingual. Más rostralmente, las fibras quedan espaciadas en pequeños grupos dispuestos simétricamente, de modo que los haces mayores y más compactos se sitúan próximos al septo, mientras que los más diseminados y pequeños lo hacen cerca del borde

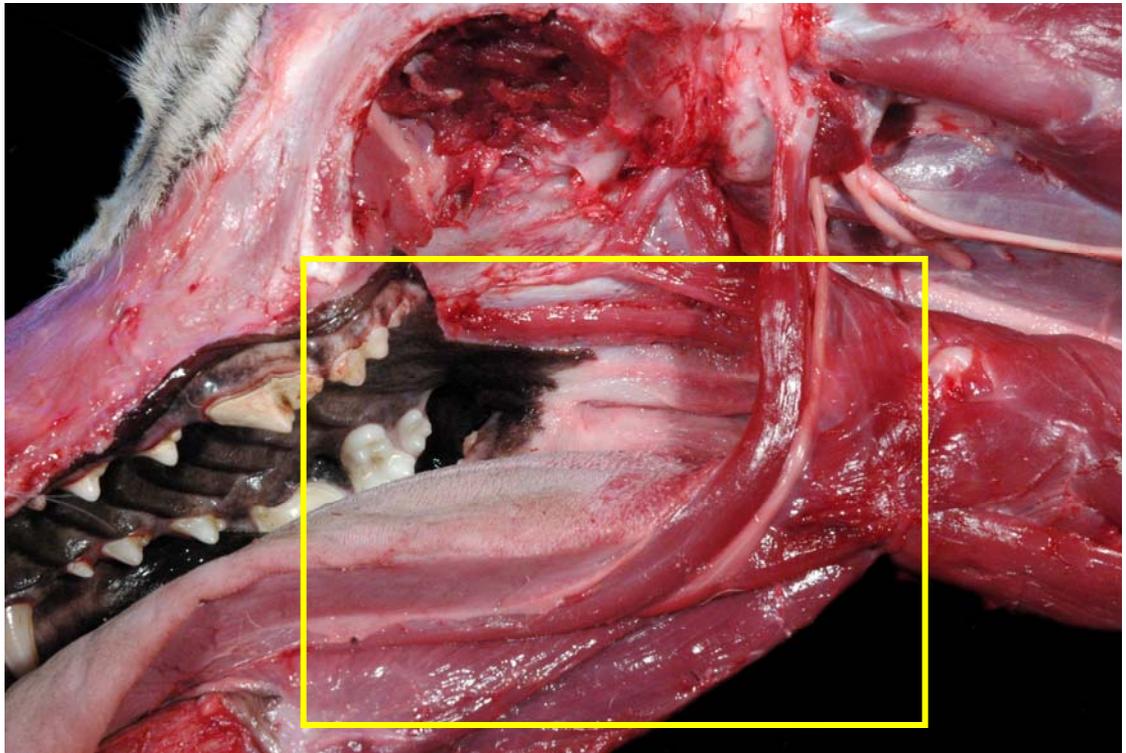


Figura 15. Imagen lateral izquierda del plano profundo de la cabeza del perro, donde se aprecia la musculatura extrínseca de la lengua, inervada por el *n. hipogloso*.

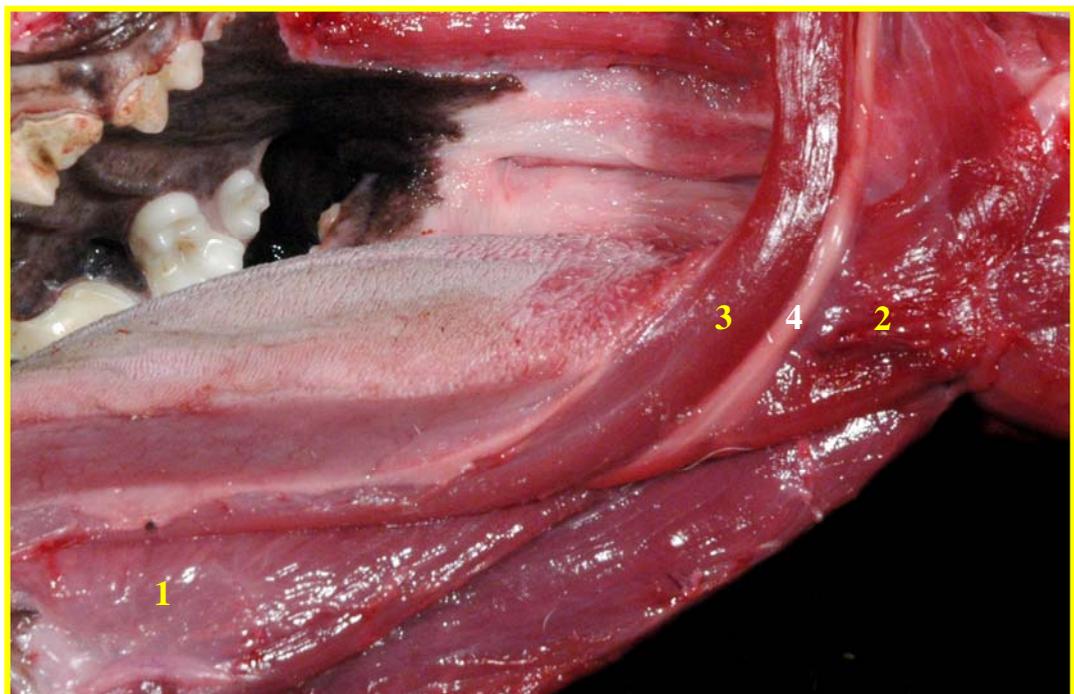


Figura 16. Imagen ampliada de la Figura 15. Se observan las siguientes estructuras: **1:** *M. geniogloso*. **2:** *M. hiogloso*. **3:** *M. estilogloso*. **4:** *N. hipogloso*.

lateral de la lengua. Las fibras transversas y verticales oblicuas ocupan un área amplia en el centro de la lengua, bajo los haces longitudinales dorsales. Forman una intrincada red entre las fibras musculares superficiales y profundas. Algunas fibras musculares largas se disponen ventralmente a esta red, integrando el fascículo longitudinal profundo. Dichas fibras, localizadas en la mitad ventral de la lengua, son menos numerosas y están menos organizadas que las fibras longitudinales dorsales. A menudo, se entremezclan con las fibras de inserción de los músculos linguales extrínsecos y con las fibras musculares intrínsecas perpendiculares y transversas. Rostralmente, sin embargo, las fibras longitudinales profundas se organizan dentro de una masa compacta y rodean la lissa. La inervación del músculo lingual propio corre a cargo también del nervio hipogloso.

Según Abdel-Malek¹ (1938), el fascículo longitudinal superficial del músculo lingual propio es el único lateralizador de la lengua. La porción longitudinal ventral del músculo lingual propio, el músculo estilogloso, y las fibras rostrales del hiogloso y del geniogloso (Abd-el-Malek¹, 1938; Bennet y Hutchinson¹, 1946), además de ser diductores homolaterales, son flexores ventrales del vértice de la lengua.

Esta entidad muscular se encarga de proyectar la lengua rostralmente, de la producción de complicados movimientos locales, intrínsecos, así como de la prevención de mordeduras. Los complejos pero precisos movimientos de la lengua del perro son importantes para la succión, prehensión, masticación y deglución, sin olvidar su función como primer órgano del gusto. Estos movimientos resultan de las acciones coordinadas de los músculos extrínsecos (estilogloso, hiogloso y geniogloso) e intrínsecos de la lengua (músculo lingual propio).

MÚSCULOS DEL PALADAR Y FAUCES

Los músculos que integran y activan el paladar blando son principalmente un par de músculos palatinos y las partes distales de los músculos tensor y elevador del velo palatino. Los **músculos palatinos** derecho e izquierdo se disponen próximos entre sí y hacia el plano medio del paladar blando, ventralmente a la aponeurosis

palatina (**Figuras 17 y 18**). Su contracción acorta y eleva el paladar blando. Según la 5ª edición de la Nómina Anatómica Veterinaria (2005), el músculo palatofaríngeo queda también encuadrado en este grupo muscular.

Músculo elevador del velo palatino. Es una entidad muscular que actúa elevando la parte más caudal del paladar blando o velo del paladar. Se inicia en la apófisis muscular, adyacente a la bulla timpánica, y discurre ventrocaudalmente en relación con la pared de la faringe. Distalmente transita entre los músculos palatofaríngeo y terigofaríngeo, dejando su inserción sobre la mitad caudal del paladar blando, lateralmente al músculo palatino. Se halla innervado por los nervios glossofaríngeo (IX par craneal) y vago (X par craneal). El músculo elevador del velo palatino está ligeramente más desarrollado que el músculo tensor del velo palatino (**Figuras 17 y 18**).

Músculo tensor del velo palatino. Es un músculo muy pequeño que se origina también en la apófisis muscular, rostral a la bulla timpánica, en el surco de la porción petrosa del hueso temporal, ventrolateralmente al músculo tensor del tímpano. Asimismo, algunas fibras de su tendón de origen invaden el canal musculotubárico. Su vientre muscular surca la pared de la faringe hacia el gancho del hueso terigoideo, donde sus fibras musculares se tendonizan e irradian rostralmente para dispersarse por el paladar. La función del músculo tensor del velo palatino es la de estirar y tensar el paladar entre los huesos terigoideos. Se encuentra impulsado por el nervio mandibular del trigémino, que delega el nervio tensor del velo palatino (**Figuras 17 y 18**).

Músculo palatofaríngeo. Se encarga de estrechar la faringe, así como de desplazarla dorsal y rostralmente. El músculo palatofaríngeo es un músculo poco desarrollado, dispuesto medialmente al músculo tensor del velo palatino, cuyas fibras se asocian libremente al abrazar la faringe. Dyce¹ (1957) lo divide en dos porciones: dorsal y ventral. La mayoría de las fibras se originan en el paladar blando

¹ Autores citados por Evans (1993)

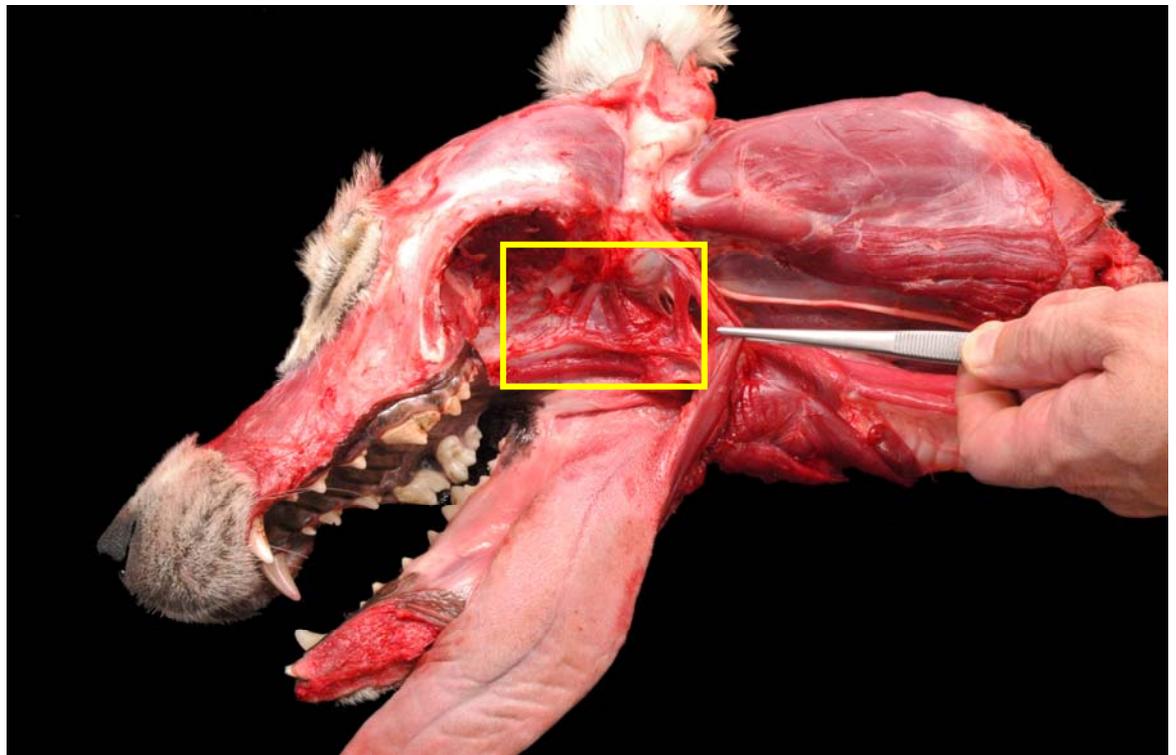


Figura 17. Imagen lateral izquierda del plano profundo de la cabeza del perro. Se aprecia la musculatura del paladar y fauces. Se ha desplazado caudalmente el estilohioides. El paladar blando ha sido seccionado parcialmente para poder ver el *m. palatino*.

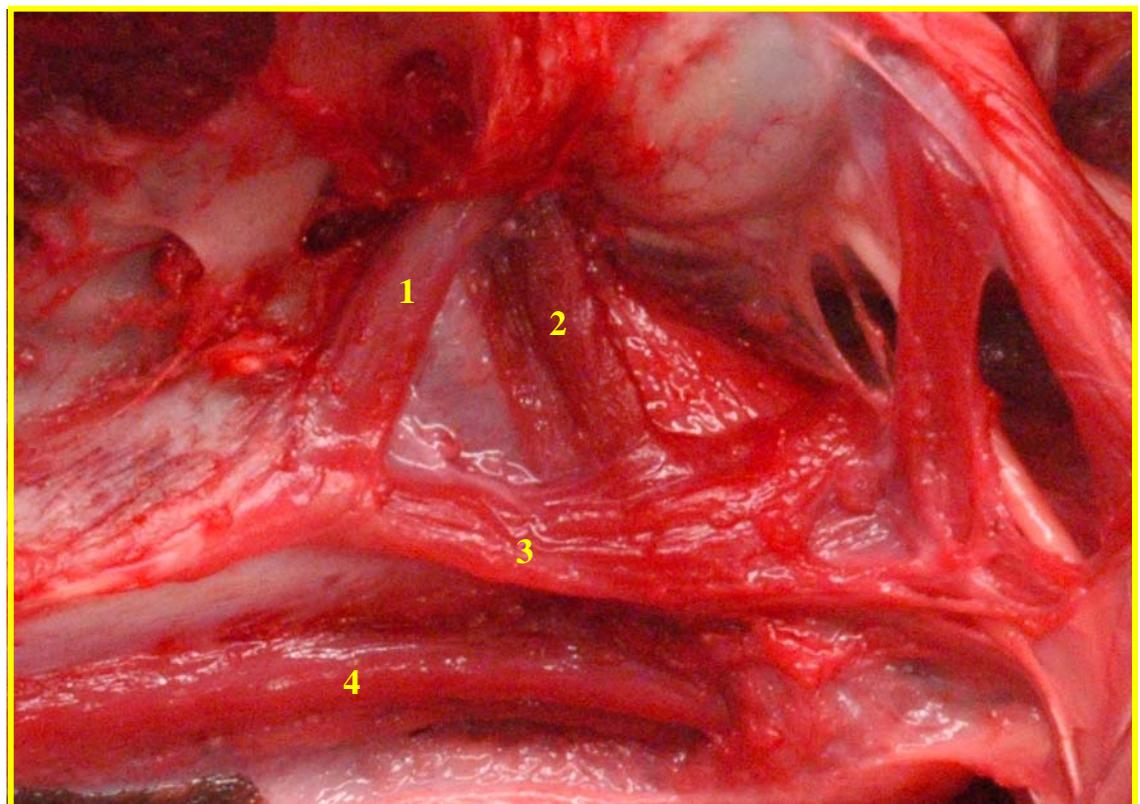


Figura 18. Imagen ampliada de la Figura 17. Se observan las siguientes estructuras: **1:** *M. tensor del velo palatino*. **2:** *M. elevador del velo palatino*. **3:** *Mm. terigofaríngeo y palatofaríngeo*. **4:** *M. palatino*.

(aponeurosis palatina) y se extienden oblicuamente en dirección dorsocaudal hacia el rafe faríngeo. Algunas fibras de los músculos terigofaríngeo y estilofaríngeo caudal se entremezclan con las del palatofaríngeo hacia la pared dorsal de la faringe. Otras fibras, sin embargo, llevan una dirección rostral desde su origen palatino y se dispersan por el paladar blando, aproximadamente hasta el nivel del gancho terigoideo. Su inervación la recibe de los ramos y plexos faríngeos de los nervios glossofaríngeo y vago. Constituye la base muscular de los pliegues palatofaríngeos que delimitan el orificio intrafaríngeo (**Figuras 17-20**).

MÚSCULOS DE LA FARINGE

Músculo terigofaríngeo. Es un músculo constrictor rostral de la faringe, difícil de delimitar del palatofaríngeo. Su función es la de estrechar la faringe y protractarla. El músculo terigofaríngeo se origina en el gancho del hueso terigoideo. Sus fibras se dirigen primero caudalmente, en posición lateral respecto al músculo elevador del velo palatino, y prosiguen luego en dirección dorsal sobre la faringe para insertarse en el rafe fibroso medio, entremezcladas con las fibras de los músculos palatofaríngeo y estilofaríngeo caudal, ya que irradian hacia sus inserciones. También está inervado por los nervios vago y glossofaríngeo (**Figuras 17-20**).

Músculo estilofaríngeo caudal. Es un pequeño músculo que se extiende desde la cara caudal del extremo proximal del estilohioides hasta la pared faríngea. Su función consiste en dilatar, elevar y desplazar rostralmente la faringe. En alguna de las tomas de muestras, hemos observado que determinadas fibras proceden del epihoides. Desde su origen, las fibras discurren caudal y ventralmente hacia la pared dorsolateral de la faringe, donde se dispersan y entremezclan con las fibras del músculo palatofaríngeo. Está inervado por los nervios glossofaríngeo y vago (ramos faríngeos) (**Figuras 19 y 20**).

Músculo hiofaríngeo. Está considerado como el músculo constrictor medio. Se encarga de estrechar a estos niveles la faringe. El músculo hiofaríngeo se

encuentra a menudo dividido en dos partes, clásicamente denominadas como músculos condrofaríngeo y queratofaríngeo. El músculo condrofaríngeo, la porción más desarrollada, surge de la cara lateral del tirohioides, cubierto por el músculo hiogloso. El músculo queratofaríngeo lo hace del queratohioides. Las fibras musculares de ambas porciones confluyen y constituyen una placa muscular que discurre dorsalmente, en relación con la laringe y la faringe, para insertarse sobre el rafe medio dorsal de la faringe, de manera opuesta a la de los músculos contralaterales. Cerca de su inserción, las fibras más caudales quedan recubiertas por las fibras de inserción del músculo tirofaríngeo. Está inervado por los nervios glossofaríngeo y vago (**Figuras 19 y 20**).

Músculo tirofaríngeo. El músculo tirofaríngeo estrecha también la faringe. Junto al músculo cricofaríngeo, conforman el grupo de los constrictores caudales de la faringe. Se dispone inmediatamente caudal al músculo hiofaríngeo. Se origina en la línea oblicua de la lámina del cartílago tiroideo, y discurre dorsorrostralmente sobre dicha lámina. Las fibras se separan sobre la superficie dorsal de la faringe y se insertan en el rafe dorsal medio. Algunas de ellas, las de inserción más rostral, recubren parcialmente a las del músculo hiofaríngeo. Se halla inervado por los nervios glossofaríngeo y vago (**Figuras 19 y 20**).

Músculo cricofaríngeo. El músculo cricofaríngeo estrecha la porción más caudal de la faringe. Constituye, con las fibras más caudales del músculo tirofaríngeo y las más rostrales del esófago, el principal componente del esfínter faringoesofágico (esfínter esofágico superior en la especie humana). Transita, como el músculo anterior, sobre la superficie lateral de la laringe y faringe. Se origina en la cara lateral del arco del cartílago cricoideo y se dirige dorsalmente para insertarse en el rafe dorsal medio de la faringe. Como sus fibras musculares transitan sobre la pared de la faringe, algunas se mezclan, en su margen caudal, con las fibras musculares del esófago. Se encuentra inervado también por los nervios vago y glossofaríngeo (**Figuras 19 y 20**).

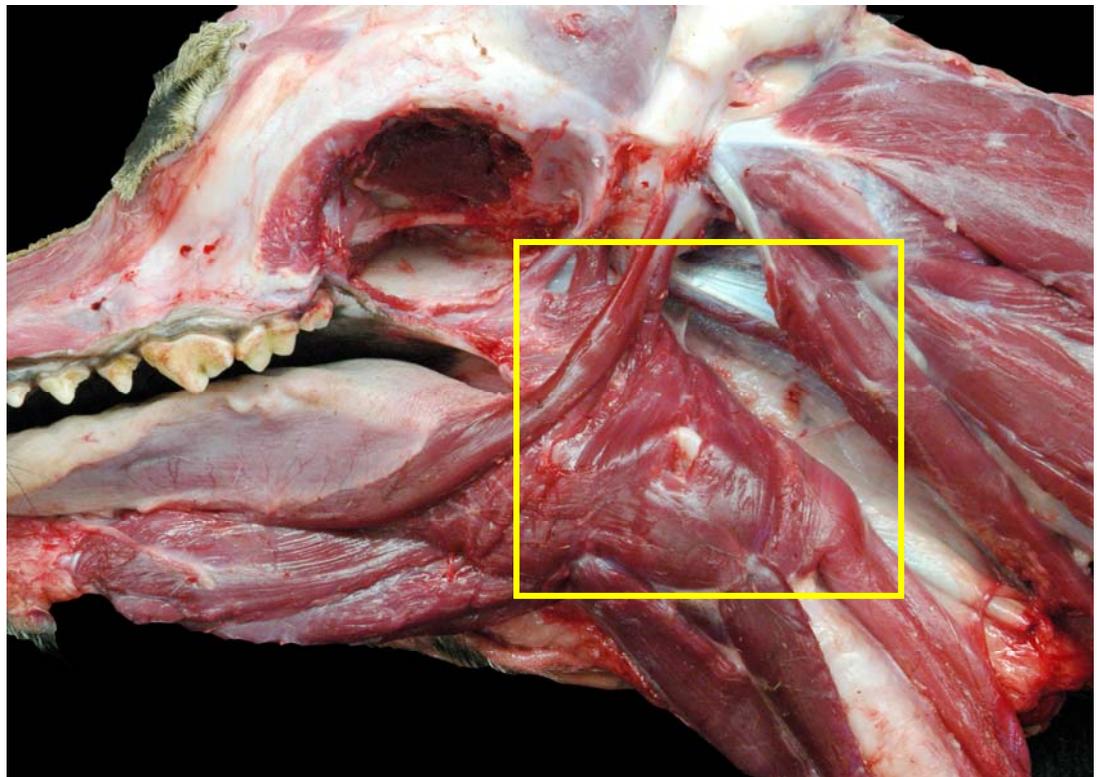


Figura 19. Imagen lateral izquierda del plano profundo de la cabeza del perro, donde se puede apreciar la musculatura faríngea.

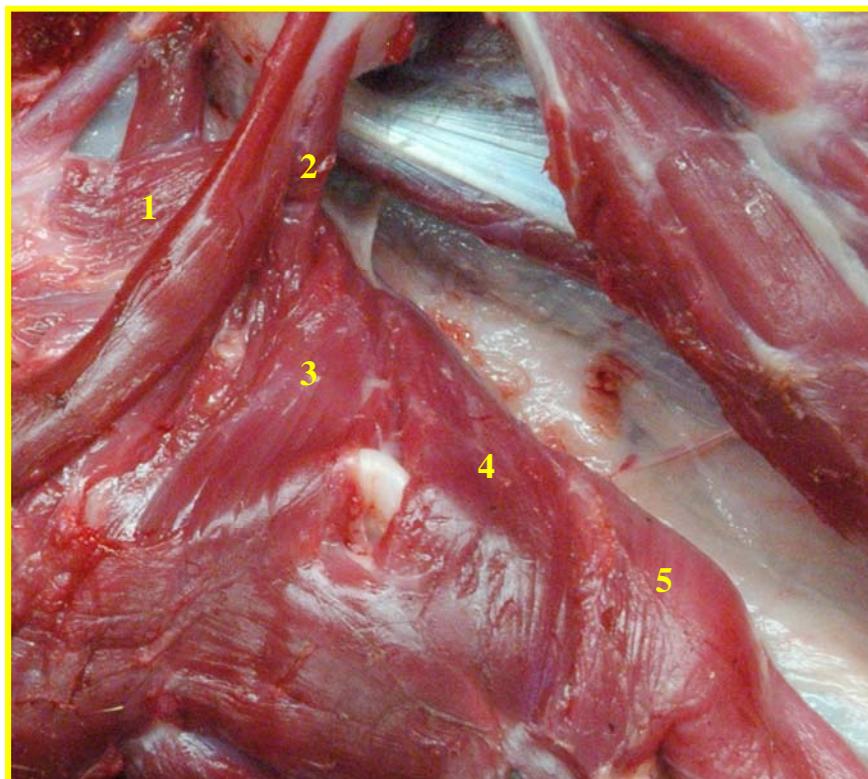


Figura 20. Imagen ampliada de la Figura 19. Se observan las siguientes estructuras: **1:** *Mm. terigofaríngeo y palatofaríngeo*. **2:** *M. estilofaríngeo caudal*. **3:** *M. hiofaríngeo*. **4:** *M. tirofaríngeo*. **5:** *M. cricofaríngeo*.

Por último, en relación con la toma de muestras hemos de referir las siguientes particularidades:

-En algunos animales, debido al escaso desarrollo del músculo palatofaríngeo (Evans, 1993) que no se diferencia macroscópicamente del músculo terigofaríngeo, ambos fueron extraídos, procesados y analizados conjuntamente.

-Del músculo lingual propio se obtuvieron tres porciones, que fueron procesadas y analizadas por separado, correspondientes a las regiones de la **raíz**, **cuerpo** y **vértice** de la lengua (Massimini, 1986).

III.2. CONGELACIÓN DE LAS MUESTRAS

Cada una de las muestras de los músculos anteriormente referidos se dispuso perpendicularmente, junto a la muestra control (músculo semitendinoso), sobre un corcho, al que previamente se había añadido una gota de OCT-Compound (Tissue-Tek[®]). El conjunto de ambas muestras se recubrió con mayor cantidad de OCT-Compound (Tissue-Tek[®]) y se procedió a su congelación. Esta se realizó dentro de un vaso de precipitado de vidrio con aproximadamente 100 ml de 2-metilbutano, enfriado con anterioridad sobre nitrógeno líquido a -190° C, almacenado en un termo. En primer lugar, se introdujo con lentitud el vaso de precipitado en el termo y se mantuvo en él hasta que el 2-metilbutano llegó a -160° C (temperatura óptima), hecho constatado al formar dicho compuesto una fina capa de color blanco adherida a las paredes y fondo del vaso. Con posterioridad, se sumergieron las muestras en el 2-metilbutano durante 10-15 segundos. De esta forma, se produce una congelación rápida y atraumática, idónea para la conservación íntegra de las estructuras enzimáticas e histológicas musculares.

Una vez congeladas las muestras y tras envolverlas para su protección con papel de aluminio, previamente refrigerado, se almacenaron a -65° C en arcón

congelador, dentro de recipientes plásticos que estaban a la misma temperatura, hasta el momento de proceder a su corte.

III.3. CORTE DE LAS MUESTRAS

Se realizaron cortes de 10 μm de grosor a -20°C con un criostato Leica, modelo 1850, que fueron recogidos sobre portaobjetos limpios y secos, por contacto de estos con la cuchilla del criostato. Para comprobar la ausencia de artefactos durante la congelación y verificar el posicionamiento correcto de la muestra (disposición transversal de los miocitos), se procedió a teñir los primeros cortes con una tinción rápida de hematoxilina-eosina. Una vez corroborados ambos aspectos, se obtuvieron un total de 40 cortes seriados por muestra por el procedimiento descrito, disponiéndose dos cortes en cada portaobjetos. Los portaobjetos se almacenaron en cajas refrigeradas previamente a -20°C , hasta ser sometidos a las diferentes técnicas.

III.4. TINCIÓNES Y TÉCNICAS EMPLEADAS

III.4.1. Técnicas histológicas (no enzimáticas)

III.4.1.1. Hematoxilina-Eosina (*Dubowitz y Brooke, 1973*)

Se aplicó en los primeros cortes histológicos para verificar la correcta disposición transversal de las fibras, comprobar la ausencia de artefactos durante la congelación y analizar la morfología de los miocitos. Con dicha técnica observamos los núcleos teñidos de azul, las fibras de rosa y el tejido conectivo de color rosa claro.

- 1.- Hematoxilina de Harris 3-6 minutos
- 2.- Lavar 3 veces con agua destilada.
- 3.- Eosina al 1% 30-60 segundos
- 4.- Deshidratar en alcoholes:

70°	1 minuto
90°	1 minuto
100°	1 minuto
100°	1 minuto
- 5.- Aclarar con isoparafina H (Panreac[®]) (2 baños de 1 minuto cada uno).
- 6.- Montar con medio sintético apropiado (Panreac[®]).

III.4.1.2. Tricrómico de Gomori modificado (*Brumback y Leech, 1984*)

Mediante esta técnica se evidencian los componentes extrafibrilares del músculo. Los núcleos de color púrpura, las miofibrillas de verde azulado (las fibras tipo I son teñidas en un tono más oscuro que las fibras tipo II), de verde claro el tejido conjuntivo y la red intermiofibrilar de rojo.

- 1.- Hematoxilina de Harris 5 minutos
- 2.- Lavar en agua destilada.
- 3.- Teñir en la solución tricrómico durante 20 minutos.

Fast green	0,3 gr
Chromotrope 2R	0,6 gr
Ácido fosfotúngstico	0,3 gr
Ácido acético glacial	1,0 ml
Agua destilada	100,0 ml
- 4.- Sumergir en ácido acético al 2% durante 10 minutos (hasta azular)
- 5.- Deshidratar en cadena ascendente de alcoholes, aclarar con isoparafina H (Panreac[®]) y montar en medio sintético apropiado (Panreac[®])

La solución de tricrómico se debe ajustar a pH 3,4 con NaOH 1M y agitarse antes de ser usada.

III.4.2. Técnicas histoquímicas

Hemos empleado dos tipos de reacciones histoquímicas. Por un lado, la técnica de la detección de la ATPasa miosínica, con preincubaciones alcalinas y ácidas, para valorar las características contráctiles de los miocitos. Por otro, la técnica de la NADH-TR, a fin de determinar el potencial oxidativo; es decir, las características metabólicas de las fibras musculares.

III.4.2.1. Técnicas de ATPasa miosínicas

Con este tipo de técnicas se detecta, mediante microscopía óptica, la actividad ATPasa (presencia o ausencia) de la miosina contenida en los miocitos. Para ello, las preparaciones son incubadas en una solución con ATP y calcio a pH 9,45. La enzima ATPasa, en este rango de pH, libera el fosfato terminal que se combina con el calcio formando fosfato cálcico, insoluble a pH alcalino, que precipita en los lugares donde se produce la reacción enzimática. Posteriormente las preparaciones son trasladadas a una cubeta con una solución de cloruro de cobalto. El cobalto sustituye al calcio en el fosfato formado anteriormente, transformándose éste en fosfato de cobalto que precipita en los mismos sitios que el fosfato cálcico. Por último, transformamos el fosfato de cobalto en sulfuro de cobalto, que también es insoluble, sometiendo las preparaciones musculares a una solución de sulfuro de amonio. El sulfuro de cobalto además de insoluble es de color negro, por lo que se puede demostrar con microscopio óptico la actividad mATPásica en las fibras musculares (Dubowitz y Brooke, 1973).

Cuando en la técnica descrita, sometemos previamente las preparaciones a medios más ácidos (pH 4,6-4,3) o alcalinos (pH 10,2-10,6); es decir, realizamos un proceso de preincubado, logramos evidenciar un mayor número de tipos fibrilares debido a la diferente labilidad de las distintas isomiosinas de las fibras musculares.

De este modo, podemos apreciar la coloración de las miofibrillas separadas por el espacio intermiofibrilar, que no llega a teñirse. En cortes longitudinales de las muestras observaríamos que la tinción se aprecia sobre las bandas A, región ocupada por miosina. Dicha característica es la que confiere la denominación de ATPasa miosínica a este tipo de técnicas (Dubowitz, 1985).

En nuestro estudio, las técnicas de ATPasa miosínica se corresponden a las referidas por Snow et al. (1982) para preincubaciones alcalinas, modificadas por Latorre et al. (1993a), y por Dubowitz y Brooke (1973) para preincubaciones ácidas, modificadas por Gil (1986). Es por ello que pasamos a describirlas.

III.4.2.1.1. Técnica de ATPasa miosínica con preincubación alcalina (método de Snow et al., 1982; modificado por Latorre et al., 1993a)

1.- Preincubar durante 15 minutos en la solución:

Cl ₂ Ca	0,1M
Acetato de sodio	0,07M
Barbital sódico	0,075M
pH: 10,2 10,3 10,4 y 10,5 (ajustados con NaOH 1M y 0,1M)	

2.- Lavar con agua destilada durante 5 minutos.

3.- Incubar durante 30 minutos en la solución:

Cl ₂ Ca	0,1M
Acetato de sodio	0,07M
Barbital sódico	0,075M
ATP	1,5 mg/ml
pH: 9,45 (ajustado con NaOH 1M y 0,1M)	

4.- Lavar con cloruro de calcio 0,2M: 2 baños de 5 minutos.

5.- Lavar con cloruro de cobalto al 2% durante 5 minutos.

6.- Lavar con agua destilada minuciosamente: 2 baños.

7.- Lavar con sulfuro de amonio al 1% durante 1 minuto.

- 8.- Lavar con agua destilada de 2 a 5 minutos.
- 9.- Deshidratar en cadena ascendente de alcoholes, aclarar con isoparafina H (Panreac[®]) y montar en medio sintético apropiado (Panreac[®])

III.4.2.1.2. Técnica de ATPasa miosínica con preincubación ácida (*método de Dubowitz y Brooke, 1973; modificado por Gil, 1986*)

En esta técnica, la concentración del acetato sódico es muy baja y a la solución preincubadora se incorpora cloruro sódico.

- 1.- Preincubar en la solución:

50 ml de solución A
101,5 ml de solución B
20 ml de cloruro sódico (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:

CIH	0,1N
-----	------

pH: 4,3 4,5 y 4,6 (ajustados con NaOH 0,1M)

El tiempo de preincubación es de 5 minutos.

- 2.- Lavar en la siguiente solución:

Barbital sódico	0,1M (2 ml)
Cloruro de calcio	0,18M (1 ml)
Agua destilada	7 ml

pH: 9,4 (se ajusta con CIH 0,1N)

El tiempo de lavado es de 30 segundos.

- 3.- Incubar en la siguiente solución:

Solución lavadora junto con 15 mg de ATP

pH: 9,4 (se ajusta con NaOH 1M y 0,1M)

El tiempo de incubación es de 45 minutos.

- 4.- Lavar con cloruro de calcio al 1%: 2 baños de 5 minutos.
- 5.- Lavar con cloruro de cobalto al 2% durante 5 minutos.
- 6.- Lavar con barbital sódico 0,01M de 5 a 10 minutos.
- 7.- Lavar con agua destilada durante 30 segundos.
- 8.- Lavar con sulfuro de amonio al 1% durante 1 minuto.
- 9.- Lavar con agua destilada de 2 a 5 minutos.
- 10.- Deshidratar en cadena ascendente de alcoholes, aclarar con isoparafina H (Panreac[®]) y montar en medio sintético apropiado (Panreac[®]).

III.4.2.2. Técnicas histoquímicas para la determinación del metabolismo fibrilar

Las enzimas oxidativas, tales como las deshidrogenasas (SDH), diaforasas (NADH-TR) y oxidasas son importantes ya que reflejan la utilización de diferentes intermediarios metabólicos del ciclo de Krebs y vías relacionadas. Indican, por tanto, las posibles fuentes de energía en el metabolismo muscular.

Estas técnicas tienen su fundamento en el uso de una sal de tetrazolio insoluble e incolora, que intercepta electrones en algún punto de la cadena respiratoria, quedando reducida, coloreada y precipitada por su carácter de insolubilidad.

Las diaforasas son las enzimas consideradas en este trabajo. La NADH se utiliza como sustrato y uno de los compuestos del tetrazolio (NBT) como captador de electrones. Con dicha técnica se manifiesta claramente el espacio intermiofibrilar que incluye mitocondrias y retículo sarcoplásmico, ya que las miofibrillas no se tiñen (Dubowitz, 1985).

III.4.2.2.1. Técnica de la nicotinamida adenina dinucleótido tetrazolium reductasa (NADH-TR) (*método de Dubowitz y Brooke, 1973; modificado por Gil, 1986*)

1.- Incubar las preparaciones en la siguiente solución:

Tampón Tris 0,2M (pH 7,4)	10 ml
NBT	10 mg
NADH	8 mg

pH: 7,2 (ajustar con ácido acético puro 1M)

El tiempo de incubación es de 45-60 minutos a 37° C.

2.- Lavar en agua destilada durante 1 minuto.

3.- Deshidratar en cadena ascendente de alcoholes, aclarar con isoparafina H (Panreac[®]) y montar en medio sintético apropiado (Panreac[®]).

III.4.3. Técnica inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica aplicada al estudio del tejido muscular permite una diferenciación más específica de los diferentes tipos de miocitos. Se basa en el empleo de un anticuerpo monoclonal (**anticuerpo primario**), específico para alguna de las isoformas de cadenas pesadas de miosina (**MyHC**) descritas en el músculo esquelético (Schiaffino y Reggiani, 1996; Maccatrozzo et al., 2004, 2007; Toniolo et al., 2007). El anticuerpo primario es revelado de forma indirecta por un **anticuerpo secundario**, conjugado con un marcador visual, dirigido contra el primario. En este estudio hemos utilizado los siguientes anticuerpos monoclonales primarios:

Anti-Myosin Skeletal Slow (Sigma M 8421): anticuerpo específico para la MyHC-I de diferentes especies (Draeger et al., 1987; Hoh et al., 1988; Harris et al., 1989). Específico también para la isoforma MyHC-I canina (Telles, 2002).

Anti-Myosin Skeletal Fast (Sigma M 4276): anticuerpo marcador de todas las isoformas rápidas de miosina (Carter et al., 1990; Havenith et al., 1990;

Naumann y Pette, 1994). Específico también para las isoformas rápidas de miosina de la especie canina (Telles, 2002).

BA-F8 (cedido por gentileza del Prof. Mascarello, Universidad de Padua): anticuerpo específico para la MyHC-I o de contracción lenta de diversas especies, desde la rata (Bottinelli et al., 1991) al cerdo (Toniolo et al., 2004). Su especificidad ha sido también demostrada para la especie canina por Toniolo et al. (2007).

SC-71 (cedido por gentileza del Prof. Mascarello, Universidad de Padua): anticuerpo específico para la MyHC-IIa rápida de la rata (Schiaffino et al., 1989; Bottinelli et al., 1991), del caballo (Rivero et al., 1996) y del cerdo (Toniolo et al., 2004). En la especie humana (Serrano et al., 2001), en la llama (Graziotti et al., 2001b, 2004), en la cabra (Argüello et al., 2001), en el cerdo (Lefaucheur et al., 2002) y en el perro (Acevedo y Rivero, 2006) se ha demostrado que, además de marcar fuertemente las fibras que contienen MyHC-IIa, también marca, aunque de forma más débil, las fibras que contienen MyHC-IIx. Toniolo et al. (2007) comprobaron que, en la especie canina, dejaba de reaccionar con las fibras que contenían MyHC-IIx, cuando se empleaban diluciones bajas (a partir de 1/400).

BF-35 clon nuevo (cedido por gentileza del Prof. Mascarello, Universidad de Padua): su efectividad ha sido comprobada en la especie porcina (Toniolo et al., 2004), en el ganado vacuno (Maccatrozzo et al., 2004) y en el perro (Toniolo et al., 2007), como marcador claro y exclusivo de las fibras que contienen MyHC-IIx, aunque también reacciona con todas las fibras rápidas en la rata (Toniolo et al., 2004).

En nuestro trabajo hemos seguido la técnica inmunohistoquímica aplicada en la Universidad de Padua por el Prof. Mascarello para la detección de cadenas pesadas de miosina lenta y rápida en el músculo esquelético, y el sistema DakoCytomation EnVision[®]+System-HRP (DAB) (DakoCytomation, Inc., California, USA) (EnVision a partir de ahora). El proceso completo es como sigue:

- 1.- Descongelar los portaobjetos durante 30 minutos.
- 2.- Realizar un lavado con tampón fosfato salino (PBS), en cuna con agitación, durante 5 minutos.

Preparación del PBS:

Na ₂ HPO ₄ (S-7907) anhidro	2,839 gr/100 ml; se cogen 70 ml
NaH ₂ PO ₄ (S-0751) anhidro	2,399 gr/100 ml; se cogen 30 ml
NaCl (S-7653)	17 gr

Se añade agua destilada hasta 2 litros.

- 3.- Secar portaobjetos.
- 4.- Colocar el anticuerpo primario sobre los portaobjetos e incubar a temperatura ambiente en cámara húmeda durante toda la noche. Las diluciones utilizadas fueron las siguientes:

Anti-Myosin Skeletal slow (Sigma M 8421)	1/2000 y 1/4000
Anti-Myosin Skeletal fast (Sigma M 4276)	1/200 y 1/400
BA-F8	1/200
SC-71	1/400
BF-35 clon nuevo	1/400
- 5.- Retirar cuidadosamente el anticuerpo primario por capilaridad con ayuda de papel secante.
- 6.- Realizar dos lavados en PBS de 5 minutos cada uno.
- 7.- Secar los portaobjetos.
- 8.- Aplicar el polímero marcador de peroxidasa suministrado por el sistema EnVision, en cantidad suficiente para cubrir las muestras y colocar cubreobjetos sobre las mismas.
- 9.- Incubar a temperatura ambiente en cámara húmeda durante 1 hora.
- 10.- Quitar los cubreobjetos sumergiendo los portaobjetos en un vaso de precipitado con PBS, dejándolos resbalar dentro del mismo.
- 11.- Realizar dos lavados en PBS de 5 minutos cada uno.
- 12.- Secar los portaobjetos.
- 13.- Aplicar la solución de diaminobencidina (Líquido DAB) junto al

cromógeno-sustrato suministrados por el sistema EnVision, en cantidad suficiente para cubrir las muestras y colocar cubreobjetos sobre las mismas.

- 14.- Incubar a temperatura ambiente en cámara húmeda durante 5-10 minutos.
- 15.- Enjuagar las preparaciones con un chorro continuo de agua corriente durante 10 minutos.
- 16.- Deshidratar en cadena ascendente de alcoholes, aclarar con isoparafina H (Panreac[®]) y montar en medio sintético apropiado (Panreac[®]).

III.5. FOTOGRAFIADO Y MICROFOTOGRAFIADO

Dado que con el paso del tiempo disminuye significativamente la calidad e intensidad de las reacciones enzimáticas e inmunohistoquímicas en las muestras procesadas, se procedió a realizar su fotografiado con celeridad. Utilizamos un fotomicroscopio Zeiss, modelo Axiostop 40, con una cámara Spot Insight QE, modelo 4.2, y como soporte informático para procesar las microfotografías digitales el programa que suministraba la cámara, el Spot 3.5 para Windows, perteneciente todo a la Unidad Docente de Anatomía y Embriología del Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas de la Universidad de Murcia. Las preparaciones se fotografiaron a 4x, 10x, 20x y 40x y 63x.

De las fotografías a 4x y 10x se obtuvo una visión amplia de las secciones musculares. Las fotografías a mayores aumentos permitieron obtener imágenes de un mismo campo histológico sometido a las distintas técnicas, con el fin de analizar el comportamiento tintorial de un mismo grupo de fibras musculares, proceder a su identificación y catalogación, y establecer los porcentajes fibrilares relativos. Estos últimos se obtuvieron al contabilizar un mínimo de 400 fibras incluidas en fascículos completos, de campos superficiales y profundos, elegidos al azar (Štrbenc et al., 2004).

Asimismo, referir en este apartado de Material y Métodos que las fotografías macroscópicas de los diferentes planos de disección de la musculatura objeto de estudio se realizaron con una cámara reflex digital Nikon, modelo D-70, siendo las imágenes procesadas con el programa Adobe Photoshop CS2 para Windows.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV.1. TIPOS DE FIBRAS EN EL MÚSCULO SEMITENDINOSO (MÚSCULO CONTROL). FIGURAS 21-25; TABLAS I Y II

IV.1.1. Técnicas histoquímicas

Las técnicas histoquímicas nos han permitido clasificar los distintos tipos de miocitos en el músculo semitendinoso del perro, según la actividad de la enzima ATPasa miosínica (**técnica mATPasa**), frente a preincubaciones alcalinas y ácidas, y el potencial oxidativo (**técnica NADH-TR**).

IV.1.1.1. Técnica mATPasa

Al comparar secciones musculares transversales seriadas, sometidas a la técnica mATPasa, se pueden identificar fácilmente tres tipos principales de fibras (**Figura 21; A, B y C**). De acuerdo a los criterios establecidos previamente para la

especie canina (Snow et al., 1982; Latorre, 1990), y para este músculo en concreto (Latorre et al., 1993b), las catalogamos como tipos **I**, **IIA** y **II propias del perro (IIp)**. En algunas de las preparaciones analizadas hemos detectado, además, un cuarto tipo fibrilar denominado **IIC**, cuya presencia resulta muy escasa (< 0,5%) (**Figura 22**). Por el grado de intensidad tintorial, la diferenciación de estos tipos fibrilares se aprecia nítidamente al aplicar la técnica mATPasa a **preincubación alcalina**, siendo idóneos los **pH 10,4** y **10,5**. La **preincubación ácida** a **pH 4,6** también permite diferenciar estos cuatro tipos fibrilares, aunque su distinción resulta más difícil en la mayoría de los cortes procesados. Mediante **preincubación ácida** a **pH 4,3** sólo es posible identificar tres tipos, ya que gran parte de las fibras que a otras preincubaciones manifiestan una actividad tintorial intensa o moderada, la pierden a este pH de preincubación. En resumen, las características histoquímicas de los referidos tipos de fibras del músculo semitendinoso del perro por la resistencia de la enzima mATPasa, frente a medios alcalinos y ácidos, son las siguientes:

Fibras tipo I: actividad mATPasa alcalino-lábil (tinción negativa) y ácido-estable (tinción muy fuerte).

Fibras tipo IIA: actividad mATPasa alcalino-estable (tinción muy fuerte) y ácido-lábil (tinción negativa).

Fibras tipo IIp (propias del perro): actividad mATPasa alcalino-estable (tinción fuerte), ácido-estable a pH 4,6 (tinción moderada) y ácido-lábil a pH 4,3 (tinción negativa).

Fibras tipo IIC: actividad mATPasa alcalino-estable (tinción moderada) y ácido-estable (tinción fuerte a pH 4,6 y moderada a pH 4,3).

IV.1.1.2. Técnica NADH-TR

En general, la capacidad oxidativa que se advierte en todos los tipos de fibras identificados mediante la técnica mATPasa suele ser elevada, como lo pone de

manifiesto el grado de intensidad tintorial que presentan con la técnica NADH-TR. No obstante, algunas de las fibras tipo II tienen dicha actividad atenuada o disminuida (**Figura 23**).

Por tanto, desde el punto de vista exclusivamente histoquímico, y conforme a los criterios establecidos para el músculo semitendinoso en la especie canina por Latorre et al. (1993b), las fibras clasificadas como tipos I, IIA, IIp y IIC pueden ser identificadas por el grado de intensidad tintorial que manifiestan frente a los dos tipos de técnicas (**Tabla I**).

IV.1.2. Técnica inmunohistoquímica

Los diferentes anticuerpos empleados frente a las cadenas pesadas de miosina (MyHC), nos permiten comprobar que las fibras catalogadas histoquímicamente como tipo I reaccionan, exclusivamente, con el anticuerpo BA-F8, específico para la isoforma de miosina lenta MyHC-I (**Figuras 21-D y 24**). Al aplicar el anticuerpo “Anti-Myosin Skeletal Slow” se observa que también marca, aunque con menor intensidad, algunas de las fibras clasificadas histoquímicamente como tipo II. Las fibras descritas como IIp reaccionan intensamente con el anticuerpo específico para la isoforma de miosina rápida MyHC-IIx (BF-35 clon nuevo; desde este momento lo denominaremos simplemente BF-35) (**Figuras 21-E y 25**). La mayoría de ellas también se marcan, aunque menos intensamente, frente al anticuerpo específico para la isoforma de miosina rápida MyHC-IIa (SC-71) (**Figura 21, E-F**). Las fibras clasificadas histoquímicamente como IIA reaccionan con el anticuerpo SC-71, si bien el anticuerpo BF-35 también marca un gran número de ellas (**Figura 21, E-F**). Todos los subtipos fibrilares rápidos reaccionan intensamente con el anticuerpo “Anti-Myosin Skeletal Fast”. Por último, las fibras catalogadas histoquímicamente como IIC reaccionan de forma moderada a fuerte ante los anticuerpos BA-F8, “Anti-Myosin Skeletal Slow”, “Anti-Myosin Skeletal Fast” y SC-71.

Según estos resultados inmunohistoquímicos, las fibras catalogadas como IIp son en realidad un conjunto de fibras híbridas IIXA, con una población muy pequeña de fibras puras IIX. Respecto a las fibras IIA, pensamos que en realidad son fibras

híbridas **IIAX** en su mayoría, ya que contienen cadenas pesadas de miosina MyHC-IIa y MyHC-IIx, incluyendo, no obstante, una subpoblación relativamente escasa de fibras puras tipo **IIA**. Por tanto, inmunohistoquímicamente observamos que el músculo semitendinoso del perro está integrado fundamentalmente por una población de fibras puras tipo **I** e híbridas tipos **IIAX** y **IIXA**, existiendo también, aunque en muy escasa proporción, los tipos fibrilares puros **IIA** y **IIIX**, así como aisladamente alguna fibra tipo **IIIC** (**Tabla II**).

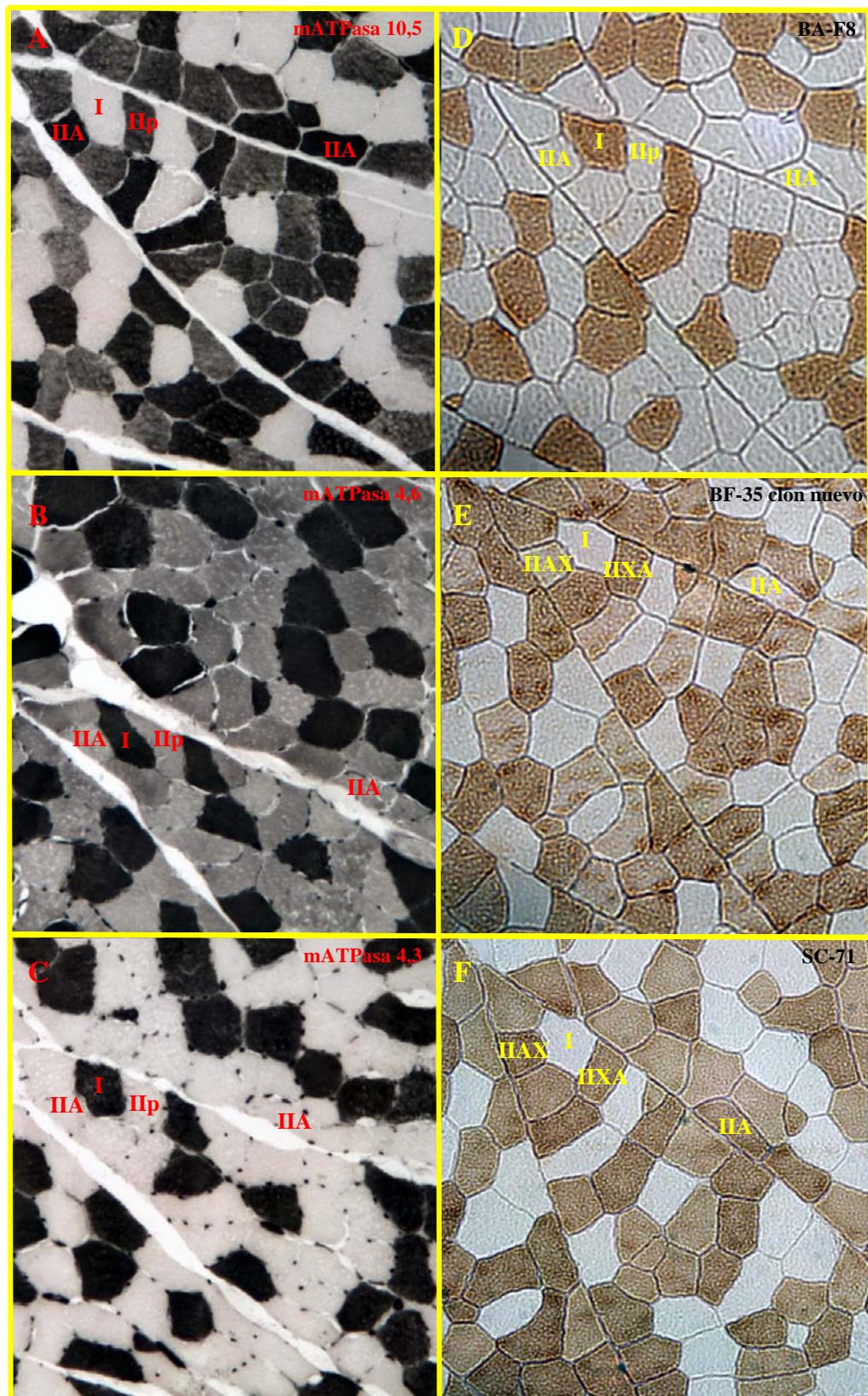


Figura 21. Secciones transversales seriadas del *m. semitendinoso* del perro. A-C: Técnica mATPasa a diferentes pH de preincubación. D-E: Técnica inmunohistoquímica con distintos anticuerpos. En las imágenes se indican los principales tipos fibrilares descritos con ambas técnicas.

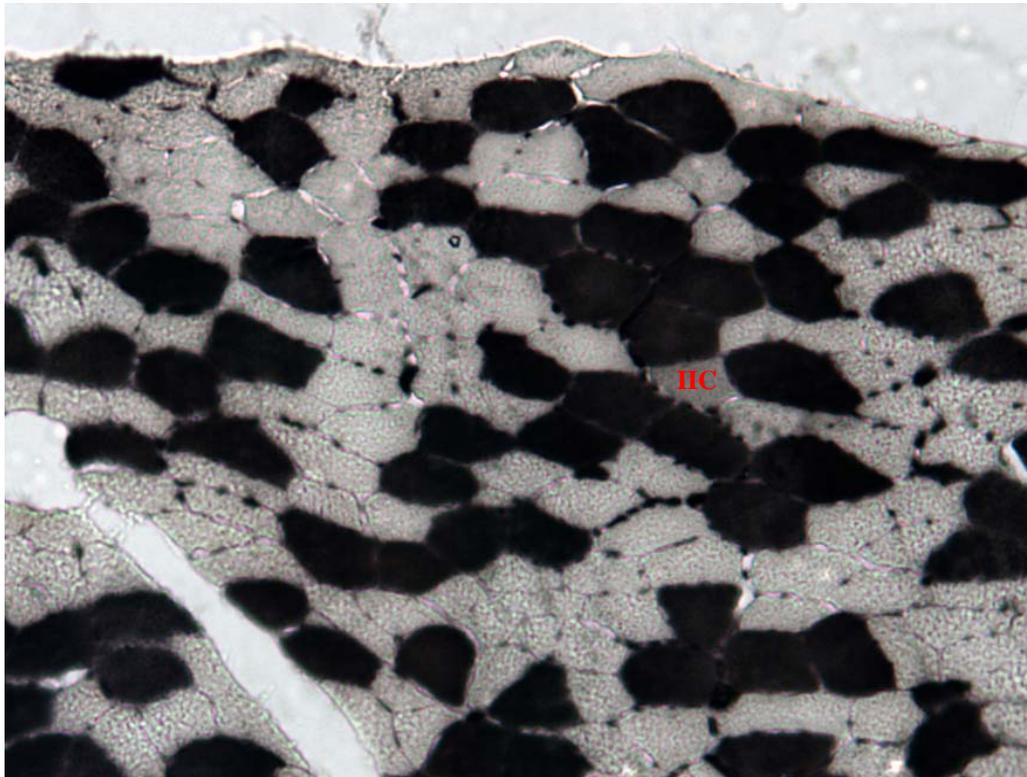


Figura 22. Sección transversal del *m. semitendinoso* del perro. Técnica mATPasa ácida a pH 4,3. En la imagen se observa una fibra tipo IIC, teñida de forma moderada en este rango de pH. Las fibras IIC aparecen en muy escaso porcentaje (< 0,5%).

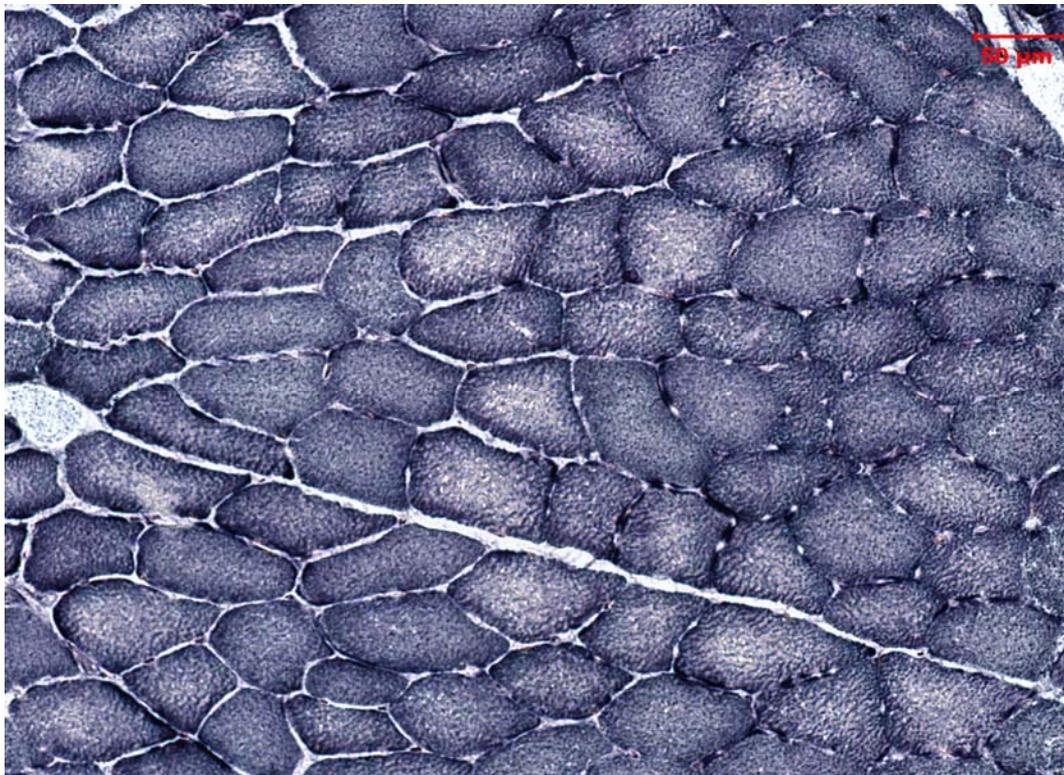


Figura 23. Sección transversal del *m. semitendinoso* del perro. Técnica NADH-TR. En la imagen se aprecia una alta capacidad oxidativa de los miocitos, aunque en algunas fibras tipo II puede estar disminuida.



Figura 24. Sección transversal del *m. semitendinoso* del perro. Inmunomarcado con el anticuerpo BA-F8. Reaccionan exclusivamente las fibras que contienen MyHC-I.



Figura 25. Sección transversal del *m. semitendinoso* del perro. Inmunomarcado con el anticuerpo BF-35. Reaccionan las fibras que contienen MyHC-IIx.

IV.1.3. Tablas

Tabla I. Características tintoriales de las fibras del músculo semitendinoso en el perro, tras aplicar las técnicas histoquímicas (mATPasa a diferentes preincubaciones y NADH-TR)*.

Técnica	Tipos de fibras			
	I	IIA	IIp	IIC
mATPasa pH 10,4-10,5	-	+++	++	+
mATPasa pH 4,6	+++	-	+	++
mATPasa pH 4,3	+++	-	-	+
NADH-TR	++/+++	+/>+++	+/>+++	+/>+++

* Intensidad de tinción relativa de los diferentes tipos de fibras: +++ (muy fuerte), ++ (fuerte), + (moderada), - (muy débil o negativa)

Tabla II. Características tintoriales de las fibras del músculo semitendinoso en el perro, tras aplicar las técnicas histoquímicas (mATPasa a diferentes preincubaciones y NADH-TR) y la inmunohistoquímica*.

Técnica	Tipos de fibras					
	I	IIA	IIAX	IIXA	IIY	IIC
mATPasa pH 10,4-10,5	-	+++	+++	++	++	+
mATPasa pH 4,6	+++	-	-	+	+	++
mATPasa pH 4,3	+++	-	-	-	-	+
NADH-TR	++/+++	+/>+++	+/>+++	+/>+++	+/>+++	+/>+++
BA-F8	+++	-	-	-	-	+/>+++
anti-I (Sigma M 8421)	+++	-/>+	-/>+	-/>+	-/>+	+/>+++
anti-II (Sigma M 4276)	-	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++	+/>+++
BF-35	-	-	+/>+++	++/+++	++/+++	-
SC-71	-	++/+++	++/+++	+/>+++	-	+/>+++

* Intensidad de tinción relativa de los diferentes tipos de fibras: +++ (muy fuerte), ++ (fuerte), + (moderada), - (muy débil o negativa)

IV.2. TIPOS DE FIBRAS EN LOS MÚSCULOS DE LA LENGUA. FIGURAS 26-33; TABLAS III Y IV

Para analizar los resultados y su posterior discusión, del músculo lingual propio debido a su compleja funcionalidad, a la diferente orientación de sus fibras, y siguiendo criterios de otros autores (Massimini, 1986), hemos obtenido muestras, como ya se expuso en el apartado de Material y Métodos, que han sido procesadas por separado a nivel de tres de sus regiones: **raíz, cuerpo y vértice**.

Las características tintoriales histo e inmunohistoquímicas de los músculos linguales, tanto extrínsecos como intrínsecos, son similares entre sí, advirtiéndose, no obstante, algunas particularidades.

IV.2.1. Técnicas histoquímicas

IV.2.1.1. Técnica mATPasa

Como en el músculo semitendinoso, si comparamos secciones musculares transversales seriadas de diferentes músculos linguales, sometidas a la técnica de mATPasa a distintas preincubaciones, se pueden identificar con claridad cuatro tipos fibrilares: fibras tipos **I, IIA, IIp** y **IIC**. Este último tipo (fibras IIC) se advierte también en muy escaso porcentaje, especialmente en los músculos geniogloso y estilogloso, así como en la región del vértice del m. lingual propio. Las características de alcalino o ácido labilidad se corresponden con las ya descritas en el músculo control. Únicamente en el vértice del músculo lingual propio no se observan fibras con actividad alcalino-lábil y ácido-estable (fibras tipo I). Las fibras tipos IIA y IIp se describen en todos los músculos linguales.

IV.2.1.2. Técnica NADH-TR

La capacidad oxidativa que manifiestan los tipos fibrilares identificados mediante la técnica mATPasa en todos los músculos linguales del perro, es de fuerte a muy fuerte para las fibras tipo I y de moderada a fuerte en el resto, hecho corroborado por su grado de intensidad tintorial frente a la técnica NADH-TR, tal y como acontece en el músculo semitendinoso (músculo control).

Por consiguiente, tras el análisis histoquímico y conforme a los criterios establecidos para el músculo control, las fibras clasificadas como tipos I, IIA, Iip y IIC pueden ser evidenciadas, por el grado de intensidad tintorial que manifiestan con los dos tipos de técnicas aplicadas (mATPasa y NADH-TR). **Tabla III.**

IV.2.2. Técnica inmunohistoquímica

Tras aplicar la técnica inmunohistoquímica, observamos en todos los músculos linguales, excepto en el vértice del músculo lingual propio, una población de fibras tipo I puras marcadas exclusivamente, y de manera intensa, con el anticuerpo BA-F8, como en el músculo control. Todos los tipos y subtipos de fibras rápidas reaccionan de manera uniforme con el anticuerpo “Anti-Myosin Skeletal Fast”. Las fibras clasificadas como IIA según la tinción de la mATPasa, se marcan con el anticuerpo SC-71, aunque la mayoría de ellas lo hacen también, aunque en menor medida, con el anticuerpo BF-35, por eso se clasifican como fibras híbridas IIAx. Únicamente en el músculo hiogloso aparecen fibras puras IIA, que reaccionan exclusivamente con el anticuerpo SC-71. Las fibras catalogadas como Iip, en cambio, se marcan con el anticuerpo BF-35, aunque casi todas reaccionan también con el anticuerpo SC-71, por ello se describen como fibras híbridas IIAx. Una extensa población de fibras Iip en el vértice del músculo lingual propio se marca exclusivamente con el anticuerpo específico para la MyHC-IIx, catalogándose pues como fibras IIX puras. Las fibras histoquímicamente clasificadas como IIC, que observamos en los músculos geniogloso y estilogloso, así como en el vértice del

músculo lingual propio, reaccionan de manera algo diferente a como lo hacen en el músculo semitendinoso. Concretamente, en los músculos geniogloso y estilogloso se marcan de fuerte a muy fuerte con el anticuerpo específico para la MyHC-I y de moderado a fuerte con el anticuerpo específico para la MyHC-IIx, pero no con el anticuerpo SC-71 como acontecía en el músculo control. En el vértice del músculo lingual propio, las fibras reaccionan con todos los anticuerpos empleados, con un grado que va de moderado a fuerte o muy fuerte. Por último, en el músculo hiogloso existe un tipo fibrilar que presenta el mismo grado de marcado (muy fuerte) tras aplicar los dos anticuerpos específicos para las miosinas rápidas. Al no contemplar en la Tesis Doctoral las técnicas de electroforesis y/o el análisis de expresión del ARN, que nos permitirían evaluar de forma cuantitativa la cantidad de isomiosina que poseen, las hemos catalogado indistintamente dentro de cualquiera de los dos tipos híbridos rápidos ya descritos (fibras IIXA o IIAX).

Tras combinar los resultados obtenidos mediante la aplicación de las técnicas histo e inmunohistoquímicas en los músculos linguales del perro (ver **Tabla IV**), podemos identificar los mismos tipos miofibrilares que en el músculo control (fibras tipos **I, IIA, IIX, IIAX, IIXA** y **IIC**).

IV.2.3. Análisis de la distribución y porcentaje de los tipos fibrilares en los músculos de la lengua

El músculo **geniogloso** (**Figura 28**) presenta un claro predominio de fibras tipo II (70%), siendo el resto fibras tipo I. Dentro de las fibras tipo II, los subtipos **IIAX** y **IIXA** presentan porcentajes muy similares (50% cada subtipo, aproximadamente).

En cuanto al porcentaje de los miocitos descritos en el músculo **hiogloso**, se aprecia también un claro predominio de las fibras rápidas (80% del total de la población) frente a un 20% de fibras lentas (**Figura 29**). Dentro de la población de miocitos tipo II, existe una mayor cantidad de fibras híbridas tipo **IIAX** (65-70%)

que de fibras híbridas tipo IIXA. Las fibras puras tipo IIA no superan el 3%, observándose de forma aislada o en grupos de dos fibras en los fascículos analizados.

En el músculo **estilogloso** predominan las fibras rápidas tipo IIXA (85%). Las tipo IIC, que alcanzan un porcentaje de aproximadamente el 5%, se aprecian aisladas dentro de la mayoría de los fascículos musculares analizados (**Figuras 26, 27 y 30**).

Los porcentajes de los dos tipos fibrilares que se identifican en la **raíz** del músculo **lingual propio** son equiparables (**Figura 31**), aunque con mayor predominio de las fibras tipo IIX (60%) frente a las tipo I (40%). Los fascículos musculares aparecen rodeados por abundante tejido conectivo. Las secciones analizadas del **cuerpo** reflejan también un mayor predominio de fibras tipo IIX (65%) respecto a las fibras tipo I (**Figura 32**). En cuanto a la distribución de las fibras tipo IIX en la región del **vértice** es uniforme (**Figura 33**), alcanzando un porcentaje superior al 70%. Los miocitos tipo IIXA se disponen entre las fibras musculares IIX por toda la superficie del corte histológico, con un porcentaje próximo al 30%. Las fibras IIC se localizan en los fascículos más periféricos y su porcentaje es muy escaso (< 3%).

El aspecto general de los músculos linguales en cortes histológicos a pocos aumentos es bastante uniforme, con una disposición en mosaico o tablero de ajedrez.

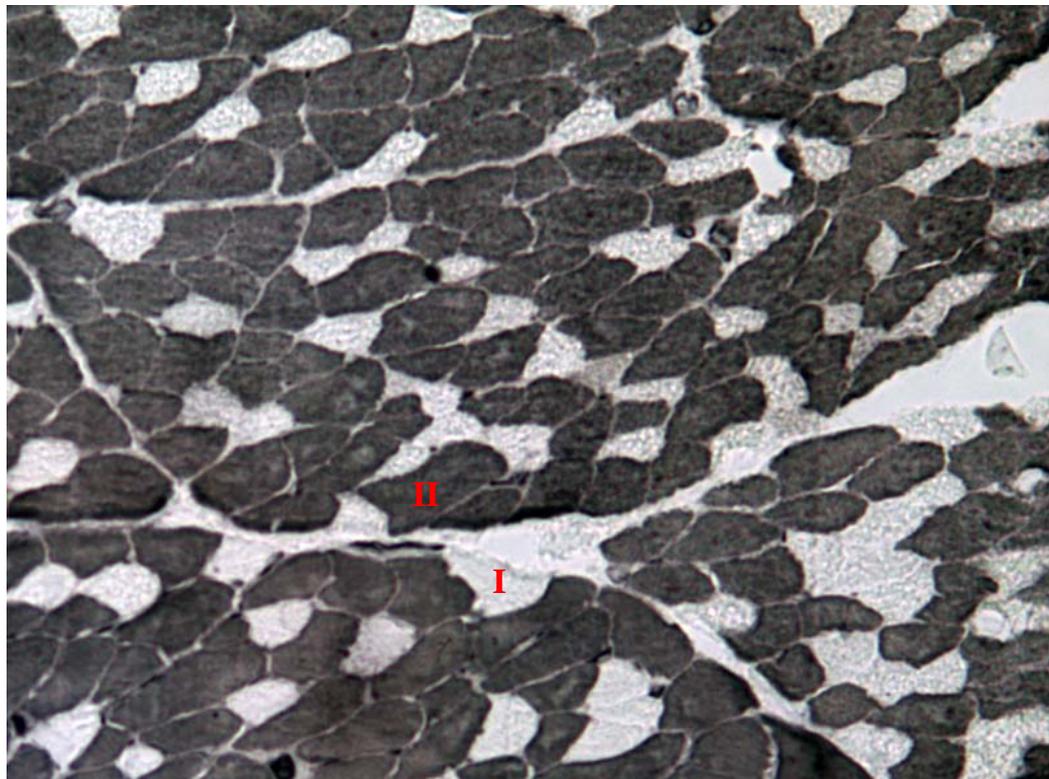


Figura 26. Sección transversal del *m. estilogoso* del perro. Técnica mATPasa alcalina a pH 10,4. En este corte histológico se observan las fibras tipo I (no teñidas) y las fibras tipo II (tinción intensa). Existe un predominio de fibras rápidas.

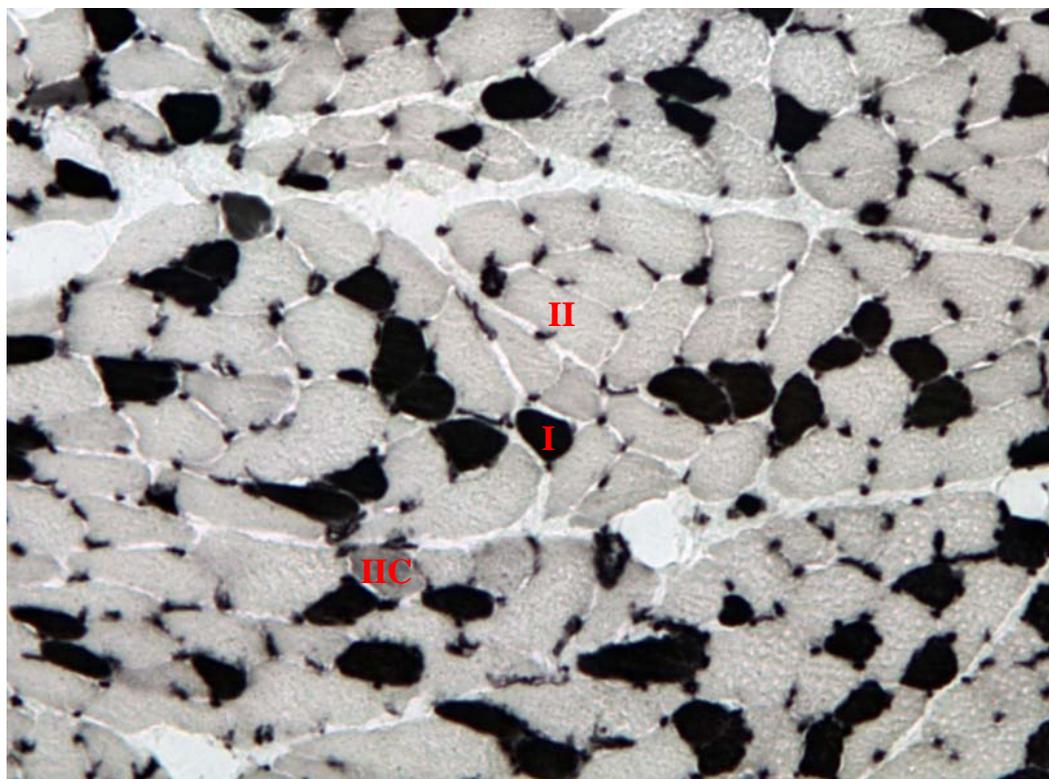


Figura 27. Sección transversal del *m. estilogoso* del perro. Técnica mATPasa ácida a pH 4,3. En esta imagen se pueden apreciar fibras tipo I (tinción intensa), fibras tipo II (no teñidas), así como una fibra tipo IIC (tinción moderada).

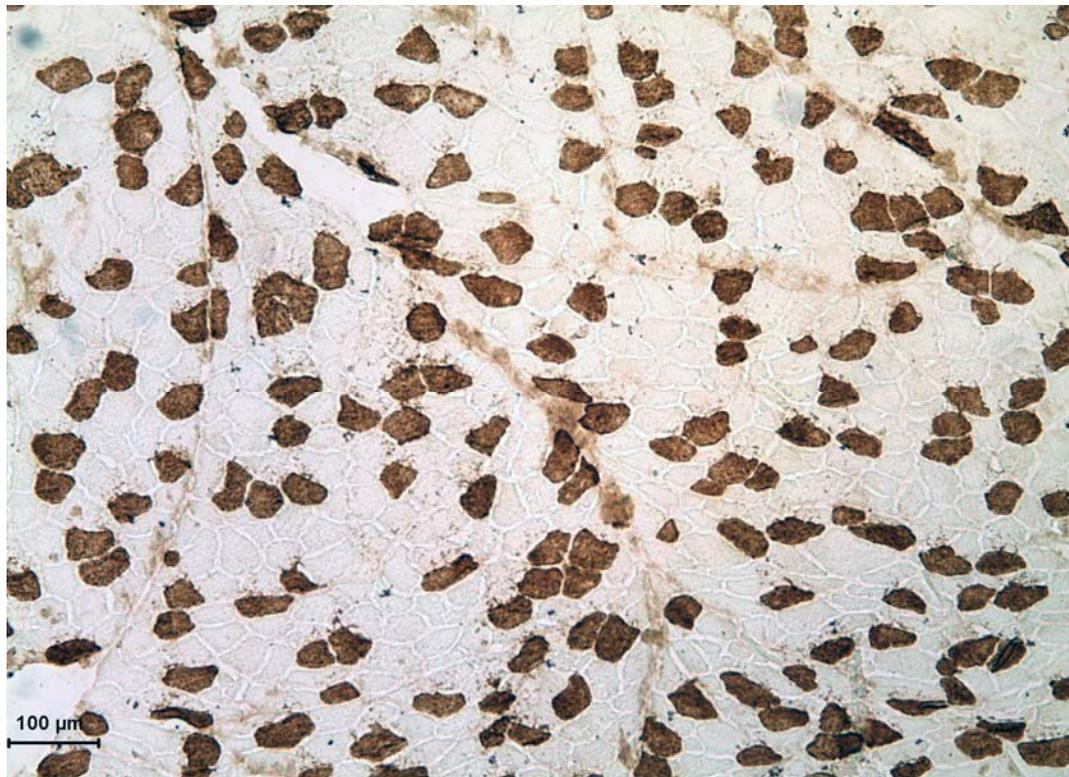


Figura 28. Sección transversal del *m. genioglossus* canino. Inmunomarcado con BA-F8. Se observa el predominio de las fibras rápidas y una distribución fibrilar en mosaico.

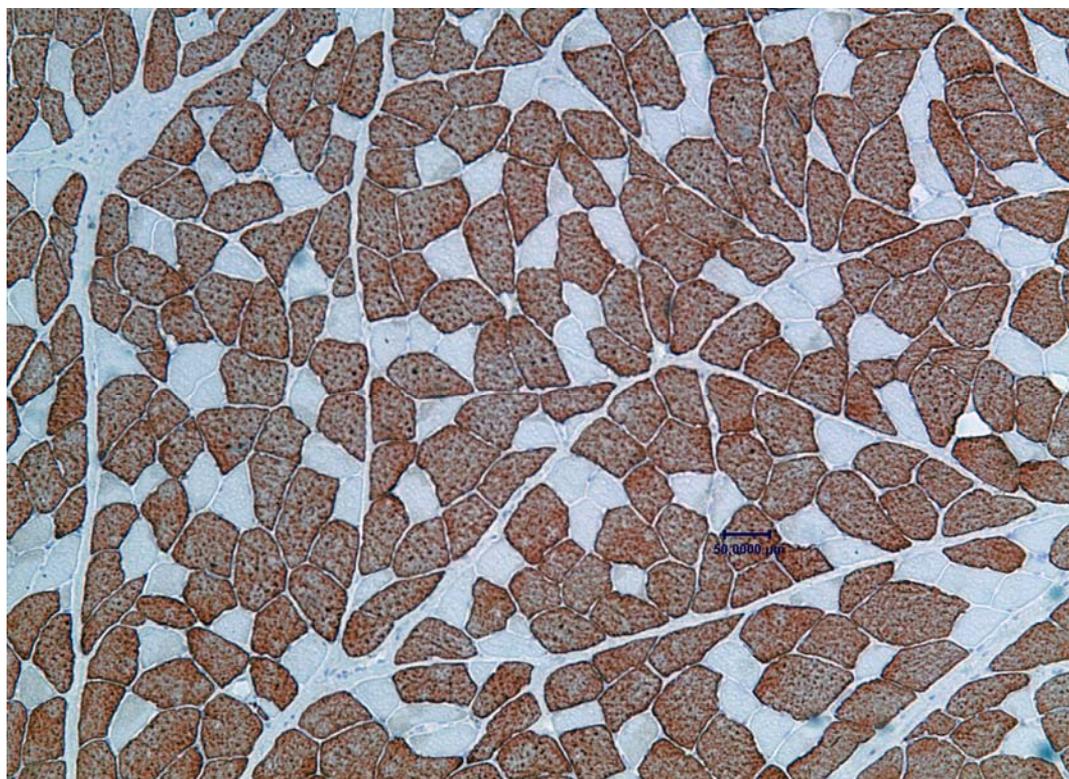


Figura 29. Sección transversal del *m. hioglossus* del perro. Inmunomarcado con "Anti-Myosin Skeletal Fast". Este anticuerpo reacciona frente a todos los miocitos con miosina rápida. En la imagen se aprecia un predominio de las fibras rápidas tipo II.

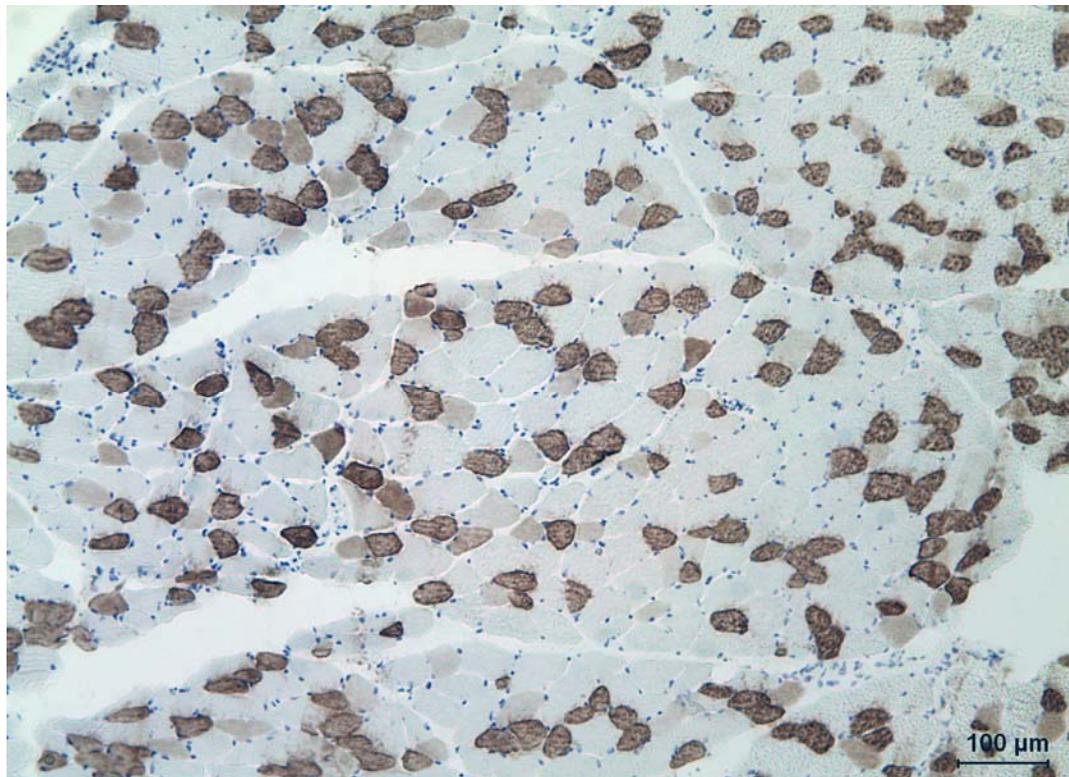


Figura 30. Sección transversal del *m. estilogloso* canino. Inmunomarcado con “Anti-Myosin Skeletal Slow”. En el perro dicho anticuerpo reacciona con las fibras tipo I y, de forma moderada, con algunas fibras tipo II. En la preparación se observa un predominio de miocitos rápidos.



Figura 31. Sección transversal del *m. lingual propio* del perro (región de la raíz). Inmunomarcado con BA-F8. Se aprecia una mayoría de fibras rápidas tipo II (60%).

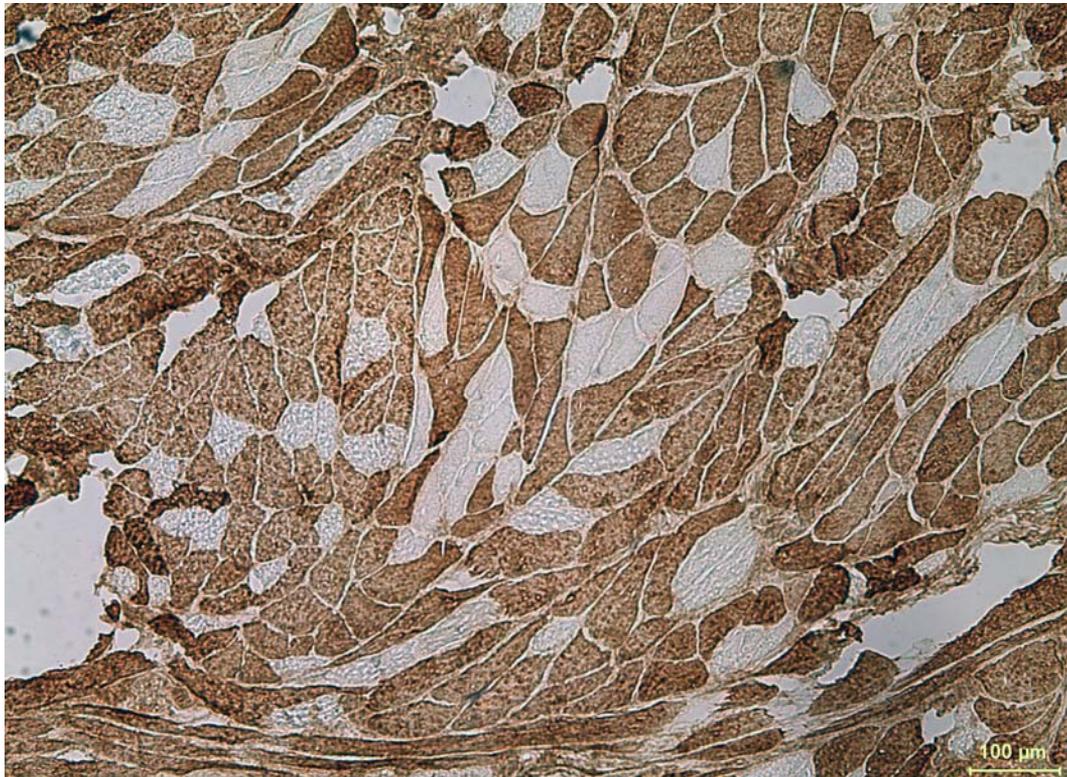


Figura 32. Sección transversal del *m. lingual propio* del perro (región del **cuerpo**). Inmunomarcado con BF-35. Predominio de fibras rápidas tipo II, de las que un 65% se corresponden con miocitos híbridos IIAX.

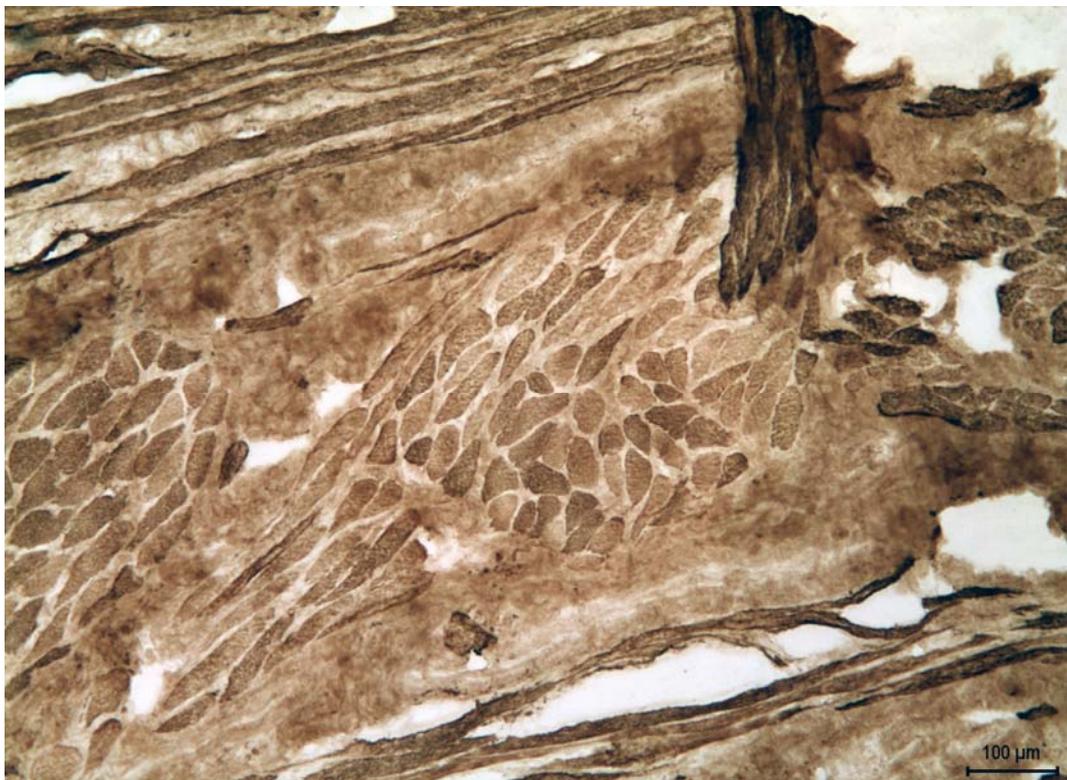


Figura 33. Sección transversal del *m. lingual propio* del perro (región del **vértice**). Inmunomarcado con BF-35. Todos los miocitos aparecen marcados con este anticuerpo, no observándose fibras tipo I.

IV.2.4. Tablas

Tabla III. Características tintoriales de las fibras de los músculos de la lengua en el perro, tras aplicar las técnicas histoquímicas (mATPasa a diferentes preincubaciones y NADH-TR)*.

Técnica	Tipos de fibras			
	I	IIA	IIp	IIC
mATPasa pH 10,4-10,5	-	+++	++	+
mATPasa pH 4,6	+++	-	+	++
mATPasa pH 4,3	+++	-	-	+
NADH-TR	++/+++	+/>+++	+/>+++	+/>+++

* Intensidad de tinción relativa de los diferentes tipos de fibras: +++ (muy fuerte), ++ (fuerte), + (moderada), - (muy débil o negativa)

Tabla IV. Características tintoriales de las fibras de los músculos de la lengua en el perro, tras aplicar las técnicas histoquímicas (mATPasa a diferentes preincubaciones y NADH-TR) y la inmunohistoquímica*.

Técnica	Tipos de fibras					
	I	IIA	IIAX	IIXA	IIY	IIC
mATPasa pH 10,4-10,5	-	+++	+++	++	++	+
mATPasa pH 4,6	+++	-	-	+	+	++
mATPasa pH 4,3	+++	-	-	-	-	+
NADH-TR	++/+++	+/>+++	+/>+++	+/>+++	+/>+++	+/>+++
BA-F8	+++	-	-	-	-	+/>+++/>+++
anti-I (Sigma M 8421)	+++	-/>+	-/>+	-/>+	-/>+	+/>+++/>+++
anti-II (Sigma M 4276)	-	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++	+/>+++/>+++
BF-35	-	-	+/>+++	++/+++	++/+++	+/>+++/>+++
SC-71	-	++/+++	++/+++	+/>+++	-	-/>+++/>+++

* Intensidad de tinción relativa de los diferentes tipos de fibras: +++ (muy fuerte), ++ (fuerte), + (moderada), - (muy débil o negativa)

IV.3. TIPOS DE FIBRAS EN LOS MÚSCULOS DEL PALADAR Y FAUCES. FIGURAS 34-44; TABLAS V Y VI

En algunos de los animales objeto de estudio, por el escaso desarrollo del músculo palatofaríngeo (Evans, 1993), no diferenciable macroscópicamente del músculo terigofaríngeo, ambas entidades musculares fueron disecadas, procesadas y analizadas conjuntamente, como ya se indicó en el apartado de Material y Métodos. Por este motivo, así como por tener una relación filogenética cercana y una funcionalidad similar (Peñuela, 1989), aunque pertenezcan a sistemas musculares diferentes (5ª edición de la Nómina Anatómica Veterinaria, 2005), los resultados fibrilares correspondientes al músculo palatofaríngeo serán referidos, junto a los del terigofaríngeo, en el subapartado IV.4 relativo a la musculatura faríngea.

IV.3.1. Técnicas histoquímicas

IV.3.1.1. Técnica mATPasa

En el músculo **palatino** se identifican los cuatro tipos fibrilares descritos en el músculo semitendinoso o músculo control. Es decir, fibras lentas tipo **I** con actividad alcalino-lábil y ácido-estable, fibras rápidas tipo **IIA** con actividades alcalina y ácida inversas a las referidas para las fibras tipo I, así como fibras tipo **Iip** alcalino-estables y parcialmente ácido-estables. Las fibras tipo **IIC** aparecen de forma aislada en los campos histológicos analizados (**Figuras 34 y 35**).

El músculo **elevador del velo palatino** presenta una mayoría de fibras con actividad alcalino-estable (tinción fuerte) a pH 10,4 y 10,5, ácido-estable a pH 4,6 (tinción moderada) y ácido-lábil a pH 4,3. Histoquímicamente, en base a la reacción mATPasa, se catalogan como fibras de contracción rápida tipo **Iip**, acorde con los criterios establecidos para el músculo semitendinoso (**Figuras 36 y 37**). El resto de las fibras se clasifican como tipo **I**, con similares características tintoriales a las del músculo control. Es decir, alcalino-lábiles (tinción negativa) y ácido-estables (tinción

muy fuerte) a pH 4,3 y 4,6. De forma aislada se advierten algunas fibras que comparten las propiedades histoquímicas de las fibras **IIC**: alcalino y ácido-estables moderadas en todos los rangos de pH.

La composición fibrilar del músculo **tensor del velo palatino** tras aplicar la técnica mATPasa, difiere ostensiblemente del resto de músculos del paladar y fauces (**Figura 38**). Por un lado, presenta fibras ácido-estables con tinción muy fuerte en los dos rangos de pH contemplados y alcalino-estables (tinción muy fuerte). Se clasifican como tipo **IIM**, de acuerdo con los estudios de Rowleron et al. (1981, 1983), en los que analizan los tipos fibrilares de los músculos mandibulares en el gato y de los músculos derivados del primer arco branquial en carnívoros y primates. Existen también fibras tipo **I**, a las que catalogamos en base a trabajos realizado por otros autores (Álvarez, 1992), ya que su tinción difiere del patrón clásico descrito en el músculo control para este tipo fibrilar. Concretamente son fibras alcalino-lábiles y ácido-estables, si bien su grado de intensidad tintorial frente al pH ácido es menor al de las fibras clasificadas como IIM y muy parecido, en el rango de pH 4,6, a las fibras tipo I_p. Por último, se describen fibras tipo **I_p** que presentan una tinción moderada a pH alcalino, en tanto que a pH ácido 4,6 manifiestan la misma intensidad tintorial que las fibras tipo I. Referir también un tipo fibrilar de tamaño mucho menor a los descritos anteriormente, que se tiñe muy fuertemente a pH alcalino y de fuerte a muy fuerte a pH ácido. Podría corresponderse con las fibras denominadas “**tónico-lentas**” por Mascarello et al. (1983), al estudiar el músculo tensor del tímpano canino.

IV.3.1.2. Técnica NADH-TR

La capacidad oxidativa de los tipos fibrilares identificados con la mATPasa en los músculos del paladar y fauces es bastante elevada para los miocitos tipo I y más atenuada para el resto de tipos fibrilares, como lo pone de manifiesto el grado de intensidad tintorial ante la NADH-TR (**Figuras 39 y 40**).

Siguiendo los criterios establecidos para el músculo control y los de Rowleson et al. (1981, 1983), Mascarello et al. (1983), y Álvarez (1992) para los tipos fibrilares especiales que aparecen en el músculo tensor del velo palatino, las fibras descritas como tipos I, IIA, Iip, IIM, “tónico-lentas” y IIC se reconocen por el grado de tinción que muestran frente a las técnicas mATPasa y NADH-TR (**Tabla V**).

IV.3.2. Técnica inmunohistoquímica

Mediante el empleo de anticuerpos monoclonales, evidenciamos que las fibras catalogadas como Iip en los músculos palatino y elevador del velo palatino, reaccionan fuertemente, y sin distinción, con los dos anticuerpos específicos para las isoformas de miosina rápida MyHC-IIx y MyHC-IIa, así como con el anticuerpo “Anti-Myosin Skeletal Fast”. Sin embargo, dichas fibras no se marcan con el anticuerpo BA-F8, específico para la isoforma de miosina lenta MyHC-I. Se clasifican, por tanto, como fibras tipos IIXA o IIX. Es decir, fibras híbridas que coexpresan dos isoformas MyHC diferentes (IIx+IIa). En cambio, las fibras Iip del músculo tensor del velo palatino se clasifican como IIX puras, pues únicamente reaccionan con el anticuerpo BF-35 (**Figuras 41 y 42**).

Las fibras del músculo palatino catalogadas histoquímicamente como IIA, reaccionan indistintamente con los dos anticuerpos específicos para las isoformas de miosina rápida MyHC-IIx (BF-35) y MyHC-IIa (SC-71), por lo que inmunohistoquímicamente se catalogan como fibras híbridas IIX o IIXA, al coexpresar ambas isoformas de miosina.

La población fibrilar definida histoquímicamente como tipo I, en los músculos analizados del paladar y fauces, reacciona fuertemente con los anticuerpos BA-F8 y “Anti-Myosin Skeletal Slow”, y negativamente con los anticuerpos BF-35, SC-71 y “Anti-Myosin Skeletal Fast”. La correspondencia entre la reacción mATPasa y los anticuerpos monoclonales también se advierte en las fibras IIC, según el criterio seguido con el músculo control (**Figuras 41-43**).

Las fibras clasificadas histoquímicamente como IIM constatamos que no se marcan con los anticuerpos utilizados en este trabajo de Tesis Doctoral (**Figura 43**).

Por último, por lo que respecta a las fibras que hemos considerado como “tónico-lentas” en base a los criterios de Mascarello et al. (1983), se observa que reaccionan de forma muy marcada con todos los anticuerpos específicos para las isoformas MyHC-I, MyHC-IIa y MyHC-IIx (**Figura 43**).

En resumen, en los músculos del paladar y fauces detectamos los tipos fibrilares **I**, **IIX**, **IIAX** o **IIXA** y **IIC**, que también se describen en el músculo semitendinoso y, además, dos tipos de miocitos no referidos en el músculo control, el tipo **IIM** y las fibras que hemos considerado “tónico-lentas”. Las propiedades tintoriales combinadas de las técnicas histo e inmunohistoquímicas para los músculos del paladar y fauces aparecen reflejadas en la **Tabla VI**.

IV.3.3. Análisis de la distribución y porcentaje de los tipos fibrilares en los músculos del paladar y fauces

El músculo **palatino** presenta una distribución fibrilar en mosaico con un 53% de fibras rápidas híbridas tipo IIAX o IIXA, siendo el resto de la población (47%) fibras lentas tipo I (**Figuras 34 y 35**).

En el músculo **elevador del velo palatino**, el porcentaje de fibras híbridas tipo IIXA o IIAX constituye, aproximadamente, un 98% del total de fibras contabilizadas, correspondiendo el 2% restante a fibras puras tipo I. Asimismo, evidenciamos alguna fibra tipo IIC aislada, no siendo significativa su proporción en el total de la población (**Figura 37**).

Respecto al músculo **tensor del velo palatino**, existe una presencia mayoritaria de fibras tipo IIM. Las fibras tipo I tienen un mayor porcentaje en los fascículos periféricos. Globalmente representan aproximadamente entre el 5 y el 10%

de la población total de miocitos, si bien en la región periférica existen fascículos con porcentajes cercanos al 60%. En dichos fascículos apreciamos también una mayor frecuencia de fibras tipo IIX que, por lo general, son muy escasas. Respecto a las fibras “tónico-lentas”, también se distribuyen uniformemente por los fascículos periféricos, como las fibras tipos I y IIX, si bien su porcentaje no supera el 3% (**Figura 44**).

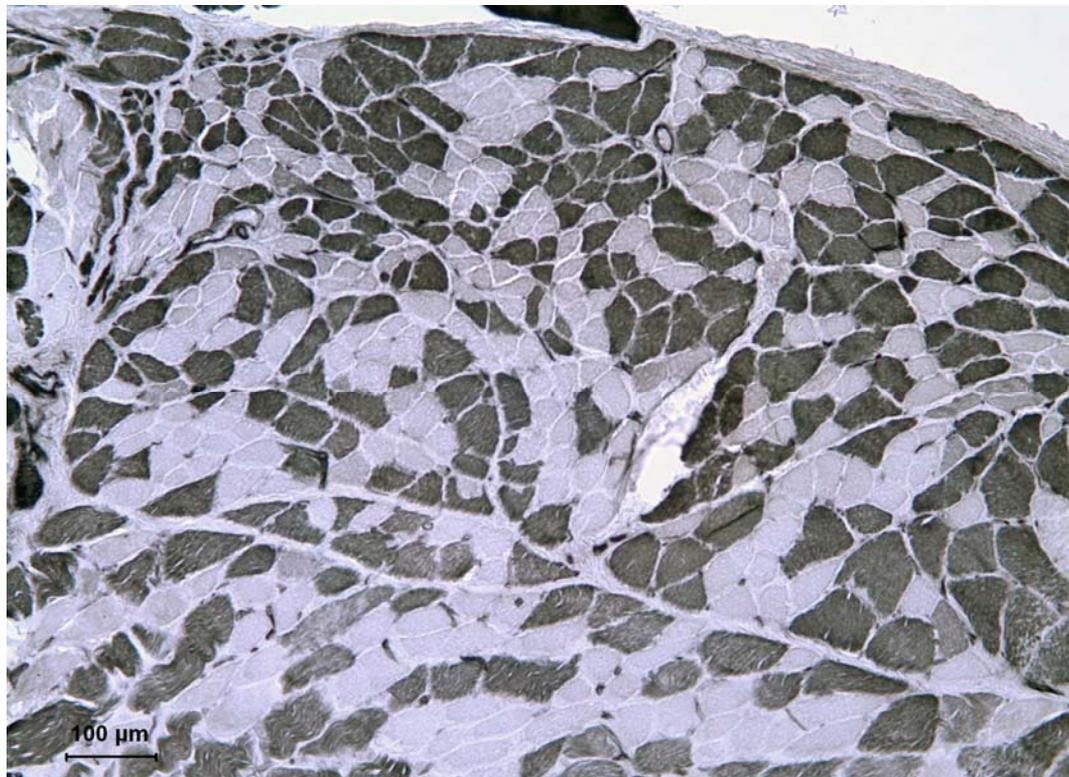


Figura 34. Sección transversal del *m. palatino* del perro. Técnica mATPasa alcalina a pH 10,5. Se identifican tres tipos de fibras: fibras tipo I (no teñidas), tipo IIA (tinción intensa) y tipo IIp (tinción moderada). Distribución fibrilar en mosaico.

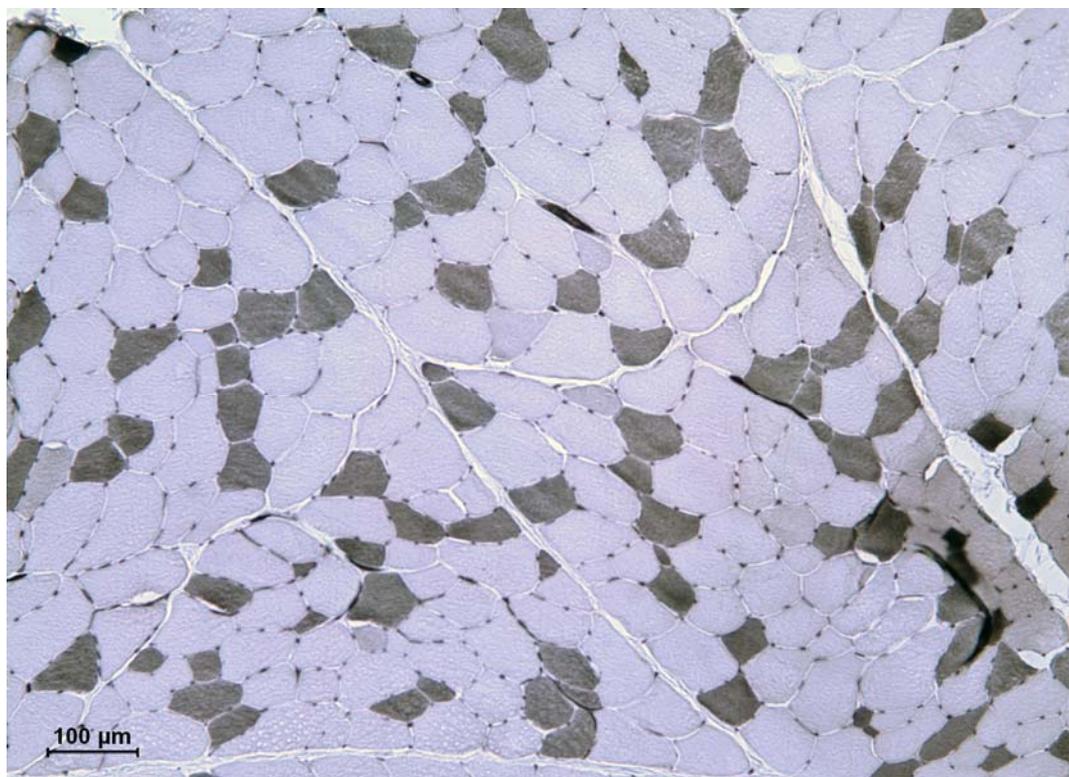


Figura 35. Sección transversal del *m. palatino* del perro. Técnica mATPasa ácida a pH 4,3. En esta imagen las fibras teñidas se corresponden con las tipo I, mientras que las fibras rápidas tipo II no se tiñen. Se advierte un predominio de miocitos rápidos.

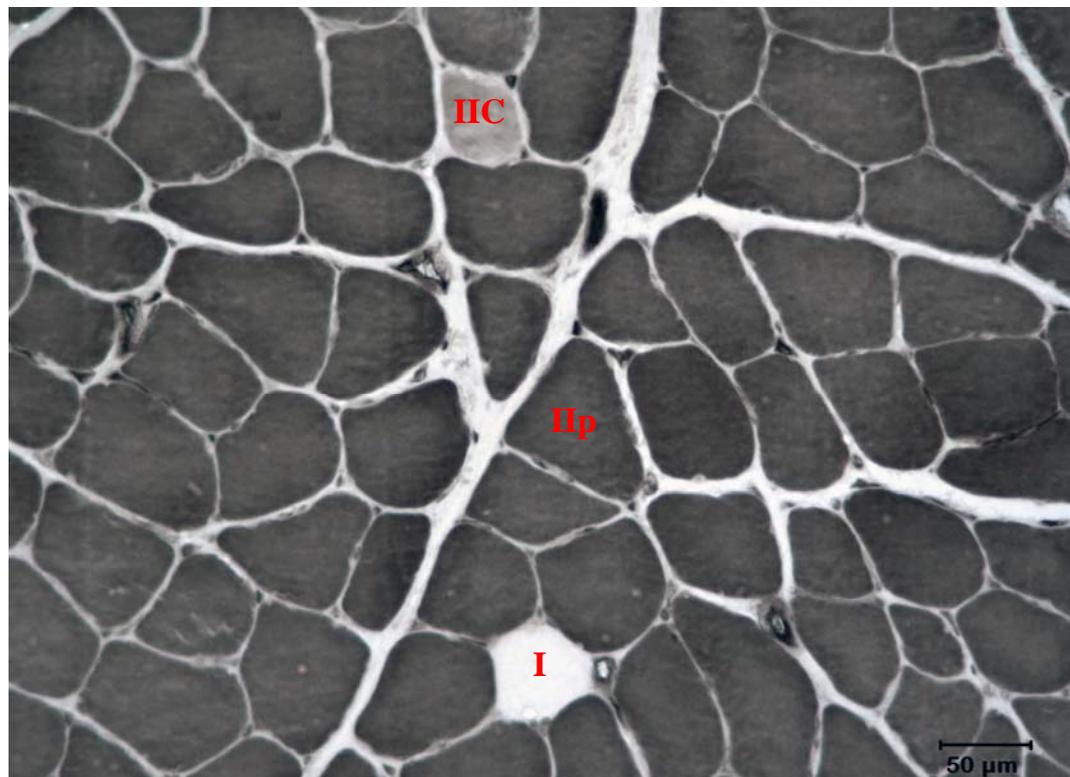


Figura 36. Sección transversal del *m. elevator del velo palatino* del perro. Técnica mATPasa alcalina a pH 10,4. En la preparación se identifican tres tipos de fibras: fibras tipo I (sin teñir); fibras tipo IIp (tinción fuerte); fibras tipo IIC (tinción moderada).

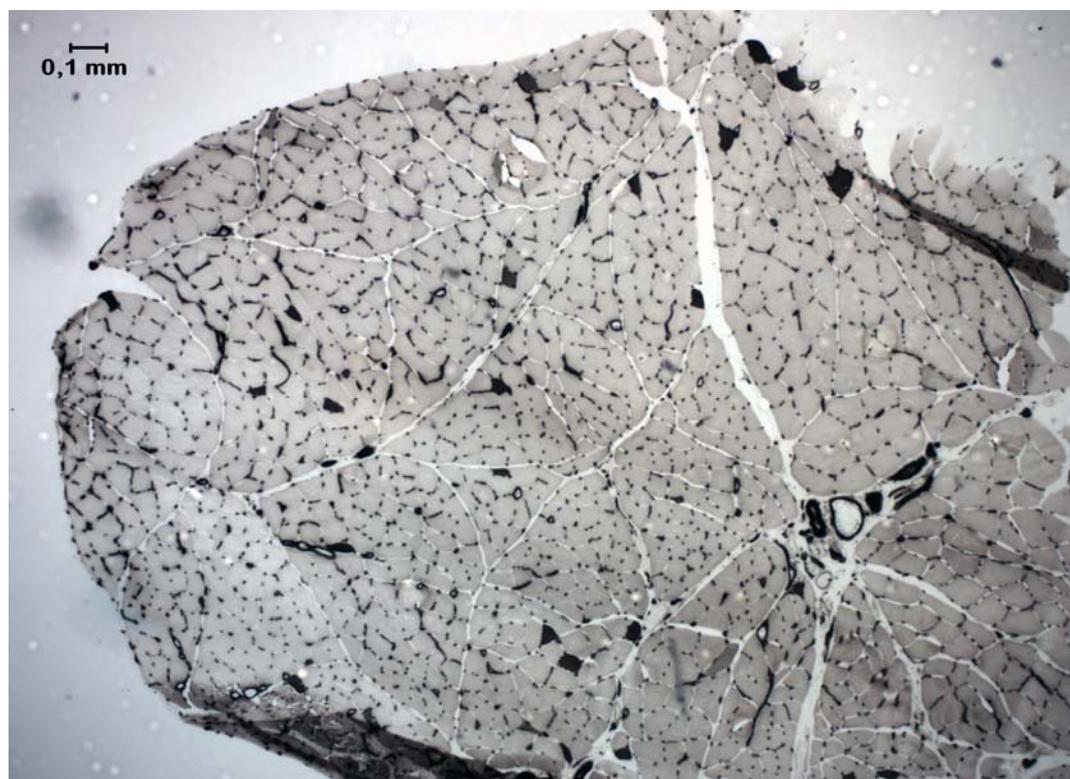


Figura 37. Sección transversal del *m. elevator del velo palatino* del perro. Técnica mATPasa ácida a pH 4,3. En esta imagen a pocos aumentos, se observa el elevado porcentaje de las fibras rápidas tipo II.

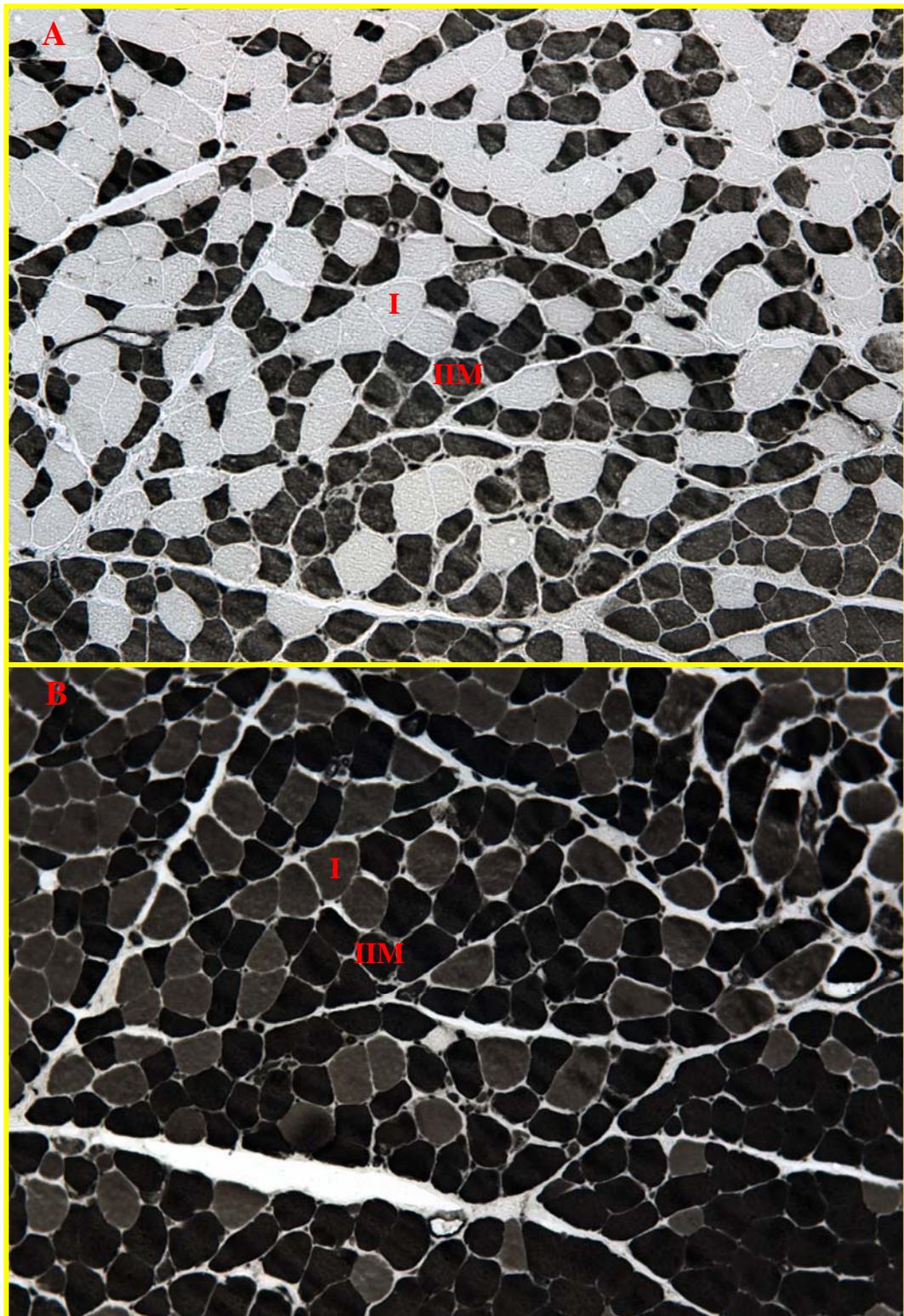


Figura 38. Secciones transversales seriadas del *m. tensor del velo palatino* del perro. **A)** Técnica mATPasa alcalina a pH 10,5. **B)** Técnica mATPasa ácida a pH 4,6. Las fibras tipo IIM presentan una intensa tinción con pH alcalino y ácido. Las fibras tipo I manifiestan, a pH ácido, menor intensidad tintorial que en el resto de músculos.

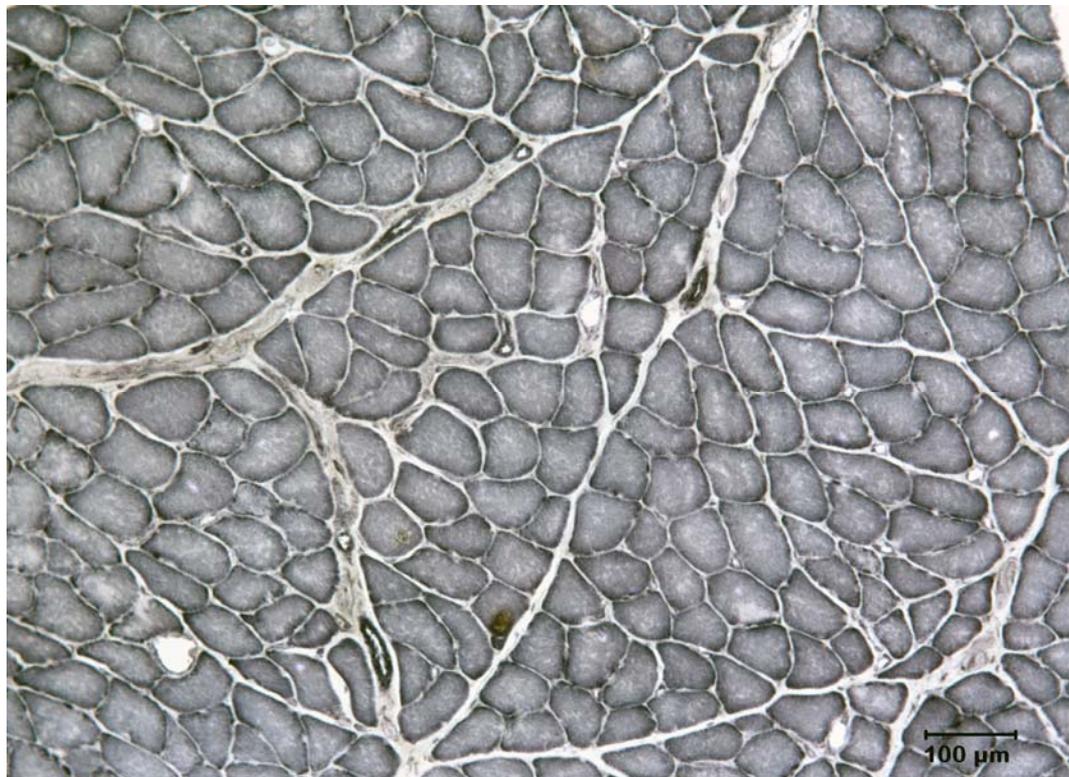


Figura 39. Sección transversal del *m. elevador del velo palatino* del perro. Técnica NADH-TR. Todas las fibras muestran una capacidad oxidativa elevada.

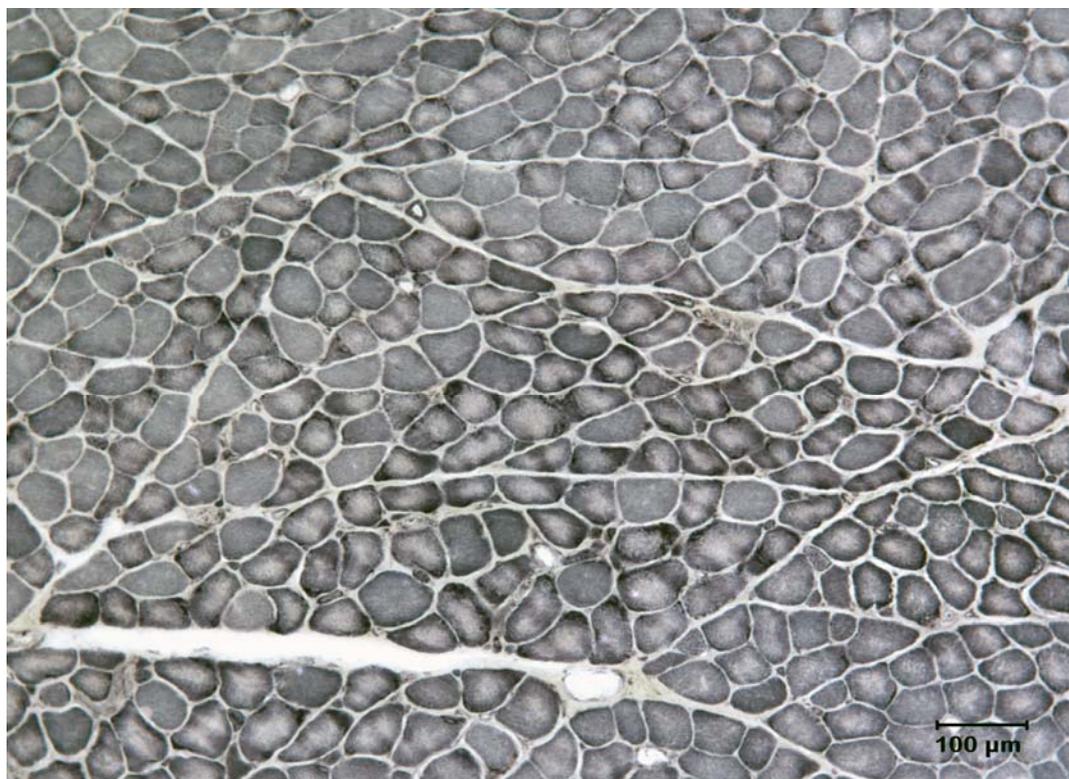


Figura 40. Sección transversal del *m. tensor del velo palatino* del perro. Técnica NADH-TR. En general, todas las fibras expresan una capacidad oxidativa de moderada a fuerte o muy fuerte.

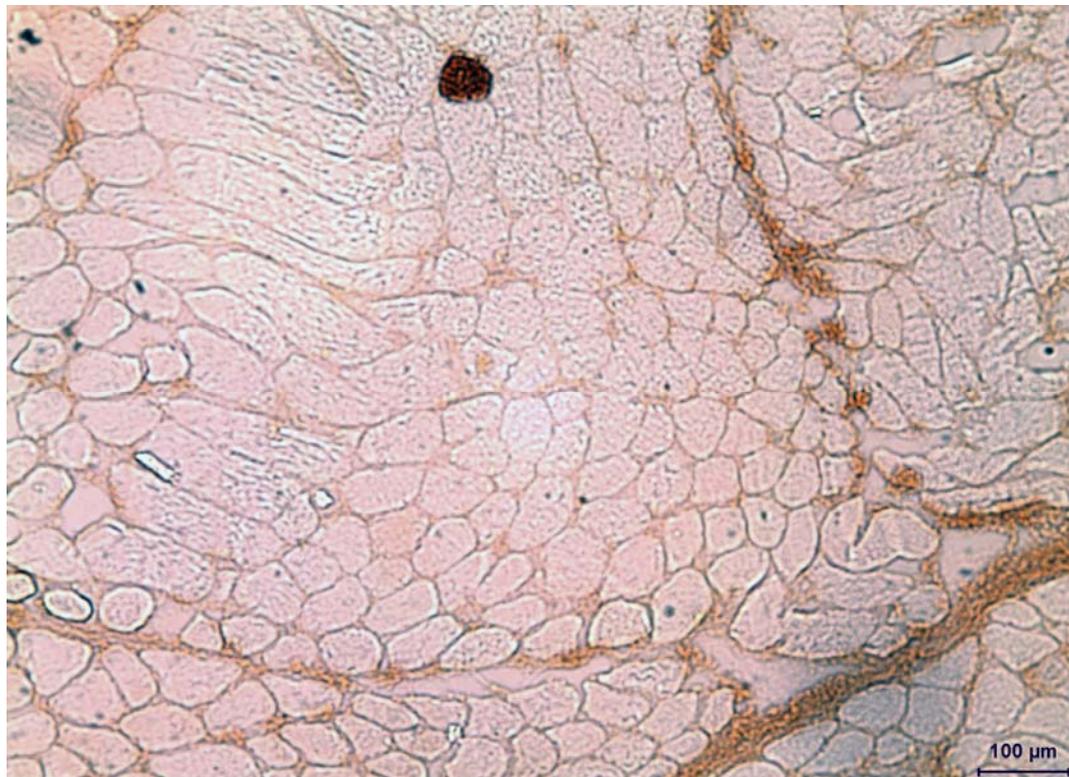


Figura 41. Sección transversal seriada del *m. elevador del velo palatino* del perro. Inmunomarcado con BA-F8. La población fibrilar de este músculo es principalmente de fibras rápidas (aproximadamente un 98%).

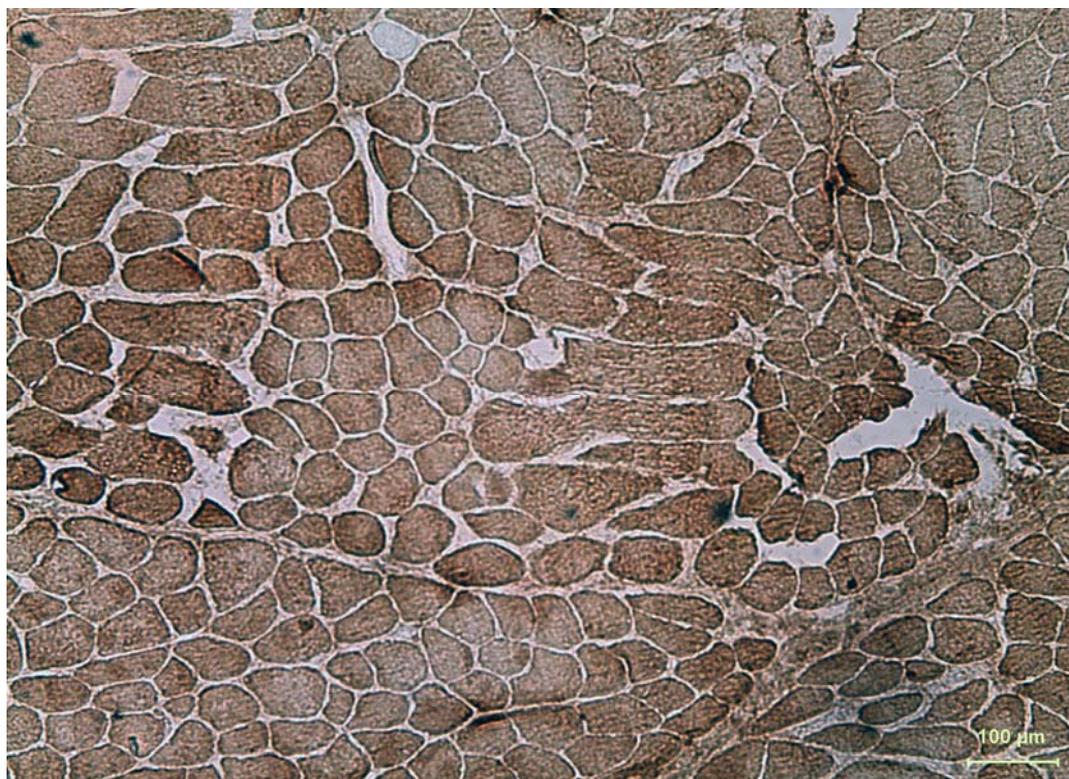


Figura 42. Sección transversal seriada del *m. elevador del velo palatino* del perro. Inmunomarcado con SC-71. Se marcan las fibras que contienen MyHC-IIa, que en este músculo también reaccionan con el anticuerpo BF-35.

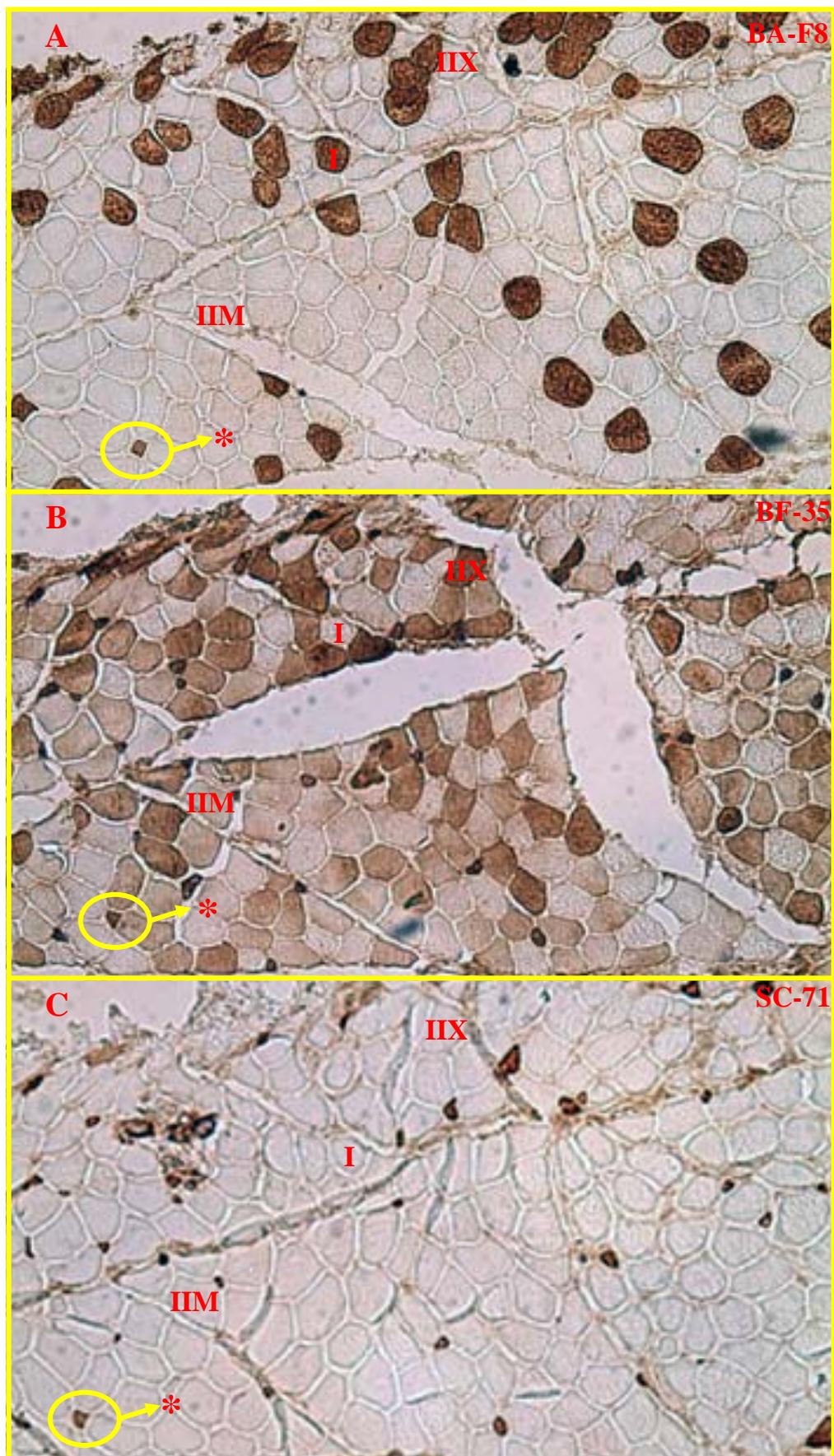


Figura 43. Secciones transversales seriadas del *m. tensor del velo palatino* del perro. Inmunomarcado con diferentes ac. monoclonales. Se indican los principales tipos fibrilares descritos para este músculo. * Estas fibras podrían corresponderse con las denominadas “tónico-lentas” por Mascarello et al. (1983).



Figura 44. Sección transversal del *m. tensor del velo palatino* en el perro. Técnica mATPasa alcalina a pH 10,5. En la imagen se puede apreciar la regionalización que presenta, advirtiéndose una zona periférica donde predominan las fibras tipo I, con fascículos de porcentajes próximos al 60%. Se aprecia también una región central donde predominan las fibras tipo IIM.

IV.3.4. Tablas

Tabla V. Características tintoriales de las fibras de los músculos del paladar y fauces en el perro, tras aplicar las técnicas histoquímicas (mATPasa a diferentes preincubaciones y NADH-TR)*.

Técnica	Tipos de fibras					
	I	IIA	Iip	“tónico-lenta”	IIM	IIC
mATPasa pH 10,4-10,5	-	+++	+ / +++	+++	+++	+
mATPasa pH 4,6	++ / +++	-	+ / +++	++ / +++	+++	++
mATPasa pH 4,3	++ / +++	-	-	++ / +++	+++	+
NADH-TR	++ / +++	+ / +++	+ / +++	+ / +++	+ / +++	+ / +++

* Intensidad de tinción relativa de los diferentes tipos de fibras: +++ (muy fuerte), ++ (fuerte), + (moderada), - (muy débil o negativa)

Tabla VI. Características tintoriales de las fibras de los músculos del paladar y fauces en el perro, tras aplicar las técnicas histoquímicas (mATPasa a diferentes preincubaciones y NADH-TR) y la inmunohistoquímica*.

Técnica	Tipos de fibras					
	I	IIAX o IIXA	“tónico-lenta”	IIM	IIX	IIC
mATPasa pH 10,4-10,5	-	++ / +++	+++	+++	+	+
mATPasa pH 4,6	++ / +++	- / +	++ / +++	+++	++	++
mATPasa pH 4,3	++ / +++	-	++ / +++	+++	-	+
NADH-TR	++ / +++	+ / +++	+ / +++	+ / +++	+ / +++	+ / +++
BA-F8	+++	-	+++	-	-	+ / +++
anti-I (Sigma M 8421)	+++	- / +	+++	-	- / +	+ / +++
anti-II (Sigma M 4276)	-	++ / +++	+++	-	++ / +++	+ / +++
BF-35	-	+ / ++ / +++	+++	-	++ / +++	-
SC-71	-	+ / ++ / +++	+++	-	-	+ / +++

* Intensidad de tinción relativa de los diferentes tipos de fibras: +++ (muy fuerte), ++ (fuerte), + (moderada), - (muy débil o negativa)

IV.4. TIPOS DE FIBRAS EN LOS MÚSCULOS FARÍNGEOS. FIGURAS 45-61; TABLAS VII Y VIII

Las características tintoriales histo e inmunohistoquímicas de los músculos faríngeos, donde incluimos al palatofaríngeo del grupo del paladar y fauces, resultan similares, advirtiéndose más peculiaridades y diferencias en el músculo cricofaríngeo.

IV.4.1. Técnicas histoquímicas

IV.4.1.1. Técnica mATPasa

Los músculos **palatofaríngeo** y **terigofaríngeo** presentan fibras con actividad alcalino-lábil y ácido-estable, que se clasifican como tipo **I**, según los criterios seguidos para el músculo control. Asimismo, con la aplicación de la mATPasa observamos dos tipos de fibras rápidas que catalogamos como **IIA** y **Iip**, acorde con los criterios anteriormente referidos. Ocasionalmente también se diferencian fibras tipo **IIC**.

En el músculo **estilofaríngeo caudal** se describen idénticos tipos fibrilares a los reseñados para los músculos palatofaríngeo y terigofaríngeo: fibras tipo **I** ácido-estables, fibras tipo **IIA** ácido-labiles, fibras **Iip** ácido-estables a pH 4,6 y fibras tipo **IIC** parcialmente alcalino y ácido-estables (**Figura 45**).

El músculo **hiofaríngeo** también presenta los tipos fibrilares descritos en los músculos anteriormente referidos. Fibras con actividad alcalino-estable (tinción fuerte) a pH 10,4 y 10,5, ácido-estable a pH 4,6 (tinción moderada) y ácido-lábil a pH 4,3, que clasificamos histoquímicamente, en base a la reacción mATPasa, como fibras **Iip**. Asimismo, observamos fibras tipo **I** con idénticas características tintoriales a las referidas en el músculo control (músculo semitendinoso). Es decir, alcalino-lábiles (tinción negativa) y ácido-estables (tinción muy fuerte) a pH 4,3 y

4,6. También se advierten fibras que comparten las propiedades histoquímicas de las fibras **IIA**: alcalino-estables y ácido-lábiles. Por último, identificamos de forma aislada miocitos que poseen las características de ácido y alcalino-estabilidad de las fibras **IIC** (**Figura 46**).

En el músculo **tirofaríngeo** detectamos, tras aplicar la técnica mATPasa, los mismos tipos fibrilares que en el músculo semitendinoso. Fibras alcalino-lábiles y ácido-estables, que clasificamos como tipo **I**. Por otra parte, fibras alcalino-estables y ácido-lábiles a las que denominamos como tipo **IIA**, y fibras alcalino-estables y parcialmente ácido-estables (a pH 4,6) que catalogamos como **IIP**. Observamos también, en número muy escaso, fibras tipo **IIC**, con idénticas características tintoriales a las descritas en el músculo control (**Figura 47**).

Por último, en el músculo **cricofaríngeo** podemos describir también los cuatro tipos de miocitos que aparecen en el músculo control. Fibras tipo **I**, cuyas características tintoriales son las referidas para el músculo semitendinoso. Fibras tipo **IIA**, alcalino-estables y ácido lábiles en el rango de pH contemplado en este trabajo. Fibras tipo **IIP**, alcalino-estables (con un grado de intensidad de tinción menor que las fibras IIA) y parcialmente ácido-estables (a pH 4,6). Fibras tipo **IIC**, parcialmente alcalino-estables (grado de tinción moderado) y ácido-estables (tinción moderada a pH 4,3 y fuerte a pH 4,6) (**Figura 48**).

IV.4.1.2. Técnica NADH-TR

Como en el músculo control, la intensidad de tinción, tras aplicar la técnica NADH-TR, que manifiestan los cuatro tipos fibrilares descritos en los músculos faríngeos resulta fuertemente oxidativa en las fibras tipo **I** y del mismo grado o algo menor en el resto de tipos fibrilares (**Figura 49**).

En la **Tabla VII** se reflejan con detalle las propiedades histoquímicas de los músculos faríngeos.

IV.4.2. Técnica inmunohistoquímica

Tras el análisis inmunohistoquímico de las muestras de los músculos faríngeos podemos describir los siguientes tipos de fibras:

-Fibras puras tipo **I**: se marcan exclusivamente con el anticuerpo BA-F8 y el “Anti-Myosin Skeletal Slow”. Se corresponden con las fibras histoquímicamente catalogadas como tipo I.

-Fibras puras tipo **IIA**: reaccionan sólo con el anticuerpo SC-71. Son análogas a las clasificadas como IIA tras aplicar la técnica de la mATPasa.

-Fibras puras tipo **IIx**: son marcadas únicamente con el anticuerpo BF-35. Histoquímicamente poseen las propiedades de las fibras descritas como Iip.

-Fibras híbridas tipo **IIC**: reaccionan con el anticuerpo BA-F8 y con el específico para la isoforma de miosina MyHC-IIa. Se corresponden con las fibras catalogadas como IIC tras realizar las técnicas histoquímicas.

-Fibras híbridas tipo **IIxA**: marcado muy fuerte al enfrentar las preparaciones al anticuerpo BF-35 y fuerte con el SC-71. En general, son fibras que histoquímicamente mediante la técnica de la mATPasa se describen como tipo Iip.

-Fibras híbridas tipo **IIAX**: reaccionan muy fuerte con los anticuerpos SC-71 y de forma moderada a fuerte con el BF-35. Se trata de fibras referidas como IIA con las técnicas histoquímicas.

Todos los subtipos de fibras II se marcan con el anticuerpo “Anti-Myosin Skeletal Fast”. El anticuerpo “Anti-Myosin Skeletal Slow”, al igual que sucede en el músculo control y en todos los músculos analizados en este trabajo de Tesis Doctoral, también reacciona, aunque en menor medida, con algunos de estos miocitos.

En las **Figuras 50-59** podemos observar los tipos fibrilares descritos en los distintos músculos. La **Tabla VIII** refleja las propiedades tintoriales histoquímicas e inmunohistoquímicas de los músculos faríngeos.

En las muestras procesadas conjuntamente de los músculos palatofaríngeo y terigofaríngeo no se describe el tipo fibrilar IIX. El músculo estilofaríngeo caudal posee, por un lado, fibras puras tipo I y, por otro, fibras híbridas que podemos catalogar de forma indistinta como IIXA o IIAX, ya que se tiñen de manera muy intensa y en igual medida con los dos anticuerpos empleados para las fibras rápidas tipo II, el BF-35 y el SC-71. El músculo hiofaríngeo se comporta tintorialmente a nivel inmunohistoquímico como los músculos palato y terigofaríngeo, apareciendo idénticos tipos fibrilares. Por último, por lo que respecta a los músculos tirofaríngeo y cricofaríngeo, se advierten los seis tipos fibrilares descritos anteriormente. También tenemos grupos de fibras que podemos catalogar indistintamente como IIAX o IIXA, por los motivos ya expuestos. Además, en el músculo cricofaríngeo observamos alguna fibra aislada que no se marca con los anticuerpos específicos utilizados, no incluyéndose dentro de los tipos fibrilares descritos con los criterios seguidos para el músculo semitendinoso (músculo control).

IV.4.3. Análisis de la distribución y porcentaje de los tipos fibrilares en los músculos faríngeos

En las muestras procesadas en conjunto de los músculos **palatofaríngeo** y **terigofaríngeo** observamos un predominio de las fibras rápidas (90%) sobre las tipo I (10% del total de fibras contabilizadas). De las fibras rápidas, un 10% son fibras híbridas tipo IIAX, algo menos del 3% fibras IIA puras y el resto fibras híbridas IIXA. Las fibras tipo I se distribuyen uniformemente por los fascículos. Las fibras híbridas IIAX se disponen en agrupaciones de 2 a 8 miocitos.

La distribución de los dos tipos fibrilares descritos en el músculo **estilofaríngeo caudal** es uniforme y en tablero de ajedrez. Predominan las fibras híbridas tipo II (62%) sobre las fibras puras tipo I (38%).

El músculo **hiofaríngeo** presenta un claro predominio de las fibras de contracción rápida sobre las fibras tipo I (14%), que aparecen distribuidas dentro de los fascículos musculares. De las fibras tipo II, un 11% pertenecen al tipo puro IIA, siendo las restantes fibras híbridas IIAX o IIXA. La distribución del tipo IIA es uniforme, observándose en grupos de 2 a 4 miocitos por la superficie de los cortes histológicos.

El músculo **tirofaríngeo** presenta, como los músculos anteriores, un claro predominio de fibras de contracción rápida sobre los miocitos tipo I (aproximadamente el 10%). Las fibras puras tipo IIA aparecen de forma aislada y son muy raras, igual que las fibras tipo IIC. Las fibras puras tipo IIX son también escasas (aproximadamente el 5%). El resto de fibras son híbridas tipos IIAX o IIXA. La distribución de todos los tipos fibrilares es uniforme en mosaico.

Al estudiar la distribución fibrilar en el músculo **cricofaríngeo** observamos que existen dos compartimentos o regiones, diferenciadas por los tipos fibrilares que presentan (**Figuras 60 y 61**). En la mayor parte del músculo cricofaríngeo predominan las fibras tipo I (80%), siendo el resto fibras híbridas IIXA o IIAX y alguna fibra tipo IIC (aproximadamente el 5%). Es en esta región muscular con un predominio fibrilar lento donde hemos encontrado las fibras que no se marcan con ningún anticuerpo, y que representan menos del 2%. En las regiones musculares periféricas se describen fascículos donde se invierte la proporción entre el tipo fibrilar lento (8%) y los rápidos (92%). Dentro de los subtipos de miocitos con formas rápidas de miosina, observamos un predominio de las fibras tipo IIX puras (55%), seguido de las fibras IIA (21%) y en menor medida de las fibras híbridas tipos IIXA o IIAX (16%), no advirtiéndose en estas regiones periféricas fibras tipo IIC.

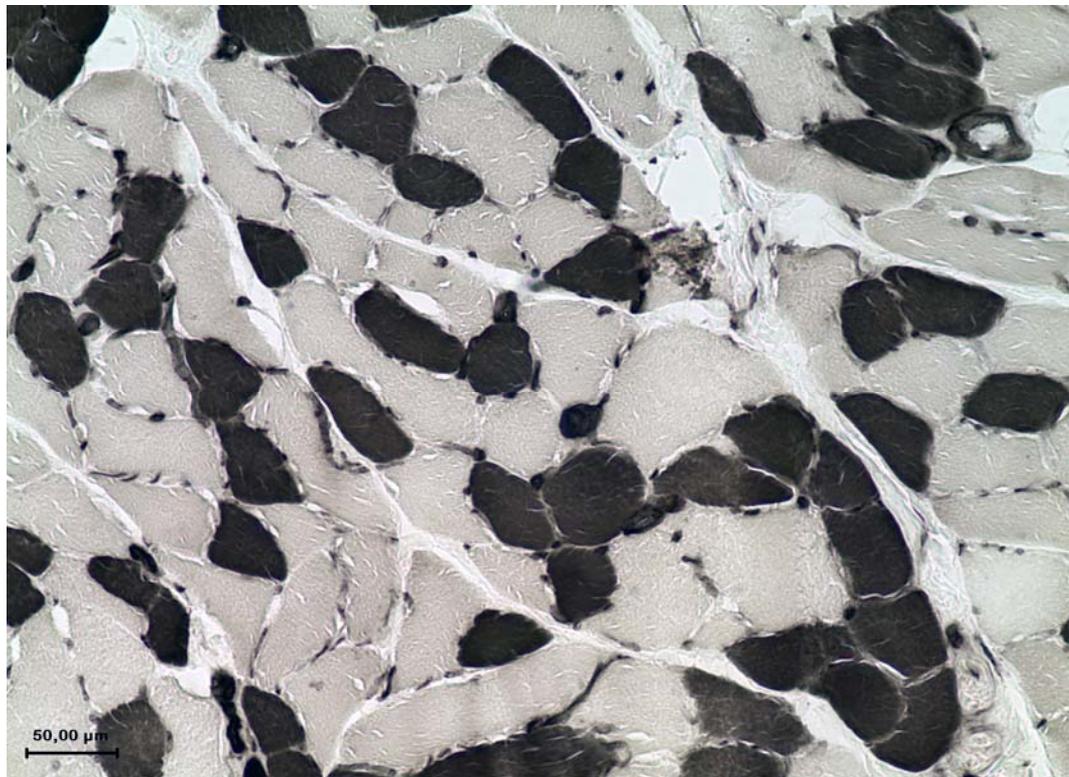


Figura 45. Sección transversal del *m. estilofaríngeo caudal* del perro. Técnica mATPasa ácida a pH 4,3. Se identifican dos tipos fibrilares con esta incubación: fibras tipo I (tinción oscura) y fibras tipo II (tinción clara).

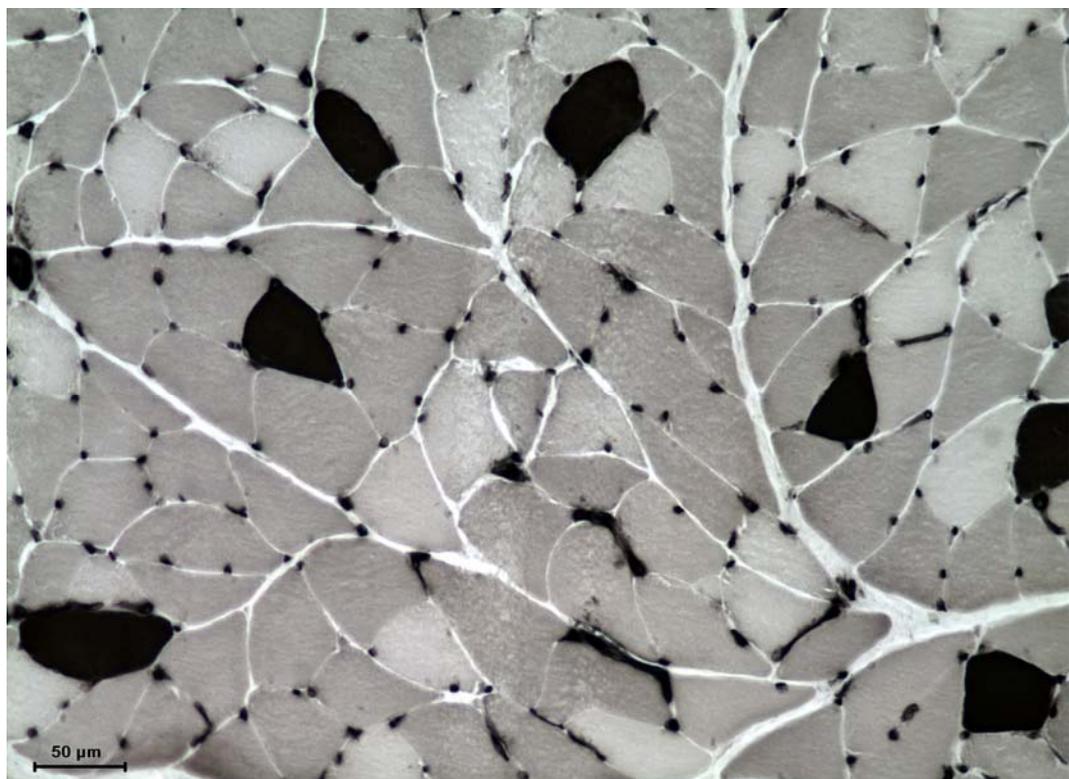


Figura 46. Sección transversal del *m. hiofaríngeo* canino. Técnica mATPasa ácida a pH 4,6. En este corte histológico se diferencian tres tipos de miocitos: fibras tipo I (tinción intensa); fibras tipo IIA (sin teñir) y fibras tipo IIp (tinción moderada).

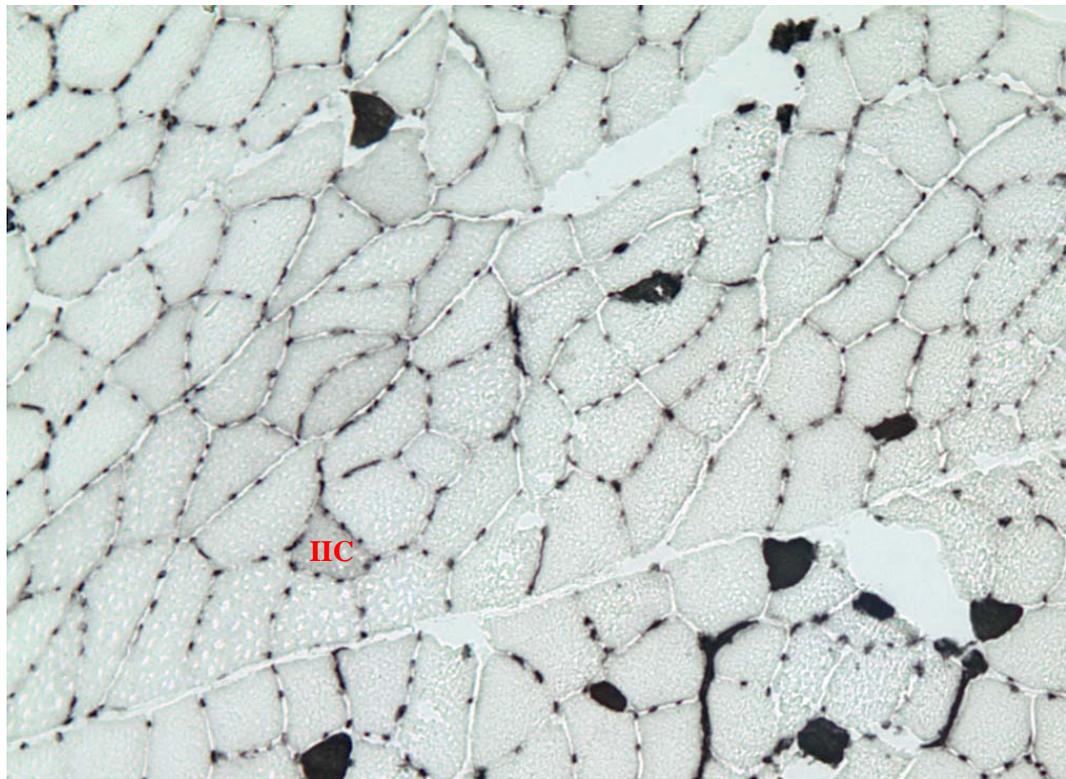


Figura 47. Sección transversal del *m. tirofaríngeo* canino. Técnica mATPasa ácida a pH 4,3. Se identifican tres tipos de miocitos: fibras tipo I (tinción intensa); fibras tipo II (sin teñir) y fibras tipo IIC (tinción moderada y presencia aislada).

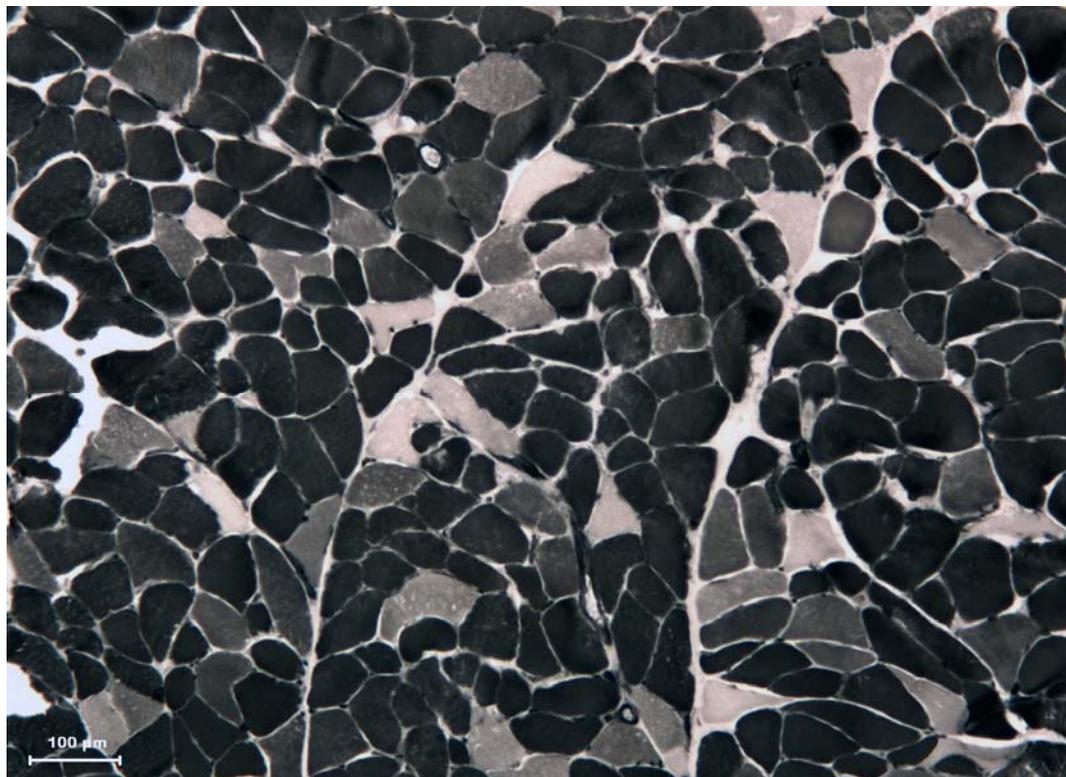


Figura 48. Sección transversal del *m. cricofaríngeo* del perro. Técnica mATPasa ácida a pH 4,6. En la imagen podemos diferenciar tres tipos fibrilares: fibras tipo I (tinción intensa), fibras tipo IIA (ausencia de tinción) y fibras tipo IIp (tinción moderada).

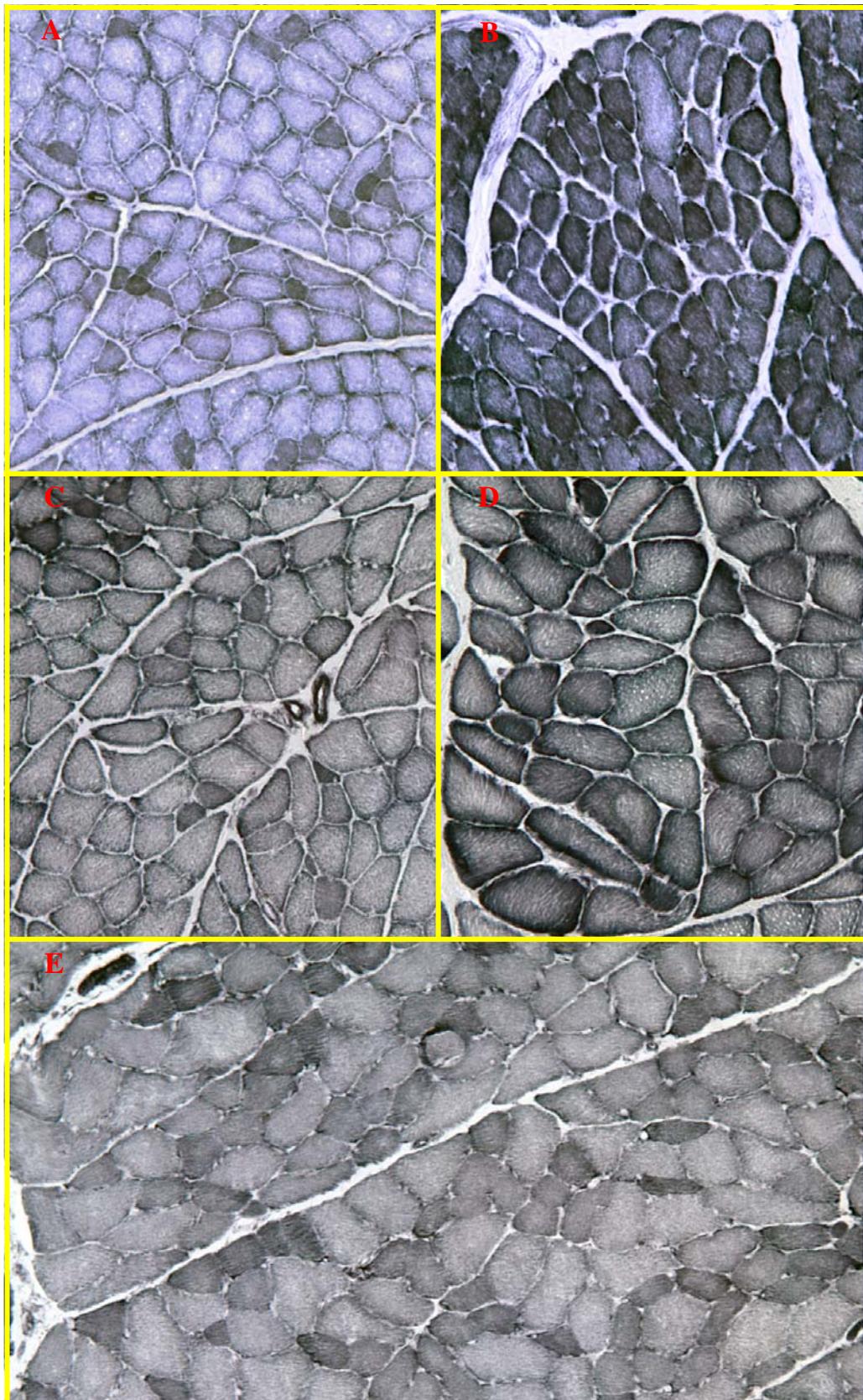


Figura 49. Secciones transversales de distintos músculos de la faringe del perro tras aplicar la técnica NADH-TR. La capacidad oxidativa es mayor en las fibras tipo I; la de los miocitos rápidos es menor, aunque puede variar según el músculo analizado. A) *M. terigofaríngeo*. B) *M. estilofaríngeo caudal*. C) *M. hiofaríngeo*. D) *M. tirofaríngeo*. E) *M. cricofaríngeo*.

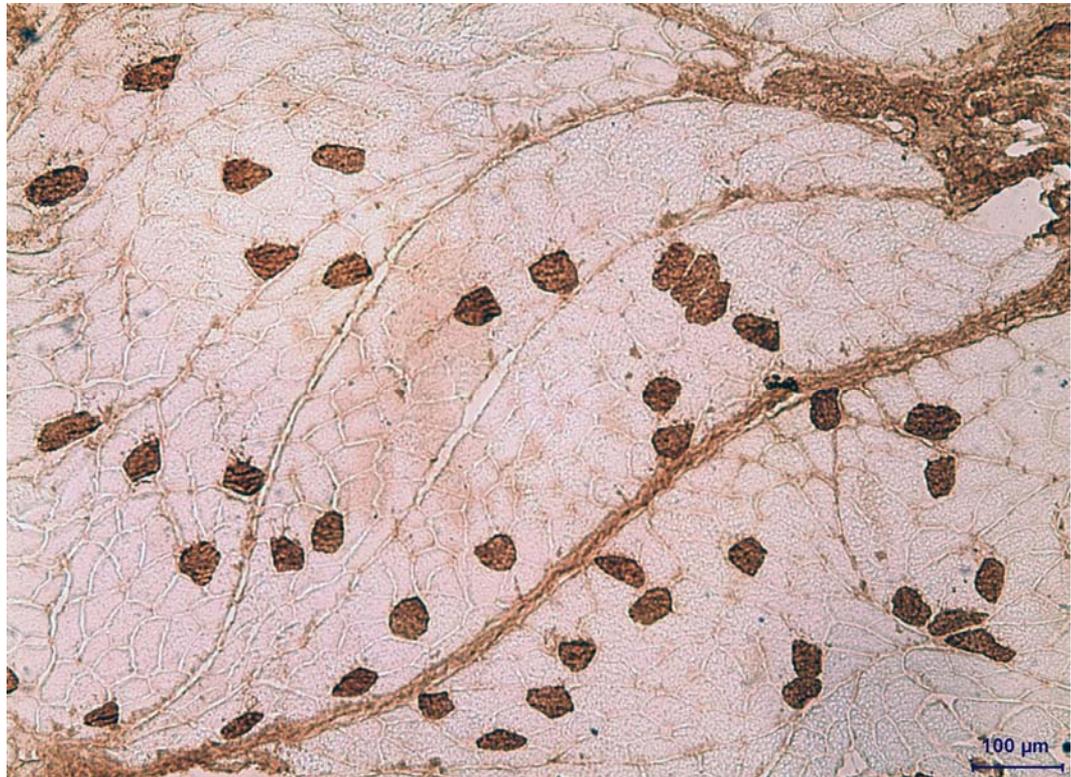


Figura 50. Sección transversal de los *mm. palatofaríngeo y terigofaríngeo* del perro. Inmunomarcado con BA-F8. En este corte histológico aparecen marcados exclusivamente los miocitos que contienen MyHC-I.

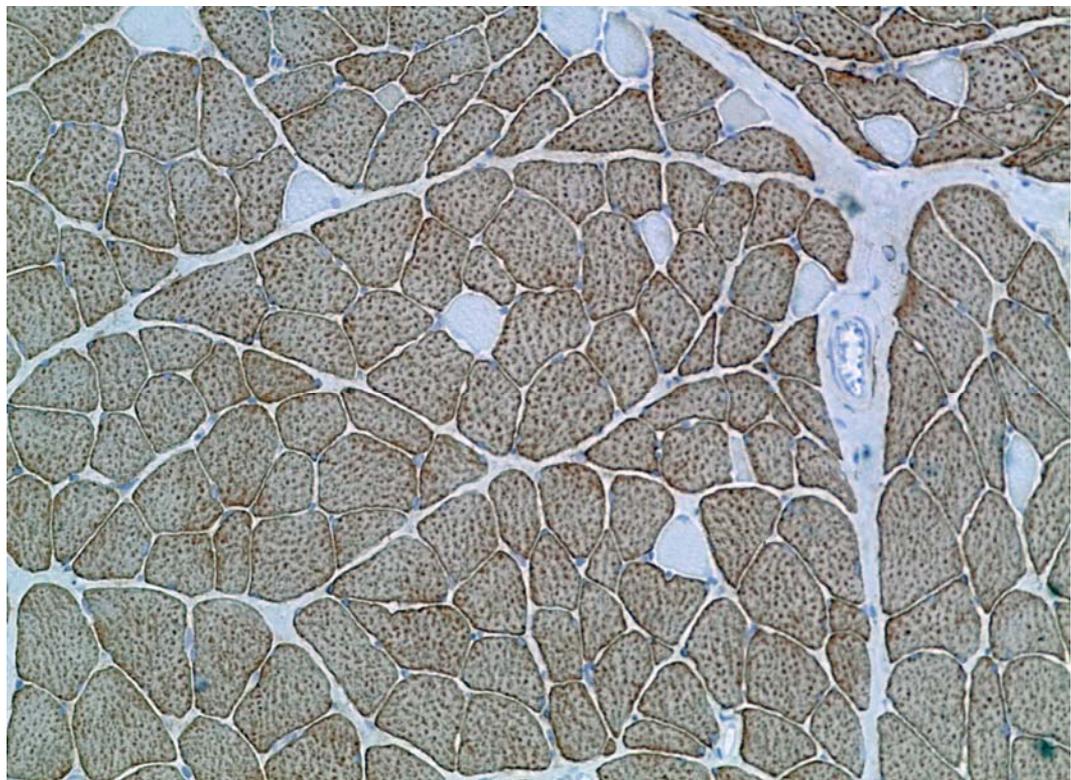


Figura 51. Sección transversal del *m. terigofaríngeo* del perro. Inmunomarcado con “Anti-Myosin Skeletal Fast”. Este anticuerpo reacciona sólo con los tipos y subtipos de fibras II, que en este músculo pueden suponer hasta un 90% del total de la población de miocitos.

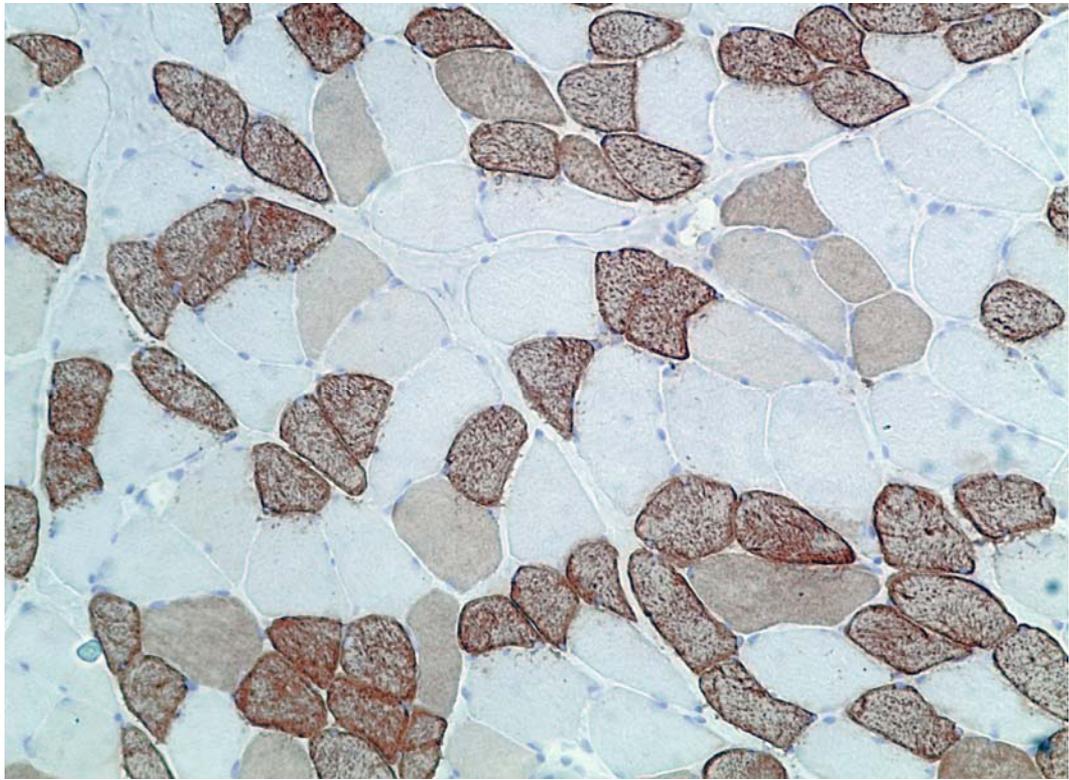


Figura 52. Sección transversal del *m. estilofaríngeo caudal* del perro. Inmunomarcado con “Anti-Myosin Skeletal Slow”. Las fibras tipo I alcanzan porcentajes cercanos al 40%. Este anticuerpo también reacciona, en menor grado, con algunas fibras tipo II.



Figura 53. Sección transversal del *m. estilofaríngeo caudal* canino. Inmunomarcado con BF-35. La disposición de sus miocitos es en tablero de ajedrez, con predominio de las fibras híbridas IIAX o IIXA.

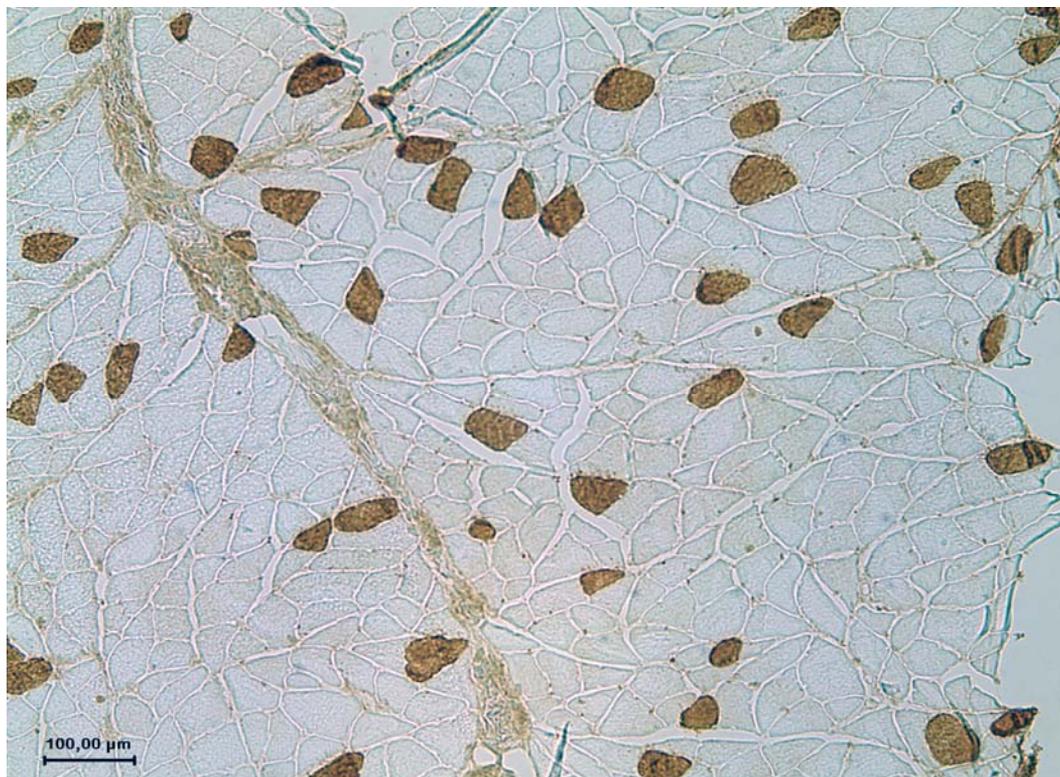


Figura 54. Sección transversal del *m. hiofaríngeo* del perro. Inmunomarcado con BA-F8. Se pueden identificar dos tipos de miocitos: fibras tipo I (marcadas) y fibras tipo II (no marcadas).

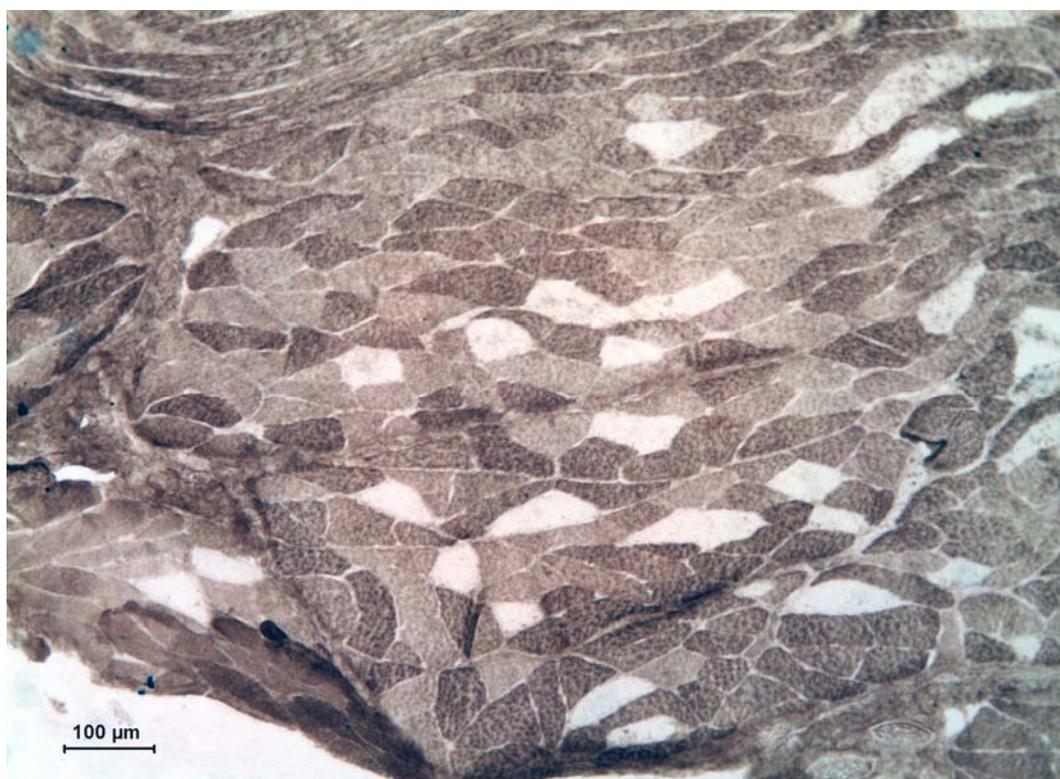


Figura 55. Sección transversal del *m. hiofaríngeo* del perro. Inmunomarcado con SC-71. Este anticuerpo reacciona con las fibras que tienen MyHC-IIa. El *m. hiofaríngeo* posee en torno a un 10% de fibras IIA puras.

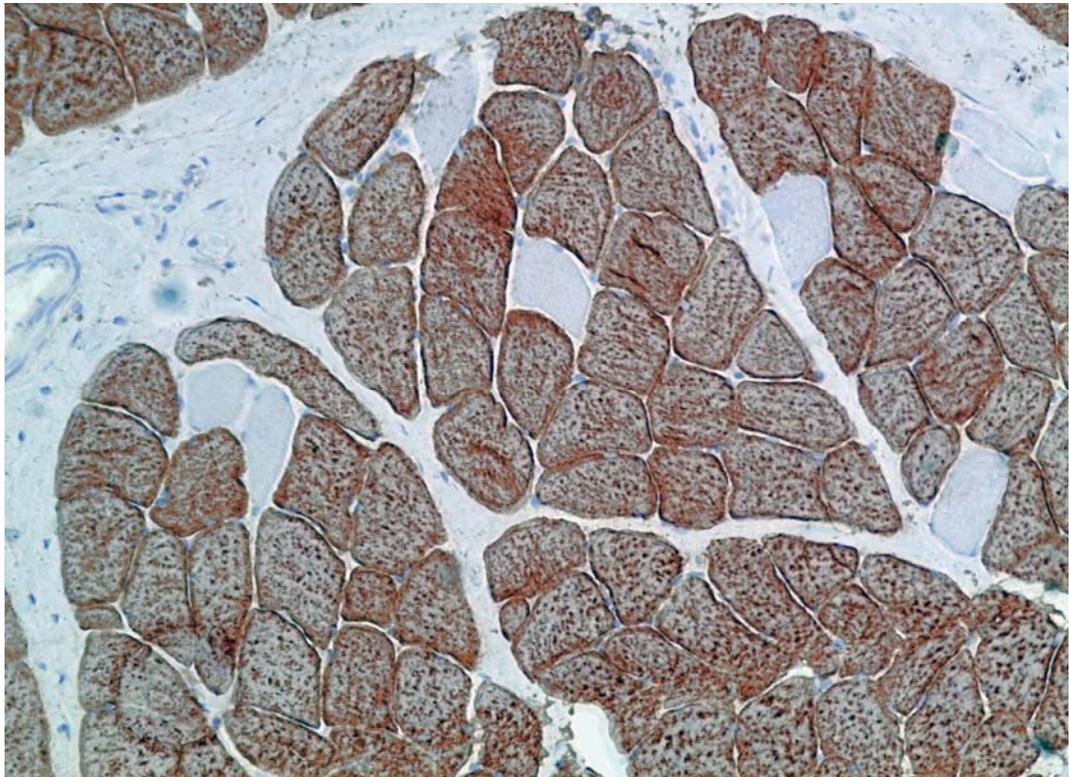


Figura 56. Sección transversal del *m. tirofaríngeo* canino. Inmunomarcado con “Anti-Myosin Skeletal Fast”. Este músculo presenta un claro predominio de fibras de contracción rápida (90%).



Figura 57. Sección transversal del *m. tirofaríngeo* del perro. Inmunomarcado con BF-35. Sobre un 5% de las fibras tipo II de este músculo son fibras puras IIX, que reaccionan con intensidad ante este anticuerpo.

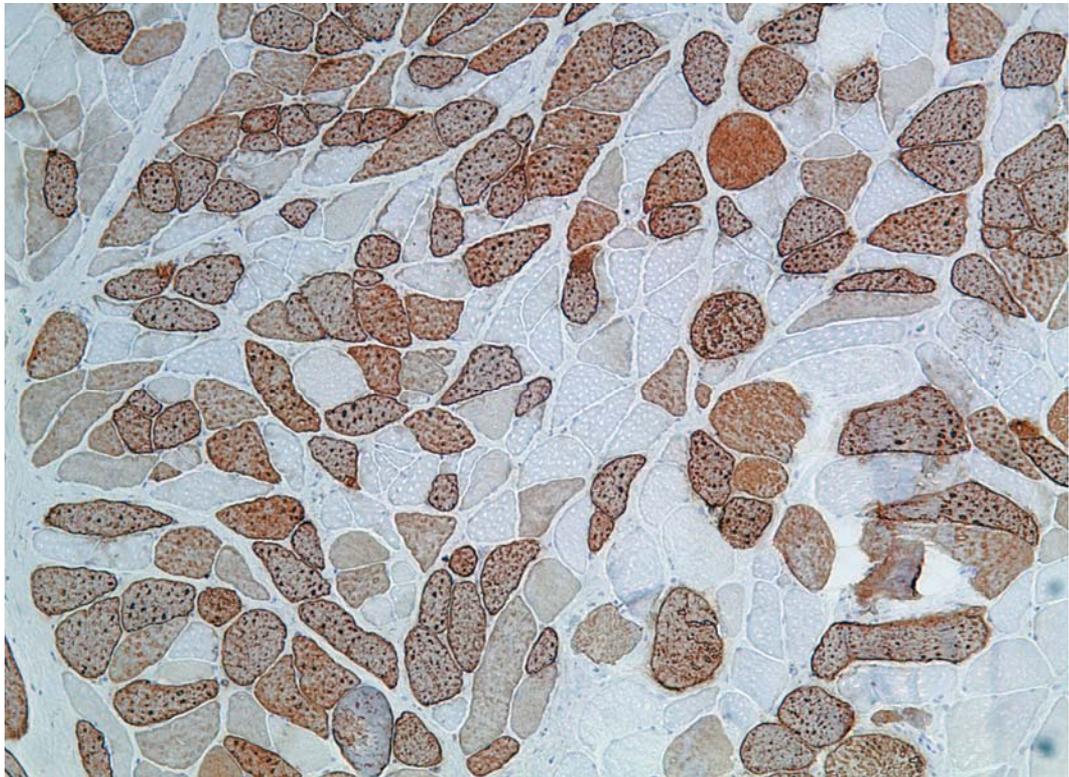


Figura 58. Sección transversal del *m. cricofaríngeo* del perro. Inmunomarcado con “Anti-Myosin Skeletal Slow”. Se observa una región muscular con predominio claro de fibras lentas tipo I.

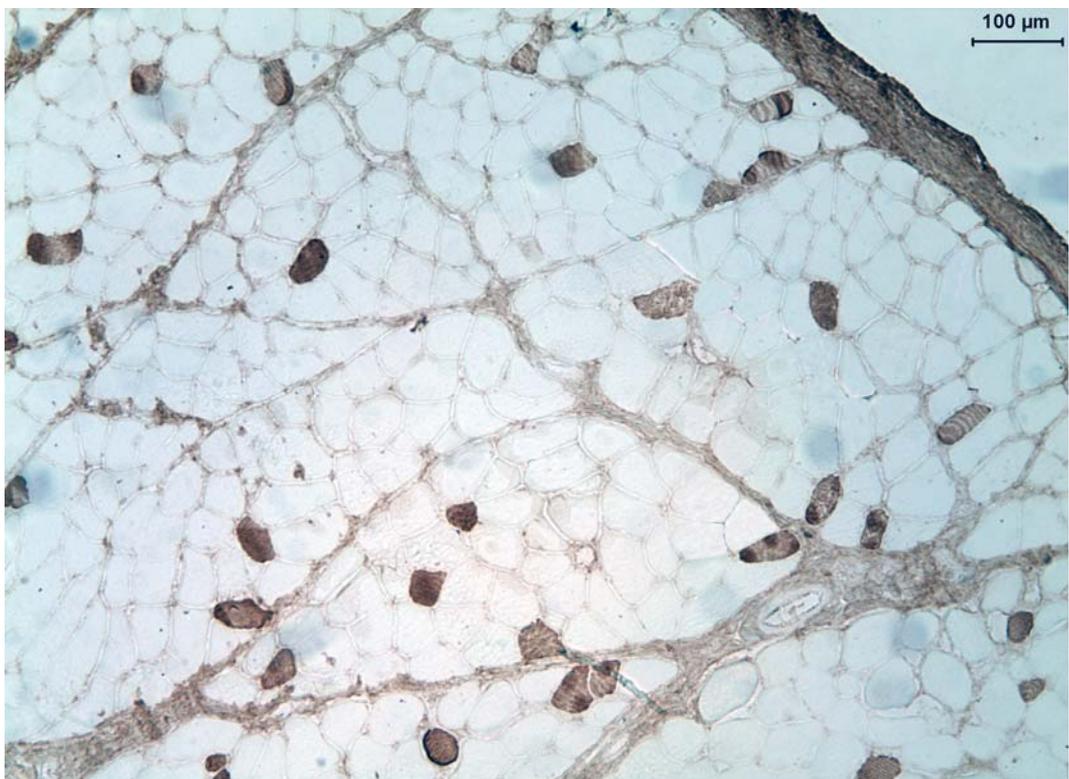


Figura 59. Sección transversal del *m. cricofaríngeo* del perro. Inmunomarcado con BA-F8. Imagen correspondiente a otra región del músculo donde predominan las fibras rápidas tipo II.

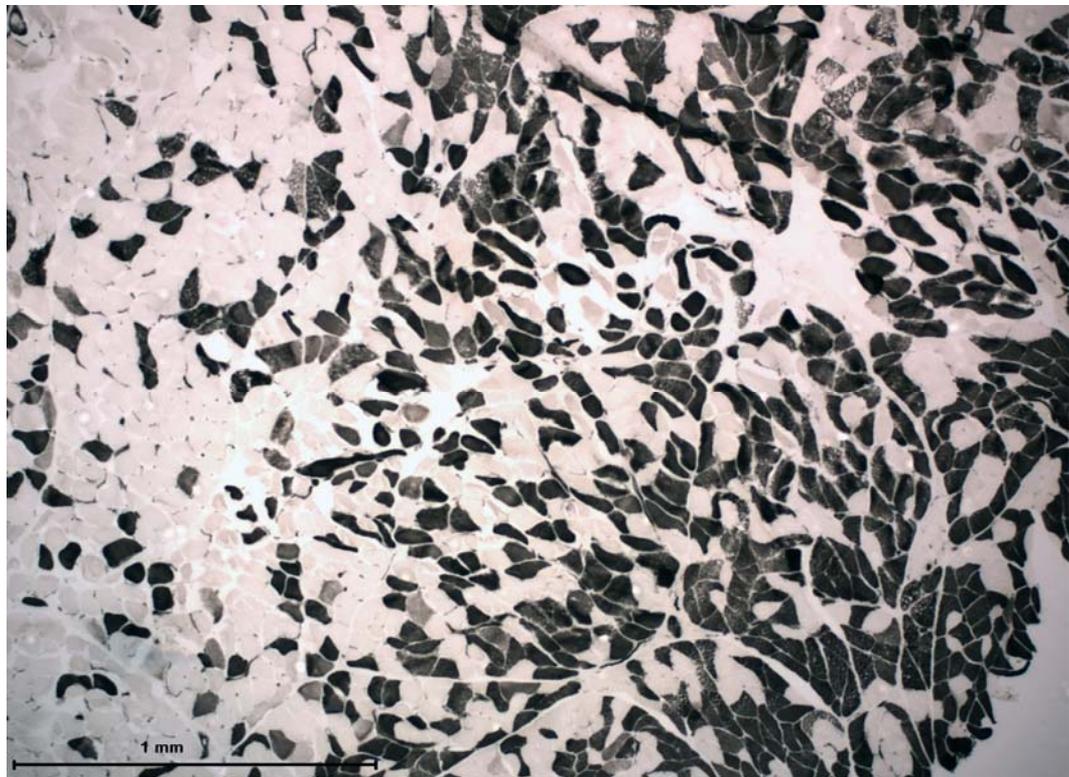


Figura 60. Sección transversal seriada del *m. cricofaríngeo* del perro. Técnica mATPasa a pH 10,5. En esta imagen a pocos aumentos se puede apreciar la regionalización de este músculo.

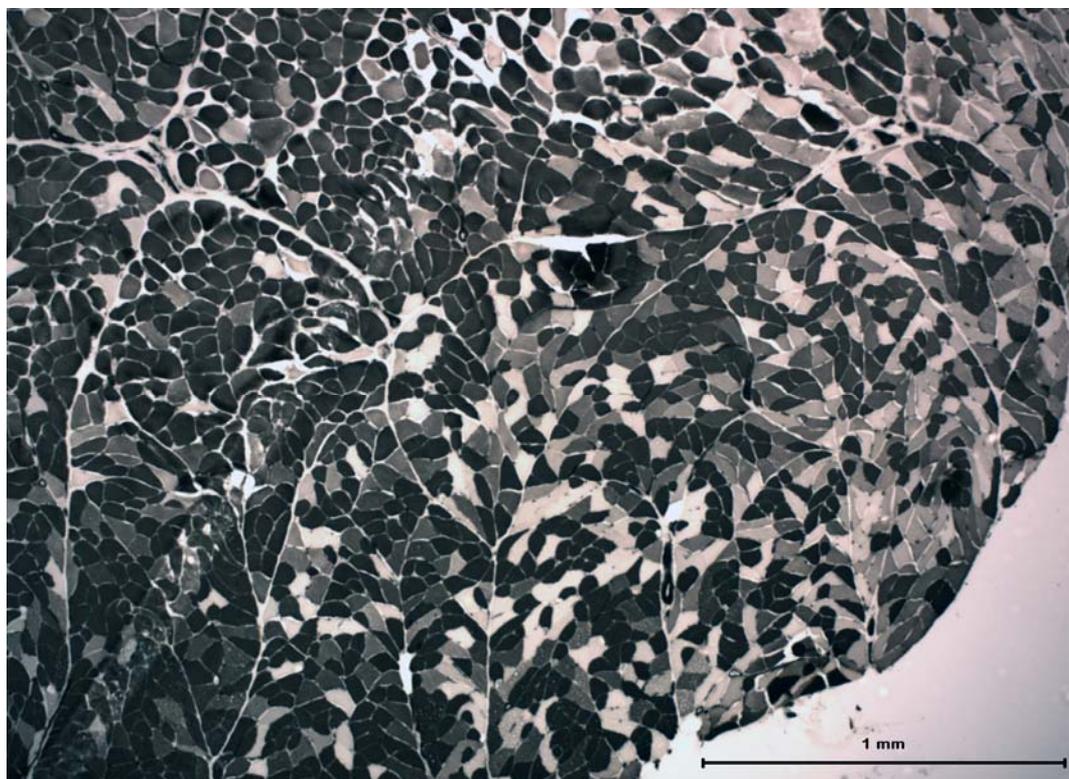


Figura 61. Sección transversal seriada del *m. cricofaríngeo* del perro. Técnica mATPasa a pH 4,6. En este corte se observa la inversión del patrón tintorial, así como la existencia de dos regiones: una región periférica rápida y una región central lenta.

IV.4.4. Tablas

Tabla VII. Características tintoriales de las fibras de los músculos faríngeos y el palatofaríngeo en el perro, tras aplicar las técnicas histoquímicas (mATPasa a diferentes preincubaciones y NADH-TR)*.

Técnica	Tipos de fibras			
	I	IIA	IIp	IIC
mATPasa pH 10,4-10,5	-	+++	++	+
mATPasa pH 4,6	+++	-	+	++
mATPasa pH 4,3	+++	-	-	+
NADH-TR	++/+++	+/>+++	+/>+++	+/>+++

* Intensidad de tinción relativa de los diferentes tipos de fibras: +++ (muy fuerte), ++ (fuerte), + (moderada), - (muy débil o negativa)

Tabla VIII. Características tintoriales de las fibras de los músculos faríngeos y el palatofaríngeo en el perro, tras aplicar las técnicas histoquímicas (mATPasa a diferentes preincubaciones y NADH-TR) y la inmunohistoquímica*.

Técnica	Tipos de fibras					
	I	IIA	IIAX	IIXA	IIY	IIC
mATPasa pH 10,4-10,5	-	+++	+++	++	++	+
mATPasa pH 4,6	+++	-	-	+	+	++
mATPasa pH 4,3	+++	-	-	-	-	+
NADH-TR	++/+++	+/>+++	+/>+++	+/>+++	+/>+++	+/>+++
BA-F8	+++	-	-	-	-	+/>+++
anti-I (Sigma M 8421)	+++	-/>+	-/>+	-/>+	-/>+	+/>+++
anti-II (Sigma M 4276)	-	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++	+/>+++
BF-35	-	-	+/>+++	++/+++	++/+++	-
SC-71	-	++/+++	++/+++	+/>+++	-	+/>+++

* Intensidad de tinción relativa de los diferentes tipos de fibras: +++ (muy fuerte), ++ (fuerte), + (moderada), - (muy débil o negativa)

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

V.1. MÚSCULO SEMITENDINOSO (MÚSCULO CONTROL)

El **semitendinoso** es uno de los músculos apendiculares más estudiado en cuanto a la composición fibrilar, tanto en el perro: Gunn (1978), Armstrong et al. (1982), Snow et al. (1982), Latorre (1990), Latorre et al. (1993b), Rivero et al. (1994), Smerdu et al. (2005), Štrbenc et al. (2004, 2006) y Acevedo y Rivero (2006), como en otras especies: Gunn (1978) y Grotmol et al. (2002) en el caballo, Argüello et al. (2001) en la cabra, Mattson et al. (2002) en el hamster. Se trata de una entidad muscular muy bien caracterizada histoquímica e inmunohistoquímicamente, razones por las que decidimos seleccionarlo como músculo control, procesándolo conjuntamente con el resto de músculos analizados, tal y como ya hemos referido en el epígrafe de Material y Métodos.

Su función principal en el perro consiste en la extensión de la cadera y de las articulaciones tarsianas, al tiempo que flexiona la articulación de la rodilla. Se

topografía por la región caudal del miembro pelviano, dispuesto entre los vientres musculares del bíceps del fémur y del semimembranoso. Presenta dos porciones, ambas inervadas por los ramos musculares proximales del nervio tibial. Dicha división, documentada en otros mamíferos, por ejemplo en el gato por English y Weeks (1987) y Chanaud et al. (1991), determina que la composición fibrilar sea distinta según la porción muscular de la que se tome la muestra. Gunn (1978) demostró en el perro variaciones significativas de su composición fibrilar en una sección muscular transversal completa. Refiere, en general, una mayor población de fibras lentas en las zonas profundas en contraposición con las zonas periféricas donde predominan las fibras rápidas, excepto en el galgo donde se invierten las proporciones de miocitos. Armstrong et al. (1982) describen un predominio de fibras rápidas sobre las lentas (28%) en el músculo semitendinoso del perro, observando igualmente un mayor porcentaje de este tipo fibrilar en las zonas profundas, aunque sin establecer diferencias interraciales. En la especie equina, Grotmol et al. (2002) también aprecian diferencias en la distribución de los tipos fibrilares entre zonas profundas y periféricas del músculo, prevaleciendo las fibras lentas tipo I en las zonas profundas, sin valorar tampoco posibles diferencias entre razas. En nuestro trabajo, todas las muestras las hemos tomado de las zonas superficiales del músculo semitendinoso, donde comprobamos que la proporción de fibras tipo I resulta menor que la población de fibras rápidas.

El semitendinoso es funcionalmente un músculo más locomotor que postural, con mayor porcentaje de fibras rápidas que de lentas. Por otra parte, el perro es un “corredor de largas distancias, por excelencia” (Snow et al., 1982), presentando gran cantidad de fibras de elevado potencial oxidativo, hecho éste que se traduce en una mayor resistencia a la fatiga. Ambos aspectos han sido evidenciados en las muestras por nosotros procesadas. En este apartado de Discusión hemos de valorar detalladamente los resultados de este músculo, comparándolos con los obtenidos por otros autores, para justificar así su empleo como patrón de referencia.

Al aplicar las técnicas de la ATPasa miosínica con preincubaciones ácidas y alcalinas, podemos diferenciar hasta cuatro tipos fibrilares a los que denominamos

como tipos I, IIA, IIp y IIC, de acuerdo a la nomenclatura establecida por Latorre (1990) y Latorre et al. (1993b). Las fibras tipo I manifiestan una actividad mATPasa alcalino-lábil y ácido estable; las fibras IIA una actividad alcalino-estable y ácido-lábil; las fibras tipo IIp, denominadas IIB por algunos autores como Rivero et al. (1994), poseen una actividad mATPasa alcalino-estable, ácido-estable a pH 4,6 y ácido-lábil a pH 4,3; y, por último, las fibras IIC consideradas fibras de transición de muy escaso porcentaje en el adulto, hecho corroborado en nuestros resultados, son fibras parcialmente alcalino y ácido-estables. Nuestros resultados coinciden con los hallazgos y criterios ya establecidos por otros autores (Snow et al., 1982; Latorre, 1990; Latorre et al., 1993b). Por dichas razones consideramos que, desde el punto de vista de la actividad mATPasa, el músculo semitendinoso resulta idóneo como músculo control, pues los patrones tintoriales que presenta están perfectamente definidos, contrastados y corroborados en la bibliografía consultada.

Otro tanto podemos referir sobre la determinación de la actividad oxidativa de las fibras del músculo semitendinoso mediante la técnica NADH-TR. Los resultados que hemos obtenido coinciden con los de otros autores (Snow et al., 1982; Latorre, 1990; Latorre et al., 1993b; Rivero et al., 1994; Smerdu et al., 2005; Štrbenc et al. 2004, 2006; Acevedo y Rivero, 2006). Es decir, tinción de moderada a fuerte o muy fuerte en todas sus fibras, equivalente a una alta resistencia a la fatiga, característica tintorial que generalmente poseen los miocitos de esta especie.

Por último, en cuanto a los resultados obtenidos tras el empleo de anticuerpos monoclonales específicos para las cadenas pesadas de miosina MyHC-I, MyHC-IIa y MyHC-IIx, observamos que las fibras lentas tipo I se marcan clara y exclusivamente con el anticuerpo BA-F8, específico para la MyHC-I. Las fibras catalogadas histoquímicamente como IIp lo hacen con el anticuerpo BF-35 que marca específicamente la MyHC-IIx, por lo que pasan a denominarse fibras IIX. No obstante, la mayor parte de estas fibras reaccionan también, en menor medida, con el anticuerpo SC-71 específico para la MyHC-IIa; es decir, las consideramos fibras híbridas tipo IIXA. Las fibras histoquímicamente descritas como IIA se marcan con el anticuerpo SC-71, aunque como acontece con las IIp reaccionan igualmente en su

mayoría con el anticuerpo específico para la MyHC-IIx, con un menor grado de intensidad, por lo que se refieren como fibras híbridas IIAX. Las escasas fibras tipo IIC se marcan tanto con el anticuerpo Ba-F8 como con el anticuerpo SC-71. En definitiva, en el músculo semitendinoso inmunohistoquímicamente detectamos una población de fibras puras tipo I, una gran mayoría de fibras híbridas descritas como IIAX o IIXA y un número muy pequeño de fibras puras tipos IIA y IIX, y IIC híbridas. Todas las fibras rápidas tipo II se marcan con alguno de los anticuerpos monoclonales específicos para las cadenas pesadas de miosina MyHC-IIa y/o MyHC-IIx. En base a ello deducimos que en el músculo semitendinoso no existen fibras puras tipo IIB, si bien no podemos descartar la presencia de alguna fibra híbrida con miosina MyHC-IIb. Estos resultados coinciden con los hallados por otros autores (Smerdu et al., 2005; Štrbenc et al. 2004, 2006; Acevedo y Rivero, 2006), por lo que, desde el punto de vista inmunohistoquímico, también consideramos idóneo para nuestro estudio al semitendinoso como músculo control.

Llegados a este punto, debemos realizar una breve consideración respecto al comportamiento de dos de los anticuerpos comerciales utilizados: el “Anti-Myosin Skeletal Slow” (Sigma M8421) y el “Anti-Myosin Skeletal Fast” (Sigma 4276), una vez analizados los resultados obtenidos en el músculo semitendinoso, que se repiten, a su vez, en el resto de músculos considerados. En todos ellos, el anticuerpo “Anti-Myosin Skeletal Fast” marca de una forma clara todas las fibras que contienen miosina rápida tipo II, sin distinción entre tipos puros o híbridos, respondiendo de este modo a características que han sido descritas en otras especies (Carter et al., 1990; Havenith et al., 1990; Naumann y Pette, 1994) y corroboradas en los músculos del globo ocular de la especie canina por Telles (2002). Sin embargo, hemos detectado que el anticuerpo “Anti-Myosin Skeletal Slow”, considerado específico para la MyHC-I de diferentes especies (Draeger et al., 1987; Hoh et al., 1988; Harris et al., 1989), incluyendo también la isoforma MyHC-I canina (Telles, 2002), reacciona con menor intensidad ante algunos de los miocitos que contienen MyHC-II. Este hecho no observado por Telles (2002) en los músculos del globo ocular, debe ser tenido en cuenta a la hora de aplicar dicho anticuerpo en la especie canina, al

menos en los músculos que hemos estudiado, al objeto de que estas fibras no sean catalogadas como híbridas tipo IIC.

Podemos resumir que, aunque con la histoquímica llegamos a evidenciar hasta cuatro tipos fibrilares diferentes, es necesaria la aportación que supone el uso de anticuerpos monoclonales específicos para las cadenas pesadas de miosina. La inmunohistoquímica nos permite diferenciar miocitos híbridos con al menos dos tipos de miosina, algo que no podemos comprobar exclusivamente con la técnica mATPasa. Resulta pues importante el uso combinado de ambas técnicas para una clasificación miofibrilar más ajustada a la realidad.

V.2. MÚSCULOS DE LA LENGUA

Según las características tintoriales histo e inmunohistoquímicas de sus fibras, los diferentes músculos de la lengua presentan una composición muy similar, con un claro predominio de fibras rápidas, concretamente de las tipo II híbridas (IIAX o IIXA) y de los tipos puros IIA y IIX, frente a las fibras lentas tipo I. Resultados que coinciden, de manera genérica, con los descritos por diferentes autores al analizar algunos de los músculos linguales en otras especies: gato (Hellstrand, 1980); especie humana (Yaron et al., 1986); cabra (Ibebunjo, 1993); rata (Sutlive et al., 2000) y ratón (Abe et al., 2002). Por otra parte, en los músculos de la lengua no se detectan fibras puras tipo IIB y, de forma aislada, se advierten algunas fibras IIC.

En el músculo **geniogloso** predominan las fibras tipo II (70%) sobre las tipo I. Respecto a las primeras, sólo se trata de fibras híbridas IIAX o IIXA, en proporciones similares, marcadas con mayor o menor grado de tinción frente a los anticuerpos SC-71 y BF-35. Estos resultados coinciden parcialmente con los referidos por Ibebunjo (1993) en la especie caprina y por Sutlive et al. (2000) en su trabajo sobre el músculo geniogloso de la rata. Ibebunjo (1993) también encontró un predominio de fibras rápidas en el músculo geniogloso de la cabra, en una cantidad aproximada al 76% de las fibras contabilizadas, repartidas entre los tipos IIA (27%),

IIB (34%) y IIC (15%). Sutlive et al. (2000) en cambio, aplicando anticuerpos monoclonales específicos frente a las cadenas pesadas de miosina, describen sólo fibras rápidas puras tipos IIA, IIB y IIX, no observando fibras lentas puras tipo I. En la Revisión Bibliográfica sólo tenemos referencia de un estudio en la especie canina del músculo geniogloso (Mu y Sanders, 2000), donde aprecian dos compartimentos musculares, asignándoles a cada uno de ellos proporciones diferentes de tipos miofibrilares. Un compartimento horizontal donde predominan las fibras tipo I, y un compartimento oblicuo en el que existe un mayor porcentaje de fibras rápidas tipo II. Tradicionalmente, en la descripción anatómica del músculo geniogloso canino se han referido tres haces musculares: un haz recto, uno vertical y otro oblicuo (Evans, 1993). Por otra parte, Mu y Sanders (2000) sólo aplican la técnica mATPasa con preincubaciones ácidas (pH 4,2), según la metodología de Guth y Samaha (1969), no existiendo por tanto una diferenciación neta entre los subtipos híbridos de fibras tipo II. Posiblemente las muestras tomadas en nuestro trabajo se correspondan con el compartimento oblicuo referido por Mu y Sanders (2000), aunque no disponemos de criterios suficientes para confirmar o desechar las hipótesis de estos autores. En conjunto, la funcionalidad del músculo geniogloso consiste en la protrusión y depresión de la lengua, retrayendo también su vértice. Este tipo de movimientos requiere la presencia de tipos fibrilares rápidos, por lo que podemos concluir que su composición fibrilar resulta acorde con su funcionalidad.

Por lo que respecta al músculo **hiogloso**, se trata de una entidad muscular que interviene en la retracción y depresión de la lengua, lo que requiere también de movimientos rápidos y de corta duración. Su composición fibrilar es similar a la del músculo geniogloso. Es decir, presenta un claro predominio de fibras tipo II (80% del total de la población analizada). La mayoría son fibras híbridas IIAX o IIXA, aunque también advertimos la presencia, si bien escasa, de fibras puras tipo IIA (no superan el 3% de la población global de fibras tipo II). Este último tipo fibrilar se observa, de forma aislada o en grupos de 2 o 3 fibras, dentro de los fascículos analizados.

El músculo **estilogloso**, implicado fundamentalmente en la retracción y lateralización de la lengua, mantiene el patrón fibrilar de los músculos considerados. Presenta un claro predominio de fibras rápidas (85%), no advirtiéndose tipos fibrilares rápidos puros sino únicamente fibras híbridas que clasificamos como IIXA por su mayor intensidad de marcado frente al anticuerpo BF-35. Asimismo aparecen, en porcentajes inferiores al 5%, fibras tipo IIC aisladas dentro de los fascículos musculares. Ibebunjo (1993), describió también un predominio de fibras rápidas (75%) en el músculo estilogloso de la cabra, con aproximadamente un 8% de fibras tipo IIC, siendo el resto fibras IIA (34%) y IIB (33%). Únicamente en este músculo extrínseco de la lengua del perro, los porcentajes contabilizados de dichas fibras se asemejan más a los de Ibebunjo (1993). Sutlive et al. (1999) constataron, al igual que Ibebunjo (1993) y a lo descrito en nuestro trabajo, un predominio de fibras rápidas en el músculo estilogloso de la rata, si bien los tipos variaban ostensiblemente respecto a los referidos en la cabra y en el perro. Concretamente, describieron fibras tipo I (1%), IIA (67%), IIB (12%) y IIX (20%), siendo este último tipo fibrilar deducido por eliminación, ya que no emplearon anticuerpos específicos para la isoforma MyHC-IIx.

Por último, el músculo **lingual propio** también posee características tintoriales similares a los músculos referidos. Presenta un claro predominio de fibras rápidas sobre lentas, aunque en proporciones diferentes según el segmento muscular analizado. Así, en la región de la raíz de la lengua encontramos fibras híbridas IIAX (60%), siendo el resto fibras lentas tipo I (40%), con aspecto de mosaico en los fascículos musculares y rodeados de gran cantidad de tejido conectivo. Idéntico patrón se advierte en la región del cuerpo de la lengua, aunque aumenta aquí algo la proporción de fibras IIAX (aproximadamente el 65%). En cambio, la región del vértice posee exclusivamente fibras tipo II, con hasta un 70% de fibras tipo IIX puras y un 30% de fibras híbridas tipo IIXA. En esta parte del músculo lingual propio también aparecen fibras tipo IIC, cuya proporción no llega al 3%, localizadas en los fascículos más periféricos. Massimini (1986) realizó un estudio de Tesis de Licenciatura sobre la composición fibrilar del músculo lingual propio de diversos mamíferos, entre ellos la rata, el gato y los primates. Los tipos fibrilares descritos por

dicho autor en las porciones longitudinal dorsal y ventral de este músculo en el gato no difieren excesivamente de los referidos por nosotros en el perro. Concretamente, describe los tipos I, IIA, IIB y IIC, ya que el tipo IIX lo detectan por vez primera Schiaffino et al. (1989), corroborándolo más tarde Gorza (1990). Refiere el autor un mayor porcentaje de fibras tipo I (hasta el 20%) en la raíz lingual, sobre todo en la porción longitudinal ventral. Asimismo, advierte un predominio de fibras tipo IIA en todas las partes analizadas (vértice, cuerpo y raíz de la lengua). En mayor medida en la porción longitudinal dorsal y una proporción muy escasa de fibras tipo I en la región del vértice, donde sólo se observan en la porción longitudinal ventral. En el resto de especies analizadas (Massimini, 1986), aunque varían los porcentajes y los tipos de fibras de las distintas regiones, existe, de manera general, un predominio de los tipos fibrilares rápidos en todo el músculo, especialmente en el vértice y cuerpo de la lengua, disminuyendo la velocidad de contracción fibrilar y observándose el tipo fibrilar lento en la región de la raíz. Por otra parte, Ibejunjo (1993) describe los distintos tipos de miocitos en el músculo lingual propio de la cabra. No toma muestras de distintas regiones ni hace referencia a las diferentes porciones de dicho músculo, sino que procesa el músculo completo. Encuentra un predominio, como en el resto de los músculos linguales por él estudiados, de las fibras tipo II (79%) frente a las fibras tipo I (21%). Es en el predominio general de las fibras rápidas en lo único que coincide con los resultados obtenidos por nosotros para el músculo lingual propio, ya que dentro de las fibras tipo II, este autor observa un alto porcentaje de fibras IIC (próximo al 14%), siendo el resto fibras tipo IIA (20%) y IIB (46%). También Abe et al. (2002), publican un trabajo sobre el músculo lingual propio de ratones. En él refieren un predominio de las fibras tipo IIB en la porción longitudinal dorsal y de las fibras tipo IIA en la porción lingual transversa. El músculo lingual propio (músculo intrínseco) se origina e inserta en el espesor de la propia lengua, siendo sus distintos componentes los responsables de la modificación de la forma de este órgano. Resulta pues difícil establecer comparaciones sobre composiciones fibrilares en distintas especies, ya que las diferencias halladas indican prestaciones funcionales diferentes. Al fin y al cabo, la forma de prehensión de los alimentos, así como la masticación, la deglución e incluso la posibilidad de modular sonidos,

funciones todas ellas en las que interviene la lengua, en mayor o menor medida, varían según la especie que consideremos.

En ninguno de los músculos linguales del perro hemos detectado fibras tipo IIB, fibras que sí describen Ibebunjo (1993) en la cabra, Sutlive et al. (1999, 2000) en la rata o Abe et al. (2002) en el ratón. Hasta hace pocos años, aún no estaba claro la presencia o ausencia de las fibras IIB en la especie canina. Snow et al. (1982) demostraron que el perro poseía un tipo fibrilar con características contráctiles similares a las fibras IIB de la rata, pero con una alta capacidad oxidativa. Este tipo fue catalogado más tarde como tipo IIp (propias del perro) (Latorre, 1990; Latorre et al., 1993b). Actualmente, con la ayuda de la inmunohistoquímica, electroforesis, hibridación *in situ* y análisis de la expresión del ARN, se ha podido comprobar que las fibras tipo IIp son realmente fibras IIX (Štrbenc et al., 2004; Acevedo y Rivero, 2006; Maccatrozzo et al., 2007; Toniolo et al., 2007). En nuestro trabajo tampoco hemos observado un alto porcentaje de fibras tipo IIC, al contrario de lo referido en la cabra por Ibebunjo (1993), advirtiéndose sólo de forma aislada. El trabajo de Ibebunjo (1993), aunque bastante completo en cuanto al número de músculos estudiados (no sólo músculos linguales sino también músculos hioideos, laríngeos y faríngeos), no emplea anticuerpos monoclonales para la determinación fibrilar. Con el uso de la inmunohistoquímica es probable que sus resultados hubieran sido diferentes, y tal vez hubiera referido algún tipo fibrilar híbrido, al igual que nosotros en la musculatura lingual del perro.

Según Acevedo y Rivero (2006), el rasgo metabólico más destacado de la musculatura en la especie canina es la elevada capacidad oxidativa que manifiestan todos sus tipos fibrilares. Generalmente, en el perro no aparecen fibras de contracción rápida con elevada capacidad glucolítica y baja capacidad oxidativa, que tan comunes son en otros mamíferos. Estas propiedades metabólicas, exclusivas del músculo del perro, son las responsables de la resistencia, tan extremadamente elevada, que caracteriza a esta especie atlética (Snow et al., 1982; Latorre, 1990; Latorre et al., 1993a, b, c; Acevedo y Rivero, 2006; Maccatrozzo et al., 2007). Todas las fibras de los músculos linguales analizados mostraron este mismo patrón.

En definitiva, podemos concluir que las características histoquímicas e inmunohistoquímicas de los músculos de la lengua del perro (fibras de contracción rápida resistentes a la fatiga) son las que cabría esperar de acuerdo a las complejas funciones en las que participan.

V.3. MÚSCULOS DEL PALADAR Y FAUCES

En general, los músculos del paladar y fauces también muestran un predominio de fibras rápidas tipo II sobre las tipo I. Tampoco observamos, como sucedía en los músculos de la lengua, fibras tipo IIB. Por otro lado, a nivel histo e inmunohistoquímico, sólo hemos encontrado referencias bibliográficas del tensor del velo palatino, que presenta diferencias muy notables respecto al músculo control y al resto de la musculatura analizada.

El aspecto funcional más importante de este grupo muscular, en conjunto, consiste en los cambios de forma del paladar blando, permitiendo su descenso y elevación. Movimientos que son imprescindibles durante la deglución, en la neumatización de la cavidad timpánica, pues los músculos elevador y tensor del velo palatino delegan algunas fibras de inserción hacia la trompa auditiva lo que permite su fijación, apertura y cierre, y, durante el lenguaje hablado y el canto en la especie humana. En el descenso, el paladar blando se pone en contacto con la lengua a la altura de la vallécula epiglótica, a modo de esfínter, interceptando la comunicación entre las cavidades bucal y faríngea. Al elevarse, como sucede durante la deglución, el paladar blando se dispone a modo de tabique horizontal entre la faringe y la porción caudal de las fosas nasales, impidiendo que el alimento fluya hacia éstas. La referida actividad funcional necesita tipos fibrilares que actúen con rapidez, pues no son movimientos sostenidos en el tiempo.

El músculo **palatino** es una entidad de pequeño tamaño, que discurre longitudinal y en paralelo a su compañero contralateral por el paladar blando. Se

origina en la propia aponeurosis palatina, dirigiéndose hacia el vértice de la úvula (borde caudal libre del paladar blando), donde termina el tejido celular submucoso. Realiza una doble función: acorta el velo del paladar y acerca los dos bordes del arco palatofaríngeo así como la porción oral o bucal de la faringe, esto último en coordinación con el músculo palatofaríngeo (Peñuela, 1989). Su composición fibrilar presenta un ligero predominio de fibras rápidas tipo II (53%) resistentes a la fatiga, que lo capacita para las funciones anteriormente descritas, ya que todas ellas requieren de movimientos rápidos y de contracciones poderosas. Es el músculo que tiene un mayor porcentaje de fibras tipo I de todos los estudiados en este apartado. Por otra parte, el 94% de las fibras rápidas se catalogaron histoquímicamente como IIA, y el resto (6%) como Iip. Tras aplicar los anticuerpos monoclonales, observamos que el 100% de las fibras rápidas se marcaron indistintamente con SC-71 y BF-35, por lo que su descripción final se corresponde con fibras híbridas IIAX o IIXA. Las fibras tipo IIC aparecen de forma aislada. En la bibliografía consultada no hemos encontrado referencia alguna sobre la composición fibrilar de esta entidad muscular.

El músculo **elevador del velo palatino** actúa en el ascenso de la zona más caudal del paladar blando (velo del paladar) durante el segundo tiempo de la deglución y, junto al músculo palatofaríngeo, evita que el bolo alimenticio se dirija hacia la nasofaringe. Histoquímicamente observamos que la mayoría de las fibras analizadas (98%) presentan las características de las clasificadas como Iip, según los criterios establecidos para el músculo control. Es decir, fibras que con la técnica mATPasa poseen actividad alcalino estable (fuerte) a pH 10,4 y 10,5, ácido-estable a pH 4,6 (moderada), y ácido-lábil a pH 4,3. El resto de las fibras (2%) se corresponde con fibras lentas tipo I. También observamos, de forma aislada, alguna fibra híbrida tipo IIC. Mediante la técnica NADH-TR apreciamos que todas ellas reaccionan positivamente (tinción de moderada a intensa); es decir, son fibras resistentes a la fatiga. Tras la aplicación de anticuerpos monoclonales específicos para las distintas cadenas pesadas de miosina, comprobamos que las fibras catalogadas como Iip son en realidad fibras híbridas que reaccionaron con los dos anticuerpos específicos para las isoformas de miosina MyHC-IIa y MyHC-IIx, no haciéndolo con el anticuerpo

específico para la isoforma de miosina lenta MyHC-I. Por esta razón, las denominamos fibras tipos IIX o IIXA, fibras híbridas que coexpresan dos isoformas MyHC diferentes (IIa+IIx). Las fibras que histoquímicamente habíamos clasificado como tipo I, reaccionaron exclusivamente con el anticuerpo específico para la isoforma MyHC-I, en tanto que las escasas fibras denominadas histoquímicamente como IIC se marcaron con el anticuerpo específico para la isoforma MyHC-I y la isoforma MyHC-IIa.

El músculo **tensor del velo palatino** desarrolla unas funciones complementarias a las del músculo elevador del velo palatino, si bien su composición fibrilar es totalmente diferente y mucho más compleja. La acción sobre la porción más craneal del paladar blando es tensar la aponeurosis palatina, entre los huesos terigoideos. Sobre su porción más caudal consiste en dilatar la trompa auditiva, interviniendo en funciones equipresivas y de drenaje del oído medio. La acción conjunta de los músculos tensor y elevador del velo palatino sobre la trompa auditiva, para neumatizar la cavidad timpánica, ya fue referida por Riu et al. (1966). Esta diversidad funcional podría explicar en parte sus peculiaridades fibrilares, en el sentido de que dicho músculo alcanza un grado de especialización mayor, tal y como sucede en otros músculos del perro, entre ellos los de la laringe o los extraoculares (Hoh, 2005; Toniolo et al., 2005). No ocurre lo mismo con el músculo elevador que, con una funcionalidad similar al tensor posee, en cambio, una composición fibrilar parecida, en términos generales, a la del resto de los músculos estudiados en el presente trabajo.

El músculo tensor del velo palatino está compuesto mayoritariamente por fibras IIM (90-95%). Este tipo especial de fibras ha sido descrito exclusivamente en aquellos músculos derivados ontogénicamente del primer arco branquial (Rowlerson et al., 1981, 1983; Mascarello et al., 1982, 1983). Las fibras IIM se caracterizan por tener una alta capacidad oxidativa y una reacción ácido-estable muy fuerte a pH 4,6 y 4,3 (intensidad tintorial superior a las fibras lentas tipo I) y alcalino-estable muy fuerte a pH 10,4 y 10,5. Estas características histoquímicas son suficientes para catalogarlas como fibras IIM, de acuerdo a criterios establecidos previamente por

Rowlerson et al. (1981, 1983), ya que no empleamos el anticuerpo monoclonal específico para la MyHC-II_m. No obstante, hemos constatado que dichas fibras no reaccionan con los anticuerpos específicos para las isoformas MyHC-I, II_a o II_x. Se trata de fibras de contracción rápida (Rowlerson et al., 1981), que se relacionan con los movimientos rápidos y potentes que realizan los músculos masticadores de los carnívoros. Creemos que el hecho de que aparezcan en el músculo tensor del velo palatino está vinculado a su origen embriológico, ya que, junto a los músculos masetero, tensor del tímpano, temporal, vientre rostral del digástrico, milohioideo y terigoideos (lateral y medial), deriva del primer arco branquial. Otros autores han descrito previamente su aparición en este mismo músculo (Rowlerson et al., 1983 en el perro), por lo que nuestros resultados confirman estos hallazgos previos. La presencia de las fibras IIM jugaría un papel importante en la función primordial de este músculo, la tensión del velo del paladar que, al igual que la elevación, exige gran rapidez.

Además de fibras IIM hemos hallado fibras tipo I, con idénticas características inmunohistoquímicas que las descritas en el músculo control. Sin embargo, a nivel histoquímico, las fibras tipo I del músculo tensor del velo palatino poseen la peculiaridad de teñirse a pH ácido con menor intensidad que el mismo tipo de miocito en el músculo semitendinoso, tal y como ya se ha descrito en los músculos masticadores del perro (Álvarez, 1992). Junto a las fibras tipo I, aparecen algunas fibras con las propiedades histoquímicas de las II_p y que, tras la aplicación de los anticuerpos, se marcan exclusivamente con el anticuerpo BF-35, por lo que pasan a denominarse como tipo IIX puras. Las fibras I y IIX se localizan, además, en la periferia muscular. Globalmente las fibras tipo I no suponen más del 5% de la población fibrilar, pero en la referida región periférica hay fascículos con porcentajes próximos al 60%. Es en dichos fascículos donde también apreciamos una mayor frecuencia de fibras tipo IIX que, por lo general, son muy escasas. Esta aparente regionalización del músculo tensor del velo palatino no ha sido referenciada en la bibliografía consultada, pero pensamos que puede estar relacionada con su diversidad funcional.

Por último, advertimos una serie de fibras en un porcentaje muy escaso (< 3%), distribuidas en la periferia, como las fibras tipo I y IIX. Sus características histoquímicas responden conjuntamente al perfil de las fibras tipo I y tipo II, con propiedades similares a las fibras IIM, y algo menos a las IIC, pero con un tamaño significativamente menor que ambas. No hemos podido catalogar estos miocitos puesto que, tras aplicar los anticuerpos monoclonales, se marcan intensamente, y en igual medida, con todos ellos. Sospechamos que podrían corresponderse con las fibras denominadas “tónico-lentas”, un tipo fibrilar frecuente en anfibios (Pierobon-Bormioli et al., 1980; Franzini-Armstrong, 1984) y aves (Ovalle, 1978; Kennedy et al., 1991), pero bastante raro en mamíferos, donde ha sido descrito en el músculo tensor del tímpano del perro (Mascarello et al., 1982, 1983; Rowleron et al., 1983), en músculos extraoculares de la especie humana (Pierobon-Bormioli et al., 1979, 1980; Sartore et al., 1987) y de algunos roedores y carnívoros (Hess y Pilar, 1963; Pierobon-Bormioli et al., 1980; Mascarello y Rowleron, 1992), en los músculos tiroariteonideo y milohioideo de la especie humana (Han et al., 1999 y Mu et al., 2004, respectivamente), e incluso, recientemente, en la musculatura que constituye el esfínter esofágico superior de dicha especie (Mu et al., 2007a, b). Las fibras “tónico-lentas” son un tipo de miocito cuyas propiedades contráctiles tónicas son significativamente diferentes de las fibras de contracción “twitch” (resto de tipos fibrilares descritos, tanto lento como rápidos). Poseen una contracción lenta pero prolongada, que se puede ajustar gradualmente de forma sostenida con escaso gasto energético (Pierobon-Bormioli et al., 1980; Hikida, 1987). No responden con un potencial de acción propagado por la estimulación nerviosa sencilla y requieren de varios segundos para alcanzar el máximo de tensión (Morgan y Proske, 1984). Las referidas propiedades ayudarían a su función como regulador de la apertura y cierre de la trompa auditiva, que no requiere de movimientos rápidos y de corta duración. Otra posible teoría sobre la aparición en el tensor del velo palatino de este tipo fibrilar sería la del origen embrionario común con el músculo tensor del tímpano (al igual que ocurría con las fibras IIM y los músculos masticadores), donde sí se han encontrado fibras “tónico-lentas” en carnívoros, incluyendo al perro (Mascarello et al., 1982, 1983; Rowleron et al., 1983). En este sentido, el origen embriológico del músculo tensor del velo palatino no ofrece discusión alguna en la actualidad

(Rowlerson et al., 1983; Peñuela, 1989). De todas formas, Rowlerson et al. (1983) no encontraron este tipo fibrilar en el músculo tensor del perro ni de otras especies al estudiar la composición de los músculos derivados del primer arco branquial, por lo que también podríamos hipotetizar que se trata de fibras híbridas, muy frecuentes en otros músculos del tronco y apendiculares del perro (Acevedo y Rivero, 2006). Por otro lado, estudios recientes (Mu et al., 2007a, b) han encontrado fibras “tónico-lentas” en la especie humana, si bien en la musculatura faríngea, coexpresadas con las fibras tipo I. Sugieren que estos tipos fibrilares “inusuales” aparecen con frecuencia en los músculos craneales, en comparación con los músculos apendiculares, independientemente de su origen embriológico, debido probablemente a su especialización funcional. Además, refieren la casi inexistencia de tipos fibrilares puros, proponiendo un sistema clasificatorio diferente para estos músculos craneales, basado en los distintos tipos de miosina que coexpresan.

En definitiva, se hace necesario analizar más profundamente el músculo tensor del velo palatino, al objeto de confirmar su aparente regionalización y la presencia de estos tipos fibrilares tan peculiares, que únicamente hemos encontrado en la referida entidad muscular.

V.4. MÚSCULOS DE LA FARINGE

En general, los músculos faríngeos del perro, exceptuando el músculo cricofaríngeo, presentan una población mayoritaria de fibras híbridas tipos IIAX o IIXA. Resultados que concuerdan con los obtenidos para estos músculos, en diversas especies, por otros autores: Ryu (1981) en el perro; Bonington et al. (1987, 1988) en el cobaya y en la especie humana; Ibebunjo (1993) en la cabra; Imamura et al. (1998) en el gato; Hyodo et al. (1998, 1999) en el perro; Mu y Sanders (2001, 2002), Sundman et al. (2004) y Mu et al. (2007a, b) en la especie humana. En nuestro trabajo no hemos detectado fibras tipo IIB, aunque no podemos descartar su existencia en el músculo cricofaríngeo. Los tipos fibrilares puros IIA, IIX o IIC no suelen aparecer en un porcentaje elevado, que varía según el músculo. Por otra parte,

las fibras de los músculos faríngeos tienen una capacidad oxidativa de moderada a alta o muy alta, es decir son resistentes a la fatiga. Seguidamente, consideramos discusivamente cada uno de los músculos faríngeos analizados.

Los resultados derivados del procesado conjunto de los músculos **palatofaríngeo** y **terigofaríngeo** indican una presencia mayoritaria de fibras híbridas IIXA (80%), frente a un 10% de fibras híbridas IIAX y un 10% de fibras tipo I. En porcentajes inferiores al 3% hemos observado, de manera aislada, fibras puras tipo IIA. Para la 5ª edición de la Nomenclatura Anatómica Veterinaria (2005) se trata de músculos incluidos en grupos diferentes. El músculo palatofaríngeo en los músculos del paladar y fauces, y el terigofaríngeo en los músculos de la faringe. Sus funciones, sin embargo, resultan similares: el músculo palatofaríngeo actúa simultáneamente descendiendo el velo del paladar y ascendiendo la faringe, con lo que acorta sus dimensiones, es decir, la estrecha (Peñuela, 1989), mientras el músculo terigofaríngeo es un constrictor rostral de la misma. Además, los dos están inervados por los mismos nervios (vago y glossofaríngeo). No hemos hallado referencia bibliográfica alguna sobre estas dos entidades musculares en los artículos revisados, tanto en el perro como en otras especies. Pensamos que la composición fibrilar que poseen ayuda a clarificar su función durante la fase de la deglución en la que intervienen, mediante contracciones potentes y rápidas, desplazando caudalmente el bolo alimenticio hacia la entrada del esófago.

El músculo **estilofaríngeo caudal** del perro actúa en la dilatación, elevación y desplazamiento rostral (protracción) de la faringe. Todo ello coadyuva al tránsito del alimento durante la deglución, permitiendo una mayor eficacia de acción en los músculos constrictores rostrales y medios. En él también predominan las fibras híbridas IIAX o IIXA (62%) frente a las fibras tipo I que suponen el 38% restante. Su función implica también una acción rápida y potente, pero algo más sostenida en el tiempo que la de los músculos propiamente constrictores. Pensamos que esta es la razón del porcentaje más elevado de fibras tipo I si lo comparamos con el resto de músculos faríngeos, excepción hecha del músculo cricofaríngeo que comentaremos con posterioridad.

El músculo **hiofaríngeo** es el constrictor medio de la faringe. Interviene, junto con los músculos terigofaríngeo y palatofaríngeo, en el desplazamiento caudal del alimento hacia su entrada en el esófago. Está constituido por un 86% de fibras rápidas tipo II, de las cuales un 11% son fibras puras tipo IIA distribuidas uniformemente por la periferia de los cortes histológicos. El resto de los miocitos rápidos son fibras híbridas tipos IIAX o IIXA. Las fibras tipo I suponen un 14% del total de fibras. Un estudio de Ryu (1981) en el perro mediante técnicas histoquímicas coincide en el porcentaje de fibras tipo I, si bien la diferencia de técnicas aplicadas no hace posible establecer comparaciones con el resto de los tipos fibrilares descritos. Ibejunjo (1993) publica un artículo en la especie caprina, coincidiendo sus resultados con los que hemos obtenido en cuanto a los porcentajes de fibras tipos I y IIA. Al contrario que Ibejunjo (1993), no hemos detectado fibras tipo IIB sino fibras híbridas IIXA o IIAX, con porcentajes muy similares a los de este tipo. Dicho autor refiere un 78,77% de fibras IIB frente a un 75% en nuestro trabajo para los tipos híbridos IIXA o IIAX. Ibejunjo (1993) empleó únicamente técnicas histoquímicas, por lo que es posible que no catalogara los tipos fibrilares híbridos que sí se pueden evidenciar mediante anticuerpos monoclonales. Por otra parte, en el perro no está todavía clara la presencia del tipo fibrilar IIB, al menos en los músculos apendiculares y del tronco, y nosotros tampoco lo hemos advertido en los músculos faríngeos analizados, excepto, tal vez, en el músculo cricofaríngeo. Imamura et al. (1998) llevan a cabo un trabajo en el que describen, mediante la inmunohistoquímica de la parvoalbúmina, los tipos fibrilares del músculo hiofaríngeo del gato. Sus resultados difieren significativamente de los nuestros, aunque coinciden en reflejar el predominio de las fibras de contracción rápida sobre las lentas, un 75% de fibras tipos IIA y IIB frente a un 25% de fibras tipo I. Estos autores no aplicaron técnicas histoquímicas para contrastar los resultados obtenidos por medio de la inmunohistoquímica. Pensamos que la parvoalbúmina no es el método idóneo para diferenciar los tipos de miosina del gato, ya que no son específicos para esta especie.

El músculo **tirofaríngeo** es, como el músculo cricofaríngeo, un constrictor caudal de la faringe, aunque su funcionalidad es completamente diferente. Son los

músculos de los que más referencias bibliográficas existen, ya que al constituir, con la porción proximal del esófago, el llamado esfínter esofágico superior (Bonington et al., 1987, 1988; Mu y Sanders, 2001; Mu et al., 2007b) intervienen, en última instancia y de forma determinante, en los mecanismos de la deglución, vómito y eructo, además de proteger las vías respiratorias superiores. En nuestro trabajo hemos observado un 90% de fibras rápidas de las que un 85% se corresponden con los tipos híbridos IIXA o IIX, un 5% de fibras puras IIX y, de forma aislada, alguna fibra pura IIA. El 10% restante corresponde a fibras lentas tipo I. Todas las fibras del músculo manifiestan una capacidad oxidativa que va de moderada a alta o muy alta según el tipo. Estos hallazgos concuerdan con la funcionalidad atribuida a la referida entidad muscular durante la deglución. Su composición fibrilar favorece los movimientos rápidos y continuos que desplazan caudalmente el bolo alimenticio hacia el esófago, como las que realizan los músculos constrictores rostral y medio. Ryu (1981) también observó un predominio de fibras rápidas tipo II sobre las fibras tipo I en el músculo tirofaríngeo del perro, al igual que Hyodo et al. (1998, 1999) en esta misma especie, Ibebunjo (1993) en la cabra, Imamura et al. (1998) en el gato y Mu y Sanders (2001), Sundman et al. (2004) y Mu et al. (2007b) en la especie humana. Las diferencias con nuestros resultados radican en los porcentajes de los tipos fibrilares encontrados. El que más se aproxima es Ibebunjo (1993) que refiere un 10% de fibras tipo I, en tanto que el resto de autores observan un 25%, aproximadamente, de este tipo de miocito, excepto Mu y Sanders (2001) que describen una compartimentalización en el músculo tirofaríngeo de la especie humana. Estos autores encuentran hasta un 50% de fibras tipo I en la región más distal, próxima al cricofaríngeo. También existen diferencias respecto a los distintos subtipos de miocitos rápidos. Los estudios realizados en el perro por Ryu (1981) e Hyodo et al. (1998, 1999) no emplean la inmunohistoquímica para la determinación fibrilar. Por ello el estudio de Ryu (1981), algo antiguo, tan sólo hace referencia a fibras tipo I y fibras tipo II. En cambio los trabajos de Hyodo et al. (1998, 1999) que siguen las pautas de clasificación fibrilar de Brooke y Kaiser (1970), catalogan las fibras como tipos I, IIA, IIB y IIC. Dichos autores obvian estudios posteriores, como el de Snow et al. (1982), donde se cita un tipo especial de fibra II en el perro, diferente del resto de las fibras tipo II, con características contráctiles similares a las

IIB de la rata aunque con una alta capacidad oxidativa. Estas fibras, posteriormente catalogadas como I_{1p} (propias del perro) (Latorre, 1990), son consideradas actualmente como fibras tipo IIX (Štrbenc et al., 2004; Smerdu et al., 2005). Del resto de trabajos no referidos a la especie canina, sólo el de Ibebunjo (1993) en cabras coincide con nosotros en cuanto a los porcentajes de fibras tipos I y II. Ellos observan en la especie caprina fibras tipos IIA (20%) y IIB (70%). Frente a estos resultados, Imamura et al. (1998) en el gato, mediante el empleo de parvoalbúmina, advierten también fibras tipos IIA y IIB, aunque en proporciones inversas (52% y 23%, respectivamente). Por último, los estudios más recientes revisados se realizan en la especie humana (Mu y Sanders, 2001; Sundman et al., 2004 y Mu et al., 2007b). En el primero de ellos, Mu y Sanders (2001) describen el músculo tirofaríngeo humano, también llamado constrictor faríngeo inferior, dividido en compartimentos, con una región o compartimento rostral y otro caudal, así como una capa exterior y otra interior en cada uno de ellos. La clasificación histoquímica que realizan es bastante somera, diferenciando únicamente las fibras tipo I de las tipo II. En la región rostral refieren un predominio de las fibras tipo II (61%), mientras que en la región caudal se invierten las proporciones (30% de fibras tipo II). A su vez, en la capa exterior predominan las fibras tipo II (62%), en tanto que en la capa interior lo hacen las fibras lentas (66%). En definitiva, según estos autores, el músculo tirofaríngeo humano en su región más caudal comparte propiedades histoquímicas con el músculo cricofaríngeo, algo que no hemos observado en las muestras tomadas en el perro. Por otra parte, Sundman et al. (2004) realizan un estudio aplicando inmunohistoquímica para catalogar las fibras del músculo tirofaríngeo humano. Advierten también un predominio de fibras tipo II, la mayoría híbridas con distintas combinaciones (II+IIa 49%; I+IIa 2%; I+II 2%; I+II+IIa 4%; II 3%), aunque refieren hasta un 35% de fibras puras tipo I. No describen tipo alguno de regionalización en el músculo tirofaríngeo y, aunque tomaron muestras exclusivamente de su región más craneal, observan propiedades histoquímicas e inmunohistoquímicas idénticas a las del músculo cricofaríngeo. Respecto a este trabajo, podemos concluir que no se realizó en individuos sanos sino en pacientes sometidos a laringectomía, por lo que sus resultados hay que tomarlos con precaución, pues las propiedades de los miocitos y la composición fibrilar de los músculos varía con el ejercicio y con la presencia de

determinadas patologías (Talmadge et al., 1993). Además, observan una variabilidad interindividual muy grande, tal vez porque el tamaño de la muestra no fuera el más adecuado. Por último, Mu et al. (2007b), en la referencia más reciente que disponemos del tirofaríngeo, realizan un estudio sobre los músculos que componen el esfínter esofágico superior humano. En él incluyen la porción más distal de este músculo junto al cricofaríngeo, como componentes principales, y el esófago superior. Corroboran los hallazgos histoquímicos del trabajo de Mu y Sanders (2001). Es decir, una composición similar entre esta porción del músculo tirofaríngeo y el cricofaríngeo, en base a un estudio con anticuerpos monoclonales específicos de las cadenas pesadas de miosina I, IIa y IIx; completándolo, además, con anticuerpos frente a cadenas pesadas de miosinas “tónico-lenta”, α -cardíaca, embrionaria y neonatal. Describen una regionalización del tirofaríngeo distal en dos capas, en proporción 1:1. Una capa interna lenta con predominio de la isoforma lenta I, coexpresada con las isoformas “tónico-lenta” y α -cardíaca, y una capa externa rápida con predominio de las isoformas rápidas, fundamentalmente la IIa, coexpresadas con las isoformas embrionaria y neonatal. No advierten fibras puras y el grado de hibridismo alcanza de dos a seis isoformas en una fibra, predominando las fibras con tres isoformas. Como ya hemos comentado, nosotros no observamos dicha regionalización en este músculo del perro, describiendo un predominio de fibras rápidas híbridas sobre las fibras lentas. Sería interesante llevar a cabo un estudio procesando la totalidad del músculo tirofaríngeo del perro, al objeto de contrastar los hallazgos de la especie humana.

La musculatura faríngea se completa discutivamente con el músculo **cricofaríngeo**. Incluido en el grupo de los constrictores caudales de la faringe, constituye el principal componente del esfínter esofágico superior. Se encarga, fundamentalmente, de mantener cerrada la porción más rostral del esófago, permitiendo su apertura únicamente en el momento de la deglución, el vómito, la regurgitación o el eructo, evitando en gran medida la aerofagia. Asimismo, interviene de manera decisiva en el mantenimiento de la permeabilidad de las vías aéreas superiores, ya que impide el reflujo supraesofágico. Genera una tensión longitudinal en la faringe, al actuar como dilatador, previniendo el colapso del tubo faríngeo

debido a la presión negativa inspiratoria. Por su importancia funcional, hemos encontrado numerosa bibliografía al respecto de estudios histo e inmunohistoquímicos en diversas especies: Ryu et al. (1981); Hyodo et al. (1998 y 1999) en el perro; Bonington et al. (1987) en el cobaya; Ibebunjo (1993) en la cabra; Imamura et al. (1998) en el gato; Bonington et al. (1988), Mu y Sanders (2001 y 2002), Sundman et al. (2004) y Mu et al. (2007a, b) en la especie humana. Acorde con su función, las características a confirmar en relación a sus fibras musculares son las de estar capacitadas para contracciones sostenidas durante períodos prolongados de tiempo. En nuestro trabajo, observamos una regionalización del músculo cricofaríngeo. Presenta una región central con un predominio de fibras tipo I (80%), siendo el resto fibras híbridas tipos IIAX o IIXA y un porcentaje pequeño de fibras tipo IIC (5%). También advertimos alguna fibra aislada, que no reaccionó ante los anticuerpos empleados, y que podría corresponderse con el tipo IIB. En las regiones periféricas, en cambio, las proporciones de los tipos fibrilares se invierten. Predominan las fibras puras tipo IIX (55%), seguido del tipo IIA (21%) y de las fibras híbridas IIXA o IIAX (16%). El resto (8%) corresponde a fibras tipo I, y no hemos observado fibras IIC. Los únicos trabajos que hemos encontrado sobre este músculo en la especie canina, son los realizados por Ryu (1981) y los de Hyodo et al. (1998 y 1999). El primero de los autores, Ryu (1981), refiere un predominio de fibras tipo I con alta capacidad oxidativa (57%), frente a las fibras rápidas tipo II (43%), si bien no observa regionalización alguna. Hyodo et al. (1998 y 1999) también refieren un predominio de las fibras tipo I (69,5%), tras aplicar la técnica histoquímica de la mATPasa, detectando, además, fibras tipos IIA (10,9%), IIB (16,0%) y IIC (3,6%). La presencia de estas últimas fibras en porcentajes superiores a los de otros músculos, como el tirofaríngeo o los músculos apendiculares, lo atribuyen a una alta incidencia de diferenciación fibrilar o a regeneración muscular. Comentan una posible relación de estos hallazgos con el mantenimiento de la función reguladora precisa de este músculo y no describen regionalización alguna. En otros carnívoros como el gato, Imamura et al. (1998) llevan a cabo un estudio mediante el empleo de la parvoalbúmina. Observan también un predominio de fibras tipo I (72,5%), siendo el resto fibras tipos IIA (25,7%) y IIB (1,7%). Sin embargo, al revisar estudios realizados en otros mamíferos como el cobaya (Bonington et al., 1987) o la

cabra (Ibebunjo, 1993), advertimos que no coinciden los tipos fibrilares descritos por estos autores con los definidos por nosotros en el perro. Concretamente Bonington et al. (1987), tras realizar técnicas histoquímicas (mATPasa y NADH-TR), refieren un 85% de fibras tipos IIA y IIB y un 10% de fibras tipo I, todas con una alta capacidad oxidativa, que respondería a las necesidades funcionales de esfínter superior esofágico. Estos mismos autores, un año después (Bonington et al., 1988), abordan el mismo estudio pero en el músculo cricofaríngeo humano, y en él sí que encuentran un claro predominio de fibras tipo I (86%), frente a un 10% de fibras tipo IIB, con alta capacidad oxidativa. No dan explicación alguna sobre estos resultados, aparentemente contradictorios; pensamos que, tal vez, sea por tratarse de especies distintas con alimentación y hábitos alimentarios muy diferentes. Sí que expresan el papel que la población de fibras rápidas podría tener en la especie humana durante el cierre del esfínter con incrementos de presión de corta duración, tales como los que acontecen durante la inspiración, momento en que el músculo cricofaríngeo se contrae más que el resto de los músculos de la región. Así como durante su rápida contracción tras la deglución, cuando la presión intraluminal alcanza aproximadamente el doble que en el nivel de reposo, en un segundo. Ibebunjo (1993) en la cabra observa un predominio de fibras tipo II (14% IIA y 58% IIB) frente a las fibras tipo I (27%), si bien es cierto que apuntan un aumento de la población de fibras tipo I en este músculo respecto al resto de los músculos faríngeos y una disminución paralela de fibras tipo IIB. Ello haría que dicho músculo generara una mayor fuerza de contracción y una mayor resistencia a la fatiga, determinante en la propulsión de la ingesta hacia el esófago y en el cierre del esfínter faringoesofágico. De cualquier manera, no se puede establecer una comparación con nuestro estudio, ya que los mecanismos de la deglución, vómito o regurgitación son completamente diferentes en los rumiantes que en los carnívoros.

Al margen del estudio ya referido de Bonington et al. (1988), es en la especie humana donde disponemos de más referencias bibliográficas. Además, es también en esta especie donde existe alguna referencia a la regionalización del músculo cricofaríngeo (Mu y Sanders, 2001, 2002; Mu et al., 2007a, b), hecho éste advertido por nosotros en el perro. Mu y Sanders (2001, 2002) citan, concretamente, una capa

externa rápida (59% de fibras tipo I y 41% de tipo II) y una capa interna lenta (84% de fibras tipo I y 16% de fibras tipo II). Estos resultados podrían coincidir parcialmente con los nuestros, pero sería necesario un estudio en el que procesáramos el músculo completo para corroborarlos. Asimismo, dichos autores describen dos compartimentos: un compartimento oblicuo, próximo al músculo tirofaríngeo, con un 69% de fibras tipo I y un 31% de fibras tipo II, en el que las dos capas referidas con anterioridad son del mismo grosor y, por otra parte, un compartimento horizontal, más caudal y cercano al esófago, con un 76% de fibras tipo I y un 24% de fibras tipo II, donde la capa interna lenta tiene mayor grosor que la capa externa rápida. Este último compartimento estaría especializado en la contracción esfintérea tónica. Su contracción estabilizaría el cartílago cricoideo y estrecharía la luz de la unión faringoesofágica. El predominio de fibras lentas ayudaría a la actividad sostenida del esfínter. El compartimento oblicuo, por el contrario, estaría más especializado en movimientos fásicos de corta duración, dado su mayor porcentaje de fibras tipo II, lo que propulsaría el bolo alimenticio y ayudaría a la apertura del esfínter durante la deglución.

Respecto a los resultados obtenidos en la especie humana, existen discrepancias entre los diferentes autores. Concretamente Sundman et al. (2004), quienes realizan un estudio histo e inmunohistoquímico con anticuerpos monoclonales específicos frente a la miosina lenta, la miosina tipo II, la tipo IIa y la neonatal, no observan diferencias regionales en el músculo cricofaríngeo. Aprecian, además, unos porcentajes fibrilares semejantes entre este músculo y el músculo tirofaríngeo (constrictor faríngeo inferior en el hombre), con la aparición de cantidades elevadas de fibras híbridas y una mayor proporción de fibras rápidas que de lentas (36% fibras tipo I, 43% fibras tipo II+IIa, 3% fibras tipo II, 3% fibras tipo I+IIa y 4% fibras tipo I+II+IIa). Como críticas a este trabajo podemos referir el que encuentran mucha variabilidad interindividual, lo que hace que no podamos valorar en su justa medida los porcentajes fibrilares, y el que las muestras se tomaron de individuos enfermos, lo que puede conducir a errores a la hora de la clasificación miofibrilar.

Los trabajos más recientes que hemos revisado son los realizados por Mu et al. (2007a, b) sobre lo que denominan, en la especie humana, la musculatura del esfínter esofágico superior (la porción distal del músculo tirofaríngeo, el músculo cricofaríngeo y el esófago superior), así como sobre el músculo cricofaríngeo aislado. Aplican técnicas inmunohistoquímicas y de inmunomarcado electroforético, empleando anticuerpos monoclonales frente a las isoformas de miosina usuales (I, IIa y IIx) y anticuerpos frente a isoformas de miosina inusuales (“tónico-lenta”, α -cardíaca, embrionaria y neonatal). Corroboran la existencia de dos capas en el músculo cricofaríngeo, la interna lenta que supone aproximadamente las dos terceras partes del grosor del músculo y la externa rápida, si bien ya no diferencian los compartimentos oblicuo y horizontal. Mu et al. (2007a, b) refieren un predominio de fibras lentas tipo I en las dos capas (64% en general, con un 70% en la interna y un 57% en la externa), así como la aparición de formas inusuales de miosina coexpresadas con los tipos principales (“tónico-lenta” y α -cardíaca con las fibras tipo I y embrionaria y neonatal con las fibras rápidas tipo II). No advierten tipos fibrilares puros, y si aparece alguno es de forma aislada, en tanto que describen hasta diez tipos fibrilares híbridos, según la combinación de isoformas de miosina que se expresan en la fibra (hasta seis en una sola fibra). Estos autores proponen un nuevo tipo de clasificación para estos músculos y, en general, para los músculos craneales, basado en la aparición de los tipos híbridos, ya que tienen una alta complejidad y unas características muy diferentes a las de los músculos apendiculares y del tronco. Los dos últimos trabajos resultan muy interesantes por su actualidad y por utilizar anticuerpos monoclonales para la determinación fibrilar. No obstante, sería conveniente contemplar un anticuerpo específico de la MyHC-IIx. Los autores emplean un anticuerpo anti-I, un anticuerpo anti-II y un anticuerpo anti-IIa, con lo que la aparición de fibras tipo IIx la deducen por la ausencia de tinción con el anticuerpo anti-IIa y el marcado con el anti-II, lo que puede conducir a errores de clasificación ya que podrían ser, por ejemplo, fibras tipo IIB. En estos estudios no quedan claras las propiedades contráctiles de las fibras que expresan miosinas inusuales, aunque parece que tanto la “tónico-lenta” como la α -cardíaca, que aparecen junto a las fibras tipo I, y en mayor proporción en la capa interna lenta, se contraerían incluso más lentamente que las fibras tipo I puras. Intervendrían,

fundamentalmente, en el mantenimiento del tono sostenido de reposo del esfínter esofágico superior, mientras que las miosinas embrionaria y neonatal, que se coexpresan básicamente con la miosina IIa y que parecen poseer unas velocidades de acortamiento menor que las miosinas rápidas, facilitarían las contracciones rápidas durante la deglución.

En resumen, por lo que respecta al músculo cricofaríngeo, nuestros resultados parecen estar en consonancia con la mayor parte de la bibliografía consultada en cuanto al predominio de fibras lentas, una alta capacidad oxidativa en general de todos los tipos fibrilares y una disposición regionalizada. No obstante, según los recientes resultados de otros autores, será necesario en un futuro un análisis más profundo de dicho músculo. Ello nos permitirá corroborar nuestros hallazgos y contrastarlos con los descritos en otras especies.

Por último, analizando con perspectiva los resultados de los músculos estudiados en este trabajo, podemos señalar que las técnicas inmunohistoquímicas *per se* son adecuadas para evaluar y clasificar los tipos principales de miocitos que integran el músculo esquelético del perro. Sin embargo, requieren el aislamiento de proteínas puras para la producción de anticuerpos, lo que limita su aplicación rutinaria, máxime cuando sólo se pueden adquirir a través de laboratorios y casas comerciales algunos anticuerpos monoclonales (Gollnick et al., 1983). Asimismo, hemos podido comprobar que la reacción histoquímica frente a la mATPasa, aunque semicualitativa, parece ser extraordinariamente sensible para determinar el contenido de las cadenas pesadas de miosina en la fibra muscular (Staron y Pette, 1986). Todo ello hace que en el trabajo rutinario de laboratorio se abogue por el uso combinado de ambas técnicas, junto al empleo de análisis que midan la actividad metabólica de los miocitos, para llevar a cabo la clasificación miofibrilar. No obstante, debemos considerar como una vía de futuro, además de ampliar el número de anticuerpos a utilizar, la combinación de las técnicas empleadas en este trabajo, con las de técnicas de electroforesis e hibridación *in situ*, e incluso con el análisis de expresión del ARN, que parece ser actualmente una técnica más específica para la determinación fibrilar (Toniolo et al., 2007).

VI. RESUMEN

VI. RESUMEN

Un análisis de los tipos de fibras y de su distribución fue realizado en muestras de músculos de la lengua (mm. geniogloso, estilogloso, hiogloso y lingual propio), del paladar y fauces (mm. palatofaríngeo, palatino, elevador y tensor del velo palatino) y de la faringe (mm. terigofaríngeo, estilofaríngeo caudal, hiofaríngeo, tirofaríngeo y cricofaríngeo) en la especie canina. Asimismo, se procesaron muestras del músculo semitendinoso, que fue utilizado como músculo control. La tipificación fibrilar se basó en técnicas histoquímicas (mATPasa y NADH-TR) e inmunohistoquímicas (aplicación de anticuerpos monoclonales específicos frente a las cadenas pesadas de miosina tipos I, IIa y IIx). En todos los músculos estudiados se evidenciaron fibras puras (tipos I, IIa y IIx) e híbridas (tipos IIAX, IIXA y IIC). Por otra parte, en el músculo tensor del velo palatino también fueron identificadas fibras tipo IIM.

En la lengua, los resultados obtenidos reflejaron una composición muy similar en todos sus músculos, con un claro predominio de las fibras rápidas,

fundamentalmente los tipos híbridos IIAX o IIXA, seguido de los tipos puros IIA y IIX. De forma aislada, se identificaron algunas fibras tipo IIC.

Los músculos del paladar y fauces del perro, excepto el músculo tensor del velo palatino, también exhibieron un predominio de tipos fibrilares rápidos, principalmente híbridos, que en el músculo elevador del velo palatino llegaron a suponer el 98% de la población total. El músculo tensor del velo palatino se caracterizó por tener una composición fibrilar diferente, con presencia de fibras tipo IIM muy abundantes en su zona central, en contraposición con su zona periférica constituida principalmente por fibras tipo I.

Los músculos faríngeos, excepto el músculo cricofaríngeo, estaban compuestos mayoritariamente por fibras rápidas tipo II, con porcentajes cercanos al 90%, predominando los tipos híbridos IIAX o IIXA. También se observaron, en menor proporción, los tipos puros IIA, IIX y el tipo híbrido IIC. El músculo cricofaríngeo presentó una región periférica “rápida” con abundantes fibras puras tipos IIX, IIA y, en menor proporción, tipos híbridos IIAX y IIXA. Por otra parte, se describió también una región central “lenta” donde predominaban las fibras tipo I, con una pequeña proporción de fibras híbridas IIAX, IIXA y IIC.

VII. SUMMARY

VII. SUMMARY

An analysis of fiber types and its distribution in canine muscles of the tongue (genioglossus, hyoglossus, styloglossus and lingualis propius muscles), soft palate (palatinus, levator veli palatini, tensor veli palatini and palatopharyngeus muscles), and pharynx (pterygopharyngeus, stylopharyngeus caudalis, hyopharyngeus, thyropharyngeus and cricopharyngeus muscles) was carried out. Additional samples were obtained from the semitendinosus muscle to be used as a control. Muscle fiber types were defined by histochemical (mATPase and NADH-TR), and immunohistochemical (monoclonal antibodies against myosin heavy chain isoforms I, IIa and IIx) techniques. In all analyzed muscles pure I, IIA and IIX fibers and hybrid IIAX, IIXA and IIC fibers were observed. Furthermore, type IIM fibers were identified in tensor veli palatini muscle.

Muscle fiber composition for all the tongue muscles was quite similar. Fast-twitch fibers, mainly the hybrid types IIAX or IIXA, predominated, followed by types IIA and IIX fibers. Also, isolated type IIC fibers were identified.

Muscles of the soft palate, except the tensor veli palatini muscle, showed a majority of fast-twitch hybrid fibers. In levator veli palatini muscle, these fibers represented the 98% of the total population. Tensor veli palatini muscle had a different fibrillar composition, since type IIM fibers occupied its central area, whereas type I fibers were found in the periphery.

Except in cricopharyngeus muscle, the canine pharyngeal muscles were mainly composed of fast-twitch type II fibers, with percentages close to 90%. In lower proportion, there were pure IIA, IIX fibers and hybrid IIC fibers. The cricopharyngeus muscle presented a “fast” peripheral region, that included pure IIX, IIA fibers and, in smaller proportion, hybrid IIAX and IIXA fibers. On the other hand, a “slow” central region, with a clear predominance of type I fibers, together with a small quantity of hybrid IIAX, IIXA and IIC fibers was described.

VIII. CONCLUSIONES

VIII. CONCLUSIONES

PRIMERA. Basándonos en los anticuerpos utilizados, sugerimos que si se aplican únicamente técnicas histoquímicas para la detección de la actividad mATPasa en los músculos del perro, las fibras catalogadas como I_p deberán denominarse fibras tipo I_X.

SEGUNDA. En todos los músculos analizados, la mayoría de las fibras clasificadas histoquímicamente como I_p y I_A en realidad se corresponden con fibras híbridas, que coexpresan cadenas pesadas de miosina I_X y I_A, siendo por tanto muy escasas las fibras puras tipo II.

TERCERA. Los resultados obtenidos tras la aplicación de anticuerpos monoclonales frente a cadenas pesadas de miosina tipos I, I_A y I_X nos permiten, por exclusión, desestimar la presencia de fibras I_B en los músculos estudiados; si bien, son necesarios análisis más complejos para poder confirmar este hecho.

CUARTA. Los músculos extrínsecos e intrínsecos de la lengua del perro están compuestos mayoritariamente por fibras rápidas tipo II, con un claro predominio de los tipos híbridos IIXA y IIX. En concreto, a nivel del vértice de la lengua no hemos detectado en el músculo lingual propio fibras tipo I.

QUINTA. Excepto el músculo tensor del velo palatino, los músculos del paladar y fauces de la especie canina quedan integrados, principalmente, por fibras híbridas tipo II de contracción rápida, fibras que en el músculo elevador del velo palatino suponen, aproximadamente, el 98% de la población total.

SEXTA. El músculo tensor del velo palatino del perro presenta una constitución fibrilar especial, diferente a la del resto de músculos del paladar y fauces. En él, destaca una zona central donde predominan las fibras de contracción rápida tipo IIM y una zona periférica integrada, fundamentalmente, por fibras lentas tipo I y rápidas tipo IIX.

SÉPTIMA. La musculatura faríngea del perro, excepto el músculo cricofaríngeo, se caracteriza por tener un claro predominio de fibras híbridas de contracción rápida, en tanto que las fibras puras tipos I, IIA y IIX se advierten en menor proporción.

OCTAVA. El músculo cricofaríngeo del perro presenta una región periférica “rápida” con elevados porcentajes de fibras puras tipos IIX y IIA, menor proporción de los tipos híbridos IIXA y IIX, y escasas fibras de contracción lenta tipo I. Por otra parte, se describe una región central “lenta” donde se observan abundantes fibras tipo I, que se entremezclan con una menor proporción de fibras híbridas rápidas IIXA y IIX, y de fibras tipo IIC. Una regionalización similar ha sido observada en el músculo cricofaríngeo de la especie humana.

IX. BIBLIOGRAFÍA

IX. BIBLIOGRAFÍA

ABE, S., MAEJIMA, M., WATANABE, H., SHIBAHARA, T., AGEMATSU, H., DOI, T., SAKIYAMA, K., USAMI, A., GOJYO, K., HASHIMOTO, M., YOSHINARI, M. y IDE, Y. (2002). *Muscle-fiber characteristics in adult mouse-tongue muscles*. *Anat. Sci. Internat.*, 77: 145-148.

ACEVEDO, L.M. y L. RIVERO, J.L.L. (2006). *New insights into skeletal muscle fibre types in the dog with particular focus towards hybrid myosin phenotypes*. *Cell Tiss. Res.*, 323: 283-303.

AIGNER, S., GOHLSCH, B., HÄMÄLÄINEN, N., STARON, R.S., UBER, A., WEHRLE, U. y PETTE, D. (1993). *Fast myosin heavy chain diversity in skeletal muscles of the rabbit: heavy chain IId, not IIb predominates*. *Eur. J. Biochem.*, 211: 367.

- ALLEN, E.R. (1973). *“Immunochemical and Ultrastructural Studies of Myogenesis. Capítulo 4”*. En: *“The striated muscle”*. Pearson, C.M. y Mostofi, F.K. Ed. Williams & Wilkins Company. Baltimore.
- ÁLVAREZ, A.I. (1992). *Estudio morfométrico, biomecánico e histoquímico de los músculos masticadores en mamíferos domésticos de distinta conducta ingestiva*. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo.
- AMANN, J.F. y FRAGA, C. (1992). *Myosin heavy chain isoforms in dog and other arctoid carnivores*. FASEB, 6: A1832.
- AMANN, J.F., WHARTON, R.E., MADSEN, R.W. y LAUGHLIN, M.H. (1993). *Comparison of muscle cell fiber types and oxidative capacity in gracilis, rectus femoris, and triceps brachii muscles in the ferret (Mustela putorius furo) and the domestic dog (Canis familiaris)*. Anat. Rec., 236: 611-618.
- ANDERSEN, P. y HENRIKSSON, J. (1977) *Training induced changes in the skeletal subgroups of human type II skeletal muscle fibers*. Acta Physiol. Scand., 99: 123-125.
- ANNOH, H., INOKUCHI, T., OHTA, K., WAKIMOTO, M. y UEDA, T. (1995). *Immunohistochemical investigations of Parvalbumin localization in the skeletal muscle fibers of rats*. Okajimas Folia Anat. Jpn., 72 (4): 221-226.
- ARGÜELLO, A., LÓPEZ-FERNÁNDEZ, J.L. y L. RIVERO, J.L.L. (2001). *Limb myosin heavy chain isoproteins and muscle fiber types in the adult goat (Capra hircus)*. Anat. Rec., 264: 284-293.
- ARMSTRONG, R.B., SAUBERT, C.W., SEEHERMAN, H.J. y TAYLOR, C.R. (1982). *Distribution of fiber types in locomotory muscles of dogs*. Am. J. Anat., 163: 87-98.

- ASHMORE, C.R. y DOERR, L. (1971). *Comparative aspects of muscle fiber types in different species*. Exp. Neurol., 31: 408-418.
- ASKANAS, V. y ENGEL, W.K. (1975). *Distinct subtypes of type I fibers of human skeletal muscle*. Neurol., 25: 58-67.
- BÄR, A. y PETTE, D. (1988). *Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle*. F.E.B.S. Lett., 235: 153-155.
- BÁRÁNY, M. (1967). *ATPase activity of miosin correlated with speed of muscle shortening*. J. Gen. Physiol., 50: 197-216.
- BERGRIN, M., BICER, S., LUCAS, C.A. y REISER, P.J. (2006). *Three-dimensional compartmentalization of myosin heavy chain and myosin light chain isoform in dog thyroarytenoid muscle*. Am. J. Physiol. Cell Physiol., 290: C1446-C1458.
- BILLETER, R., HEIZMANN, C.W., HOWALD, H. y JENNY, E. (1981). *Analysis of myosin light and heavy chain types in single human skeletal muscle fibres*. Eur. J. Biochem., 116: 389-395.
- BIRAL, D., BETTO, R., DANIELI-BETTO, D. y SALVIATI, G. (1988). *Myosin heavy chain composition of single fibers from normal human muscle*. Biochem. J., 250: 307-308.
- BONINGTON, A., WHITMORE, I. y MAHON, M. (1987). *A histological and histochemical study of the cricopharyngeus muscle in the guinea-pig*. J. Anat., 153: 151-161.
- BONINGTON, A., MAHON, M. y WHITMORE, I. (1988). *A histological and histochemical study of the cricopharyngeus muscle in man*. J. Anat., 156: 27-37.

- BOSLEY, M. y ROWLERSON, A. (1980). *A new myosin associated with the fast fibre type in the cat jaw-closer muscles?*. J. Physiol. (London), 306: 18.
- BOTTINELLI, R., SCHIAFFINO, S. y REGGIANI, C. (1991). *Force-velocity relations and myosin heavy chain isoform compositions of skinned fibres from rat skeletal muscle*. J. Physiol., 437: 655–672.
- BOTTINELLI, R., BETTO, R., SCHIAFFINO, S. y REGGIANI, C. (1994). *Maximum shortening velocity and coexistence of myosin heavy chain isoforms in single skinned fast fibres of rat skeletal muscle*. J. Muscle Res. Cell Motil., 15: 413-419.
- BRAUND, K.G. (1989). *Skeletal muscle biopsy*. Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small animal), 4: 108-115.
- BRAUND, K.G. y LINCOLN, C.E. (1981). *Histochemical differentiation of fiber types in neonatal canine skeletal muscle*. Am. J. Vet. Res., 42: 407-415.
- BRAUND, K.G., HOFF, E.J. y RICHARDSON, K.E. (1978). *Histochemical identification of fiber types in canine skeletal muscle*. Am. J. Vet. Res., 39: 561-565.
- BRAUND, K.G., McGUIRE, J.A. y LINCOLN, C.E. (1982). *Observations on normal skeletal muscle of mature dogs: a cytochemical, histochemical and morphometric study*. Vet. Pathol., 19: 577-595.
- BROOKE, M.H. y KAISER, K.K. (1970). *Muscle fibre types: How many and what kind?*. Arch. Neurol., 23: 369-379.

- BROOKE, M.H., WILLIAMSON, E. y KAISER, K.K. (1971). *The behavior of four fiber types in developing and reinnervated muscle*. Arch. Neurol., 25: 360-366.
- BRUMBACK, R.A. y LEECH, R.W. (1984). “*Color Atlas of Muscle Histochemistry*”. Ed. PSG Publishing Company, Inc. Massachusetts.
- BUÑO, W. y GERMINO, N.I. (1958). *Distribution of succinic dehydrogenase in the organs of the adult albino rats*. Acta Anat. (Basel), 33: 161.
- BURKE, R.E., LEVINE, D.N., ZAJAC, F.E., TSAIRIS, P. y ENGEL, W.K. (1971). *Mammalian motor units: Physiological-histochemical correlation in three types in cat*. Science, 174: 709-712.
- BURKE, R.E., LEVINE, D.N., TSAIRIS, P. y ZAJAC, F.E. (1973). *Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastronemius*. J. Physiol., 234: 723-748.
- BURKE, R.E., LEVINE, D.N., SALCMAN, M. y TSAIRIS, P. (1974). *Motor units in cat soleus muscle: Physiological, histochemical and morphological characteristics*. J. Physiol., 238: 505-514.
- CARDINET, G.H., LEONG, C.L. y MEANS, P.S. (1982). *Myofiber differentiation in normal and hypotrophied canine pectineal muscles*. Muscle & Nerve, 5: 665-673.
- CARTER, R.L., JAMESON, C.F., PHILP, E.R. y PINKERTON, C.R. (1990). *Comparative phenotypes in rhabdomyosarcomas and developing skeletal muscle*. Histopathol., 17: 301-309.
- CASTLE, M.E. y REYMAN, T.A. (1984). *The effect of tenotomy and tendon transfer on muscle fiber types in the dog*. Clin. Orthop., 186: 302-310.

- CELIO, M. R. y HEIZMANN, C. W. (1982). *Calcium-binding protein parvalbumin is associated with fast contracting muscle fibres*. *Nature*, 297: 504-506.
- CHANAUD, C.M., PRATT, C.A. y LOEB, G.E. (1991). *Functionally complex muscles of the cat hindlimb. V. The roles of histochemical fiber-type regionalization and mechanical heterogeneity in differential muscle activation*. *Exp. Brain Res.*, 85: 300-313.
- CHANG, K.C. y FERNANDEZ, K. (1997). *Developmental expresión and 5' End cDNA cloning of the porcine 2x and 2b myosin heavy chain genes*. *DNA and Cell Biol.*, 16: 1429-1437.
- CHANG, K.C., DA COSTA, N., BLACKLEY, R., SOUTHWOOD, O., EVANS, G., PLASTOW, G., WOOD, J.D. y RICHARDSON, R.I. (2003). *Relationships of myosin heavy chain fibre types to meat quality traits in traditional and modern pigs*. *Meat Sci.*, 64: 93-103.
- CHILDERS, M.K., STALEY, J.T., KORNEGAY, J.N. y McDONALD, K.S. (2005). *Dystrophin-deficient dogs incur comparable stretch-induced force deficit*. *Muscle & Nerve*, 31: 768-771.
- COBOS, A. R., SEGADE, L. A. G. y FUENTES, I. (2001). *Muscle fibre types in the suprahyoid muscles of the rat*. *J. Anat.*, 198: 283-294.
- COOPER, B.J., WINAND, N.J., STEDMAN, H., VALENTINE, B.A., HOFFMAN, E.P., KUNKEL, L.M., SCOTT, M.O., FISCHBECK, K.H., KORNEGAY, J.N. y AVERY, R.J. (1988). *The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs*. *Nature*, 334: 154-156.

- DANIELI-BETTO, D., ZERBATO, E. y BETTO, R. (1986). *Type 1, 2A, and 2B myosin heavy chain electrophoretic analysis of rat muscle fibers*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 138: 981-987.
- DEKLEVA, A. y SIRCA, A. (1978). *Histochemical type I fibres in the soleus muscle of the rat*. *J. Anat.*, 127: 595-601.
- DELLMANN, H.D. (1994). "*Histología Veterinaria. 2ª Edición*". Ed. Acribia. Zaragoza.
- DELLMANN, H.D. y BROWN, E.M. (1980). "*Histología Veterinaria*". Ed. Acribia. Zaragoza.
- DIZ, A. (1987). *Diferenciación histoquímica y estudio morfológico sobre algunos músculos de perros en razas de diferentes aptitudes dinámicas*. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- DRAEGER, A., WEEDS, A.G. y FITZSIMONS, R.B. (1987). *Primary, secondary and tertiary myotubes in developing skeletal muscle: a new approach to the analysis of human myogenesis*. *J. Neurol. Sci.*, 81: 19-43.
- DUBOWITZ, V. (1985). "*Muscle Biopsy: A practical approach. 2ª Edición*". Ed. Baillière Tindall. London.
- DUBOWITZ, V. y BROOKE, M.H. (1973). "*Muscle Biopsy: A Modern Approach. 1ª Edición*". Ed. W.B. Saunders Company. London.
- DUBOWITZ, V. y PEARSE, A.G. (1960a). *A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle*. *Histochemie*, 2: 105-117.

- DUBOWITZ, V. y PEARSE, A.G. (1960b). *Reciprocal relationship of phosphorylase and oxidative enzymes in skeletal muscle*. Nature, 185: 701-702.
- EDJTEHADI, G.D. y LEWIS, D.M. (1979). *Histochemical reactions of fibres in a fast twitch muscle of the cat*. J. Physiol., 287: 439-453.
- ENGEL, W.K. (1962). *The essentiality of histo- and cytochemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular disease*. Neurol., 12: 778-790.
- ENGLISH, A. W. M. y WEEKS, O. I. (1987). *An anatomical and functional analysis of cat biceps femoris and semitendinosus muscles*. J. Morphol., 191: 161-175.
- EVANS, H.D. (1993). "Miller's Anatomy of the Dog. 3ª Edición". Ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia.
- FRANDSON, R.D. (1988). "Anatomía y Fisiología de los Animales Domésticos. 4ª Edición". Ed. Interamericana-McGraw-Hill. México.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1984). *Freeze fracture of frog slow tonic fibers. Structure of surface and internal membranes*. Tissue Cell, 16: 647-664.
- FÛCHTBAUER, E.M., ROWLERSON, A.M., GÖTZ, K., FRIEDRICH, G., MABUCHI, K., GERGELY, J. y JOCKUSH, H. (1991). *Direct correlation of Parvalbumin levels with myosin isoforms and succinate dehydrogenase activity on frozen sections of rodent muscle*. J. Histochem. Cytochem., 39: 355-361.
- 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. y PADYKULA, H.A. (1966). *Cytochemical studies on fibre types in skeletal muscle*. J. Cell Biol., 28: 333-354.
- GIL, F. (1986). *Diferenciación postnatal de los tipos de miofibrillas de algunos músculos del perro*. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- GIL, F., VÁZQUEZ, J.M. y MORENO, F. (1987a). *Algunas consideraciones sobre los aspectos histoquímicos y morfométricos de las fibras "b de Wohlfart" en el músculo del perro*. Anat. Vet. (Murcia), 2: 51-60.
- GIL, F., VÁZQUEZ, J.M. y MORENO, F. (1987b). *Contribución al estudio histoquímico y morfométrico de las fibras tipo IIb en el músculo esquelético del perro*. Anat. Vet. (Murcia), 2: 61-66.
- GIL, F. LÓPEZ-ALBORS, O., VÁZQUEZ, J.M., LATORRE, R., RAMÍREZ-ZARZOSA, G. y MORENO, F. (2001a). *The histochemical profiles of fibre types in porcine skeletal muscle*. Histol. Histopathol., 16: 439-442.
- GIL, F., LÓPEZ-ALBORS, O., RAMÍREZ-ZARZOSA, G., LATORRE-REVIRIEGO, R., MARTÍNEZ-GOMARIZ, F. y VÁZQUEZ, J.M. (2001b). *Estudio histoquímico del músculo cuádriceps del muslo (vasto medial) en cerdos Landrace e Ibérico*. Rev. Anaporc, 1: 2-8.
- GOLLNICK, P.D. y MATOBA, H. (1984). *Identification of fiber types in rat skeletal muscle based on the sensitivity of myofibrillar actomyosin ATPase to cooper*. Histochem., 81: 379-383.
- GOLLNICK, P.D., PARSONS, D. y OAKLEY, C.R. (1983). *Differentiation of fiber types in skeletal muscle from the sequential inactivation of myofibrillar actomyosin ATPase during acid preincubation*. Histochem., 77: 543-555.

- 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. Histochem. Cytochem., 38: 257-266.
- GRAZIOTTI, G. H., DELHON, G., RÍOS, C.M. y L. RIVERO, J. L.L. (2001a). *Fiber muscle types in adult female pigs as determined by combining histochemical and immunohistochemical methods*. Rev. chil. anat., 19(2): 167-173.
- GRAZIOTI, G.H., RÍOS, C.M. y RIVERO, J.L.L. (2001b). *Evidence for three fast myosin heavy chain isoforms in type II skeletal muscle fibers in adult llama (Lama glama)*. J. Histochem. Cytochem., 49: 1033-1044.
- GRAZIOTI, G.H., PALENCIA, P., DELHON, G. y RIVERO, J.L.L. (2004). *Neuromuscular partitioning, architectural design, and myosin fiber types of the M. vastus lateralis of the llama (Lama glama)*. J. Morphol., 262: 667-681.
- GREEN, H.J., REICHMAN, H. y PETTE, P. (1982). *A comparison of two ATPase based schemes for histochemical muscle fibre typing in various mammals*. Histochem., 76: 21-31.
- GROTMOL, S., TOTLAND, G.K., KRYVI, H., BREISTØL, A., ESSÉN-GUSTAVSSON, B. y LINDHOLM, A. (2002). *Spatial distribution of fiber types within skeletal muscle fascicles from standardbred horses*. Anat. Rec., 268: 131-136.
- GUNN, H.M. (1978). *Differences in the histochemical properties of skeletal muscles of different breeds of horses and dogs*. J. Anat., 127: 615-634.
- GUTH, L. y SAMAHA, F.J. (1969). *Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle*. Exp. Neurol., 25: 138-152.

- GUTH, L. y SAMAHA, F.J. (1970). *Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase*. Exp. Neurol., 28: 365-367.
- GUY, P.S. y SNOW, D.H. (1981). *Skeletal muscle fibre composition in the dog and its relationship to athletic ability*. Res. Vet. Sci., 31: 244-248.
- HÄMÄLÄINEN, N. y PETTE, D. (1993). *The histochemical profiles of fast fiber IIB, IID, IIA in skeletal muscle of mouse, rat, and rabbit*. J. Histochem. Cytochem., 38: 257-265.
- HÄMÄLÄINEN, N. y PETTE, D. (1995). *Patterns of myosin isoforms in mammalian skeletal muscle fibres*. Microsc. Res. Tech., 30: 381-389.
- HAN, Y., WANG, J., FISCHMAN, D.A., BILLER, H.F. y SANDERS, I. (1999). *Slow tonic muscle fibers in the thyroarytenoid muscles of human vocal folds: a possible specialization for speech*. Anat. Rec., 256: 146-157.
- HARKER, D.W. (1972). *The structure and innervation of sheep superior rectus and levator palpebrae extraocular muscles*. Invest. Opht., 11: 956-969.
- HARRIS, A.J., FITZSIMONS, R.B., y McEWAN, J.C. (1989). *Neural control of the sequence of expression of myosin heavy chain isoforms in foetal mammalian muscles*. Development, 107: 751-769.
- HAVENITH, M.G., VISSER, R., SCHRIJVERS VAN SCHENDEL, J.M.C.y BOSMAN, F.T. (1990). *Muscle fiber typing in routinely processed skeletal muscle with monoclonal antibodies*. Histochem., 93: 497-499.
- HEIZMANN, C. W. (1984). *Parvalbumin, an intracellular calcium-binding protein; distribution, properties and possible roles in mammalian cells*. Experientia, 40: 910-921.

- HEIZMANN, C. W. y CELIO, M. R. (1987). *Immunolocalization of Parvalbumin*. Methods in enzymology, 139: 552-570.
- HEIZMANN, C.W., BERCHTOLD, M.W. y ROWLERSON, A.M. (1982). *Correlation of parvalbumin concentration with relaxation speed in mammalian muscles*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 7243-7247.
- HELLSTRAND, E. (1980). *Morphological and histochemical properties of tongue muscles in cat*. Acta Physiol. Scand. (Suppl.), 473: 37.
- HESS, A. y PILAR, G. (1963). *Slow fibres in the extraocular muscles of the cat*. J. Physiol., London., 169: 780-798.
- HIKIDA, R.S. (1987). *Quantitative ultrastructure of histochemically identified avian skeletal muscle fiber types*. Anat. Rec., 218: 128-135.
- HOH, J.F.Y (2005). *Laryngeal muscle fibre types*. Acta Physiol. Scand., 183: 133-149.
- HOH, J.F.Y., McGRATH, P.A. y WHITE, R.I. (1976). *Electrophoretic analysis of multiple forms of myosin in fast-twitch and slow-twitch muscle of the chick*. Biochem. J., 157: 87-95.
- HOH, J.F.Y., HUGHES, S., HALE, P.T. y FITZSIMONS, R.B. (1988). *Immunocytochemical and electrophoretic analyses of changes in myosin gene expression in cat limb fast and slow muscles during postnatal development*. J. Muscle Res. Cell Motil., 9: 30-47.
- HYODO, M., AIBARA, R., KAWAKITA, S. y YUMOTO, E. (1998). *Histochemical study of the canine inferior pharyngeal constrictor muscle: implications for its function*. Acta Otolaryngol. (Stockh), 118: 272-279.

- HYODO, M., YUMOTO, E., KAWAKITA, S. y YAMAGATA, T. (1999). *Postnatal changes in the types of muscle fibers in the canine inferior pharyngeal constrictor*. Acta Otolaryngol (Stockh), 119: 843-846.
- IBEBUNJO, C. (1993). *Histochemical and morphometric properties of muscles of the upper airway of goats*. Res. Vet. Sci., 55: 215-223.
- I.C.V.G.A.N. (2005). "Nómina Anatómica Veterinaria, 5ª Edición". Ed. Committee. Hannover.
- IMAMURA, R., YOSHIDA, Y., FUKUNAGA, H., NAKASHIMA, T. e HIRANO, M. (1998). *Parvalbumin distribution in the musculature of the pharyngo-oesophageal segment*. Acta Otolaryngol (Stockh), 118: 875-881.
- INGJER, F. (1978). *Maximal aerobic power related to the capillary supply of quadriceps muscle in man*. Acta Physiol. Scand., 104: 238-240.
- JANSSON, E., SJÖDIN, B. y TESCH, P. (1978). *Changes in muscle fiber type distribution in man after physical training. A sign of fiber type transformation?*. Acta Physiol. Scand., 104: 235-237.
- JENEKENS, F.G.I., MEIJER, A.E.F.H., BETHLEM, J. y VAN WINGAARDEN, G. (1974). *Fibre hybrids in type groups*. J. Neurol. Sci., 23: 337-352.
- KARLSSON, A. (1993). *Porcine muscle fibres. Biochemical and histochemical properties in relation to meat quality*. Tesis Doctoral. Universidad de Uppsala.
- KARPATI, G., EISEN, A. y CARPENTER, S. (1975). *Subtypes of the histochemical type I muscle fibers*. J. Histochem. Cytochem., 23: 89-91.

- KENNEDY, J.M., ZAK, R. y GAO, L. (1991). *Myosin expresión in hypertrophied fast twitch and slow tonic muscles of normal and dystrophic chickens*. Muscle & Nerve, 14: 166-177.
- KHAN, M.A. (1978). *Histoenzymatic characterization of subtypes of types I fibres in fast muscles of rats*. Histochem., 55: 129-138.
- KHAN, M.A., PAPADIMITRIOU, J.M., HOLT, P.G. y KAKULAS, B.A. (1972). *A calcium-citro-phosphate technique for the histochemical localization of myosin ATPase*. Stain Technol., 47: 277-281.
- KHAN, M.A., PAPADIMITRIOU, J.M., y KAKULAS, B.A. (1974). *The effect of temperature on the pH stability of myosin ATPase as desmostrated histochemically*. Histochem., 38: 181-194.
- KORFAGE, J.A.M. y VAN EIJDEN, T.M.G.J. (2003). *Myosin heavy chain composition in human masticatory muscles by immunohistochemistry and gel electrophoresis*. J. Histochem. Cytochem., 51: 113-119.
- KORNEGAY, J.N., TULER, S.M., MILLER, D.M. y LEVESQUE, D.C. (1988). *Muscular dystrophy in a litter of golden retriever dogs*. Muscle & Nerve, 11: 1056-1064.
- KUGELBERG, E. y EDSTRÖM, L. (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.
- LARSSON, L., EDSTRÖM, L., LINDEGREN, B., GORZA, L. y SCHIAFFINO, S. (1991). *MHC composition and enzyme-histochemical and physiological properties of a novel fast-twitch motor unit type*. Am. J. Physiol., 261 (Cell physiol., 30): C93-C-101.

- LATORRE, R. (1990). *Organización morfológica e histoquímica de los distintos tipos de fibras que integran el músculo flexor carporradial del perro*. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- LATORRE, R., GIL, F., VÁZQUEZ, J.M., MORENO, F., MASCARELLO, F. y RAMÍREZ, G. (1993a). *Morphological and histochemical characteristics of muscle fibre types in flexor carpi radialis of the dog*. J. Anat., 182: 313-320.
- LATORRE, R., GIL, F., VÁZQUEZ, J.M., MORENO, F., MASCARELLO, F. y RAMÍREZ, G. (1993b). *Skeletal muscle fiber types in the dog*. J. Anat., 182: 329-337.
- LATORRE, R., GIL, F., RAMÍREZ, G., VÁZQUEZ, J.M., LÓPEZ-ALBORS, O. y MORENO, F. (1993c). *Postnatal development of semitendinosus muscle in the dog*. Anat. Embryol., 188: 401-407.
- LEFAUCHEUR, L., HOFFMAN, R.K., GERRARD, D.E., OKAMURA, C.S., RUBINSTEIN, N. y KELLY, A. (1998). *Evidence for three adult fast myosin heavy chain isoforms in type skeletal muscle fibers in pigs*. J. Am. Sci., 76: 1584-1593.
- LEFAUCHEUR, L., ECOLAN, P., PLANTARD, L. y GUEGEN, N. (2002). *New insights into muscle fiber types in the pig*. J. Histochem. Cytochem., 50(5): 719-730.
- LOWEY, S. y RISBY, D. (1971). *Light chains from fast and slow muscle myosins*. Nature (London), 234: 81-85.
- MABUCHI, K. y SRÉTER, F.A. (1980). *Actomyosin ATPase II. Fiber typing by histochemical ATPase reaction*. Muscle & Nerve, 3: 233-239.

- MACCATROZZO, L., PATRUNO, M. TONIOLO, L., REGGIANI, C. y MASCARELLO, F. (2004). *Myosin heavy chain 2B isoform is expressed in specialized eye muscles but not in trunk and limb muscles of cattle*. Eur. J. Histochem., 48: 357-366.
- MACCATROZZO, L., CALIARO, F., TONIOLO, L. PATRUNO, M. REGGIANI, C. y MASCARELLO, F. (2007). *The sarcomeric myosin heavy chain gene family in the dog: Analysis of isoform diversity and comparison with other mammalian species*. Genomics, 89: 224-236.
- MAILLET, M. (1980). "*Histología e Histofisiología Humanas. 4. Tejido Muscular*". Ed. AC. Madrid.
- MARTÍNEZ LÓPEZ, J.F. (1987). *Estudio citoquímico de las miopatías provocadas por inyección intraarticular de corticoides en el perro*. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- MASCARELLO, F. y ROWLERSON, A. (1992). *Myosin isoform transitions during development of extra-ocular and masticatory muscles in the fetal rat*. Anat. Embryol. (Berl.), 185: 143-153.
- MASCARELLO, F. y VEGGETTI, A. (1979). *A comparative histochemical study of intrinsic laryngeal muscles of ungulates and carnivores*. Basic Appl. Histochem., 23: 103-125.
- MASCARELLO, F., CARPENE, E., VEGGETTI, A., ROWLERSON, A. y JENNY, E. (1982). *The tensor tympani muscle of cat and dog contains IIM and slow-tonic fibres: an unusual combination of fibre types*. J. Muscle Res. and Cell Motil., 3: 363-374.
- MASCARELLO, F., VEGGETTI, A., CARPENE, E. y ROWLERSON, A. (1983). *An immunohistochemical study of the middle ear muscles of some carnivores*

- and primates, with special referente to the IIM and slow-tonic fibre types. J. Anat.*, 137: 95-108.
- MASCARELLO, F., ROMANELLO, M.G. y SCAPOLO, P.A. (1986). *Histochemical and inmunohistochemical profile of pink muscle fibres in some teleosts. Histochem.*, 84: 251-255.
- MASSIMINI, M. (1986). *Perfil histo-inmunohistoquímico de las fibras musculares de la lengua de algunos mamíferos. Tesis de Licenciatura. Universidad de Padua.*
- MATOBA, H. y GOLLNICK, P.D. (1984). *Influence of ionic composition, buffering agent, and pH on the histochemical demonstration of myofibrillar actomyosin ATPase. Histochem.*, 80: 609-614.
- MATOBA, H., ALLEN, J.R., BAYLY, W.M., OAKLEY, C.R. y GOLLNICK, P.D. (1985). *Comparison of fiber types in skeletal muscles from ten animal species based on sensitivity of the myofibrillar actomyosin ATPase to acid or copper. Histochem.*, 82: 175-183.
- MATTSON, J.P., MILLER, T.A., POOLE, D.C. y DELP, M.D. (2002). *Fiber composition and oxidative capacity of hamster skeletal muscle. J. Histochem. Cytochem.*, 50(12): 1685-1692.
- MAXWELL, L.C., BARKLAY, J.K., MOHRMAN, D.E. y FAULKNER, J.A. (1977). *Physiological characteristics of skeletal muscles of dogs and cats. Am. J. Physiol.*, 233: 14-18.
- McCOMAS, A.J. (1996). *"Skeletal muscle. Form and Function"*. Ed. Human Kinetics. Leeds.

- McCONATHY, D., GIDDINGS, C.J. y GONYEA, W.J. (1983). *Structure-function relationships of the flexor carpi radialis muscle compared among four species of mammals*. J. Morphol., 175: 279-292.
- MEIJER, A.E.F.H. (1970). *Histochemical method for the demonstration of myosin adenosine triphosphatase in muscle tissues*. Histochemie, 22: 51-58.
- MILLER, J.E. (1967). *Cellular organisation of rhesus extraocular muscle*. Invest. Ophthalmol., 6: 18-39.
- MORENO, F. (1986). *Estudio citoquímico del desarrollo de la fibra muscular del perro*. Trabajo de investigación. Universidad de Murcia.
- MORGAN, D.L. y PROSKE, U. (1984). *Vertebrate show muscle: its structure, pattern of innervation, and mechanical properties*. Physiol. Rev., 64: 103-169.
- MU, L. y SANDERS, I. (1998). *Neuromuscular specializations of the pharyngeal dilator muscles: I. Compartments of the canine geniohyoid muscle*. Anat. Rec., 250: 146-153.
- MU, L. y SANDERS, I. (1999). *Neuromuscular organization of the canine tongue*. Anat. Rec., 256: 412-424.
- MU, L. y SANDERS, I. (2000). *Neuromuscular specializations of the pharyngeal dilator muscles: II. Compartmentalization of the canine genioglossus muscle*. Anat. Rec., 260: 308-325.
- MU, L. y SANDERS, I. (2001). *Neuromuscular compartments and fiber-type regionalization in the human inferior pharyngeal constrictor muscle*. Anat. Rec., 264: 367-377.

- MU, L. y SANDERS, I. (2002). *Muscle fiber-type distribution pattern in the human cricopharyngeus muscle*. *Dysphagia*, 17: 87-96.
- MU, L., SU, H., WANG, J., HAN, Y. y SANDERS, I. (2004). *Adult human mylohyoid muscle fibers express slow-tonic, α -cardiac, and developmental myosin heavy-chain isoforms*. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.*, 279: 749-760.
- MU, L., SU, H., WANG, J. y SANDERS, I. (2007a). *Myosin heavy chain-based fiber types in the adult human cricopharyngeus muscle*. *Muscle & Nerve*, 35: 637-648.
- MU, L., WANG, J., SU, H. y SANDERS, I. (2007b). *Adult human upper esophageal sphincter contains specialized muscle fibers expressing unusual myosin heavy chain isoforms*. *J. Histochem. Cytochem.*, 55(3): 199-207.
- MÜNTENER, M. (1979). *Variable pH dependence of the myosin ATPase in different muscles of the rat*. *Histochemie*, 62: 299-303.
- NACHMIAS, V.T. y PADYKULA, H.A. (1958). *A histochemical study of normal and denervated red and white muscles of the rat*. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.*, 4: 47.
- NARUSAWA, M., FITZSIMONS, R.B., IZUMO, S., NADAL-GINARD, B., RUBINSTEIN, A.M. y KELLY, A.M. (1987). *Slow myosin in developing rat skeletal muscle*. *J. Cell. Biol.*, 104: 447-459.
- NAUMANN, K. y PETTE, D. (1994). *Effects of chronic stimulation with different impulse patterns on the expresión of myosin isoforms in rat myotube cultures*. *Differentiation*, 55: 203-211.

- NEMETH, P. y PETTE, D. (1980). *The interrelationship of two systems of fiber classification in rat EDL muscle*. J. Histochem. Cytochem., 28: 193.
- NEMETH, P. y PETTE, D. (1981a). *Succinate dehydrogenase activity in fibres classified by myosin ATPase in three hind limb muscles of rat*. J. Physiol. (London), 320: 73-80.
- NEMETH, P. y PETTE, D. (1981b). *The limited correlation of myosin-based and metabolism based classification of skeletal muscle fibers*. J. Histochem. Cytochem., 29: 89-90.
- NEMETH, P., HOFER, H.W. y PETTE, D. (1979). *Metabolic heterogeneity of muscle fibers classified by myosin ATPase*. Histochem., 63: 191-201.
- NICKEL, R., SCHUMMER, A. y SEIFERLE, E. (1979). *"The Viscera of the Domestic Mammals. 2ª Edición Revisada"*. Ed. Verlag Paul Parey. Berlín.
- OGATA, T. (1958). *A histochemical study of the red and white muscle fibers. Parts I, II and III*. Acta Med. Okayama, 12: 216-236.
- OVALLE, W.K. (1978). *Histochemical dichotomy of extrafusil and intrafusil fibers in an avian slow muscle*. Am. J. Anat., 152: 587-598.
- PADYKULA, H.A. (1952). *The localization of succinic dehydrogenase in tissue sections of the rat*. Am. J. Anat., 91: 107-145.
- PADYKULA, H.A. y HERMAN, E. (1955). *Factors affecting the activity of adenosine triphosphatase and other phosphatase as measured by histochemical techniques*. J. Histochem. Cytochem., 3: 161-169.

- PAUL, A. C. (2001). *Muscle length affects the architecture and pattern of innervation differently in leg muscles of mouse, guinea pig, and rabbit compared to those of human and monkey muscles*. *Anat. Rec.*, 262: 301-309.
- PEACHEY, L.D., TAKEICHI, M. y NAG, A.C. (1974). “*Muscle fibre types and innervation in adult cat extra-ocular muscles*”. En: “*Exploratory Concepts in Muscular Dystrophy, Vol. II*”. Milhorat, A.T. Ed. Excerpta Medica. Amsterdam.
- PEÑUELA, A. (1989). *Origen de la musculatura del velo del paladar en la rata. Su relación con la musculatura derivada del tercer arco branquial*. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- PETER, J.B., BARNARD, V.R., EDGERTON, V.R., GILLESPIE, C.A. y STEMPEL, K.E. (1972). *Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscles in guinea pigs and rabbits*. *Biochem.*, 11: 2627-2633.
- PETTE, D. y STARON, R.S. (1988). “*Molecular basis of the phenotypic characteristics of mammalian muscle fibres*”. En: “*Plasticity of the Neuromuscular System*”. Evered D. y Whelan J. Ciba Foundation Symposium 138. Ed. Wiley. Chichester.
- PETTE, D. y STARON, R.S. (1997). *Mammalian skeletal muscle fibre type transitions*. *Int. Rev. Cytol.*, 170: 143-223.
- PIEROBON-BORMIOLI, S., TORRESAN, P., SARTORE, S., MOSCHNI, G.B. y SCHIAFFINO, S. (1979). *Immunohistochemical identification of slow-tonic fibers in human extrinsic eye muscles*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 18: 303-306.

- PIEROBON-BORMIOLI, S., SARTORE, S., DALLA LIBERA, L. VITADELLO, M. y SCHIAFFINO, S. (1980). *Slow myosin in vertebrate skeletal muscle. An immunofluorescence study*. J. Cell Biol., 85: 672-681.
- RHEE, H.S., LUCAS, C.A. y HOH, J.F.Y. (2004). *Fiber types in rat laryngeal muscles and their transformations after denervation and reinnervation*. J. Histochem. Cytochem., 52: 581-590.
- RIU, R., FLOTTE, L., BOUCHE, J. y LEPENT, R. (1966). "*Physiologie de la trompe d'Eustache. Applications cliniques et thérapeutiques*". Ed. Masson & CIE. Paris, Arnette.
- RIVERO, J.L.L., DIZ, A., TOLEDO, M. y AGÜERA, E. (1994). *Enzyme histochemical profiles of fiber types in mature canine appendicular muscles*. Anat. Histol. Embryol., 23: 330-336.
- RIVERO, J.L.L., TALMADGE, R.J. y EDGERTON, V.R. (1996). *Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in equine skeletal muscle and the influence of training*. Anat. Rec., 246: 195-207.
- RODRÍGUEZ-BARBUDO, M.V., MORENO, F., FUENTES, S., VIVÓ, J., MONTERDE, J.G., MIRÓ, F., CARPIO, M y GIL, F. (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.
- ROMANUL, F.C. (1964). *Enzymes in muscle. I. Histochemical studies of enzymes in individual muscle fibres*. Arch. Neurol., 11: 355-368.

- ROWLERSON, A., POPE, B., MURRAY, J., WHALEN, R.B. y WEEDS, A.G. (1981). *A novel myosin present in cat jaw-closing muscles*. J. Muscle Res. Cell Motil., 2: 415-438.
- ROWLERSON, A., MASCARELLO, F., VEGGETTI, A. y CARPENE, E. (1983). *The fibre-type composition of the first branchial arch muscles in Carnivora and Primates*. J. Muscle Res. Cell Motil., 4: 443-472.
- RUSHBROOK, J.I. y STRACHER, A. (1979). *Comparisson of adult, embryonic and dystrophic myosin heavy chains form chicken muscle by sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis and peptide mapping*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 4331-4334.
- RYU, S. (1981). *A histochemical study of swallowing muscles in the inlet of the esophagus*. Otol. Fukuoka, 27: 43-59.
- SAMAHA, F.J., GUTH, L. y ALBERS, R.W. (1970). *Phenotypic differences between the actomyosin ATPase of the three fiber types of mammalian skeletal muscle*. Exp. Neurol., 26: 120-125.
- SAMPAOLESI, M., STEPHANE, B., D'ANTONA, G., GRANGER, N., TONLORENZI, R., INNOCENZI, A., MOGNOL, P., THIBAUD, J., GALVEZ, B., BETHELEMY, I., PRERANI, L., MANTERO, S., GUTTINGER, M., PANSARASA, O., RINALDI, C., DE ANGELIS, M.G., TORRENTE, Y., BORDIGNON, C., BOTTINELLI, R. y COSSU, G. (2006). *Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs*. Nature, 444: 574-579.
- SANDERS, I., JACOBS, I., WU, B.L. y BILLER, H.F. (1993). *The three bellies of the posterior cricoarytenoid muscle: implication for understanding laryngeal function*. Laryngoscope, 103: 171-177.

- SARNAT, H. B. (1983). "*Muscle Pathology and Histochemistry*". Ed. American Society of Clinical Pathologists Press. Chicago.
- SARTORE, S., MASCARELLO, F., ROWLERSON, A., GORZA, L., AUSONI, S., VIANELLO, M. y SCHIAFFINO, S. (1987). *Fibre types in extraocular muscles: a new myosin isoform in the fast fibres*. J. Muscle Cell. Motil., 8: 161-172.
- SCHIAFFINO, S. y REGGIANI, C. (1996). *Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance*. Physiol. Rev., 76: 371-423.
- SCHIAFFINO, S., HANZLIKOVA, V. y PIEROBON-BORMIOLI, S. (1970). *Relations between structure and function in rat skeletal muscle fibers*. J. Cell Biol., 47: 107-119.
- SCHIAFFINO, S., SAGGIN, L., VIEL, A., AUSONI, S., SARTORE, S. y GORZA, L. (1986). "*Muscle fiber types identified by monoclonal antibodies to myosin heavy chains*". En: "*Biochemical aspects of physical exercise*". Benzi, G., Packer, L. y Siliprandi, N. Ed. Elsevier Science. Amsterdam.
- SCHIAFFINO, S., GORZA, L., SARTORE, S., SAGGIN, L., VIANELLO, M., GUNDERSEN, K. y LOMO, T. (1989). *Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres*. J. Muscle Res. Cell Motil., 10: 197-205.
- SCIOTE, J.J. y ROWLERSON, A. (1998). *Skeletal fiber types and spindle distribution in limb and jaw muscles of the adult neonatal opossum, Monodelphis domestica*. Anat. Rec., 251: 548-562.
- SEIDEL, J.C. (1967). *Studies on myosin from red and white fibres. Inactivation of myosin from red muscles under mild alkaline conditions*. J. Biol. Chem., 242: 5623-5629.

- SELIGMANG, A.M. y RUTENBURG, A.M. (1951). *The histochemical demonstration of succinic dehydrogenase*. Science, 113: 317-321.
- SEMENOFF, W.E. (1935). *Mikrochemische Bestimmung der Aktivität der Succinodehydrase in den Organen der Rana temporaria*. Zeitschrift für Zelforschung, 22: 305.
- SERRANO, A.L., PETRIE, J.L., L. RIVERO, J.L.L.y HERMANSON, J.W. (1996). *Myosin isoforms and muscle fiber characteristics in equine gluteus medius muscle*. Anat. Rec., 244: 444-451.
- SERRANO, A. L., PÉREZ, M., LUCÍA, A., CHICHARRO, J. L., QUIROZ-ROTHE, E. y L. RIVERO, J. L. L. (2001). *Immunolabelling, histochemistry and in situ hybridisation in human skeletal muscle fibres to detect myosin heavy chain expression at the protein and mRNA level*. J. Anat., 199: 329-337
- SMERDU, V. KARSH-MIZRACHI, I., CAMPIONE, M., LEINWARD, L. y SCHIAFFINO, S. (1994). *Type Iix myosin heavy chain transcripts are expressed in tipe Iib fibers of human skeletal muscle*. Am. J. Physiol. (Cell. Physiol.), 267: 1723-1728.
- SMERDU, V., ŠTRBENC, M., MEZNARIČ-PETRUŠA, M. y FAZARINC, G. (2005). *Identification of myosin heavy chain I, Iia and Iix in canine skeletal muscles by an electrophoretic and immunoblotting study*. Cells Tiss. Org., 180: 106-116.
- SMITH, A., CARTER, N. y JEFFERY, S. (1987). *Increased ATPase acid stability in type I fibers of rats soleus*. J. Histochem. Cytochem., 35: 699-701.

- SNOW, D., BILLETER, F., MASCARELLO, F., CARPENE, E. y JENNY, E. (1982). *No classical IIB fibers in dog skeletal muscle*. Histochem., 75: 53-65.
- SRÉTER, F.A., SEIDEL, J.C. y GERGELY, J. (1966). *Studies on myosin from red and white skeletal muscles of the rabbit. I. Adenosine triphosphatase activity*. J. Biol. Chem., 241: 5772-5776.
- STARON, R.S. y PETTE, D. (1986). *Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in rabbit muscle fibers*. Histochem., 86: 19-25.
- STARON, R.S. y PETTE, D. (1987a). *The multiplicity of myosin light and heavy chain combinations in histochemically typed single fibres. Rabbit soleus muscle*. Biochem. J., 243: 687-693.
- STARON, R.S. y PETTE, D. (1987b). *The multiplicity of myosin light and heavy chain combinations in histochemically typed single fibres. Rabbit tibialis anterior muscle*. Biochem. J., 243: 695-699.
- STARON, R.S., HIKIDA, R.S. y HAGERMAN, F.C. (1983). *Reevaluation of human muscle fast-twitch subtypes: Evidence for a continuum*. Histochem., 78: 33-39.
- STEIN, J.M. y PADIKULA, H.A. (1962). *Histochemical classification of individual skeletal muscle fibers of the rat*. Am. J. Anat., 110: 103-123.
- ŠTRBENC, M., SMERDU, V., ŽUPANC, M., TOZON, N. y FAZARINC, G. (2004). *Pattern of myosin heavy chain isoforms in different fibre types of canine trunk and limb skeletal muscles*. Cell Tiss. Org., 176: 178-186.

- ŠTRBENC, M., SMERDU, V., POGAČNIK, A. y FAZARINC, G. (2006). *Myosin heavy chain isoform transitions in canine skeletal muscles during postnatal growth*. J. Anat., 209: 149-163.
- SUNDMAN, E., ANSVED, T., MARGOLIN, G., KUYLENSTIERNA, R. y ERIKSSON, L.I. (2004). *Fiber-type composition and fiber size of the human cricopharyngeal muscle and the pharyngeal constrictor muscle*. Acta Anaesthesiol. Scand., 48: 423-429.
- SUTLIVE, T.G., McCLUNG, J.R. y GOLDBERG, S.J. (1999). *Whole muscle and motor unit contractile properties of the styloglossus muscle in rat*. J. Neurophysiol., 82: 584-592.
- SUTLIVE, T.G., SHALL, M.S., McCLUNG, J.R. y GOLDBERG, S.J. (2000). *Contractile properties of the tongue's genioglossus muscle and motor units in the rat*. Muscle & Nerve, 23: 416-425.
- SWATLAND, H.J. (1984). "Estructura y desarrollo de los animales de abasto". Ed. Acribia. Zaragoza.
- TALMADGE, R.J. (2000). *Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: Potencial regulatory mechanisms*. Muscle & Nerve, 23: 661-679.
- TALMADGE, R.J., ROY, R.R. y EDGERTON, V.R. (1993). *Muscle fiber types and function*. Curr. Op. Rheumatol., 5: 695-705.
- TANAKA, Y., YOSHIDA, Y., HIRANO, M., MORIMOTO, M. y KANASEKI, T. (1993). *Distribution of SP- and CGRP-immunoreactivity in the cat's larynx*. J. Laryngol. Otol., 107: 522-526.

- TELLES, A. (2002). *Estudio Histoquímico y Morfométrico de los Músculos del Globo del Ojo en el Perro*. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- TERMIN, A., STARON, R.S. y PETTE, D. (1989). *Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle*. *Histochem.*, 92: 453-457.
- TONIOLO, L., PATRUNO, M., MACCATROZZO, L., PELLEGRINO, M.A., CANEPARI, M., ROSSI, R., D'ANTONA, G., BOTINELLI, R., REGGIANI, C. y MASCARELLO, F. (2004). *Fast fibres in a large animal: fibre types, contractile properties and myosin expression in pig skeletal muscles*. *J. Exp. Biol.*, 207: 1875-1886.
- TONIOLO, L., MACCATROZZO, L., PATRUNO, M., CALIARO, F., MASCARELLO, F. y REGGIANI, C. (2005). *Expression of eight distinct isoforms in bovine striated muscles: evidence for MHC-2B presence only extraocular muscles*. *J. Exp. Biol.*, 208: 4243-4253.
- TONIOLO, L., MACCATROZZO, L., PATRUNO, M., PAVAN, E., CALIARO, F., ROSSI, R., RINALDI, C., CANEPARI, M., REGGIANI, C. y MASCARELLO, F. (2007). *Fiber types in canine muscles: myosin isoform expression and functional characterization*. *Am. J. Physiol. (Cell. Physiol.)*, 292: 1915-1926.
- TREVINO, G.S., DEMAREE, R.S., SAUNDERS, B.V. y O'DONELL, T.A. (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., SALGADO, J.D., OZBAYSAL, R. y GAUNT, A.S. (1992). *The composite structure of quail pectoralis muscle*. *J. Morphol.*, 212: 27-35.

- WACHSTEIN, M. y MEISEL, E. (1955). *The distribution of histochemically demonstrable succinic dehydrogenase and of mitochondria in tongue and skeletal muscles*. J. Biophys. Biochem. Cytol., 1: 483-489.
- WANG, L.C. y KERNELL, D. (2001). *Quantification of fibre type regionalisation: an analysis of lower hindlimb muscles in the rat*. J. Anat., 198: 295-308.
- WEEDS, A.G. (1980). "Myosin light chains, polymorphism and fiber types in skeletal muscle". En: "Plasticity of muscle". Pette, D. Ed. Walter de Gruyter. Berlin.
- WEEDS, A.G. y BURRIDGE, K. (1975). *Myosin from cross-reinnervated cat muscles. Evidence for reciprocal transformation of heavy chains*. F.E.B.S. Lett., 57: 203-208.
- WHALEN, R.G., SELL, S.M., BUTLER-BROWNE, G.S., SCHWARTZ, K., BOUVERET, P. y PINSET-HARSTROM, I. (1981). *Three myosin heavy-chain isozymes appear sequentially in rat muscle development*. Nature (London), 295: 805-809.
- WIECZOREK, D.F., PERIASAMY, M., BUTLER-BROWNE, G.S., WHALEN, R.G. y NADAL-GINARD, B. (1985). *Co-expression of multiple myosin heavy chain genes, in addition to a tissue specific one, in extraocular musculature*. J. Cell. Biol., 101: 618-629.
- WU, Y.Z., BAKER, M.J., CRUMLEY, R.L., BLANKS, R.H.I. y CAIOZZO, V.J. (1998). *A new concept in laryngeal muscle: multiple myosin isoform types in single muscle fibers of the lateral cricoarytenoid*. Otolaryngol. Head Neck Surg., 118: 86-94.

-
- WU, Y.Z., CRUMLEY, R.L., y CAIOZZO, V.J. (2000). *Are hybrid fibers a common motif of canine laryngeal muscles?*. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg., 126: 865-873.
- YARON, R., SAGHER, U., HAVIVI, Y., PELED, I.J. y WEXLER, M.R. (1986). *Myofibers in tongues of Down's Syndrome*. J. Neurol. Sci., 73: 279-287.
- ZHANG, K.-M., HU, P., WANG, S.-W., FEHER, J.J., WRIGHT, L.D., WECHSLER, A.S., SRATT, J.A. y BRIGGS, F.N. (1996). *Salbutamol changes the molecular and mechanical properties of canine skeletal muscle*. J. Physiol., 496.1: 211-220.