



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

Análisis de los Tipos de Fibras Musculares del Toro
Bravo (*Bos taurus ibericus*): su Relación con Algunas
Enzimas de Fatiga Muscular y el Comportamiento
durante la Lidia

D. Juan Ros Sempere
2015

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	4
II. OBJETIVOS	7
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
III.1. EL MIOCITO O FIBRA MUSCULAR	10
III.2. TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES	13
III.2.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	13
III.2.2. HISTOQUÍMICA MUSCULAR.....	14
III.2.3. INMUNOHISTOQUÍMICA MUSCULAR	24
III.2.4. TIPOS DE FIBRAS EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DEL VACUNO	28
III.2.5. TIPOS DE FIBRAS Y FUNCIÓN MUSCULAR.....	30
III.2.6. ALTERACIONES MORFOLÓGICAS Y MORFOMÉTRICAS DE LA FIBRA MUSCULAR	32
III.3. TORO DE LIDIA. LA CAÍDA	41
III.4. ESTUDIOS QUE RELACIONAN LA CAÍDA DEL TORO BRAVO CON LAS FIBRAS Y ENZIMAS MUSCULARES	51
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	56
IV.1. ANIMALES.....	57
IV.2. TOMA DE MUESTRAS.....	58
IV.3. PROCESADO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE	59
IV.4. PROCESADO DE MUESTRAS MUSCULARES	65
IV.4.1. CONGELACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	65
IV.4.2. CORTE DE LAS MUESTRAS.....	66
IV.5. TINCIONES Y TÉCNICAS EMPLEADAS	67
IV.5.1. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS (NO ENZIMÁTICAS)	67
IV.5.1.1 Hematoxilina-Eosina	67

IV.5.1.2. Tricrómico de Gomori modificado	67
IV.5.2. TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS	68
IV.5.2.1. Técnicas ATPasa miosínicas	68
IV.5.2.1.1 ATPasa miosínica preincubación alcalina.....	69
IV.5.2.1.2. ATPasa miosínica preincubación ácida	70
IV.5.2.2. Técnica de determinación del metabolismo de las fibras...	71
IV.6. MICROFOTOGRAFIADO	72
V. RESULTADOS.....	73
V.1. TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES.....	74
V.2. LESIONES FIBRILARES.....	85
V.3. RESULTADOS DEL ANÁLISIS PRACTICADO A LAS MUESTRAS DE SANGRE.....	100
V.4. RESULTADOS RELATIVOS AL COMPORTAMIENTO DE LOS NOVILLOS DURANTE LA LIDIA	103
VI. DISCUSIÓN	105
VII. CONCLUSIONES	112
VIII. RESUMEN	115
IX. BIBLIOGRAFÍA	119

I. INTRODUCCIÓN

El toro de lidia es una de las razas bovinas autóctonas con más importancia, no solo por su valor económico y medioambiental, sino también por ser el elemento fundamental de la fiesta nacional. Es una raza que tiene su razón de ser gracias a la fiesta, pues si no, el coste económico que supone su mantenimiento no justificaría en ningún caso su uso en las ganaderías como animal de abasto. Es por ello su valía como reserva genética, ya que es la única raza bovina que tiene aptitud para la lidia (manifestada como la capacidad de embestir, de humillar, de entrar al caballo de picar y resistir la puya, no solo huyendo, sino aguantando e incluso repitiendo). Es una raza que presenta un comportamiento especial y único, siempre fuera de sus terrenos o cuando se sienten amenazados. Es, en definitiva “la bravura”, la que los hace únicos para el toreo y pieza imprescindible de la fiesta nacional.

Esta particular conducta que presenta el toro bravo durante la lidia no es una constante, sino que a causa de la misma, el toro experimenta varias transformaciones las cuales, no afectando en ningún caso a su bravura, sí que modifican su comportamiento disminuyendo su ímpetu inicial y la fuerza de sus embestidas a medida que avanza la lidia. A estas transformaciones se las conoce como *estados* y son tres: *levantado*, *parado* y *aplomado* (Montes, “Tauromaquia completa”, 1836). En el estado inicial de *levantado* el toro permanece erguido, despierto, atendiendo a todos los objetos aunque sin fijarse en ninguno en particular y corre a gran velocidad por la plaza. Acaba de salir a la arena y se encuentra en plenitud de sus facultades físicas tras haber permanecido en reposo durante varias horas en los chiqueros. El segundo *estado* que experimenta el toro es el de *parado*. En esta fase de la lidia, el toro reduce notablemente la velocidad en sus movimientos y comienza a fijarse en objetos concretos que tiene a una distancia media. El toro está *parado* y distingue el capote al que debe embestir, arrancando repetidamente y con gran vigor sobre él. Esto ocurre antes del tercio de varas. El tercer y último *estado* conocido como *aplomado* transcurre durante el último tercio de la lidia. Debido al desgaste sufrido en los anteriores tercios el toro siente una pesadez en las patas que le impide arrancar enérgicamente sobre la

muleta, arremetiendo con lentitud y en ocasiones frenándose, aumentando así el riesgo de la lidia.

Teniendo en cuenta esta disminución de potencia que experimenta el toro durante la lidia, en las últimas décadas su comportamiento se venía caracterizando por la extraordinaria fortaleza que presentaba el animal durante estos cambios de estado, no viéndose afectada en esencia su fuerza y su vigor más allá de lo razonable.

Sin embargo, de un tiempo a esta parte, muchos toros están presentando una clara falta de fuerza, que se manifiesta con signos de fatiga o debilidad muscular, cojeras, claudicaciones intermitentes y continuas, caídas, postración e incluso incapacidad para poder llegar a levantarse. En términos taurinos, todos estos signos han sido agrupados en lo que comúnmente se ha denominado como “síndrome de la caída del toro de lidia”.

Aunque este síndrome debe entenderse como un problema de etiología multifactorial que implica diferentes sistemas orgánicos (García Berenguer, 1995; Arbola, 1998; Jiménez Chamorro, 2000), son muy escasos los estudios que han tratado de establecer el papel que desempeña el músculo esquelético, y concretamente, los tipos de fibras de fibras musculares en dicho síndrome.

Con el trabajo que presentamos tratamos de abordar esta temática, pero en nuestro caso, estudiando algunos músculos de novillos, que a diferencia de los toros analizados en otros trabajos (Martinez Gomariz et al 1998; 1999; 2002; 2003; Picard et al. 2005), se suelen caracterizar por tener más fuerza y sufrir menos caídas durante la lidia.

II. OBJETIVOS

El presente trabajo se enmarca dentro de la línea de investigación “Histoquímica Muscular”, que desde el año 1983 desarrolla el grupo de investigación “Anatomía y Embriología” de la Universidad de Murcia. El estudio se ha realizado a partir de muestras de músculo esquelético y sangre procedentes de toros (novillos) lidiados en la plaza de toros de Calasparra (Murcia) durante las temporadas 2007 y 2008. Los objetivos fijados son los siguientes:

- 1) Mediante aplicación de técnicas histológicas de rutina e histoquímicas convencionales, analizar el tejido muscular esquelético desde el punto de vista de su sección transversal, identificando los principales tipos de miocitos y describiendo las posibles alteraciones o lesiones que se pudieran encontrar.
- 2) A través del correspondiente análisis serológico, obtener los valores indicativos del posible daño hepático.
- 3) Estudiar la relación que pudiera existir entre el comportamiento mostrado por los toros durante la lidia y los resultados referidos a tipos de fibras, lesiones observadas y valores serológicos encontrados.

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

III.1. EL MIOCITO O FIBRA MUSCULAR

Las fibras musculares o miocitos constituyen las unidades celulares básicas del tejido muscular estriado esquelético (músculo esquelético). Se trata de células extraordinariamente largas (1-40 mm de longitud), de diámetro variable (entre 10 y 120 μm) y que a menudo recorren toda la longitud del músculo (**fibras cilíndricas**), desde el origen hasta la inserción. Sin embargo, existen otras (**fibras cónicas**) que sólo se unen por un extremo al punto de inserción, mientras que por el otro terminan en el propio músculo adhiriéndose fuertemente a los tabiques conjuntivos. También se describen **fibras fusiformes**, que no tienen relación alguna con los extremos del músculo (Maillet, 1980). Todas ellas presentan la peculiaridad de ser multinucleares, pues resultan de la fusión de numerosas células mononucleares (mioblastos) aisladas en un sincitio continuo (Dellmann y Brown, 1980; Dellmann, 1994). En los mamíferos, estos núcleos se sitúan normalmente en la periferia, próximos a la membrana (**sarcolema**), es decir, en posición subsarcolémica. Tienen forma ovalada, una longitud media de entre 8 y 10 μm y su número puede superar los varios centenares en una fibra muscular. El citoplasma del miocito recibe el nombre de **sarcoplasma**, que contiene los elementos contráctiles del músculo (miofilamentos) agrupados en miofibrillas, además de otras estructuras citoplasmáticas tales como el retículo sarcoplásmico, mitocondrias, aparato de Golgi, vacuolas lipídicas, glucógeno y mioglobina. Esta última representa el pigmento rojo que da la coloración al tejido muscular e interviene en la fijación del oxígeno aportado por la sangre para cederlo finalmente a las mitocondrias.

Para un correcto funcionamiento del músculo resulta imprescindible el suministro de oxígeno durante el ejercicio (tarea realizada por la arteria y la vena) además de la perfecta regulación de las contracciones que experimenta dicho músculo al recibir las instrucciones que llegan a sus terminaciones nerviosas a través de las fibras nerviosas motoras procedentes del sistema nervioso central.

Las **miofibrillas** constituyen las unidades contráctiles de la fibra muscular de 1-2 μm de diámetro que recorren la fibra de un extremo a otro y son el resultado de la asociación ordenada de dos tipos de proteínas contráctiles (**miofilamentos**) que se diferencian por su estructura bioquímica y diámetro. Los filamentos gruesos o tipo A están constituidos principalmente por miosina, que es una molécula lineal con una longitud aproximada de 200nm, 2-3nm de diámetro y con forma de “palo de golf”, mientras que en los finos o tipo I predomina una proteína globular de bajo peso molecular (42kd) que a pH fisiológico polimeriza formando una hélice de filamento. A esta proteína se la conoce como actina. Ambos tipos de filamentos (gruesos o tipo A y finos o tipo I) se disponen longitudinalmente y paralelos entre sí y al eje de contracción del miocito de forma ordenada y alternante ocupando gran parte del sarcoplasma y aportando el aspecto estriado típico de la miofibrilla o fibra muscular.

La miosina está provista de una doble cabeza que en condiciones óptimas se agrega en filamentos gruesos. Las cabezas tienen actividad enzimática adenosintrifosfatasa (ATPasa), cuya actividad se utiliza como criterio para alguna de las clasificaciones histoquímicas que pueden hacerse del miocito. Los miocitos individuales se unen entre sí formando **haces o fascículos primarios**, que a su vez se asocian para constituir el músculo. Dentro del fascículo, una fina red de tejido conectivo formado por fibras de colágeno y de reticulina (**endomisio**) envuelve a cada una de las fibras, separándolas de las otras. Este tejido conectivo no sólo envuelve al miocito sino que además es portador de la red de capilares sanguíneos y fibras nerviosas terminales que penetran dentro de los fascículos para llegar a las células. Cada uno de los fascículos primarios está envuelto a su vez por fibras densas de colágeno (**perimisio**), que une los fascículos adyacentes (conectivo interfascicular) y es portador de los vasos sanguíneos y nervios que penetran dentro de los haces e intervienen en el riego e inervación de las fibras musculares. Por último, todo el músculo queda envuelto por un tejido conjuntivo grueso y denso, rico en colágeno, llamado **epimisio**. El

tamaño de los fascículos guarda relación con la función particular del músculo. Así, los músculos responsables de movimientos finos, altamente especializados (por ejemplo, los músculos del globo ocular) están formados por fascículos pequeños y la proporción de perimysio es más elevada. Por el contrario, los músculos encargados de movimientos más vastos (por ejemplo, los de la región glútea) poseen fascículos grandes y el perimysio resulta más escaso (Figura 1).

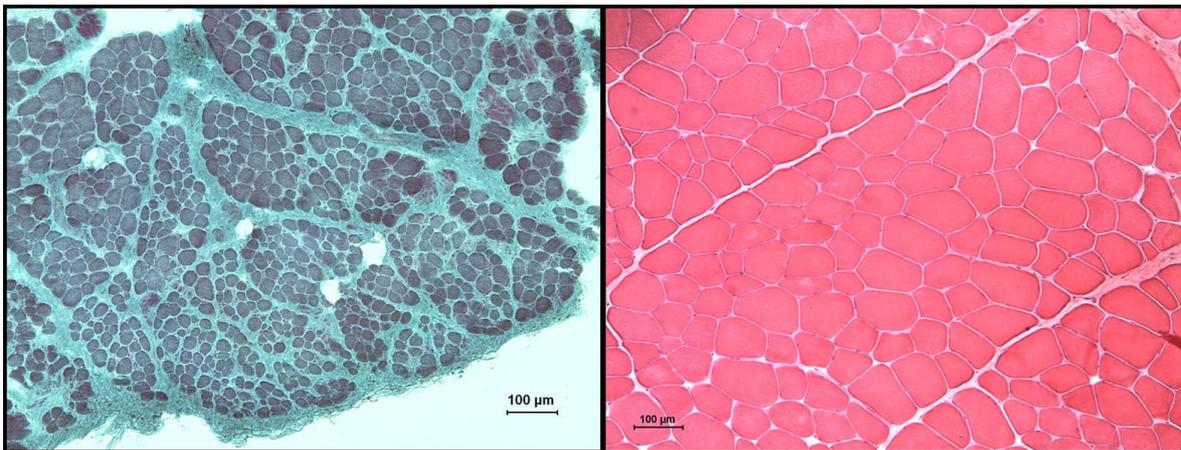


Figura 1. Secciones transversales de un músculo del globo ocular (imagen izquierda; Tricrómico de Gomori) y del músculo semitendinoso de vacuno (imagen derecha; H &E). Se aprecia la diferente constitución que ofrecen los fascículos de acuerdo con el grado de especialización muscular. (Fuente: Grupo de investigación Anatomía y Embriología Veterinaria. Universidad de Murcia).

Dentro de cada fascículo pueden diferenciarse dos tipos de fibras musculares: las **fibras extrafusales**, repartidas de forma mayoritaria por todo el fascículo, que responden a la descripción propia del miocito, y las **intrafusales** situadas dentro de los **husos neuromusculares**. Éstos se definen como mecanorreceptores que responden específicamente a las variaciones pasivas o activas de la longitud del músculo (Maillet, 1980). Están formados por tejido conjuntivo que contiene fibras nerviosas sensoriales (aférentes) y motoras (eferentes), y fibras musculares intrafusales que difieren claramente del miocito típico respecto a la posición de sus núcleos, ya que se sitúan formando una

cadena a lo largo de las fibras (núcleos en cadena) o concentrándose en una dilatación de la misma (saco nuclear).

III.2. TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES

III.2.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Cuando en 1678 Stefano Lorenzini* clasificó a los músculos de los mamíferos en rojos y blancos, diversos investigadores iniciaron una serie de trabajos tendentes a buscar una explicación a tal hecho, relacionando el color del músculo con características estructurales y fisiológicas propias de la fibra muscular. Fue a mediados del siglo XIX cuando Ranvier* (1873, 1874, 1880) llevó a cabo estudios muy extensos sobre músculos de conejo, estableciendo una correlación entre el color muscular y la velocidad de contracción. Observó que las fibras de los músculos rojos eran más oscuras y tenían un aspecto más granular que la de los músculos blancos. Fue por tanto el primero en establecer una clasificación fibrilar, cataloga a los miocitos en rojos y blanco y le asigna una velocidad de contracción: los músculos rojos se contraen más lentamente que los músculos blancos.

El mayor o menor contenido en gránulos de la fibra muscular permitió a Kolliker* (1857) establecer una clasificación fibrilar que fue corroborada posteriormente por Grutzner* (1884). Este último autor señaló que el color rojo dependía de la presencia de gránulos sarcoplásmicos, que además eran más abundantes en las fibras de menor tamaño. En 1890, Retzius* propone que dichos gránulos sean denominados "sarcosomas" (mitocondrias). En este sentido, Knoll* (1891) sugiere catalogar a las fibras dependiendo de su riqueza o pobreza en sarcoplasma: fibras oscuras y fibras claras, respectivamente. Observó además, que los músculos implicados en funciones más constantes (respiratorios, oculomotores y masticadores) contenían una mayor proporción de fibras oscuras y que muchos de los gránulos presentaban naturaleza lipídica. Asimismo, indicó

que los músculos podían estar formados únicamente por fibras rojas o blancas, o bien ser mixtos.

Mediante tinción selectiva de lípidos con la técnica del sudán III, Bullard* (1919) logra diferenciar por vez primera tres tipos de fibras en el músculo del gato. En base a su mayor o menor contenido en grasa clasifica a las fibras en oscuras, intermedias y claras, respectivamente. Indica también, que la proporción y tamaño de las fibras varía dependiendo del músculo que se analiza. Denny y Braund* (1929), de acuerdo con este planteamiento, tratan de establecer una correlación entre las características histológicas de estas fibras y la velocidad de contracción de los músculos del gato, pero no encuentran relación alguna.

Años más tarde, Besley y Hoerr* (1934) utilizan la centrifugación para localizar ciertas enzimas de diferentes fracciones musculares y demuestran que existe una correlación entre la densidad mitocondrial y la actividad respiratoria. Los estudios posteriores de Paul y Sperling* (1952) confirman dicha correlación, pues observan que la actividad respiratoria es mucho más baja en los músculos pobres en mitocondrias (músculos blancos) que en los músculos ricos en mitocondrias (músculos rojos).

III.2.2. HISTOQUÍMICA MUSCULAR

La aparición de las técnicas histoquímicas a mediados del siglo XX supuso un vuelco espectacular en relación con las clasificaciones establecidas hasta el momento de la fibra muscular. La aplicación de estas novedosas técnicas sobre las secciones transversales del tejido muscular permite la localización de algunas enzimas y otros componentes químicos a nivel celular en el músculo esquelético. Con su aplicación se consigue evidenciar la existencia de notables diferencias metabólicas y funcionales entre los distintos tipos de fibras, demostrándose que hay una correlación directa entre la morfología fibrilar y la actividad funcional. Asimismo, se introduce el término “mosaico fibrilar”: los tipos de fibras en el

músculo de los mamíferos se encuentran distribuidas de manera entremezclada y no necesariamente agrupadas.

Principalmente han sido dos los métodos histoquímicos desarrollados para poder diferenciar los distintos tipos de fibras. Uno de ellos se basa en la actividad de la enzima adenosintrifosfatasa miofibrilar o miosínica (mATPasa), y el otro, en la detección de enzimas relacionadas con los metabolismos aerobio y anaerobio.

La detección de la actividad succinicodehidrogenasa (SDH) permitió a Ogata (1958) clasificar en tres tipos las fibras de los músculos en anfibios, peces, aves y mamíferos: fibras pequeñas, rojas, con alta actividad enzimática; fibras grandes, blancas, de escasa actividad y fibras intermedias, tanto en tamaño como en actividad SDH. Resultados similares obtienen también con esta técnica en la rata, Seligmang y Rutenburg (1951) y Padykula (1952). La actividad de la enzima SDH es estudiada también por Wachstein y Meisel (1955) y por Buño y Germino (1958), comparando diferentes músculos entre sí. Señalan que existe una mayor proporción de fibras con alta actividad SDH en los músculos masetero y diafragma que en los músculos de los miembros. Nachmias y Padykula (1958), en relación también con esta enzima, determinan que las fibras pequeñas, con actividad SDH más elevada, contienen un mayor número de mitocondrias por unidad de área.

Una relación recíproca entre la actividad de varias enzimas mitocondriales oxidativas y la actividad glucolítica de la fosforilasa fue encontrada por Dubowitz y Pearse (1960) al analizar músculos de diferentes especies (rata, paloma, humano). En base a estos resultados establecieron por primera vez una clasificación con criterios enzimáticos, catalogando a las fibras de la siguiente forma:

Fibras tipo 1: de menor diámetro, con alta actividad oxidativa y baja glucolítica

Fibras tipo 2: de mayor diámetro, con baja actividad oxidativa y alta glucolítica.

Este trabajo puso en evidencia la existencia de dos fuentes energéticas a utilizar por las fibras durante la contracción. Así, mientras que las fibras tipo 1 utilizarían los lípidos para obtener su energía, las tipo 2 recurrirían al glucógeno almacenado intracelularmente. Se sugirió, por tanto, que el elevado número de mitocondrias y la alta actividad oxidativa mostrada por las fibras tipo 1 estaría en relación con contracciones largas y sostenidas en el tiempo. Por el contrario, las fibras tipo 2 actuarían en movimientos rápidos y de escasa duración. También se llegó a la conclusión que los mencionados tipos de fibras, 1 y 2, se correspondían claramente con las fibras “rojas” y “blancas” descritas por los primeros investigadores.

Analizando biopsias de músculo esquelético humano, Engel (1962) clasificó a las fibras en dos tipos, pero en este caso tomando como criterio el tipo de actividad mostrado por la enzima adenosín trifosfatasa (ATPasa). Para ello aplicó una técnica descrita previamente por Padykiula y Herman (1955) y denominó a las fibras como tipos I y II, con baja y alta actividad ATPasa, respectivamente. Tres años más tarde, Bárány et al. (1965) demostraron que la actividad mATPasa guardaba relación con la velocidad de contracción muscular, de tal manera que las fibras tipo I son de contracción lenta y las tipo II de contracción rápida.

Tres tipos de fibras fueron identificados este mismo año por Stein y Padykula (1962), en base a las reacciones de la SDH, ATPasa y esterases, trabajando sobre el músculo gastronemio de la rata. Aplicaron la denominación de tipos “A”, “B” y “C”, de tal manera que el tipo A se correspondería con la clásica fibra blanca de gran tamaño, mientras que los tipos B y C se encuadrarían dentro de las fibras clásicas rojas. Para los autores, la actividad SDH mostrada por las fibras tenía una relación muy estrecha con el número de mitocondrias. Éste sería

muy escaso en las fibras tipo A, muy elevado en las tipo C y con valores intermedios en las tipo B.

Combinando técnicas histoquímicas y bioquímicas, Romanul (1964) llega a identificar hasta 8 tipos fibrilares distintos que incluye en tres grupos principales: fibras tipo I, tipo II y tipo III. Las tipo I se corresponderían con las clásicas fibras blancas, presentando bajo metabolismo oxidativo, alta capacidad glucolítica (metabolismo anaerobio) y bajo contenido en lípidos y mioglobina. Las tipo II tenían alta capacidad tanto oxidativa como glucolítica, gran contenido en mioglobina y moderado contenido en lípidos. Las fibras tipo III se caracterizaban por su alta capacidad oxidativa, baja capacidad glucolítica, gran cantidad de mioglobina y moderada cantidad de lípidos. Los dos últimos tipos se corresponderían con las clásicas fibras rojas.

A estas denominaciones siguieron otras, creándose cierta confusión al no adoptarse un sistema único de nomenclatura y usar distintos criterios a la hora de la clasificación fibrilar. En este sentido, Gauthier y Padykula (1966) y Gauthier (1969), analizando el músculo diafragma de varios mamíferos y el músculo semitendinoso del gato, respectivamente, proponen clasificar a las fibras en tres tipos: "rojas", "blancas" e "intermedias", en base a estudios ultraestructurales de las mitocondrias. Las llamadas fibras rojas eran las de menor tamaño y presentaban grandes mitocondrias, con abundantes crestas, distribuidas entre las miofibrillas y junto al sarcolema (disposición subsarcolémica). Las fibras blancas, las de mayor tamaño, presentaban grandes mitocondrias, con escasas crestas, dispuestas principalmente en relación con el sarcolema. Las fibras intermedias tenían características similares a las de las fibras rojas, pero con un número menor de mitocondrias. El uso de esta nomenclatura estaba basado en la relación existente entre el color que ofrecía el músculo y la proporción de cada una de estas fibras (Gauthier, 1969).

La observación de que las miosinas rápida y lenta tienen diferente estabilidad alcalina y ácida (Sréter et al., 1966; Seidel, 1967), sirvió para elaborar métodos más precisos en la determinación de la actividad mATPasa. Previamente, Stein y Padykula (1962), advirtieron que existían diferentes fibras rápidas (tipo II) al comprobar comportamientos distintos de su ATPasa frente a preincubaciones con formaldehído. Con posterioridad, Guth y Samaha (1969) y Samaha et al. (1970) usando una combinación de diferentes pH y sensibilidad de la actividad mATPasa al formaldehído, consiguieron evidenciar tres tipos de miocitos. Optaron por denominar a las fibras como tipos α , β , y $\alpha\beta$. Las fibras α (fibras rápidas) presentaban una actividad mATPasa alcalino-estable y ácido-lábil; las tipo β (fibras lentas) una actividad alcalino-lábil y ácido-estable, y las $\alpha\beta$ (fibras rápidas) mostraban características intermedias a las dos anteriores.

Aprovechando la diferente ácido-estabilidad de la enzima ATPasa, Brooke y Kaiser (1970) realizan preincubaciones ácidas a pH 4.6 y 4.3 y establecen en el músculo humano una clasificación basada también en la diferente actividad de la enzima ATPasa, pero sugiriendo otra denominación. Este cambio detectado en el comportamiento de la enzima ATPasa tras la preincubación en una solución ácida afectaba directamente al grado de intensidad de la tinción de las fibras (Figura 2). Así, aunque diferencian dos tipos principales denominados I y II, dentro de éstas últimas llegan a evidenciar tres subtipos (IIA, IIB y IIC). Las características de estas fibras serían las siguientes:

Fibras tipo I: actividad mATPasa alcalino-lábil y ácido-estable. No se tiñen a preincubaciones alcalinas y lo hacen fuertemente a preincubaciones ácidas.

Fibras tipo IIA: actividad mATPasa alcalino-estable y ácido-lábil. No se tiñen frente a preincubaciones ácidas y lo hacen ante preincubaciones alcalinas

Fibras tipo IIB: actividad mATPasa alcalino-estable y parcialmente ácido-estable. Se tiñen fuertemente frente a preincubaciones alcalinas, moderadamente a preincubaciones ácidas a pH 4.6 y no se tiñen por debajo de este pH

Fibras tipo IIC: actividad mATPasa alcalino-estable y ácido-estable. Estas fibras se tiñen tanto a pH alcalinos como ácidos (tinción moderada a pH 4.6 y 4.3). Su actividad desaparece con preincubaciones de pH inferiores a 3.9.

Trabajos posteriores (Brooke et al., 1971) confirmaron que las fibras IIC eran muy escasas en los músculos del adulto y que podría tratarse de fibras en diferenciación hacia los tipos IIA o IIB.

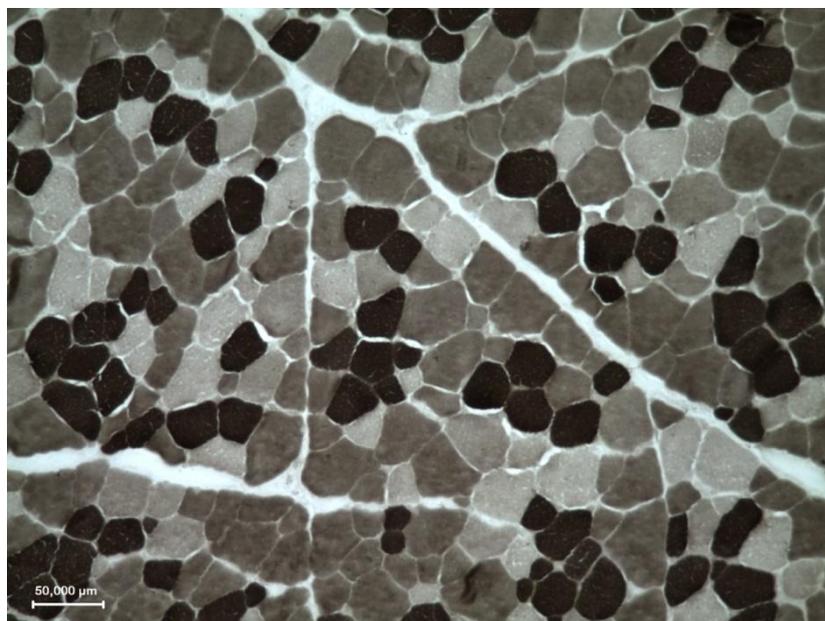


Figura 2. Sección transversal del músculo longísimo lumbar (cerdo de 45 días). Técnica mATPasa tras preincubación ácida pH 4.6. Se aprecian tres tipos de fibras, I (oscuras), IIA (claras) e IIB (intermedias). (Fuente: Grupo de investigación Anatomía y Embriología Veterinaria. Universidad de Murcia).

Comparando la actividad oxidativa (enzima SDH) con la actividad glucolítica (enzima fosforilasa) y adoptando la terminología propuesta por Samaha et al. (1970), Ashmore y Doerr (1971) establecen una nueva clasificación cuando estudian el músculo esquelético en pollos, ratones, cerdos y bovinos. De esta

forma surge la clasificación de las fibras en tipos α W (fibras “white”, blancas, con ATPasa ácido-lábil), α R (“red”, rojas, con ATPasa alcalino-lábil) y β R (“red”, rojas, con ATPasa ácido-lábil).

Por su parte, Peter et al. (1972) proponen una nueva nomenclatura al estudiar músculos del miembro pelviano en conejo y cobaya. Para ello emplean tres criterios: capacidad oxidativa y/o glucolítica de las fibras, y velocidad de contracción de las mismas (Figura 3). Describen tres tipos principales de fibras que denominan así:

Fibras SO (slow-oxidative): de contracción lenta y alta capacidad aerobia (oxidativa).

Fibras FG (fast-glycolytic): de contracción rápida y alta capacidad anaerobia (glucolítica).

Fibras FOG (fast-oxidative-glycolytic): de contracción rápida y metabolismo oxidativo y glucolítico.

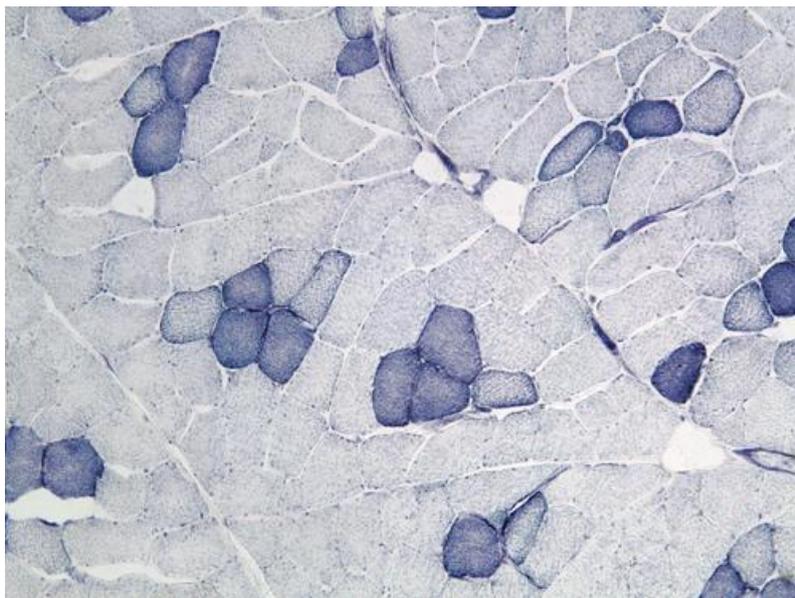


Figura 3. Sección transversal del músculo longísimo lumbar (cerdo adulto). Técnica NADH-TR. Se aprecian tres tipos de fibras, SO (oscuras), FG (claras) y FOG (intermedias). (Fuente: Grupo de investigación Anatomía y Embriología Veterinaria. Universidad de Murcia).

Aunque la clasificación establecida por Brooke y Kaiser (1970) es la que ha tenido mayor aceptación, muchos investigadores han seguido optando por la de Ashmore y Doerr (1971), e incluso por la de Peter et al. (1972), lo que dificultó la comparación de resultados entre las distintas investigaciones y creó cierta confusión que fue advertida por algunos investigadores. Ello determinó la publicación de trabajos tendentes a utilizar un único método o a establecer posibles correlaciones entre las distintas denominaciones otorgadas a las fibras.

Así, Dubowitz y Brooke (1973) proponen un sistema de clasificación basado en el empleo exclusivo de la reacción oxidativa (enzimas SDH o NADH-TR) o de la reacción ATPasa. La técnica para la ATPasa permitiría evidenciar hasta cuatro tipos: I, IIA, IIB y IIC, mientras que la reacción oxidativa otorgaría a cada una de ellas el perfil metabólico: la capacidad oxidativa es siempre elevada en las fibras tipo I, baja en las IIB, moderada en las tipo IIA y alta en las tipo IIC. Asimismo, sugieren que se debe tener cuidado a la hora de extrapolar resultados entre especies o entre diferentes músculos dentro de una misma especie, ya que hasta el momento sólo se han realizado estudios parciales que establecen una correlación entre propiedades histoquímicas, histológicas y funcionales en algunas entidades musculares.

Aunque inicialmente se estimó que podría existir una correlación entre las fibras α , β , y $\alpha\beta$ (Samaha et al., 1970) con los tipos I, IIA y IIB (Brooke y Kaiser, 1970) y con las fibras SO, FOG y FG (Peter et al., 1972), más tarde se comprobó que los sistemas utilizados para obtener dichas clasificaciones no eran del todo compatibles. Por lo tanto, no está justificado asumir que las propiedades metabólicas se corresponden con la actividad mATPasa y diversos autores (Nemeth et al., 1979; Nemeth y Pette, 1980, 1981^a) han indicado que ambos sistemas son incompatibles. Además, la mayoría de los esquemas de clasificación realizados se han llevado a cabo a partir de unos pocos músculos y en un número de especies relativamente pequeño. Concretamente, Green et al., (1982) demostraron que aunque la correspondencia entre las fibras tipo I y las fibras α

era total, había variaciones significativas al comparar entre sí los subtipos rápidos IIA y IIB con los tipos β y $\alpha\beta$, respectivamente. Por otra parte, dichas diferencias variaban en relación con la especie. Advierten que esta incompatibilidad podría deberse a la existencia de subpoblaciones adicionales de fibras rápidas que se expresan en diferentes músculos y en distintas especies. Es por ello que la nomenclatura fibrilar que se utilice debe responder al tipo de metodología aplicada.

A continuación se muestran en la Tabla I las diferentes clasificaciones de los tipos de fibras en las últimas décadas.

	Referencias	Tipos Fibrilares		
	Dubowitz y Pearse, 1960 a,b	<i>I</i>		<i>II</i>
	Engel, 1962.			
	Stein y Padykula, 1962.	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
	Moody y Cassens, 1968	<i>Rojas</i>	<i>Intermedias</i>	<i>Blancas</i>
	Gauthier, 1970.			
Propiedades	Brooke y Kaiser, 1970.	<i>I</i>	<i>IIA</i>	<i>IIB</i>
	Ashmore y Doerr, 1971.	βR	αR	αW
	Peter et al., 1972	<i>SO</i>	<i>FOG</i>	<i>FG</i>
	Solomon y Dunn, 1988.			
	Schiaffino et al., 1988,1989	<i>SO</i>	<i>FOG</i>	<i>FG</i>
	Gorza, 1990.			
Fisiología	Velocidad de contracción.	Lenta	Rápida	Rápida
	Resistencia a la fatiga.	+++	+++	+
Morfología	Color.	Roja	Roja	Blanca
	Área seccional.	+	+++	+++
Metabolitos	Glucógeno.	+	+++	+++
	Lípidos.	+++	+++	+
Propiedades enzimáticas	Actividad mATPasa.	+	+++	+++
	Enzimas glucolíticas.	+	++	+++
	Enzimas oxidativas.	+++	++	+

Tabla I. Características principales de los tipos fibrilares según diversos autores

Procedimientos complementarios para la clasificación de las fibras de acuerdo con la actividad mATPasa, fueron realizados modificando el método original establecido por Padykula y Herman en 1955 (Meijer, 1970; Khan et al., 1972; Müntener, 1979; Mabuchi y Sreter, 1980; Gollnick et al., 1983; Staron et al., 1983; Gollnick y Matoba, 1984; Matoba y Gollnick, 1984). Las modificaciones no sólo confirmaron la existencia de nuevos subtipos de fibras rápidas, sino que también permitieron la identificación de subtipos dentro de las fibras lentas. De esta forma surgió la subdivisión de las fibras tipo I en subtipos IA y IB (Jennekens et al., 1974; Khan et al., 1974; Askanas y Engel, 1975; Karpati et al., 1975; Dekleva y Sirca, 1978; Khan, 1978; Gollnick et al., 1983; Smith et al., 1987). Se establecieron también subtipos en las fibras IIC (Jansson et al., 1978; Staron y Pette, 1986) y se describieron las fibras IIAB y IIAC, es decir, fibras con características intermedias a las tipo IIA y IIB, y a las tipo IIA y IIC, respectivamente (Andersen y Henriksson, 1977; Ingjer, 1978; Staron et al., 1983; Gil et al., 2001b).

Estudios más recientes, basados en la aplicación de anticuerpos monoclonales y en el empleo de preincubaciones alcalinas y ácidas para la técnica mATPasa, han permitido en determinados mamíferos: rata, ratón, cobaya y conejo, la distinción de un nuevo tipo de fibra rápida denominada IID o IIX (Gorza, 1990; Hämmäläinen y Pette, 1993). Estas fibras poseen características intermedias entre las tipo IIA y IIB respecto a los enzimas oxidativos (Schiaffino et al., 1986; Schiaffino et al., 1989), actividad mATPasa (Gorza, 1990; Latorre et al., 1993), resistencia a la fatiga (Larsson et al., 1991) y velocidad de contracción (Bottinelli et al., 1994). Dichas modificaciones también han permitido identificar histoquímicamente las fibras tipo II propias del perro (Latorre et al., 1993) y un nuevo tipo de fibra en los músculos del cerdo, que podría corresponder a las referidas tipo IIX (Gil et al., 2001a).

Todos estos resultados permitieron aventurar la hipótesis relacionada con la “plasticidad muscular”: las fibras musculares presentan una dinámica natural

(Pette y Staron, 1988); es como si existiera un "continuum" de tipos de fibras. Por todo ello, algunos autores piensan que la clasificación histoquímica de las fibras es una simplificación de lo que en realidad sucede, sobre todo si se tiene en cuenta la capacidad que presenta el miocito para adaptarse al trabajo muscular requerido en cada situación.

III.2.3. INMUNOHISTOQUÍMICA MUSCULAR

El poder antigénico de la miosina ha servido para incorporar las técnicas inmunohistoquímicas al estudio del músculo esquelético. Se ha podido demostrar que cada uno de los tipos de fibras evidenciados mediante técnicas histoquímicas presenta una isoforma propia de miosina, y que el grado de tinción que se obtiene mediante las técnicas de mATPasa está en relación con el tipo y cantidad de miosina que presenta la fibra (Staron y Pette, 1986 1987 a, b; Termin et al., 1989). Por lo tanto, los tipos de fibras que tienen diferente actividad mATPasa contienen distintas isoformas de miosina (Weeds, 1980). Dichas miosinas se diferencian entre sí 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). La molécula de miosina, parte fundamental de los filamentos gruesos de las miofibrillas, se compone de dos cadenas pesadas (MHC) y cuatro cadenas ligeras (MLC). En los últimos años han sido identificadas múltiples isoformas de cadenas pesadas y ligeras de miosina en el músculo esquelético de los mamíferos domésticos y se ha podido demostrar que ambos tipos de cadena juegan un papel fundamental en las propiedades contráctiles del músculo (Bottinelli et al., 1994). La distribución de estas isoformas varía entre los distintos tipos de fibras, identificándose, en primer lugar, mediante la aplicación de anticuerpos monoclonales, las miosinas existentes en los tipos histoquímicos de fibras I y II: miosina de tipo lento "slow-twitch" y de tipo rápido "fast-twitch" IIa y IIb. Más recientemente, una tercera población de fibras tipo II, conteniendo una cadena pesada de miosina distinta (MHC IIx), ha podido ser identificada en los músculos esqueléticos de la rata,

ratón y cobaya (Schiaffino et al., 1989). Esta miosina se corresponde con la llamada miosina IId descrita mediante electroforesis en músculos de rata y conejo (Bär y Pette, 1988; Termin et al., 1989; Aigner et al., 1993). Otros tipos de miosinas identificados han sido los siguientes: miosina lenta “slow-tonic”, presente en músculos de anfibios, peces, reptiles y aves, y probablemente también en los músculos extraoculares de los mamíferos (Pierobon-Bormioli et al., 1980); dos miosinas cardíacas: atrial y ventricular (Whalen et al., 1981; Narusawa et al., 1987); dos miosinas presentes durante el desarrollo: embrionario y neonatal; además de otras miosinas presentes en fibras de contracción rápida de determinados músculos esqueléticos: masticadores (fibras tipo IIM), músculos estriados del esófago (fibras Iloes), fibras Ileo de los músculos del globo del ojo (Wieczorek et al., 1985; Sartore et al., 1987) y fibras Ildog de los músculos apendiculares del perro (Snow et al., 1982). La existencia, por tanto, de un rango considerable de fibras de contracción rápida que contienen isoformas diferentes de miosina, podría ser la respuesta del músculo a las diversas y variadas necesidades funcionales (Mascarello et al., 1986).

Estudios muy recientes parecen confirmar la existencia de MHC IIX en músculos de vertebrados de mayor tamaño, como la propia especie humana (Smerdu et al., 1994), el caballo (Serrano et al., 1996; López-Rivero et al., 1998) y el cerdo (Lefaucheur et al., 1998). Por otra parte, se ha establecido la diferencia entre las llamadas fibras “puras”, integradas de forma exclusiva por un determinado tipo de miosina, y las fibras “híbridas”, es decir aquéllas que coexpresan 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 concreto, Staron y Pette (1987) ya advirtieron que el tipo histoquímico IIC coexpresaba MHC I y IIa, aunque posteriormente Schiaffino et al. (1986) observaron en estas fibras la presencia de miosina embrionaria y neonatal. Las fibras híbridas fueron primeramente detectadas en músculos sometidos a experimentación, como son los procesos de transformación de músculos rápidos en lentos por estimulación

crónica a bajo frecuencia (Termin et al., 1989). Su presencia en músculos “normales”, aunque en menor cantidad, sugiere la posibilidad de que estos tipos constituyan también una población estable, que sería utilizada por el músculo para un ajuste continuo ante las demandas funcionales. Además, en el cerdo, Lefaucheur et al (1998) indican que el 25% de las fibras existentes en el músculo longísimo son fibras híbridas tipo IIX/IIB. Dado que estas fibras podrían ser fibras en transición hacia fibras puras, Hämäläinen y Pette (1993) sugieren una sintonización muy precisa entre las MHCs IIX y IIB, lo que denotaría una alta plasticidad de la composición fibrilar.

En definitiva, las técnicas inmunohistoquímicas parecen ser las más adecuadas a la hora de estudiar y catalogar los tipos de fibras que integran el músculo esquelético (Figura 4). Sin embargo, requieren el aislamiento de proteínas puras para inducir la producción de anticuerpos, hecho que limita su aplicación rutinaria, máxime cuando tan sólo dos anticuerpos, anti-slow y anti-fast, se pueden adquirir a través de casas comerciales (Gollnick et al., 1983). Asimismo, se ha podido constatar que aunque la reacción mATPasa es una técnica histoquímica semicualitativa, este método parece ser extremadamente sensible respecto al contenido de cadena pesada de miosina (Staron y Pette, 1986).

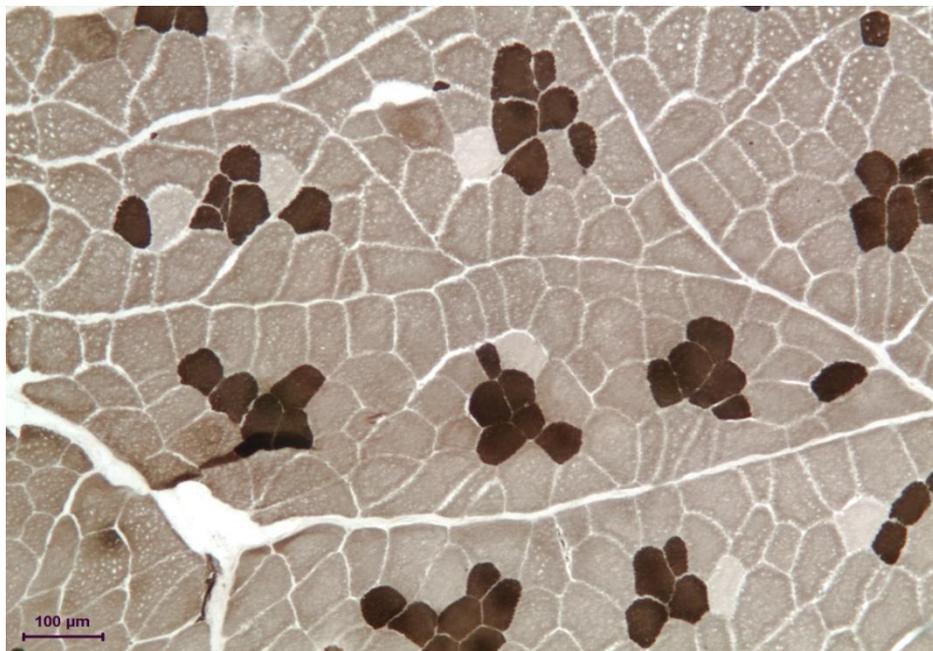
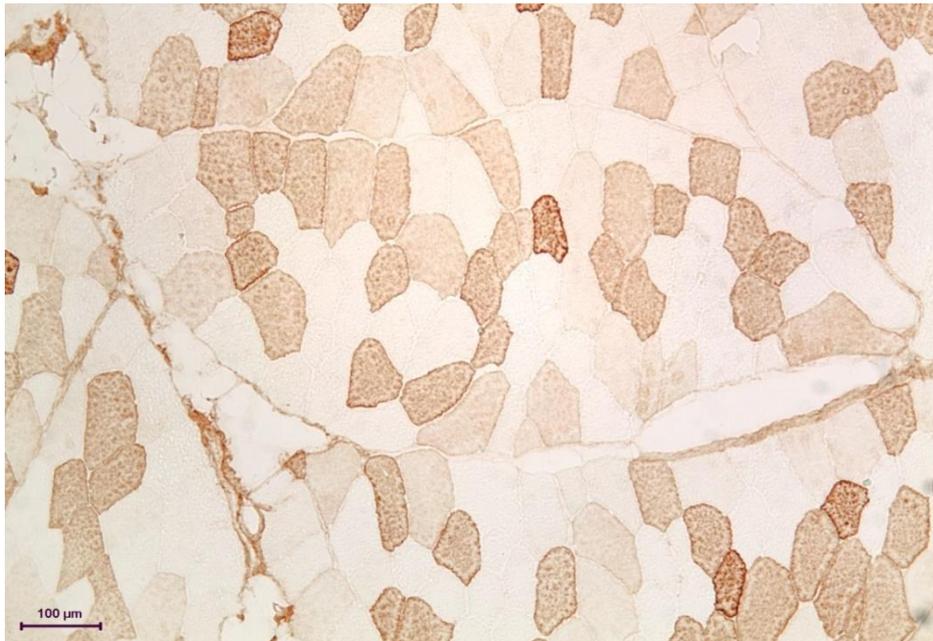


Figura 4. Tipos de fibras en el M. longísimo lumbar de cerdo tras la aplicación de anticuerpo monoclonal MyHC BF-35 (anti-2x) y su comparación con la técnica mATPasa pH 4.6. Las fibras marcadas con el anticuerpo son todas las que contienen, en mayor o menor proporción, miosina tipo IIx (fibras híbridas). (Fuente: Jiménez García C., Tesis Doctoral Universidad de Murcia, 2009)

III.2.4. TIPOS DE FIBRAS EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DEL VACUNO

Las referencias sobre el comportamiento histoquímico de los distintos tipos de fibras integrantes de la musculatura esquelética del ganado vacuno son por lo general escasas. La mayoría de ellas se encuadran en un contexto más amplio relacionado con diferentes parámetros que estiman la calidad de la carne. Por supuesto, no hemos encontrado referencia bibliográfica alguna de esta naturaleza en el toro de lidia, al margen de las ya citadas en el epígrafe de Introducción.

De acuerdo con la nomenclatura propuesta por Ashmore y Doerr (1971), Hunt y Hedrich (1977) describen tres tipos de fibras (α R, α W y β R) en los músculos longísimo, psóas mayor, glúteo medio, semitendinoso y semimembranoso de ganado USDA Choice. Esta clasificación la fundamentan en el empleo de técnicas mATPásicas, según el método Padikula y Herman (1955), modificado por Guth y Samaha (1969), y técnicas de NADH-TR (Engel y Brooke, 1966). En sus resultados refieren la existencia de diferencias significativas entre los músculos estudiados respecto a los tipos de fibras observadas, área de las mismas, longitud del sarcómero, color, porcentaje de reflectancia, contenido en mioglobina y hemoglobina, pH, etc. Idénticos tipos fibrilares describen May et al. (1977) cuando analizan, mediante técnicas de mATPasa y DPNH, el músculo longísimo de diferentes cruces entre distintas razas de ganado vacuno (Simmental x Angus; Hereford x Angus y Limousin x Angus). Refieren los autores que en el cruce Limousin x Angus predominan las fibras α W, y éstas son más abundantes en la zona lateral del músculo que en la medial. Asimismo, constatan la no existencia de diferencias respecto a los diámetros de los tres tipos de fibras en los cruces analizados. Sin embargo, en todos ellos, las fibras α W resultan siempre de mayor diámetro que las α R y las β R, siendo estas últimas las más pequeñas.

La nomenclatura propuesta por Ashmore y Doerr (1971) es también utilizada por Solomon y Dunn (1988), cuando estudian el músculo longísimo del dorso en ocho toros de 16 meses de edad. Realizan una combinación de técnicas histoquímicas sobre un mismo corte y concluyen que en el músculo de vacuno la incubación para la técnica SDH, seguida de la tinción mATPasa a pH 4.15 y de la hematoxilina-eosina, son las más efectivas para distinguir los tres tipos de fibras: α R (tinción más oscura), β R (tinción intermedia) y α W (tinción clara).

El músculo semitendinoso de cinco toros noruegos fue analizado por Totland et al. (1988), quienes mediante técnicas de mATPasa a pH de preincubación 10.3, 4.6, 4.3 y metabólicas de NADH-TR, clasifican a las fibras como tipos I, IIA, IIB y IIC, siguiendo la nomenclatura propuesta por Brooke y Kaiser (1970). Indican que las fibras tipo I incrementan su porcentaje hacia las zonas profundas del músculo (30%), y son más escasas en las zonas superficiales (10%). Por su parte, las fibras IIB tienen una distribución opuesta a las tipo I, con un mayor porcentaje en las zonas periféricas que en las profundas. Las fibras IIA muestran una distribución más homogénea, en tanto que las IIC nunca superan el 1% del total. Respecto al tamaño, también encuentran variaciones dependiendo de la zona muscular considerada. Así, las fibras IIB son las más grandes en la zona superficial y lateral del músculo, mientras que en las zonas profundas son las tipo I las que ostentan el mayor tamaño. Destacar pues la importancia que tiene el lugar de toma de las muestras a la hora de establecer datos concluyentes sobre porcentajes y tamaños fibrilares.

Un estudio mucho más completo sobre esta misma raza (toro rojo de Noruega) lo llevan a cabo Totland y Kryvi (1991) en el que analizan, desde el punto de vista histoquímico, un total de treinta y cuatro músculos. En este trabajo las fibras son también clasificadas como I, IIA, IIB y IIC, advirtiéndose la existencia de los tipos I, IIA y IIB en todos los músculos considerados, con las excepciones del músculo sóleo donde no se hallaron fibras IIA y del músculo esternomandibular carente de fibras IIB. Refieren los autores que aunque las

fibras tipo I, IIA y IIB mostraron alta, moderada y baja actividad NADH-TR, respectivamente, se observan grandes variaciones relativas en su capacidad oxidativa. La capacidad oxidativa también varió dependiendo del músculo estudiado, siendo muy elevada en los músculos infraespinoso y semiespinal de la cabeza. Respecto a los porcentajes fibrilares, de forma general, comentan que varían considerablemente entre músculos del miembro torácico y músculos del miembro pelviano. Señalan, además, que los músculos implicados en el mantenimiento de la verticalidad y posición son particularmente ricos en fibras tipo I, mientras que los músculos antagonistas antigraavitatorios (músculos latísimo del dorso, braquial y bíceps braquial) presentan todos un mayor porcentaje de fibras IIB (55%) que de tipo I (20%).

III.2.5. TIPOS DE FIBRAS Y FUNCIÓN MUSCULAR

La identificación de los tipos de miocitos, bien sea desde el punto de vista histoquímico o mediante la aplicación de anticuerpos monoclonales, ha estado siempre relacionada con los aspectos funcionales del músculo esquelético. Ya en 1970, Schiaffino et al. indicaron que la clasificación de las fibras musculares no debe basarse en una sola propiedad, sino que se deben tener en cuenta diversos aspectos: histoquímicos, morfológicos, funcionales, etc... Señalan también que la estructura de la fibra muscular resulta de la expresión de dos parámetros funcionales: velocidad de contracción y resistencia a la fatiga.

La velocidad de contracción está en relación directa con la actividad de la ATPasa miosínica (Bárány, 1967), que, como ya sabemos, puede ser determinada mediante técnicas histoquímicas (Guth y Samaha, 1969; Brooke y Kaiser, 1970), mientras que la resistencia a la fatiga depende de la capacidad oxidativa (Kugelberg y Edstrom, 1968; Burke et al., 1971, 1973 y 1974) y de la presencia de glucógeno. Así, a mayor capacidad oxidativa mayor resistencia a la fatiga, y a mayor cantidad de glucógeno intrafibrilar mayor facilidad para fatigarse. Se comprobó también que las fibras tipo II (alta actividad mATPasa frente a pH

alcalinos) eran de contracción rápida, mientras que las de tipo I (baja actividad mATPasa frente a preincubaciones ácidas) eran de contracción lenta (Guth y Samaha, 1969).

Estudiando el músculo gastronemio del gato, Burke et al. (1971, 1973) clasifican a las fibras de acuerdo con su velocidad de contracción, integrándolas en tres unidades motoras principales:

Unidad motora tipo "S": integrada por fibras con elevada capacidad oxidativa y baja actividad mATPasa (alcalino-lábil y ácido-resistente). Son fibras de contracción lenta y resistentes a la fatiga. Al ser capaces de mantener una actividad sostenida, durante largos periodos de tiempo, intervienen en las funciones posturales o de aplomo. Desde el punto de vista energético son muy eficientes y desarrollan relativamente poca fuerza. Histoquímicamente se corresponden con las fibras tipo I, ST (slow-twitch) o SO (slow oxidative).

Unidad motora tipo "FR": las fibras que la integran presentan metabolismo oxidativo y glucolítico y tienen alta actividad mATPasa (alcalino-resistente y ácido-lábil). Su contracción es rápida y también resisten la fatiga. Desde el punto de vista histoquímico se corresponden con las fibras tipo IIA, FOR (fast-twitch-red) o FOG (fast-twitch-glycolytic). Son muy eficientes en aquellos movimientos que se traducen en un acortamiento muscular.

Unidad motora tipo "FF": formada por fibras con metabolismo predominantemente glicolítico y elevada actividad mATPasa (alcalino-estable; ácido-resistente a pH 4.6; ácido-lábil a pH 4.3). Histoquímicamente se corresponden con las fibras tipo IIB o FG (fast-glycolytic). Son las fibras de mayor tamaño, pero insuficientes desde el punto de vista energético. Se contraen rápidamente pero se fatigan fácilmente. Están implicadas en la realización de movimientos vigorosos rápidos.

A estos tres tipos de unidades motoras se suma una cuarta que integra a las fibras tipo IIX o IID. Se trata de fibras resistentes a la fatiga (Larsson et al., 1991) y de contracción rápida con máxima velocidad de acortamiento (Bottinelli et al., 1994).

III.2.6. ALTERACIONES MORFOLÓGICAS Y MORFOMÉTRICAS DE LA FIBRA MUSCULAR

En este apartado se definen los principales cambios patológicos que se observan en el músculo esquelético al analizar secciones transversales sometidas a distintas técnicas histoenzimáticas. Con ello pretendemos facilitar la interpretación de los hallazgos que puedan resultar de nuestro estudio. Con mayor profundidad, las lesiones o injurias son analizadas en distintos tratados específicos de miología (Dubowitz y Brooke, 1973; Sarnat, 1983; Brumback y Leeck, 1984; Dubowitz, 1985; Kakulas y Adams, 1985; Engel y Banker, 1986).

Las principales alteraciones patológicas se agrupan en tres grandes apartados:

- A. Lesiones por degeneración y regeneración.
- B. Reacciones celulares.
- C. Cambios en la arquitectura citoquímica.

A. Lesiones por degeneración y regeneración.

Se trata de alteraciones que normalmente pueden ser evidenciadas con relativa facilidad en secciones teñidas con HE (hematoxilina-eosina) o tricrómico de Gomori modificado. En función del aspecto que presentan las fibras ante estas tinciones podemos diferenciar:

A.1. Necrosis: se trata de procesos degenerativos musculares que suceden en distrofias, miopatías inflamatorias, en muchas miopatías de

origen metabólico y en estados crónicos de denervación (Sarnat, 1983). Las fibras necróticas muestran una tinción acidófila y homogénea, son fibras con aspecto “vidrioso o licuado” (Sarnat, 1983; Dubowitz, 1985). Algunos autores indican que son consecuencia de procesos degenerativos que pueden limitarse a zonas focales dentro de la propia fibra, extenderse a la totalidad de la misma e incluso afectar a un grupo de fibras vecinas (Engel y Banker, 1986) (Figura 5). Con las técnicas histológicas de rutina (H&E, Tricrómico) ofrecen una tinción muy pálida debido a la pérdida de miofibrillas y otras estructuras del sarcoplasma, por lo que también se distinguen con las técnicas histoquímicas, especialmente con la NADH-TR (Sarnat, 1983). Los estados de necrosis normalmente suelen concurrir con fagocitosis e infiltrado de células mononucleares, que a veces sólo se limitan a la porción central de la fibra (Dubowitz, 1985).

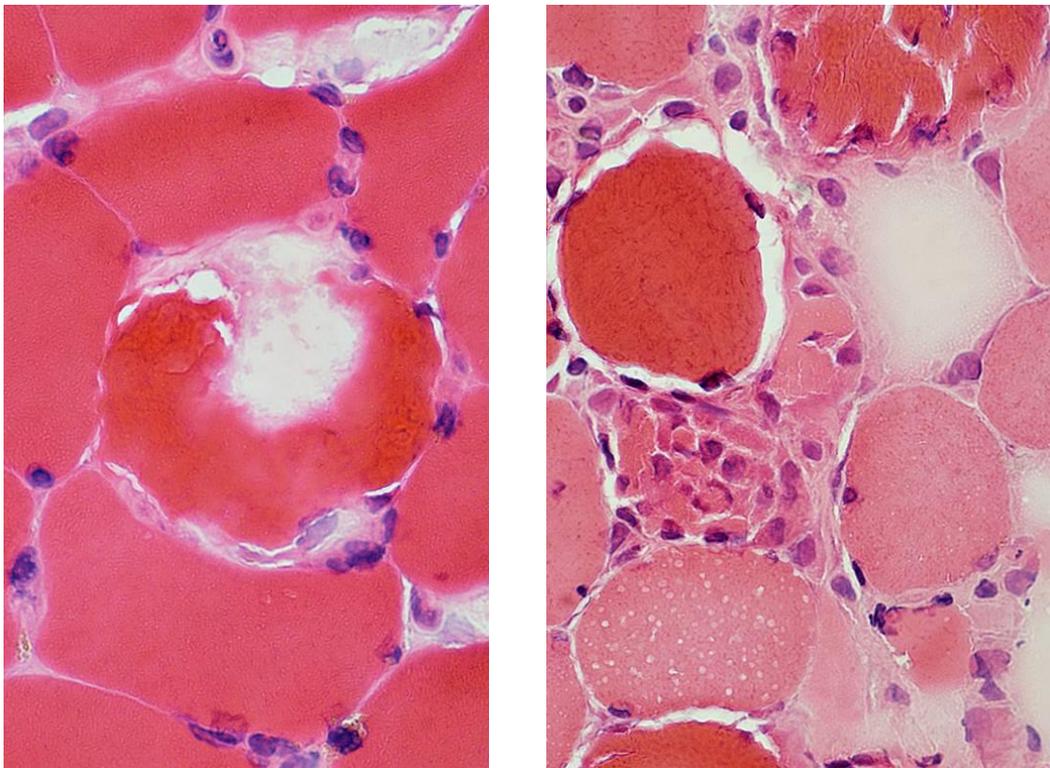


Figura 5. Aspecto que presentan las fibras musculares asociadas a procesos de necrosis. Fuente: Neuromuscular Disease Center, Washington University, St. Louis, MO USA (neuromuscular.wustl.edu/index.html)

A.2. Fibras basófilas: Una señal de regeneración muscular la representan las llamadas fibras basófilas (Dubowitz, 1985), caracterizadas por presentar un sarcoplasma de color azul ante la HE. Se observan frecuentemente en muchas miopatías y también cuando de forma experimental se realiza una isquemia o trauma en un músculo determinado (Figura 6). Desde un punto de vista histoquímico, las fibras regenerativas conforman el tipo 2C (Dubowitz, 1985). Según Sarnat (1983), la regeneración puede coexistir con la degeneración muscular, como sucede en las distrofias musculares. Para este autor, la regeneración de las fibras musculares se caracteriza por tres propiedades histológicas:

- Basofilia sarcoplásmica debida al alto contenido en ARN que presentan las fibras regeneradas.
- Proliferación acentuada de núcleos subsarcolémicos, a modo de clusters o agrupados en cadenas.
- Las fibras regenerativas son mucho más pequeñas que las normales. La actividad oxidativa (NADH-TR) de las mismas está muy aumentada e incluso aparecen teñidas de forma más intensa que las fibras tipo 1. También se tiñen fuertemente con las técnicas del PAS y mATPasa.

Engel y Banker (1986) indican que la basofilia es debida a una concentración de polisomas y ribosomas. Los gránulos de ribonucleoproteínas serían precursores en la construcción de filamentos contráctiles.

Una señal de regeneración, referida como “embrionaria”, se produce cuando existen en el músculo adulto células mononucleares y mioblastos (Engel y Banker, 1986).

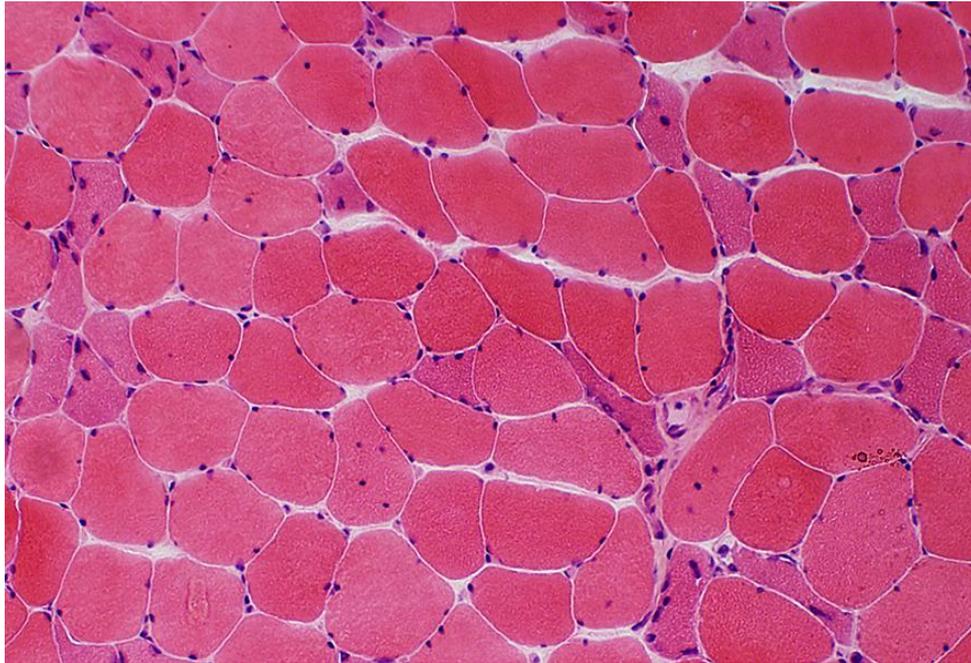


Figura 6. Aspecto característico de fibras musculares en proceso de regeneración (fibras basófilas). Fuente: Neuromuscular Disease Center, Washington University, St. Louis, MO USA (neuromuscular.wustl.edu/index.html).

A.3. Cambios del contorno de la fibra muscular: Deben ser tenidos en cuenta dentro de las alteraciones que estamos analizando. La sección transversal de la fibra muscular esquelética adulta tiene forma poligonal. Esta forma típica puede perderse, observándose entonces fibras redondeadas (Figura 7) y/o con ángulos bien marcados (Figura 8). Las fibras de contornos redondeados se tiñen más intensamente que las que les rodean por lo que son más densas y están hipercontraídas debido a un aumento de la concentración de calcio en su interior a consecuencia de daños en el sarcolema (Sarnat, 1983). Aunque este tipo de fibras pueden ser consecuencia de procesos autolíticos asociados al *rigor mortis*, también se aprecian en ciertas distrofias, polimiositis, deficiencia en vitamina E y traumas musculares (Sarnat, 1983). Dichas lesiones, aunque inespecíficas, son rasgos evidentes de que existe una miopatía (Engel y Banker, 1986).

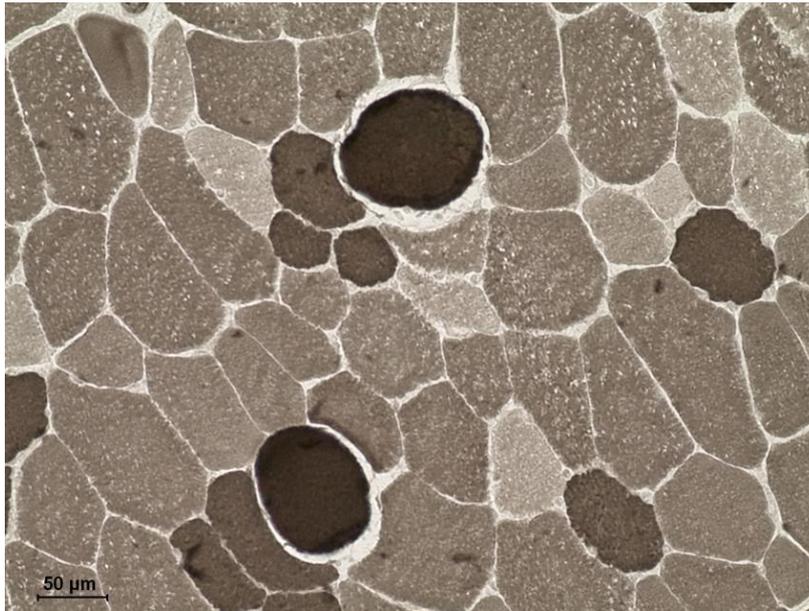


Figura 7. Presencia de fibras con pérdida del contorno poligonal y aumentadas de tamaño (fibras redondeadas gigantes). Músculo de cerdo, técnica mATPasa pH 4,6. (Fuente: Grupo de investigación, "Anatomía y Embriología, Universidad de Murcia)

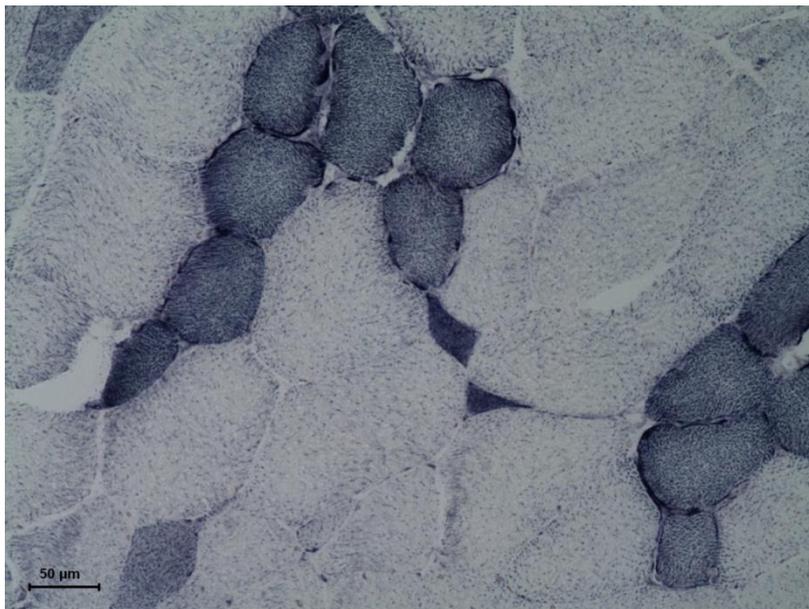


Figura 8. Presencia de fibras con perfiles angulados y escaso tamaño (fibras anguladas). Músculo de cerdo, técnica NADH-TR. (Fuente: Grupo de investigación, "Anatomía y Embriología, Universidad de Murcia)

A.4. “Splitting” o “fragmentación de la fibra muscular”: Es una alteración frecuente en las enfermedades primarias del músculo y particularmente notable en las distrofias (Engel y Banker, 1986) (Figura 9). Según Dubowitz (1985) se presenta de tres formas:

- Fibras de gran tamaño que muestran un número importante de hendiduras o fisuras.
- Fibras que presentan una división parcial tanto en la sección transversal como en la longitudinal.
- Fibras con un septo fibroso dentro del sarcoplasma.

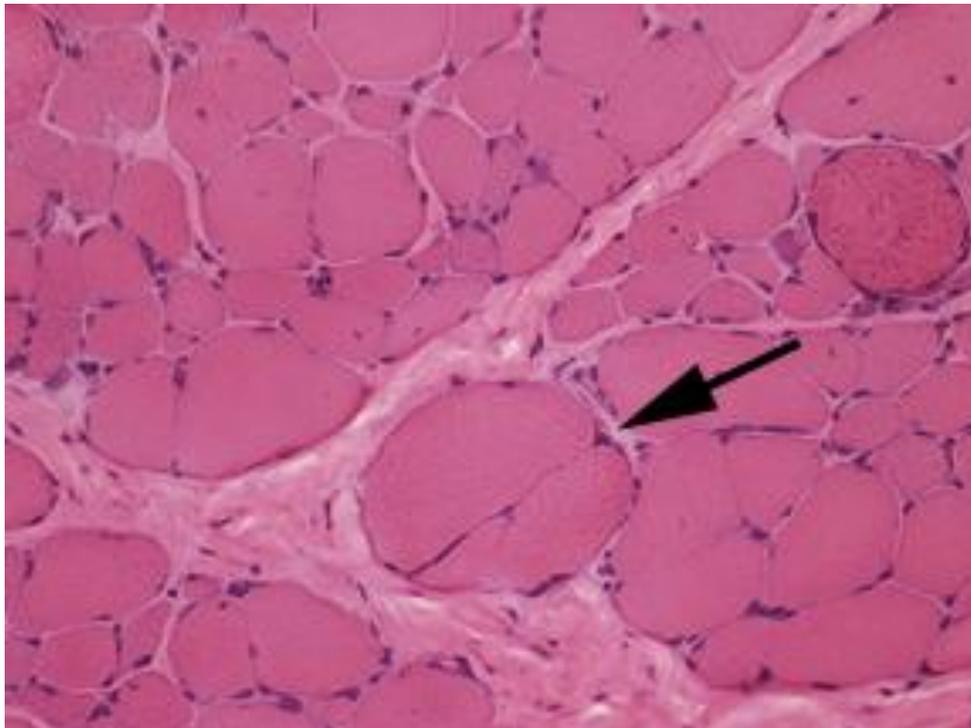


Figura 9. Típica fibra en “splitting”. Técnica H&E. Fuente: Muscle and Nerve Pathology: An Introduction for Medical Students

Para Engel y Banker (1986), cuando dos fibras musculares están en íntima aposición y ocupan el espacio de una de ellas, puede asumirse de forma general que están experimentando un “splitting”. En la sección transversal se observa mejor este proceso ya que las fibras musculares se ven muy próximas entre sí y asentadas dentro del mismo endomisio que las encierra, semejando las piezas de un rompecabezas. Dubowitz (1985), señala, no obstante, que en circunstancias normales este fenómeno se puede observar a nivel de las uniones miotendinosas, generalmente asociados con la presencia de núcleos centrales, lo que se deberá tener en cuenta a la hora del estudio anatomopatológico.

B. Reacciones celulares.

Para Dubowitz (1985) la respuesta más común es la presencia de histiocitos o linfocitos, y en ciertas circunstancias de otras células inflamatorias tales como leucocitos polimorfonucleares o células plasmáticas. Además de la fagocitosis que involucra a la fibra necrótica, frecuentemente existe una reacción celular de histiocitos o macrófagos alrededor del daño o de la fibra necrótica. Las reacciones celulares no son específicas de ninguna patología muscular en concreto. Según este mismo autor cabe destacar la respuesta perivascular, o reacción celular que ocurre en las proximidades de un vaso sanguíneo, y la fibrosis que implica la proliferación del tejido conectivo peri o endomisial. La fibrosis perimisial es menos significativa que la endomisial. Esta última es más frecuente en las miopatías que en las neuropatías (Figura 10). Según Sarnat (1983), la forma de las fibras atroficas, anguladas o redondeadas, en la sección transversal mayoritariamente viene determinada por la proliferación y extensión del contenido endomisial.

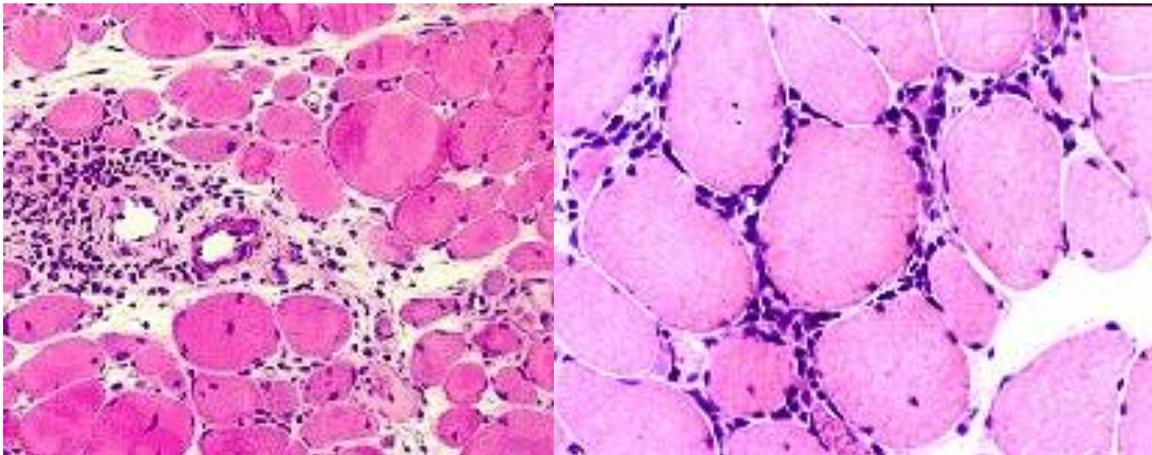


Figura 10. Aspecto característico de fibras musculares con procesos inflamatorios perivasculares y perimisiales (imagen izquierda) e inflamación endomisial (imagen derecha). Fuente: Neuromuscular Disease Center, Washington University, St. Louis, MO USA (neuromuscular.wustl.edu/index.html).

C. Cambios en la arquitectura citoquímica.

Las técnicas histoquímicas, y en particular las oxidativas, revelan un número de cambios estructurales dentro de la arquitectura citoquímica de las fibras individuales, que no se observan con las técnicas histológicas de rutina. Algunos de esos cambios son específicos de entidades patológicas.

C.1. Anomalías mitocondriales (Dubowitz, 1985).

Pueden ser alteraciones en cuanto al número, tamaño, estructura y distribución. Necesita del microscopio electrónico para su confirmación, aunque se sospecha la alteración con las técnicas oxidativas: fibras aisladas que presentan una tinción más intensa y de forma granular.

Hay también una agregación de mitocondrias y de la actividad oxidativa entre los núcleos centrales en la miopatía miotubular. Los agregados mitocondriales pueden ser difusos o focales (Figura 11).

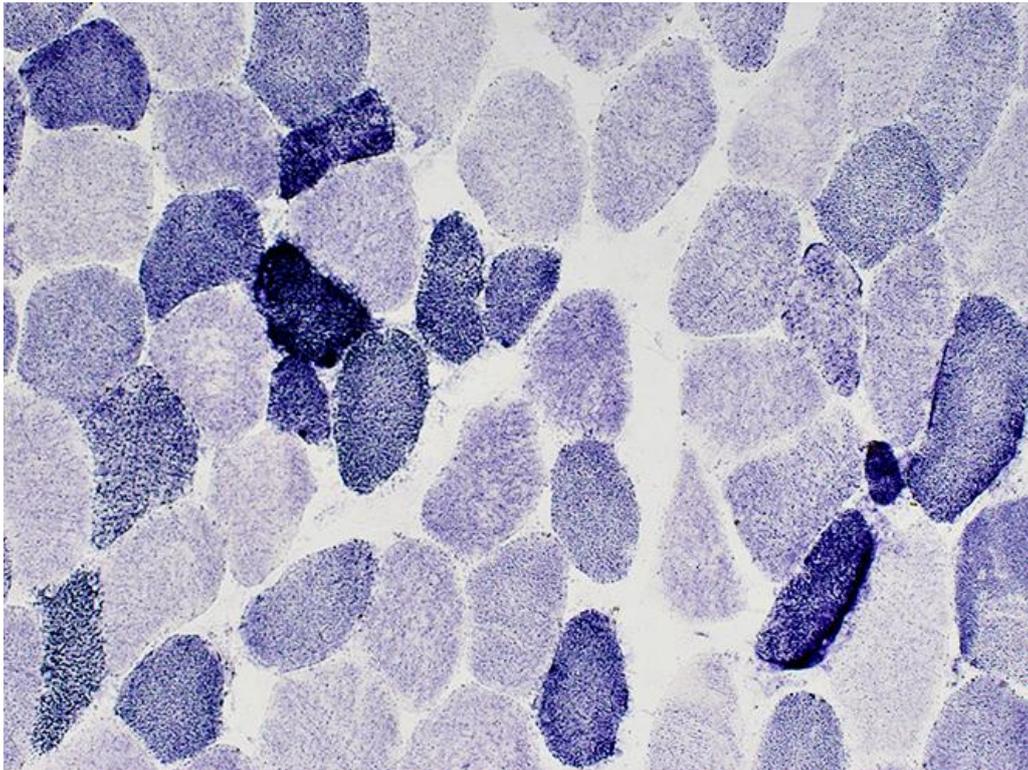


Figura 11. Aspecto característico de fibras musculares con proliferación mitocondrial (técnica SDH) Fuente: Neuromuscular Disease Center, Washington University, St. Louis, MO USA (neuromuscular.wustl.edu/index.html).

C.2. Vacuolas.

Una vacuola se define como un espacio anormal o cavidad dentro de la fibra muscular que aparece sin teñir con los métodos de tinción o estudio (Figura 12). Si es un espacio limitado por una membrana, el contenido de la misma varía, si no tiene membrana limitante, el espacio contiene un exceso de componentes celulares normales o anormales.

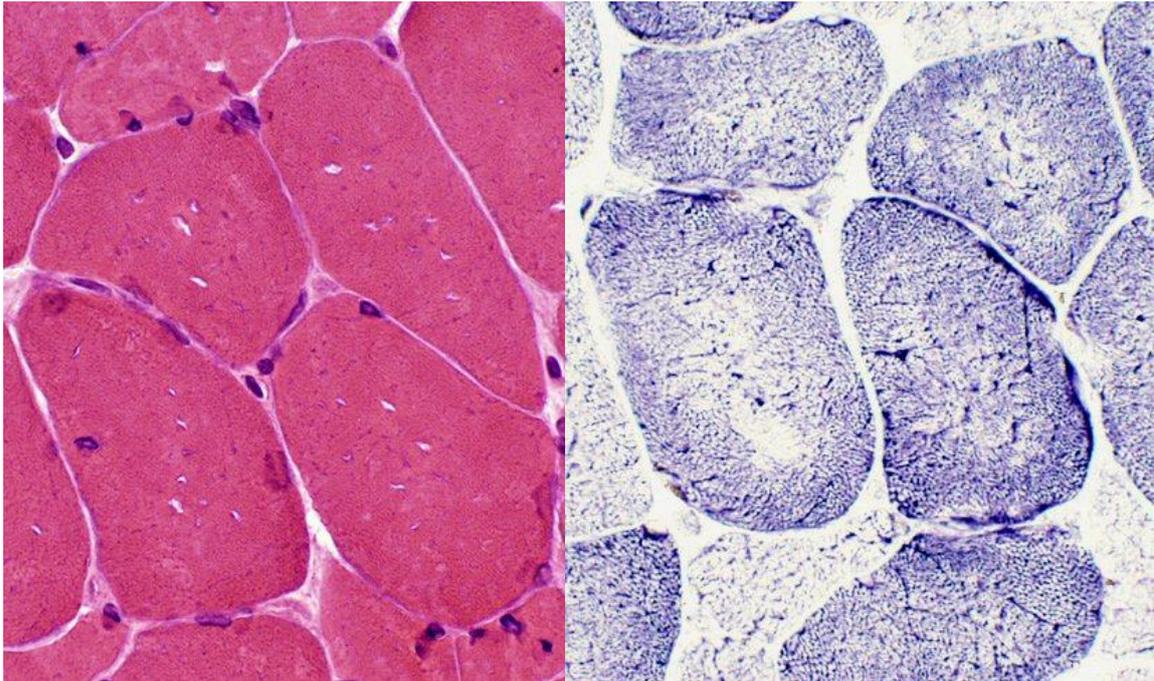


Figura 12. Fibras musculares mostrando múltiples vacuolas pequeñas (imagen izquierda, técnica H&E). Aspecto que presentan las fibras con vacuolas con la técnica NADH-TR (imagen derecha). Fuente: Neuromuscular Disease Center, Washington University, St. Louis, MO USA (neuromuscular.wustl.edu/index.html)

Las vacuolas en el músculo representan una alteración común, encontrándose en desórdenes variados no relacionados. Su significado viene determinado por su morfología, características histoquímicas y por los diferentes cambios patológicos en el músculo.

III.3. TORO DE LIDIA. LA CAÍDA.

En este apartado de la revisión bibliográfica realizaremos un recorrido por las diferentes etiologías consideradas acerca de la caída del toro de lidia, con especial referencia a aquellas que creemos más interesantes para nuestro trabajo. Sólo algunos aspectos del músculo esquelético de esta raza se han puesto de manifiesto, al tratar de asociar la falta de fuerza y caída de algunos animales durante la lidia con la existencia de posibles miopatías.

Como definición más acertada se considera a la **caída** como un síndrome de debilidad muscular que cursa con incoordinación motora y pérdida de la estación y del equilibrio (Fernández Mardomingo, 1998; Alonso de la Varga, 1998). Sanz Méndez (1998) la define como el conjunto de síntomas y signos clínicos observados durante la lidia, que no obedecen a una etiología conocida específica o bien a una enfermedad concreta, y que se caracteriza fundamentalmente por la falta de fuerzas del toro durante la lidia ocasionando su caída.

La falta de fuerza y caída del toro bravo no ha de entenderse como un hecho producido por un único agente etiológico, sino como un complejo etiológico o de una etiología multifactorial en el que están implicados los sistemas musculoesquelético, nervioso, neuroendocrino, cardiovascular, respiratorio y hematopoyético (Jiménez Chamorro, 2000), existiendo interconexión de unas causas con otras.

Diferentes teorías se han formulado acerca de las posibles causas desencadenantes de este síndrome. Romagosa (1977) las clasifica en seis grupos que resumimos a continuación:

- **Teorías genéticas:** Incluyen consanguinidad, factores de estirpe y selección sin tener en cuenta el factor caída.
- **Teorías de base alimenticia:** Comprendería el cebo forzado al final de la recría, excesivo alimento durante los últimos meses, y suministro de piensos compuestos y oligoelementos como favorecedores de las caídas.
- **Teorías basadas en el manejo:** Referidas a la falta de gimnástica funcional, deficiencias en el transporte de las reses y práctica del afeitado.

- **Teorías durante la lidia:** Incluye la suerte de varas que destroza amplias zonas ricamente inervadas del raquis y la presencia de público como factor estresante.
- **Teorías patológicas:** Considera dentro de este apartado la hemoglobinuria paroxística, el reumatismo periarticular, la tromboarteritis obliterante por larvas de parásitos y diversas neuropatías.
- **Teorías medicamentosas:** Relacionadas con la aplicación fraudulenta de drogas, inoculación de estimulantes del sistema nervioso central, aportes de arsénico, crotón y trementina a través de la piel.

García-Belenguer et al. (1995) describen también la caída del toro de lidia como un problema multifactorial, donde numerosas causas o factores pueden adicionarse unos a otros e incluso potenciarse, describiendo los siguientes:

- **Factores genéticos:** Basados en los estudios de Zarazaga (1984), consideran el fenómeno de la consanguinidad y el tipo de selección a que se ha sometido el ganado bravo desde antaño, basado fundamentalmente en la perpetuación del carácter bravura y en la tipología externa del animal. Posteriormente, Rodero (1998) indica la existencia de un gen autosómico recesivo que influiría en la caída del toro, aunque con expresividad variable y penetración incompleta.
- **Factores nutricionales:** Las deficiencias de vitamina E y selenio causan una distrofia muscular nutricional en los rumiantes (García-Belenguer et al, 1992). Así, han observado una estrecha relación entre las bajas concentraciones de selenio y vitamina E, y la existencia de lesiones miocárdicas y musculoesqueléticas crónicas. Este hecho, unido a la inexistencia de manifestaciones clínicas antes de la lidia, sugiere que los toros bravos podrían llegar a la lidia sufriendo un proceso carencial

subclínico, que les predispondría a manifestar una debilidad muscular al ser sometidos a un esfuerzo intenso.

- **Factores relacionados con la condición física:** La lidia supone un esfuerzo físico considerable para el toro bravo, por lo que es muy importante que el animal esté en perfectas condiciones físicas para afrontar con éxito dicho esfuerzo. Durante la lidia se produce un ejercicio intenso de una duración aproximada de 15 minutos que provoca cambios metabólicos importantes evidenciables al finalizar la misma. Se alteran diferentes parámetros hematológicos y, además, se vierten a la circulación grandes cantidades de enzimas que en condiciones normales se encuentran en el interior de las células musculares como la creatinquinasa (CK), la lactato deshidrogenasa (LDH) o la aspartato amino transferasa (AST). Su elevación en sangre es índice de lesión. Purroy y González (1984), observaron una relación directa entre la elevación de la actividad enzimática y la falta de fuerza que manifestaban los toros en el transcurso de la lidia, comprobando posteriormente (Purroy et al., 1992) la existencia de lesiones, mediante estudios histológicos, en músculos locomotores como son el gracilis y el bíceps femoral.
- **Factores de estrés:** Cuando un animal percibe un estímulo o agresión y éste es incapaz de responder, o bien la respuesta es exagerada o bien se produce un agotamiento de la capacidad de respuesta, llegando a producirse alteraciones patológicas e incluso la muerte del animal.
- **Transporte a la plaza:** Las alteraciones bioquímicas que produce el transporte en los animales se pueden resumir en una rápida elevación de los corticosteroides plasmáticos en el momento del embarque. Después, durante el viaje, se asiste a una elevación gradual de la glucemia y de los ácidos grasos no esterificados. Se pueden producir también alteraciones funcionales tanto en el hígado como en el músculo, lo que se ve reflejado en

una elevación de ciertas actividades enzimáticas en sangre (García-Belenguer, 1991).

- **Cambio de manejo:** En el ganado de lidia, la sujeción es una práctica de manejo muy estresante como lo demuestran las altas concentraciones de cortisol sérico obtenidas tras la introducción de vacas bravas en el potro de contención (García-Belenguer et al., 1991 y 1992).
- **La lidia:** La totalidad de las suertes que constituyen la lidia, sumado al ambiente de la corrida, constituyen una situación estresante tanto física como psicológica que afecta profundamente a la fisiología del toro bravo (Aceña, 1993).

En definitiva, García-Belenguer et al. (1995) concluyen que el síndrome de la caída del toro bravo es un fenómeno complejo y multifactorial de difícil solución, pues son muchos los aspectos a controlar y los intereses creados en torno a este problema. Indican que probablemente se evitarían gran número de caídas llevando a cabo una correcta selección genética, proporcionando una alimentación adecuada a las necesidades del animal en cada momento de su vida y estableciendo programas de entrenamiento físico y emocional, que mejorarían las condiciones físicas y psíquicas de los toros.

También Ariola (1998), al igual que los autores citados anteriormente, entiende que la falta de fuerza y caída del toro de lidia parecen ser el resultado de la acumulación de deficiencias provenientes de su constitución genética, estado de salud, situación nutricional, acondicionamiento físico y prácticas de manejo antes y durante la lidia, que finalmente se traducen en la imposibilidad del animal para responder al esfuerzo físico que se espera de él durante la lidia. Clasifica las causas de este síndrome en cuatro grandes grupos:

- **Primarias.** De origen genético, sin llegar a precisar si es de tipo autosómico o polisómico.

- **Secundarias.** Las divide a su vez en:

Selección. El ganadero ha venido seleccionando para el toro que se demanda actualmente, un toro de mayor toreabilidad y nobleza en detrimento de la fiereza y bravura. La observación general es que la falta de fuerza y caída tiene una correlación positiva con toreabilidad y una correlación negativa con fiereza y bravura.

Enfermedades infecciosas y parasitarias o sus secuelas. Producen lesiones localizadas en tejidos, órganos y/o sistemas conduciendo a un deficiente funcionamiento y falta de coordinación orgánica. Así Sanz (1998) considera como agente etiológico a un parásito protozoo, conocido por la literatura científica veterinaria, perteneciente a la clase *Sporozoasida*, orden *Coccidio*, familia *Sarcocystidae*, género *Sarcocystis* y especie *S. miescheriana*. Este protozoo se caracteriza por realizar una parasitación intramuscular, localizada fundamentalmente en la musculatura cardíaca y en el tejido muscular de los miembros, además del esófago, laringe y otras musculaturas, así como en células endoteliales (Jiménez Chamorro. 2000). Sanz (1998) estudiando un total de 150 toros de lidia encontró, en el tejido muscular esquelético y cardíaco, quistes encapsulados intracelulares, observando, a su vez, en todos los animales estudiados, en mayor o menor medida, lesiones inflamatorias, degenerativas y necróticas debido al enquistamiento por esporozoitos del gato y del perro.

Patologías nutricionales o alimentarias. Pueden traducirse en un desarrollo orgánico anormal, exceso de peso con desproporción músculo-grasa y trastornos metabólicos.

Falta de acondicionamiento físico. Determina falta de masa, tono y resistencia muscular, así como deficiencias circulatorias y respiratorias.

- **Asociadas.** Referidas a las deficiencias de manejo, las divide en dos bloques: antes de la lidia y durante de la lidia.

Antes de la lidia. Considera cuatro subgrupos:

- Equipo e instalaciones de manejo: mangas, cajones, camiones, tiempo y forma de transporte, corrales y chiqueros inadecuados, lo que provoca un importante estrés.
- Tiempo de reposo insuficiente, lo que conlleva una falta de recuperación y, por tanto, un agotamiento prematuro durante la lidia.
- Condiciones de reposo desfavorables. Dureza del piso de chiqueros, polvo, frío, humedad, que se traduce en un descanso inadecuado e insuficiente.
- Demanda de toros con pesos excesivos y, por consiguiente, con sobrecarga en el aparato locomotor.

Durante la lidia .Contempla tres subgrupos:

- Exceso de peso que determina una sobrecarga no solamente del aparato locomotor, sino que también afecta a los sistemas circulatorio y respiratorio, con los problemas de shock e hipoventilación.
- La técnica de toreo moderno que obliga a un mayor esfuerzo y produce más quebranto.
- Forma y condiciones de la pica que origina un mayor grado de daño muscular.

- **Desencadenantes.** El estrés de la lidia, de la tienta o agresiones similares que con efecto aditivo y potenciado pasan factura al aparato locomotor.

García-Belenguer (1991), tras estudios realizados mediante diferentes ensayos en animales de lidia, ha evidenciado la existencia de lesiones musculares puestas de manifiesto por una marcada elevación de las concentraciones séricas de enzimas musculares (CK, LDH y AST) y por el estudio histopatológico, en el que observaron un elevado número de animales con degeneración aguda y/o crónica en músculos esqueléticos y cardíacos. Las lesiones musculares agudas se producen durante el desarrollo de la lidia, siendo independientes del castigo recibido. Las lesiones crónicas, las que se produjeron con anterioridad, estaban estrechamente relacionadas con la deficiencias de vitamina E y selenio, así como con una escasa actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px), lo que en su opinión puede ayudar al desarrollo de miopatías durante la lidia o tienta.

Aceña (1993), al analizar 198 toros bravos lidiados y muertos a estoque en las plazas de Zaragoza y Pamplona, relaciona la falta de fuerza manifestada por los toros con la capacidad de adaptación del animal para responder al estrés de la lidia, así como con la aptitud del toro para realizar el ejercicio que supone ésta. La respuesta metabólica de los toros bravos al ejercicio se traduce en un incremento de los parámetros de la serie roja, concentraciones de ácido láctico plasmático muy elevadas, aumento de actividad sérica de enzimas de origen muscular, depleción de los depósitos de glucógeno en músculos esqueléticos, así como disminución del pH en dichos músculos. Los resultados anteriormente expuestos reflejan que el animal durante la lidia realiza un ejercicio de gran intensidad y existen suficientes indicios que hacen pensar que el toro bravo no se encuentra bien preparado para dicho esfuerzo físico, ya que las variaciones de estos

parámetros son muy importantes y, además, están relacionadas directa o indirectamente con la presencia de caídas.

Esta misma investigación, considera que la concentración plasmática de ácido láctico es un índice útil que valora la aptitud de un individuo para el ejercicio físico, de forma que los animales entrenados poseen una mayor capacidad oxidativa en sus fibras musculares y por ello presentan menores elevaciones de este metabolito. También ha evidenciado un agotamiento de las reservas de glucógeno muscular en los toros después de la lidia. Este hecho, junto con el desarrollo de una acidosis muscular, contribuye a la aparición de la fatiga muscular o imposibilidad de mantener una intensidad de fuerza determinada (Aceña, 1993).

En esta misma línea, Seva. et al. (2001), estudiaron la cantidad y distribución del glucógeno hepático en 30 animales lidiados, observando que los niveles de glucógeno en los hígados de los animales lidiados son menores que en los controles (dos animales no lidiados). La distribución en el lobulillo hepático de dicho glucógeno es centrolobulillar a diferencia de los animales control, donde es panlobulillar, lo que indica que en las zonas perilobulillares es donde primero comienza la formación de glucosa a partir de glucógeno y su liberación a la circulación sanguínea. También observan que los valores medios de glucógeno eran menores en aquellos animales que manifestaban mayor debilidad en la plaza.

En uno de los grupos de animales estudiados, coincidente con los que menos caídas manifestaban, Aceña (1993) observó que presentaron un menor grado de acidosis muscular después de la lidia, planteando la posibilidad de que las fibras musculares de esos toros tuvieran una mayor capacidad oxidativa gracias a la cual podían obtener energía produciendo menor cantidad de ácido láctico. Todo lo anteriormente expuesto indicaría, por un lado, la mejor aptitud de esos animales para llevar a cabo el ejercicio

de la lidia y, por otro, la importancia del entrenamiento. En este sentido, indica que un programa de entrenamiento adecuado reduciría la utilización de glucógeno muscular como sustrato energético, aumentaría la capacidad oxidativa de las fibras musculares, disminuiría la producción de ácido láctico y por tanto retrasaría la aparición de la fatiga muscular, mejorando así la condición física de los toros bravos para soportar el intenso ejercicio de la lidia.

De la misma opinión que Aceña (1993) es Carceller (1997), quien considera la necesidad de un entrenamiento específico debido a las características tan particulares que rodean a este tipo de animal: toro desproporcionado, crianza en espacios reducidos, manejo dificultoso, el gran estrés que sufren (embarque, transporte, etc.). La principal respuesta de la función muscular al entrenamiento es el aumento de la capacidad oxidativa del músculo, produciéndose un incremento de mitocondrias en las fibras musculares y un aumento del número de capilares. Este incremento está asociado con mejoras en la utilización de energía y mayor tolerancia a la fatiga. En opinión de dicho autor, “el problema fundamental de los toros no es su falta de casta, bravura, el afeitado, tranquilización, etc., sino la falta de movilidad. Cuando un toro se mueve se omite lo anterior”.

Paniagua, (1998), define el umbral de esfuerzo aeróbico como el trabajo máximo que un organismo es capaz de desarrollar en base a la energía elaborada con el oxígeno que cada animal puede fijar. Cuando los esfuerzos desarrollados por el animal son superiores al umbral aeróbico, el toro tiene que recurrir a fuentes energéticas suplementarias de naturaleza anaerobia. Estas energías que se utilizan exclusivamente cuando los animales realizan esfuerzos cuya potencia supera las posibilidades aeróbicas, es una circunstancia que se da con demasiada precocidad y frecuencia en el toro de lidia, a pesar de que tienen menor eficacia y generan productos nocivos especialmente para la fuerza. Este autor señala

que los animales más capacitados para la captación de oxígeno son los mejor dotados para el esfuerzo, destacando que la escasa duración de los tiempos de ejercicio desarrollados por los toros durante la lidia, pone de manifiesto que se trata de animales deficientemente dotados para realizar esfuerzos en los que se combinan la fuerza y el fondo físico.

III.4. ESTUDIOS QUE RELACIONAN LA CAIDA DEL TORO BRAVO CON LAS FIBRAS Y ENZIMAS MUSCULARES.

En el toro de lidia, principalmente han sido dos los métodos histoquímicos utilizados para la identificación de los tipos de fibras. Uno de ellos se basa en la detección de la actividad de la enzima adenosíntrifosfatasa miosínica (mATPasa) y, el otro, en la detección de enzimas relacionadas con el metabolismo oxidativo (aerobio) y glicolítico (anaerobio). Mediante ambos métodos, los trabajos realizados por Martínez-Gomariz et al. (1998; 1999; 2002; 2003), han puesto de manifiesto que la musculatura esquelética del toro bravo (Mm. extensor digital común, latísimo del dorso, serrato ventral del tórax, longísimo del tórax, gluteobíceps y extensor digital largo), está integrada por tres tipos principales de fibras (I, IIA y IIB) y otros dos complementarios más escasos (IIAB y IIC). Las fibras tipo I pertenecen a unidades motoras de contracción lenta, mientras que las tipo II son de contracción rápida. Desde el punto de vista metabólico, las fibras tipo I, IIAB y IIC presentan cierta actividad oxidativa, lo que las hace más resistentes a la fatiga, mientras que las fibras IIA y IIB son glicolíticas y, por tanto, fácilmente fatigables. Este aspecto es importante, ya que se ha podido observar que los músculos estudiados presentan una gran proporción de fibras IIA y IIB en comparación con el escaso número de fibras tipo I, cuyo porcentaje no supera a veces ni tan siquiera el 3% (Martínez-Gomariz, 2001). Esta característica ha sido relacionada con la falta de fuerza y caída del toro bravo durante la lidia, pues es de sobra conocido que a mayor capacidad oxidativa, mayor va a ser la resistencia del músculo y, por ende del animal, a la fatiga. Estos datos concuerdan con los

resultados obtenidos por Aceña (1993), que al estudiar la respuesta metabólica de toros bravos al ejercicio consecuencia de la lidia, encontró que los animales que sufrieron menos caídas presentaban un menor grado de acidosis muscular, probablemente debido a que sus músculos estaban dotados de una mayor proporción de fibras oxidativas (más ricas en capilares sanguíneos y mitocondrias). Por otra parte, las fibras glicolíticas tienen el glucógeno como sustrato energético principal y funcionalmente se encargan de los movimientos rápidos y vigorosos de escasa duración. Como la lidia supone un esfuerzo físico de considerable magnitud, se ha sugerido que estas fibras agotan rápidamente sus reservas de glucógeno y se lesionan con mayor facilidad, lo que explicaría las elevadas concentraciones de enzimas plasmáticas relacionadas con el esfuerzo muscular que han sido encontradas por otros investigadores en diversos estudios (Purroy y González, 1984; García-Belenguer, 1991; Purroy et al., 1992; Aceña, 1993). Asimismo, estos trabajos demuestran también la existencia de lesiones y alteraciones que afectan en mayor o menor grado a las fibras musculares. Concretamente, este tipo de alteraciones fueron observadas en el 42% de los músculos de los toros lidiados, resaltando que dichas lesiones no afectaban a toda la sección muscular, sino que estaban comprometidos sólo algunos de sus fascículos o algunas de sus fibras. El tipo de lesión encontrado con más frecuencia fue la pérdida del contorno poligonal de la fibra en sección transversal, ofreciendo ésta un aspecto redondeado y de gran tamaño. En determinadas secciones se hizo patente la presencia de fibras que manifestaban un mayor grado de alteración, mostrando signos degenerativos acompañados de procesos de desestructuración de la miofibrilla. También describen, aunque de forma aislada, otro tipo de alteraciones, como la centralización de núcleos, procesos de necrosis (fibras “licuadas”), fragmentación fibrilar (“splitting”), y existencia de pequeñas vacuolas en el interior del sarcoplasma. Todas estas lesiones recaían en las fibras tipo II y, principalmente, en las tipo IIB. En ninguna de las secciones analizadas pudieron observar alteración alguna de las fibras tipo I. Por otra parte, las técnicas metabólicas confirmaron la existencia de numerosas alteraciones que afectan, en mayor o menor medida, al sarcoplasma. Así, identificaron alteraciones

mitocondriales que interesaban total (incremento de la actividad NADH-TR y α -MGPDH) o parcialmente (agregados mitocondriales subsarcolémicos), a alguna de las fibras tipo II (IIA y IIB). Destacaron también la presencia de algunas fibras con escasa o nula actividad oxidativa en el centro del sarcoplasma y con actividad moderada en la periferia. Con relativa frecuencia, en un 30% de las muestras musculares analizadas, tanto de toros no lidiados como lidiados, se encontró parasitación muscular con presencia de quistes encapsulados intramusculares de sarcocystis. Dichos quistes se localizaban en el interior de las fibras, y en todas las muestras analizadas siempre afectaban a las fibras tipo II.

Por otra parte destaca el trabajo realizado por Picard et al. (2005), en toros bravos lidiados en Francia, donde además de analizar los tipos de fibras musculares, identifican otros factores responsables de la fatiga muscular con un especial enfoque sobre las modificaciones fisiológicas, musculares, hepáticas, sanguíneas y urinarias. Los resultados mostraron que el músculo tríceps braquial posee propiedades contráctiles y metabólicas peculiares. Tiene pocas (o no tiene) fibras rápidas glucolíticas IIX y presenta un metabolismo muy oxidativo y poco glucolítico. Así, los toros que más se cayeron poseían el mayor contenido de fibras IIX y el menor en fibras IIA. De forma muy interesante, parece que estas propiedades están relacionadas con la variable “caída” pero no con los factores “debilidad” y “gasto energético”, lo que indica que los problemas de caídas y de debilidad tienen orígenes distintos. Las reservas energéticas en glucógeno y en lípidos no estaban agotadas cuando acabó la corrida. Los toros más flojos y que se caían con mayor frecuencia, mostraban perturbaciones metabólicas a niveles muscular y sanguíneo (acidosis), con una mala utilización de sus reservas de glucógeno y lípidos. Los toros más “fuertes” son los que tenían un nivel antioxidante alto lo que, probablemente, les permitía limitar los efectos deletéreos del estrés oxidante debido al esfuerzo físico. El estudio demostró que los músculos de los toros bravos presentaban propiedades peculiares, con músculos muy oxidativos y una proporción de fibras rápidas glucolíticas (IIX) baja. Sin embargo, se notan variaciones importantes entre las ganaderías estudiadas. Así,

el “equipo” de fibras musculares de cada toro era más o menos adecuado al tipo de esfuerzo que se le pide. Los toros más flojos y que se caían mostraban perturbaciones metabólicas a nivel muscular y sanguíneo, con una mala utilización de sus reservas de glucógeno y de lípidos. El peso y la edad de los toros no son factores negativos, al contrario del exceso de engorde. Por último, indicaron, que un equilibrio correcto entre forrajes y concentrados en la ración alimenticia parece primordial. Sobre la valoración del hemograma y de los perfiles renal, hepático y muscular de toros lidiados tras ser corridos en encierros, en el sentido de defender la hipótesis de que el descanso hasta el día después de ese encierro, mejora la lidia, en contra de los que defienden que la empeora por establecerse un estado acidótico por el esfuerzo muscular intenso (Mc Kenna, 1992), produciendo fatiga muscular, no compensada por la respuesta de adaptación del toro al estrés generado debido al tiempo transcurrido hasta la lidia. El estudio compara valores obtenidos tras la lidia, de la sangre de ejemplares utreros y cuatreños que se lidiaron transcurridos diferentes periodos de tiempo, desde que se corrieron por las calles, analizando el hemograma, el perfil muscular en base a la actividad de la LDH (lactato deshidrogenasa) y la CK (creatinquinasa), el perfil renal valorando las tasas de urea y creatinina y el perfil hepático comparando los valores de proteínas totales, fosfatasa alcalina, GOT (transaminasa glutámico oxalacética) y GPT (transaminasa glutámico pirúvica). En cuanto al perfil renal, los valores obtenidos indican que el ejercicio y el estrés del encierro favorece una ligera mejoría en la respuesta renal a la avalancha de urea producida por la degradación proteínica en el hígado. Asimismo señalan que la creatinina plasmática producida por la degradación de la creatina, podría significar una alta fuente de energía celular por su transformación en ATP. Los resultados encontrados en toros lidiados el mismo día (10h) son discretamente inferiores a los lidiados al día siguiente, probablemente por la disminución de la función renal (fallo renal), en un tiempo relativamente inmediato en el que se mantienen, o incluso se ven ligeramente incrementados los niveles de urea y creatinina. Respecto al perfil hepático, los incrementos de la fosfatasa alcalina y las transaminasas GOT y GPT son claros indicadores de problemas hepáticos, y

sobre todo las dos últimas enzimas son exponentes del daño celular existente. Según los valores que obtuvieron, las posibles alteraciones hepáticas existentes son de menor importancia en los toros lidiados el mismo día (10h). En lo que respecta al perfil muscular, señalan que las enzimas analizadas como prototipo de este perfil (LDH y CK) son liberadas al torrente sanguíneo por alteración de la membrana de las células musculares, en función de las miopatías generadas por el esfuerzo de encierro y lidia. Una vez más, los valores encontrados en toros lidiados el mismo día que se corrieron en el encierro (10h) son más favorables que los lidiados el día siguiente. Este trabajo concluye afirmando que la valoración de los perfiles renal, hepático y muscular en toros que se lidian al día siguiente de su participación en un encierro, no recuperan valores más favorables indicativos de estos sistemas, sino que incluso se produce una cierta degradación en cada uno de ellos.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV.1.ANIMALES

Para la realización del presente trabajo analizamos novillos correspondientes a dos temporadas taurinas; 24 novillos lidiados en la XVIII Feria del Arroz de Calasparra de la temporada 2007 y otros 24 novillos lidiados en la XIX Feria del Arroz de Calasparra de la temporada 2008 (Figura 13), pertenecientes a diferentes ganaderías. Esta feria novillera es una de las más importantes de España, no sólo por la duración de la misma (es la segunda más larga de nuestro país), sino también por las ganaderías que acuden y los encastes de las que proceden, todo ello propiciado por la gran afición a los toros en dicha localidad.



Figura 13. Imágenes de algunos de los novillos lidiados en la temporada 2007 utilizados para este estudio

Las ganaderías participantes fueron muy variadas en cuanto a diversidad de encastes así como hierros, todas ellas de reconocido prestigio y afamadas dentro del mundo del toro (D. Ángel y Juan Antonio Sanpedro, Cebada Gago, Sánchez de Ybargüen, Partido de Resina, Tomás Prieto de la Cal, Hermanos Martínez Pedrés, José Escolar, Rehuelga y El Cubo)

Así mismo, todas las novilladas, tanto de la temporada 2007 como las de la temporada 2008, fueron grabadas con el fin de poder realizar un posterior y detenido visionado y estudio del comportamiento de los animales en el ruedo.

La grabación fue realizada con cámara de video profesional modelo Sony X160.

IV.2. TOMA DE MUESTRAS

Para la realización de este estudio se tomaron muestras de músculos y sangre de los novillos de la temporada 2007. En el caso de la temporada 2008, únicamente se tomaron muestras musculares.

Las muestras de sangre se recogieron tras el arrastre de los toros al desolladero después de su lidia. El sangrado fue realizado mediante sección de la vena yugular, recogiendo la sangre en tubos sin anticoagulante. Una vez recogida fue refrigerada de forma casi inmediata a 4^o C, temperatura a la que se mantuvieron hasta su envío al Laboratorio de Análisis Veterinarios Sagunto 99 (C/ Sagunto 105 bajo de Valencia).

La toma de muestras musculares se realizó inmediatamente después del sacrificio, en el mismo desolladero, una vez obtenidas las canales, al objeto de evitar posibles alteraciones morfológicas y/o morfométricas de las fibras musculares (Braun, 1989; Karlsson, 1993).

Sobre las canales de los novillos de ambas temporadas procedimos a identificar los músculos tríceps braquial (cabeza larga) y semitendinoso.

La selección de los músculos se efectuó en base a su pertenencia a los miembros torácico (M. tríceps) y pelviano (M. semitendinoso) y a sus características funcionales. Así, la *cabeza larga del tríceps braquial* actúa como extensor del codo, mientras que *el músculo semitendinoso* interviene como flexor de la articulación de la rodilla.

Una vez identificados, fueron desprovistos de grasa y fascia de recubrimiento, tomando fragmentos de 1 cm de longitud por 0,5 cm de ancho a nivel del tercio medio de cada vientre muscular.

IV.3. PROCESADO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

Una vez llegadas las muestras al laboratorio a 4°C, se centrifugaron durante cinco minutos a 6000 rpm para la obtención del suero.

Con dicho suero se realizaron las analíticas de los parámetros objeto de estudio. Los parámetros seleccionados para el estudio fueron: Urea, Creatinina, Proteínas Totales, GOT, GPT, GGT, Fosfatasa Alcalina, LDH y CK, las cuales fueron procesadas en el laboratorio de análisis clínicos Sagunto 99.

UREA. (BUN) (*Blood urea nitrogen*, por sus siglas en inglés) es la cantidad de nitrógeno circulando en forma de urea en el torrente sanguíneo. La urea es una sustancia secretada a nivel del hígado, producto del metabolismo proteico, a su vez, es eliminada a través de los riñones. Los valores de nitrógeno ureico en sangre pueden ser indicativos de la función renal.

CREATININA: La creatinina es un compuesto orgánico generado a partir de la degradación de la creatina (que es un nutriente útil para los músculos). Se trata de un producto de desecho del metabolismo normal de los músculos que habitualmente produce el cuerpo en una tasa muy constante (dependiendo de la masa de los músculos), y que normalmente filtran los riñones excretándola en la

orina. La medición de la creatinina es el modo más simple de monitorizar la correcta función de los riñones.

PROTEINAS TOTALES: La proteína total en suero, también llamada proteína total en plasma o proteína total, es una prueba bioquímica para medir la cantidad total de proteína en plasma sanguíneo o suero. La proteína en el plasma está compuesta de albúmina y globulina.

GOT: conocida como transaminasa glutámico-oxalacética y también llamada aspartato aminotransferasa o aspartato transaminasa (AST) es una enzima aminotransferasa que se encuentra en varios tejidos del organismo de los mamíferos, especialmente en el corazón, el hígado y el tejido muscular. También se encuentra presente en hematíes, miocardio, músculo esquelético, riñón y cerebro, por lo cual ante la presencia de daño en cualquiera de estos sitios también elevará su concentración sérica.

GPT: La transaminasa glutámico-pirúvica o también alanina aminotransferasa (ALT), también llamada alanina transaminasa, es una enzima aminotransferasa con gran concentración en el hígado y en menor medida en los riñones, corazón y músculos. Cuando hay una lesión de estos órganos la ALT es liberada a la sangre y aparece elevada en los análisis.

GGT: La gamma glutamil transpeptidasa, es una enzima hepática. Su nivel en sangre puede ser medido, y a pesar de existir en una gran cantidad de tejidos, su presencia predomina a nivel de los hepatocitos, siendo un marcador de laboratorio de enfermedad hepática.

Fosfatasa Alcalina (FA): La fosfatasa es una enzima clasificada dentro de las hidrolasas. Son enzimas que se encuentran presentes en casi todos los tejidos del organismo, siendo particularmente alta en huesos, hígado, placenta, intestinos y riñón. Tanto el aumento, así como su disminución en plasma tienen significado clínico. Las causas de un aumento de ALP: obstrucciones hepáticas, hepatitis, hepatotoxicidad por medicamentos y osteomalacia.

LDH: La lactato deshidrogenasa, es una enzima catalizadora que se encuentra en muchos tejidos del cuerpo, pero su presencia es mayor en músculos, corazón, hígado, riñones, , glóbulos rojos, cerebro y pulmones. Corresponde a la categoría de las oxidorreductasas, dado que cataliza una reacción redox, en la que el piruvato es reducido a lactato gracias a la oxidación de NADH a NAD⁺. Participa en el metabolismo energético anaerobio, reduciendo el piruvato (procedente de la glucólisis) para regenerar el NAD⁺, que en presencia de glucosa es el sustrato limitante de la vía glucolítica. En algunos tejidos o tipos celulares, obtienen la mayor parte de su energía del mL La LDH pasa a la sangre ante toda destrucción de estos tejidos (traumática, infecciosa o neoplásica), por lo que su elevación en el suero es un *signo inespecífico* de organicidad de un proceso, es decir, de que un órgano o tejido ha sido lesionado.

CK: La creatinkinasa cataliza la producción de fosfocreatina a través de la fosforilación de una molécula de creatina, consumiendo una molécula de ATP en el proceso. La molécula de ADP formada para crear una molécula de fosfocreatina se convierte inmediatamente en ATP por las mitocondrias. En la miofibrilla, al inicio de la contracción muscular, la concentración de ADP aumenta a medida que disminuye los niveles de ATP. En esta situación la enzima cataliza la reacción inversa, transfiriendo un radical fosforilo al ADP, restaurando rápidamente la concentración de ATP. La fosfocreatina, por intermedio del ATP, constituye una reserva energética rápidamente utilizable por el músculo esquelético y otros tejidos, como por ejemplo el del cerebro (metabolismo anaeróbico). Sin embargo, la reserva de fosfocreatina no permite este gasto por un gran período de tiempo.

El ejercicio intenso puede provocar daño muscular, pérdida de fuerza, debilidad y aumento de los niveles en sanguíneos de proteínas y enzimas del miocito como la CK y la lactato deshidrogenasa (LDH).

Los niveles de CK total dependen de la edad, la raza, la masa muscular, la actividad física y las condiciones climáticas. Los altos niveles de CK en suero en animales aparentemente sanos se relacionan con el entrenamiento físico y daño en la estructura muscular.

El incremento en la actividad enzimática, especialmente de la CK, después de la actividad se registró por primera vez en 1958, y estudios posteriores han demostrado que muchos son los factores que determinan el incremento de estas enzimas durante y después del ejercicio.

La actividad total de la actividad de CK en suero es elevada especialmente durante las 24 horas posteriores al ejercicio, y durante la recuperación la actividad enzimática retorna gradualmente a los niveles basales.

A modo de conclusión, la determinación de los niveles séricos de CK es un marcador bioquímico de gran utilidad para valorar el estrés muscular que causa la actividad física.

La técnica y metodología que se utilizó en cada una de ellas fue la siguiente:

Para la realización de las pruebas se utilizó la técnica de Espectrofotometría visible ultravioleta.

La espectrofotometría de absorción molecular ultravioleta visible está basada en la medición de absorción de radiación U.V. o visible por determinadas moléculas. La radiación correspondiente a estas regiones del espectro electromagnético provoca transiciones electrónicas a longitudes de ondas características de la estructura molecular de un compuesto. La conversión de absorbancia a concentración se basa en la Ley de Lambert-Beer.

Cada una de las distintas determinaciones fue realizada por un método específico a cada parámetro, de la siguiente manera

UREA: MÉTODO CINÉTICO. : Enzimático ureasa.

PRINCIPIO DEL MÉTODO: El reactivo urea de Gernon determina cuantitativamente la concentración de Urea en suero, plasma u orina mediante el método Ureasa GLDH. La disminución de la concentración de NADH es proporcional a la concentración de urea en la muestra.

CREATININA: MÉTODO CINÉTICO. Cinético Picrato Alcalino.

PRINCIPIO DEL MÉTODO: El reactivo Creatinina de Gernon sirve para la cuantificación de la concentración de Creatinina en suero, plasma u orina. La creatinina reacciona con el ácido picrico en medio básico formando un complejo coloreado, tal como describe el método de Jaffe. El incremento de densidad óptica medido en un intervalo de tiempo determinado es proporcional a la concentración de creatina en la muestra.

GOT: MÉTODO CINÉTICO UV. Cinético IFCC.

PRINCIPIO DEL MÉTODO: El reactivo GOT de Gernon determina la actividad de GOT-ASAT en muestras de suero o plasma mediante el método optimizado de la IFCC (International Federation of Clinical Chemistry).

GGT: MÉTODO CINÉTICO. Cinético Gamma Glutamil 4-nitroanilida.

PRINCIPIO DEL MÉTODO: El reactivo GGT de Gernon sirve para cuantificar la actividad de la Gamma Glutamyltransferasa (GGT) en suero. La GGT cataliza la transferencia de ácido glutámico a glicilglicina, produciéndose 5-Amino-2-Nitrobenzoato que puede leerse a 405 nm. El incremento de absorbancia a esta longitud de onda está directamente relacionado con la actividad de la GGT.

GPT: MÉTODO CINÉTICO UV. Cinético IFCC.

PRINCIPIO DEL MÉTODO: El reactivo GPT de Gernon determina la actividad de GPT-ALAT en muestras de suero o plasma mediante el método optimizado de la IFCC (International Federation of Clinical Chemistry).

CK: MÉTODO ENZIMATICO. Cinético IFCC

PRINCIPIO DEL MÉTODO: El reactivo CK-NAC de Gernon determina la actividad de CK-NAC en suero y plasma según el método de IFCC y DG. La

actividad de CK-NAC en la muestra es directamente proporcional a la formación de NADPH.

FOSFATASA ALCALINA: MÉTODO ENZIMÁTICO. Cinético p-Nitrofenilfosfato.

PRINCIPIO DEL MÉTODO: El reactivo Fosfatasa Alcalina de Gernon determina la actividad de Fosfatasa Alcalina en muestras de suero y plasma. La Fosfatasa Alcalina cataliza la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato produciendo p-nitrofenol y fosfato según el método DGKC. La actividad de la Fosfatasa Alcalina en muestras es proporcional a la formación de p-nitrofenol.

LDH: MÉTODO CINÉTICO UV. Cinético DGKC.

PRINCIPIO DEL MÉTODO: El reactivo LDH de Gernon determina la actividad de LDH en muestras de suero mediante el método optimizado de la DGKC. La velocidad de disminución de la concentración de NADH es directamente proporcional a la concentración de LDH en la muestra.

PROTEÍNAS TOTALES: MÉTODO COLORIMÉTRICO. Biuret.

PRINCIPIO DEL MÉTODO: El reactivo Gernon de Proteínas Totales determina la concentración de proteínas en suero o plasma mediante método Biuret. Las proteínas junto a los iones de cobre forman un complejo de color azul-violeta en solución alcalina. La absorbancia del color es directamente proporcional a la concentración de las proteínas.

Para el estudio del posible daño hepático se seleccionaron: GOT, GPT, GGT y Fosfatasa Alcalina. Para el estudio del posible daño renal se seleccionaron: Urea, Creatinina y Proteínas Totales, mientras que para el estudio del posible daño muscular se seleccionaron GOT, LDH y CK.

IV.4. PROCESADO DE LAS MUESTRAS MUSCULARES

IV.4.1. CONGELACIÓN DE LAS MUESTRAS

El traslado de las muestras para su congelación en el laboratorio se realizó en el menor tiempo posible, manteniéndolas mientras tanto en recipientes cerrados y refrigerados al objeto de impedir su deshidratación.

Los fragmentos se dispusieron perpendicularmente sobre portabloques a los que añadimos previamente una gota de OCT-compound. Posteriormente se recubrió toda la muestra con más cantidad de este producto para proceder a su congelación. Ésta se realizó en el interior de un vaso de precipitado de vidrio con 100 c.c. de 2-metilbutano (Figura 14), previamente enfriado sobre nitrógeno líquido (-190°C), almacenado en un termo. Para ello introdujimos lentamente el vaso de precipitado en un termo, y lo mantuvimos hasta que el 2-metilbutano alcanzó la temperatura óptima (-160°C), lo que se advierte al congelarse y quedar adherido a las paredes y fondo del vaso formando una fina capa de color blanco. Éste es el momento adecuado para sumergir los portabloques en el 2-metilbutano durante 10-15 segundos. La muestra sufre así una congelación inmediata y mínimamente traumática, idónea para el mantenimiento íntegro de las estructuras histológicas y enzimáticas.



Figura 14. Fotografía del proceso de congelación de las muestras musculares en 2-metil-butano previamente enfriado sobre nitrógeno líquido.

Las muestras congeladas se protegieron con papel de aluminio, previamente refrigerado, y fueron almacenadas a -40°C en arcón congelador en recipientes plásticos a esta temperatura, hasta el momento de proceder al corte de las mismas.

IV.4.2. CORTE DE LAS MUESTRAS

Los cortes de 10 micrómetros de grosor se realizaron en un criostato Leica CM 1850 a -20°C siendo recogidos sobre portaobjetos limpios y secos, mediante contacto de éstos sobre la cuchilla del criostato (Figura 15). Los primeros cortes nos sirvieron para comprobar que la congelación había sido correcta y verificar la disposición transversal de las fibras mediante una tinción rápida con hematoxilina-eosina. Seguidamente y por el procedimiento descrito anteriormente, se obtuvieron un total de 40 cortes seriados por muestra disponiendo dos de ellos en cada portaobjetos. Los cortes se almacenaron en cajas previamente refrigerada a -40°C para ser posteriormente sometidos a las diferentes técnicas histoquímicas.

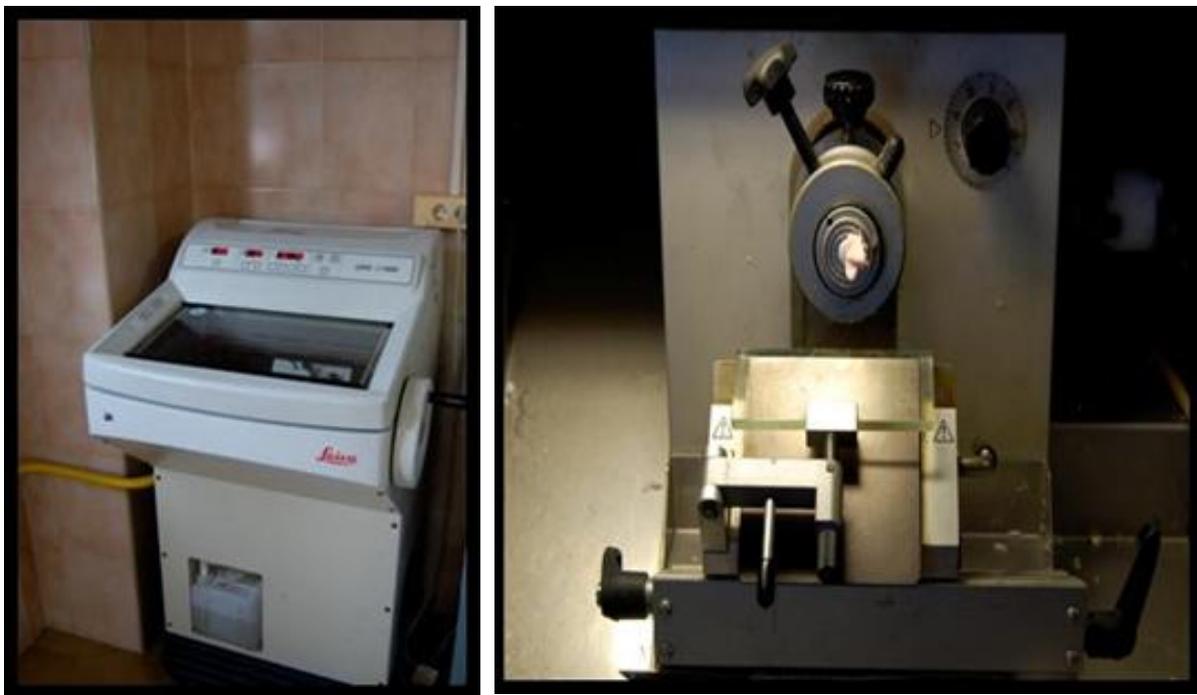


Figura 15. La secciones musculares de 10 micrómetros se obtuvieron mediante criostato a -20°C .

IV.5. TINCIONES Y TÉCNICAS EMPLEADAS

IV.5.1. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS (NO ENZIMÁTICAS).

IV.5.1.1 Hematoxilina-Eosina (Dubowitz y Brooke, 1973)

Hematoxilina de Harris	3-6 minutos
Lavar	3 veces con agua destilada
Eosina al 1%	30-60 segundos
Deshidratar en alcoholes:	
70°	1 minuto
90°	1 “
100°	1 “
100°	1 “
Aclarar con xilol (2 baños de 1 minuto cada uno)	
Montar con medio sintético apropiado (Eukitt)	

Con esta técnica observamos los núcleos de color azul, las fibras de color rosa y el tejido conectivo de color rosa claro. Se realiza para comprobar la disposición transversal de las fibras, detectar la ausencia o presencia de artefactos debidos a la congelación y analizar la morfología de los miocitos.

IV.5.1.2. Tricrómico de Gomori modificado (Brumback y Leech, 1984)

Hematoxilina de Harris	5 minutos
Lavar	agua destilada
Teñir en la solución tricrómico	20 minutos
Fast green	0.3 gr
Chromotrope 2R	0.6 gr
Ácido phosphotúngstico	0.3 gr
Ácido acético glacial	1 ml
Agua destilada	100 ml

Sumergir en ácido acético al 2% durante 10 minutos (hasta azular).
Deshidratar con alcoholes, aclarar con xilol y montar en medio sintético (Eukitt).

La solución de tricrómico se debe ajustar a pH 3.4 con NaOH 1M y agitarse antes de usarla.

Utilizamos esta técnica para destacar los componentes extrafibrilares del músculo, observándose los núcleos de color púrpura, la red intermiofibrilar de color rojo, las miofibrillas de color verde azulado (las fibras tipo I se tiñen con una tonalidad más oscura que las tipo II) y el tejido conectivo de color verde claro.

IV.5.2. TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS

VI.5.2.1. Técnicas ATPasa miosínicas.

Aplicamos estas técnicas a fin de detectar mediante microscopía óptica la presencia o ausencia de actividad ATPasa por parte de la miosina de las fibras musculares.

Para ello, las preparaciones se incuban en una solución que contiene ATP y calcio a pH 9.45. A este pH la enzima ATPasa libera el fosfato terminal, que se combina con el calcio de la solución formando fosfato cálcico, insoluble a pH básico, que precipitará en el lugar donde reside la actividad enzimática. A continuación las preparaciones se trasladan a una solución de cloruro de cobalto. El cobalto sustituye al calcio en el fosfato de calcio, y el fosfato de cobalto resultante precipita en el mismo sitio. Por último sometemos las preparaciones de tejido muscular a una solución de sulfuro de amonio formándose sulfuro de cobalto que es insoluble y de color negro, demostrándose así la existencia de una actividad mATPásica por parte de las fibras musculares (Dubowitz y Brooke, 1973).

Si previamente a la incubación con ATP a pH 9.45, las preparaciones son introducidas en medios más alcalinos (pH 10,2-10,6) o ácidos (pH 4,6-4,3), conseguiremos evidenciar un mayor número de tipos fibrilares, como consecuencia de la diferente labilidad que manifiestan los distintos tipos de isomiosinas. Las fibras musculares así teñidas nos permiten apreciar a microscopía óptica la coloración adquirida por las miofibrillas, que quedan separadas entre sí por el espacio intermiofibrilar no teñido. Si el corte de la fibra fuera longitudinal, observaríamos que la tinción se aprecia sobre las bandas A, debido a que esta zona se encuentra ocupada por miosina, y es por lo que estas técnicas se denominan ATPasa miosínica. (Dubowitz, 1985).

Las técnicas utilizadas en nuestro estudio corresponden a la referida por Snow et al. (1982) para preincubaciones alcalinas, y por Dubowitz y Brooke (1973) para preincubaciones ácidas, introduciendo ciertas modificaciones, por lo que las describimos a continuación.

IV.5.2.1.1. ATPasa miosínica preincubación alcalina (método Snow et al., 1982).

1.- Preincubación 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, 10,5 y 10,6 (ajustados con NaOH 1M y 0,1M)

2.- Lavado con agua destilada durante 5 minutos.

3.- Incubación 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.- Lavado con cloruro de calcio 0,2M: dos baños de 5 minutos.

- 5.- Lavado con cloruro de cobalto al 2% durante 5 minutos.
- 6.- Lavado con agua destilada minuciosamente: dos baños.
- 7.- Lavado de un minuto con sulfuro de amonio al 1%.
- 8.- Lavado de 2 a 5 minutos con agua destilada.
- 9.- Deshidratación en cadena ascendente de alcoholes y montaje con medio sintético (Eukitt).

IV.5.2.1.2. ATPasa miosínica preincubación ácida (método modificado de Dubowitz y Brooke, 1973).

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

1.- Preincubar en la solución:

- 50 ml de solución A
- 101,5 ml de solución B
- 20 ml de cloruro de sodio (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 0,1 N
pH: 4, 3, 4, 5, 4,6 (ajustados con NaOH 0,1 M)

Tiempo de preincubación: rango entre 2.5 y 5 minutos

2.- Lavar en la siguiente solución:

- Barbital sódico 0,1 M (2ml)
- Cloruro de calcio 0,18 M (1 ml)
- Agua destilada 7 ml
- pH: 9,4 (ajustado con CIH 0,1 N)
- Tiempo de lavado: 30 segundos

3.- Incubar en la siguiente solución:

Solución lavadora + 15 mg. de ATP

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

Tiempo de incubación: 45 minutos

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

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

6.- Barbital sódico 0,01 M: un baño de 5-10 minutos

7.- Agua destilada: un baño de 30 segundos

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

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

10.- Deshidratar en cadena ascendente de alcoholes y montar en medio sintético (Eukitt)

IV.5.2.2. Técnica para la determinación del metabolismo de las fibras: Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Reduced)-Tetrazolium Reductase (NADH-TR). Método Dubowitz y Brooke (1973).

Los enzimas oxidativos, entre los que incluimos las deshidrogenasas (SDH), diaforasas (NADH-TR) y oxidasas, tienen importancia porque reflejan la utilización de diferentes intermediarios metabólicos del ciclo de Krebs y vías relacionadas, indicando, por lo 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.

En la empleada por nosotros (Diaforasas), la NADH se utiliza como sustrato y uno de los compuestos del tetrazolium (NBT) como captador de electrones. Con esta técnica se manifiesta claramente el espacio intermiofibrilar que incluye mitocondrias y retículo sarcoplásmico, ya que las miofibrillas no se tiñen (Dubowitz, 1985).

Metodología a seguir:

1.- Incubar en la siguiente solución:

0,2 M-Tris Buffer (pH 7,4) 10 ml

NBT 10 mg

NADH 8 mg

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

Tiempo de incubación: 60 minutos a 37° C

2.- Lavado con agua destilada: 1 minuto

3.- Deshidratación en cadena de acetonas (1 minuto): 30%-60%-
90%-60%-30%

4.- Lavado en agua destilada: 1 minuto

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

IV.6. MICROFOTOGRAFIADO

Se realizó con la mayor celeridad posible tras la tinción ya que la intensidad y calidad de las tinciones enzimáticas disminuye con el tiempo. Utilizamos un microscopio “Axioskop” 40 con cámara fotográfica digital modelo “Spot insight QE” (Figura 16). Las preparaciones fueron fotografiadas a 10x, 20x y 40x, siendo almacenadas en ordenador para su posterior análisis. Con las fotografías obtenidas procedimos al recuento de fibras (100 por cada uno de los campos histológicos seleccionados) con el fin de calcular los porcentajes de cada uno de los miocitos identificados.



Figura 16. Imagen del microscopio (“Axioskop” 40) y cámara “Spot insight QE”) utilizados para la obtención de las microfotografías

V. RESULTADOS

V.1. TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES

Las técnicas histológicas de rutina nos permiten comprobar las características morfológicas que ofrece la fibra en su sección transversal. Estas se encuentran agrupadas en fascículos, con formas poligonales y separadas unas de otras por el tejido endomisial (Figura 17).

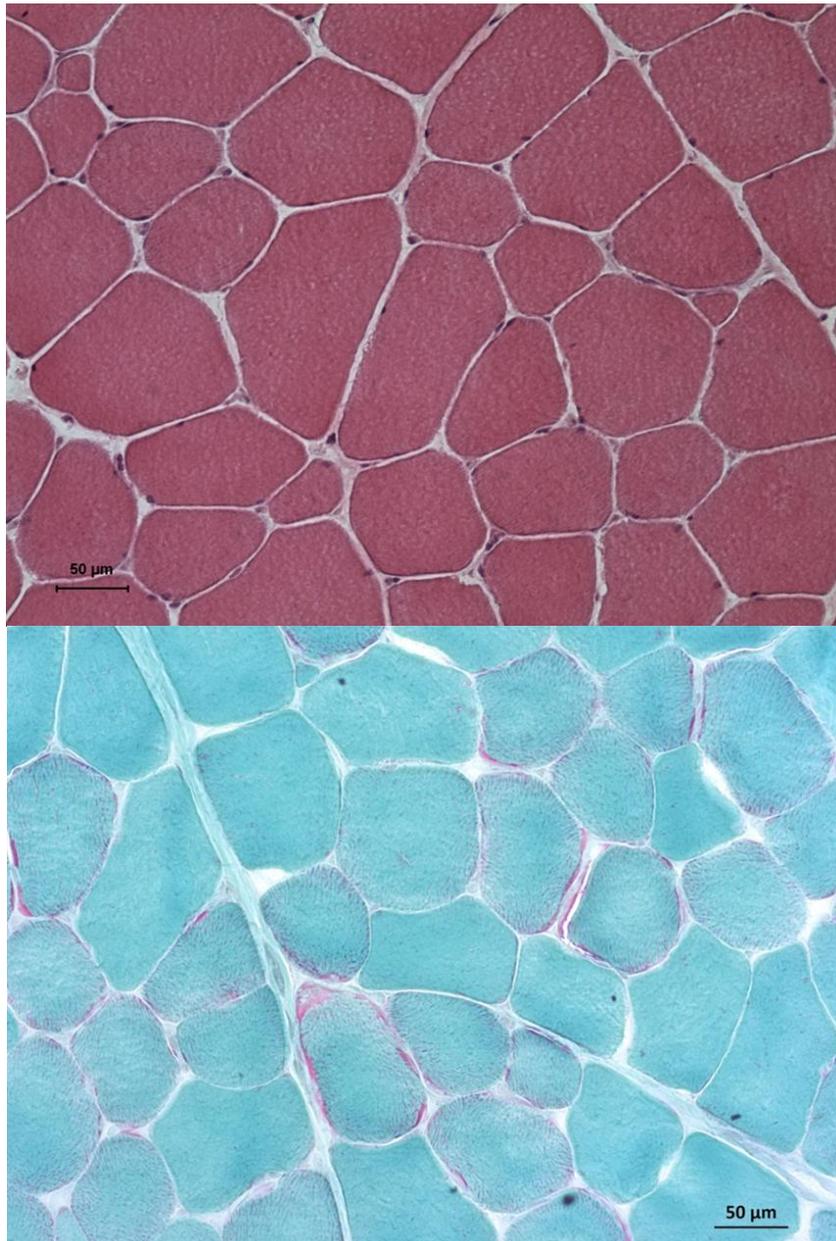


Figura 17. Fascículos musculares normales (sin lesiones). Los miocitos muestran su típica forma poligonal, separados por el endomisio y con núcleos en posición subsarcolemática. Técnicas H&E (imagen superior) y Tricrómico de Gomori (imagen inferior).

El estudio y catalogación de los distintos tipos de fibras se realizó tras someter secciones musculares transversales seriadas a diferentes reacciones histoenzimáticas. Con el empleo de técnicas de mATPasa a preincubaciones alcalinas y ácidas se pudieron evidenciar claramente tres tipos principales de fibras.

De acuerdo con la clasificación propuesta para el toro de lidia por Martínez Gomariz (2001) y Picard et al. (2005) hemos denominado a estas fibras como tipos I, IIA, y IIX (Figura 18). Estas últimas, clásicamente han sido consideradas como IIB. Al utilizar rangos de tiempos de preincubación para la técnica mATPasa ácida a pH 4,6, pudimos apreciar fibras con tinción intermedia entre los tipos IIA y IIX, que decidimos considerar de un tipo u otro en función de su grado de intensidad de tinción.

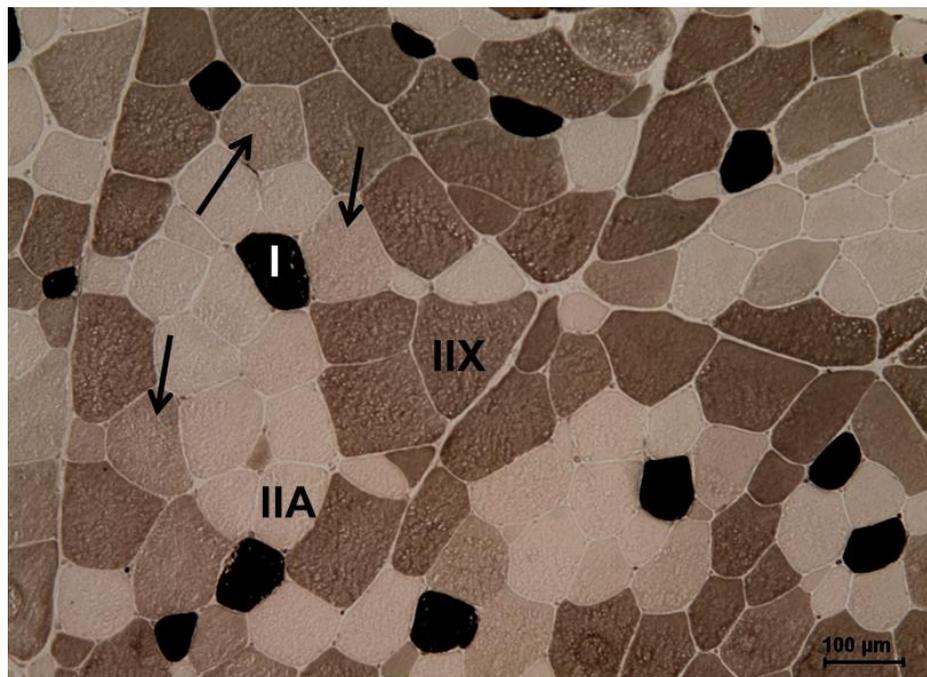
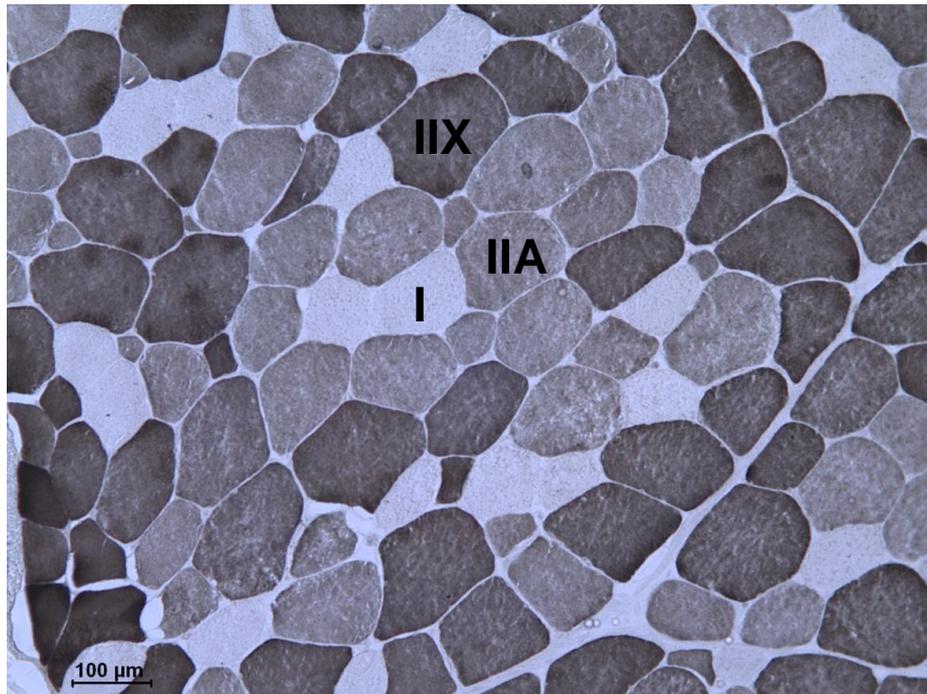


Figura 18. Tipos principales de fibras (I, IIA y IIX) identificados mediante la técnica mATPasa, preincubación alcalina pH 10,4 (imagen superior) y preincubación ácida pH 4,6 (imagen inferior). Obsérvese la presencia de fibras con tonalidad tintorial intermedia a las de las IIA y IIX (flechas). Fascículos sin lesiones.

- Las fibras tipo I presentan actividad mATPasa alcalino lábil (tinción negativa o clara frente a pH alcalinos) y ácido estable (fuerte tinción o positiva a pH ácidos). Este modelo tintorial se corresponde con el de las típicas fibras I, de contracción lenta, descritas en la mayoría de los mamíferos.

- Las fibras tipo IIA tienen actividad mATPasa alcalino estable (tinción moderada) y ácido lábil (tinción clara a pH 4,6 y 4,3). Con pH alcalinos de preincubación (10.2, 10.3, 10.4, 10.5 y 10.6) se diferencian claramente de las restantes fibras tipo II, que presentan un mayor grado de intensidad de tinción.

- Las fibras tipo IIX (clásicamente encuadradas como IIB), presentan la mayor actividad mATPasa alcalino estable (fuerte tinción), y reaccionan de forma moderada (tinción intermedia) ante preincubaciones a pH 4.6, siendo totalmente ácido lábiles a preincubaciones pH 4.3.

- Estos tres tipos principales de fibras fueron fácilmente reconocibles en los dos músculos estudiados, sobre todo al haber utilizado un amplio rango de pH en las preincubaciones alcalinas y diferentes tiempos en las preincubaciones ácidas.

La distribución de estos tipos de fibras musculares en los novillos estudiados obedece a un patrón clásico en mosaico o tablero de ajedrez, con los tipos entremezclados entre sí, sin compartimentos donde predomine ningún tipo fibrilar (Figura 19).

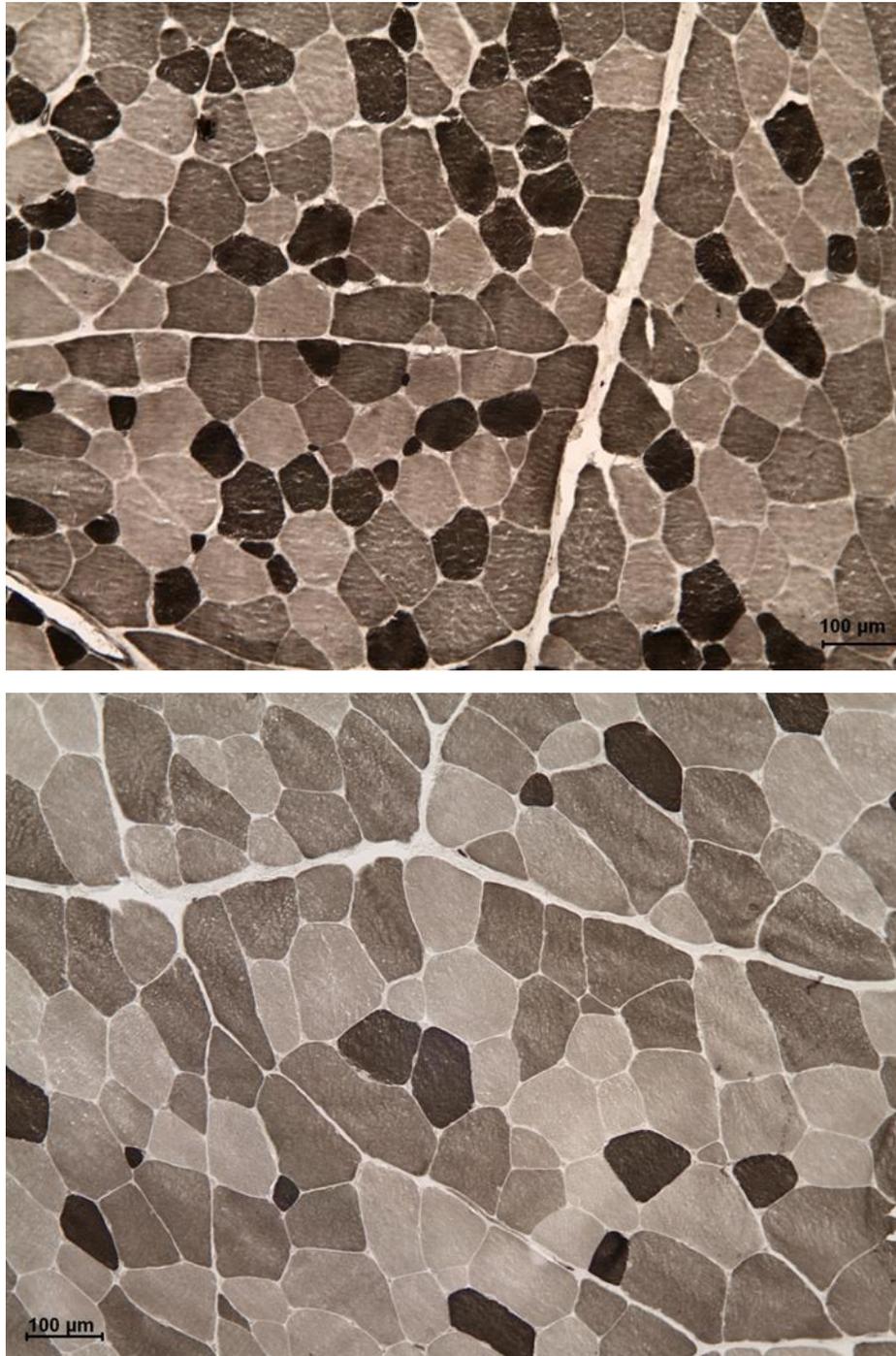


Figura 19. Secciones transversales de los músculos tríceps braquial (imagen superior) y semitendinoso (imagen inferior) donde se aprecia la distribución de los tres tipos principales de fibras musculares en modelo mosaico o tablero de ajedrez. Fascículos sin lesiones.

La técnica oxidativa NADH-TR nos ha permitido apreciar también que ambos músculos se componen de al menos tres tipos principales de fibras de acuerdo con del grado de intensidad de tinción (Figura 20). Dicho grado lo hemos referido como alto (fibras SO), bajo (fibras FG) y moderado (fibras FOG), de acuerdo con la clasificación establecida en su día por Peter et al. (1972).

Al contrastar los perfiles ATPásicos con las reacciones que manifiestan las fibras musculares ante la técnica oxidativa NADH-TR, podemos referir las siguientes características:

- Todas las fibras tipo I reaccionaron de manera intensa (tinción alta) frente a la técnica NADH-TR, por lo que podemos asegurar que presentan un perfil netamente oxidativo. Se corresponden por tanto con fibras de contracción lenta y resistentes a la fatiga (fibras SO).
- Las fibras tipo IIA manifestaron un comportamiento variable, mostrando la mayoría de las veces una intensidad de tinción moderada, aunque algunas de ellas presentaron alta actividad NADH-TR; se corresponden por tanto con las clásicas fibras de contracción rápida y menor resistencia a la fatiga, con un metabolismo oxidativo-glicolítico (fibras FOG).
- La mayor parte de las fibras tipo IIX analizadas apenas se tiñen con la técnica NADH-TR. Se trata pues de fibras de contracción rápida, fácilmente fatigables, que tienen un metabolismo glicolítico no oxidativo (fibras FG).

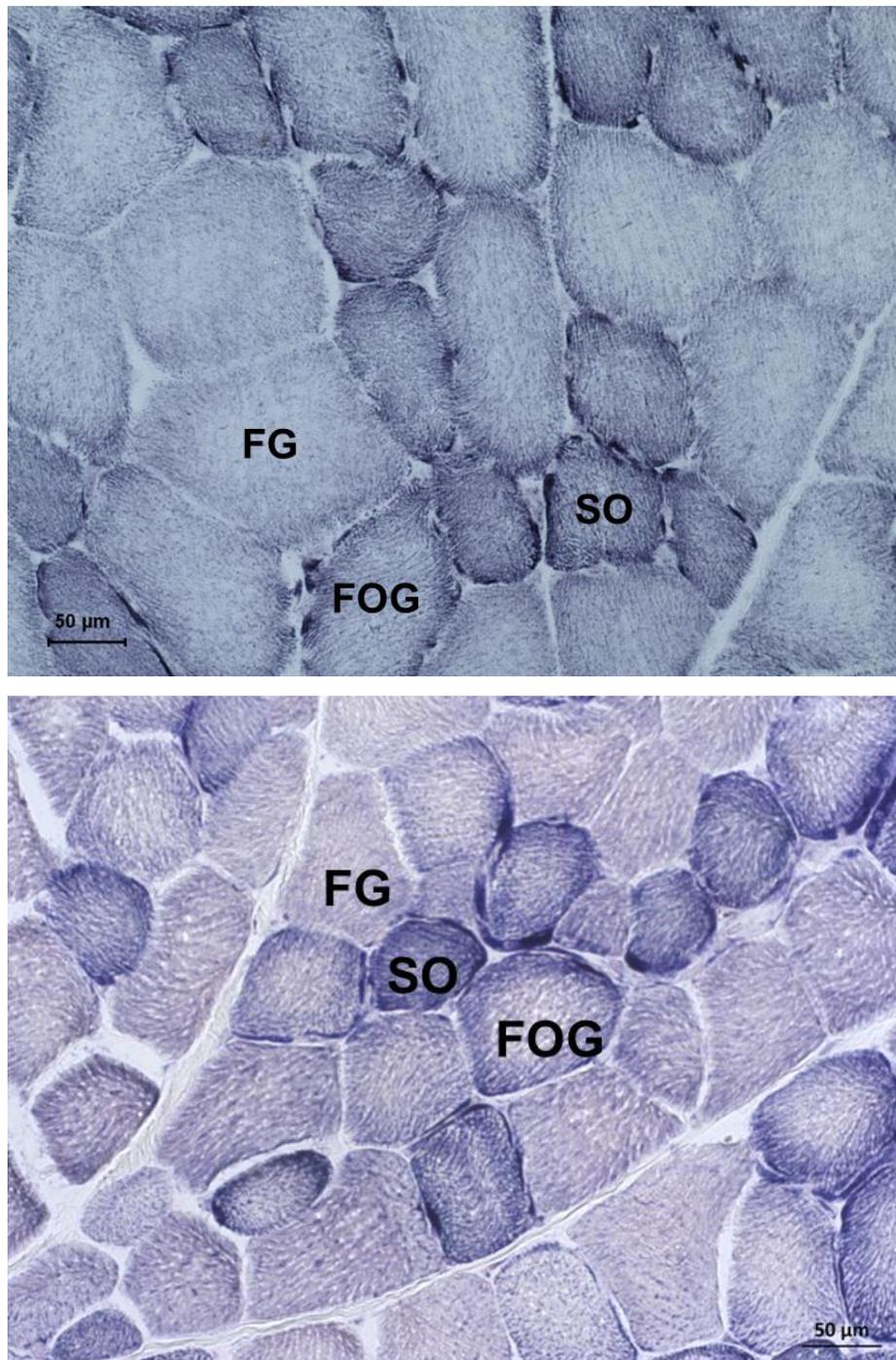


Figura 20. Secciones transversales de los músculos tríceps braquial (imagen superior) y semitendinoso (imagen inferior). Técnica NAD-TR. Las fibras pueden ser catalogadas de acuerdo con su intensidad de tinción en tres tipos principales: SO, FOG y FG. Fascículos sin alteraciones.

Los valores de porcentajes obtenidos para cada uno de los tipos de fibras identificados quedan reflejados en las tablas II (M. tríceps) y tabla III (M. semitendinoso) han sido representados en sus correspondientes gráficos. Como puede observarse (Figura 21), en ambos músculos predominan las fibras tipo II (IIA + IIX) aunque la cabeza larga del tríceps presenta un mayor porcentaje de fibras oxidativas (SO + FOG). Por el contrario, el músculo semitendinoso ostenta un mayor número de fibras con capacidad glicolítica (tabla IV).

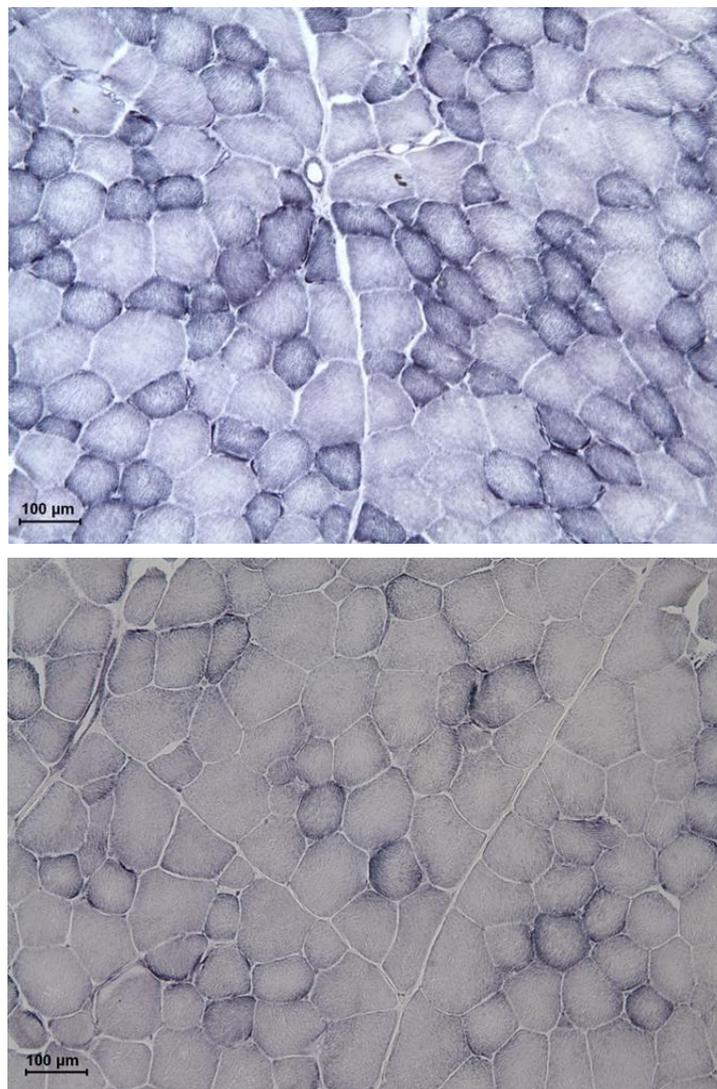
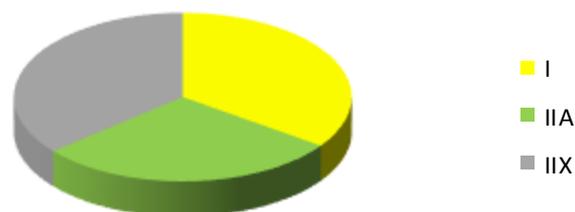


Figura 21. Secciones transversales teñidas con la técnica NAD-TR. Las fibras oxidativas (SO + FOG) son más numerosas en la cabeza larga del tríceps braquial (imagen superior), mientras que las fibras glicolíticas predominan en el músculo semitendinoso (imagen inferior). Fascículos sin alteraciones

TRICEPS	
mATPasa	
TIPOS DE FIBRAS	MEDIAS \pm ERROR
I	34,79 \pm 1,43
IIA	29,09 \pm 1,46
IIX	36,12 \pm 1,96

TRICEPS: Medias mATPasa



TRICEPS	
NADH-TR	
TIPOS DE FIBRAS	MEDIAS \pm ERROR
SO	28.94 \pm 0,85
FOG)	31,89 \pm 1,40
FG	39,17 \pm 1,42

TRICEPS: Medias NADH-TR

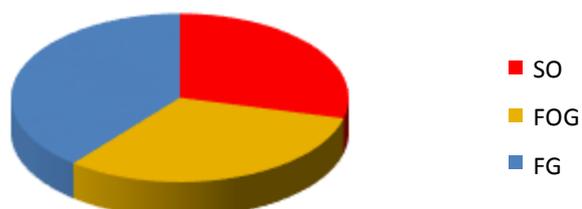


Tabla II Valores de porcentajes de fibras obtenidos para la cabeza larga del M. tríceps braquial y su correspondiente representación gráfica.

SEMITENDINOSO	
mATPasa	
TIPOS DE FIBRAS	MEDIAS \pm ERROR
I	39,52 \pm 1,27
IIA	12,88 \pm 0,84
IIX	47,60 \pm 1,52

SEMITENDINOSO: Medias mATPasa



SEMITENDINOSO	
NADH-TR	
TIPOS DE FIBRAS	MEDIAS \pm ERROR
SO	31,52 \pm 1,11
FOG	22,19 \pm 1,25
FG	46,29 \pm 1,33

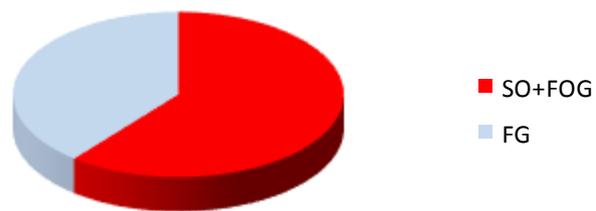
SEMITENDINOSO: Medias NADH-TR



Tabla III. Valores de porcentajes de fibras obtenidos para el M. Semitendinoso y su correspondiente representación gráfica

TRICEPS	
NADH-TR	
TIPOS DE FIBRAS	%
SO+FOG	60,83
FG	39,17

TRICEPS: FIBRAS OXIDATIVAS vs FIBRAS GLICOLÍTICAS



SEMITENDINOSO

SEMITENDINOSO	
NADH-TR	
TIPOS DE FIBRAS	%
SO+FOG	53,71
FG	46,29

SEMITENDINOSO: FIBRAS OXIDATIVAS vs FIBRAS GLICOLÍTICAS

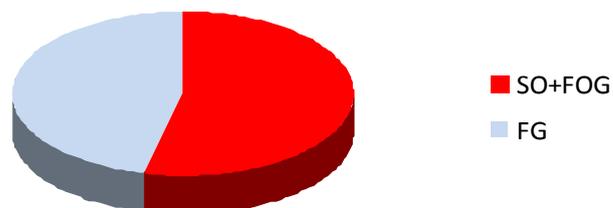


Tabla IV. Valores de porcentajes de fibras con capacidad oxidativa (SO + FOG) y glicolíticas (FG) obtenidos en ambos músculos y su correspondiente representación gráfica

V.2. LESIONES FIBRILARES

Las técnicas histológicas que hemos empleado, nos permiten en primer lugar, observar y analizar el modelo y arquitectura de los fascículos musculares; en segundo lugar, valorar las lesiones y alteraciones que de forma individual acontecen en las fibras.

Las reacciones histoquímicas (NADH-TR, mATPasa) permiten constatar alteraciones musculares relacionadas con la desestructuración del sarcoplasma, de las propias miofibrillas (técnica mATPasa) y de la organización mitocondrial (técnica NADH-TR), así como poder determinar qué tipo de fibra es la que presenta la lesión.

En las tablas V y VI (novillos temporada 2007) y VII y VIII (novillos temporada 2008) se recogen las lesiones encontradas para cada músculo y toro analizado. Sin embargo, no todas las muestras fueron evaluadas, ya que desde que se realiza la toma de muestras hasta que se obtienen las diferentes tinciones y reacciones enzimáticas pueden surgir fallos que hacen inviable el análisis del músculo al microscopio óptico. Esto sucedió con 6 de los 24 novillos de la temporada 2007, por lo que el número de animales analizados desde el punto de vista histológico se redujo a 18. Por fortuna, en la segunda temporada (2008) sí se consiguió evaluar las muestras histológicas de los 24 novillos seleccionados.

Nº de TORO	MÚSCULOS	
	TRICEPS	SEMITENDINOSO
	LESIONES	LESIONES
1	- <i>Sarcocystis</i> - Pérdida contorno poligonal - Fibras licuadas - Rotura sarcolema	- Sin lesiones
2	- <i>Sarcocystis</i> - Rotura sarcolema	- Rotura sarcolema
3	- Sin lesiones	- Sin lesiones
4	- Pérdida contorno poligonal - Rotura sarcolema	- Sin lesiones
5	- Rotura sarcolema	- Sin lesiones
6	- Sin lesiones	- Pérdida contorno poligonal - Rotura sarcolema
7	- Pérdida contorno poligonal - Rotura sarcolema	- Sin lesiones
8	- Sin lesiones	- Pérdida contorno poligonal - Rotura sarcolema
9	- Pérdida contorno poligonal	- Sin lesiones

Tabla V. Lesiones fibrilares en los novillos de la temporada 2007

Nº de TORO	MÚSCULOS	
	TRICEPS	SEMITENDINOSO
	LESIONES	LESIONES
10	- Pérdida contorno poligonal - Rotura sarcolema	- Sin lesiones
11	- Pérdida contorno poligonal - <i>Sarcocystis</i>	- Presencia de fibras anguladas
12	- Sin lesiones	- Sin lesiones - <i>Sarcocystis</i>
13	- Sin lesiones	- Sin lesiones
14	- Pérdida contorno poligonal - Rotura sarcolema - Vacuolas	- Sin lesiones
15	- Sin lesiones	- Sin lesiones
16	- Rotura sarcolema	- Rotura sarcolema
17	- Rotura sarcolema	- Pérdida contorno poligonal - Rotura sarcolema
18	- Rotura sarcolema	

Tabla VI. Lesiones fibrilares en los novillos de la temporada 2007

Nº de TORO	MÚSCULOS	
	TRICEPS	SEMITENDINOSO
	LESIONES	LESIONES
1	- Sin lesiones	- Pérdida contorno poligonal - Rotura sarcolema
2	- Sin lesiones	- Sin lesiones
3	- Sin lesiones	- Sin lesiones
4	- Pérdida contorno poligonal - Vacuolas - Rotura sarcolema	- Sin lesiones
5	- Sin lesiones	- Sin lesiones
6	- Vacuolas	- Pérdida contorno poligonal
7	- Pérdida contorno poligonal - Vacuolas	- Pérdida contorno poligonal - Vacuolas
8	- Sin lesiones	- Fibras anguladas
9	- Pérdida contorno poligonal	- Sin lesiones
10	- Pérdida contorno poligonal - Rotura sarcolema	- Fibras anguladas
11	- Pérdida contorno poligonal - Vacuolas	- Sin lesiones
12	- Pérdida contorno poligonal - Rotura sarcolema	- Pérdida contorno poligonal

Tabla VII. Lesiones fibrilares en novillos de la temporada 2008

Nº de TORO	MÚSCULOS	
	TRICEPS	SEMITENDINOSO
	LESIONES	LESIONES
13	- Sin lesiones	- Sin lesiones
14	- Pérdida contorno poligonal	- Pérdida contorno poligonal - Rotura sarcolema
15	- Sin lesiones	- Sin lesiones
16	- Sin lesiones	- Sin lesiones
17	- Pérdida contorno poligonal - <i>Sarcocystis</i>	- Sin lesiones
18	- Pérdida contorno poligonal	- Sin lesiones
19	- Sin lesiones	- Sin lesiones
20	- Sin lesiones	- Sin lesiones
21	- Sin lesiones	- Sin lesiones
22	- Sin lesiones	- Sin lesiones
23	- Sin lesiones	- Sin lesiones
24	- Sin lesiones	- Sin lesiones

Tabla VIII. Lesiones fibrilares en novillos de la temporada 2008

En general, todas las secciones musculares analizadas presentaban fascículos bien conformados separados por el correspondiente tejido conjuntivo perimisial. Los fascículos estaban integrados a su vez por fibras de aspecto poligonal, separadas por endomisio y con núcleos en posición subsarcolémica (técnicas H&E y Tricrómico de Gomori). La mayoría de los miocitos analizados mostraron además una buena estructuración de sus miofibrillas (técnica m-ATPasa) y una disposición ordenada de las mitocondrias (técnica NADH-TR). Sin embargo, en un número importante de muestras (tablas V-VIII) pudimos observar diferentes alteraciones o lesiones en algunas de las fibras, siempre de manera aislada comprometiendo a un número escaso de fascículos y nunca a toda la sección muscular (Figura 22). El número de novillos donde pudimos describir las lesiones varió según se tratara de la primera o segunda temporada. Así, de los 18 novillos evaluados en la temporada 2007, tan solo uno de ellos no presentó lesión alguna en ninguno de los músculos analizados. Sin embargo, en la temporada 2008, 12 de los 24 toros no presentaron lesiones dignas de destacar. En ambas temporadas las lesiones fueron más frecuentes en el M. tríceps braquial (22 muestras afectadas) en comparación con las encontradas en el M. semitendinoso (10 muestras afectadas).

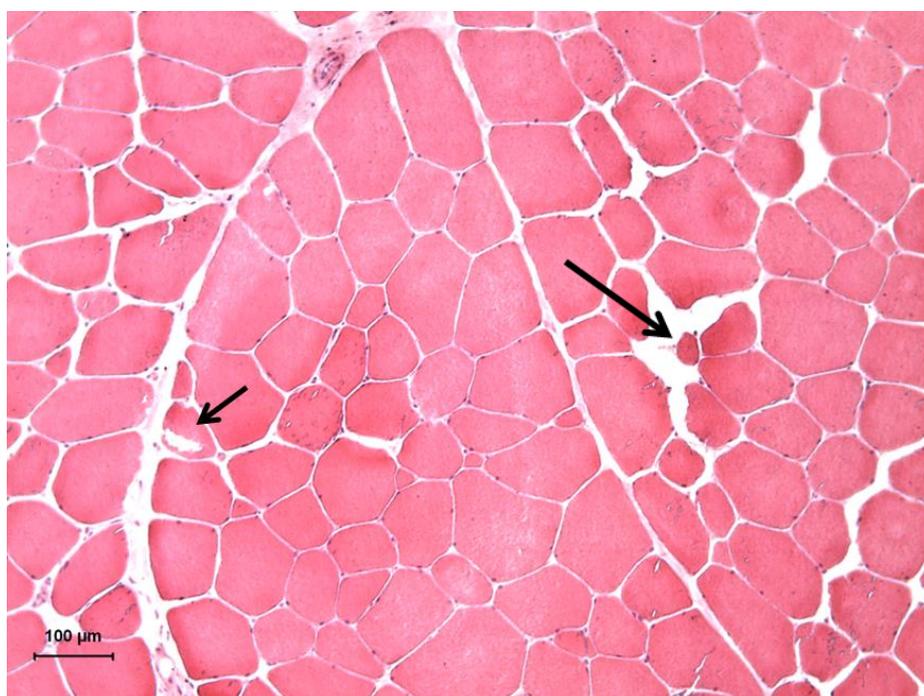


Figura 22. Las fibras con alteraciones (flechas) se presentan de manera aislada y no afectan a la integridad del fascículo muscular. Técnica H&E.

El tipo de lesión más frecuente consistió en la presencia de fibras de aspecto redondeado, es decir con pérdida de su contorno poligonal típico en su sección transversal (Figura 23) y con un aumento de tamaño e intensidad de tinción (hipercontraídas).

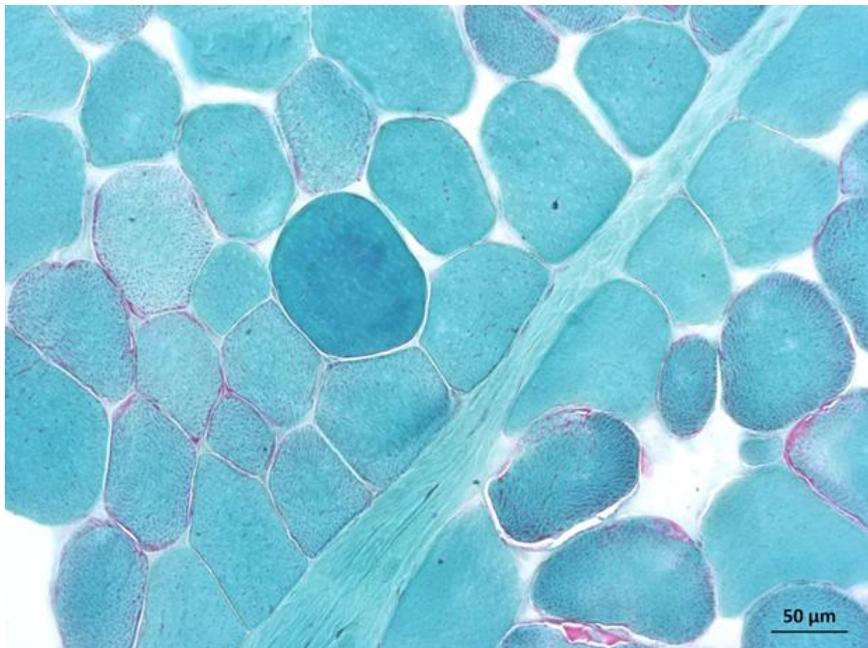
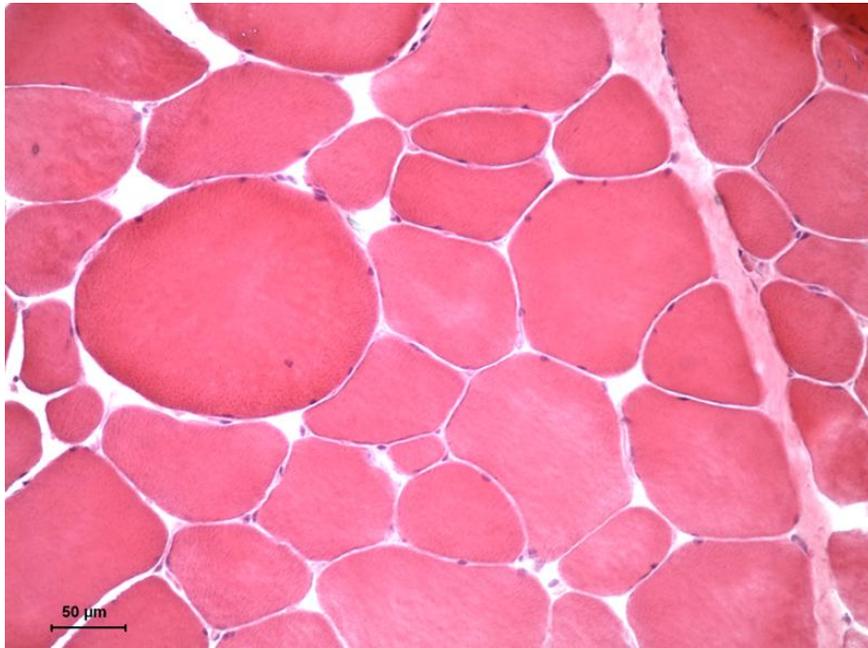


Figura 23. Imágenes típicas de fibras con pérdida de su contorno poligonal y aumento de tamaño e intensidad de tinción. Se trata de la lesión observada con mayor frecuencia. Técnica H&E (imagen superior) y Tricrómico de Gomori (imagen inferior)

Asimismo fueron observadas fibras con rotura del sarcolema y consiguiente pérdida del sarcoplasma (Figura 24).

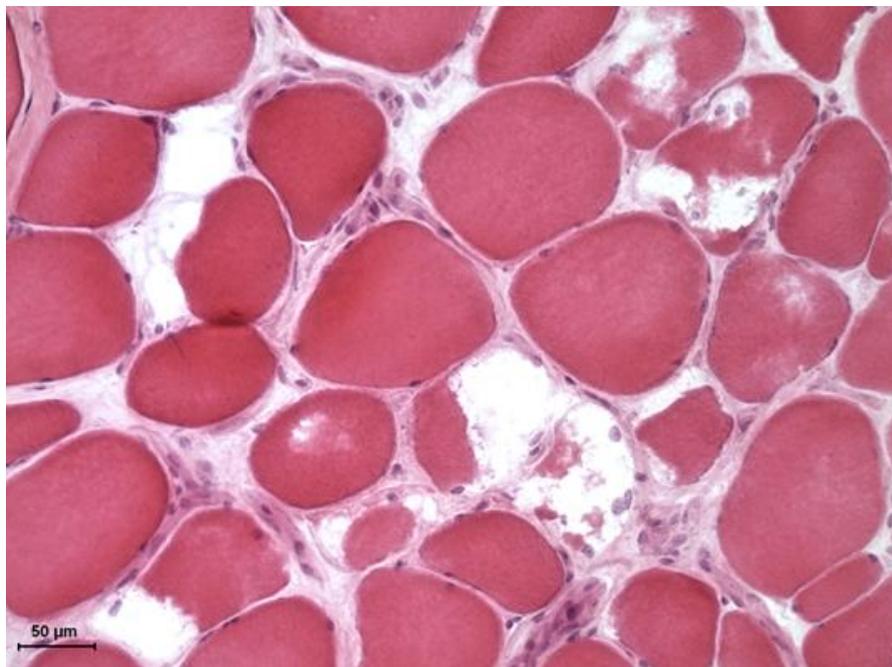
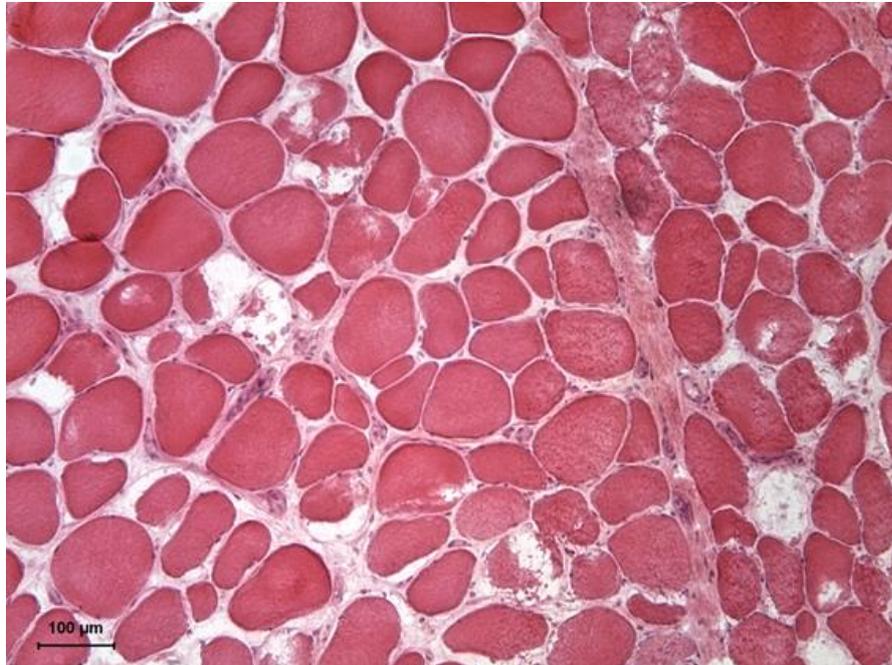


Figura 24. Secciones transversales del M. Tríceps braquial. Técnica Hematoxilina-Eosina. Presencia de fibras con vacuolas, rotura del sarcolema y consiguiente pérdida de sarcoplasma.

En determinadas secciones se hace patente la presencia de fibras que manifiestan un mayor grado de alteración, mostrando signos degenerativos que se acompañan de procesos de desestructuración de las miofibrillas. Estos procesos son aún más evidentes cuando sometemos las secciones a la técnica de mATPasa y a la NADH-TR (Figura 25).

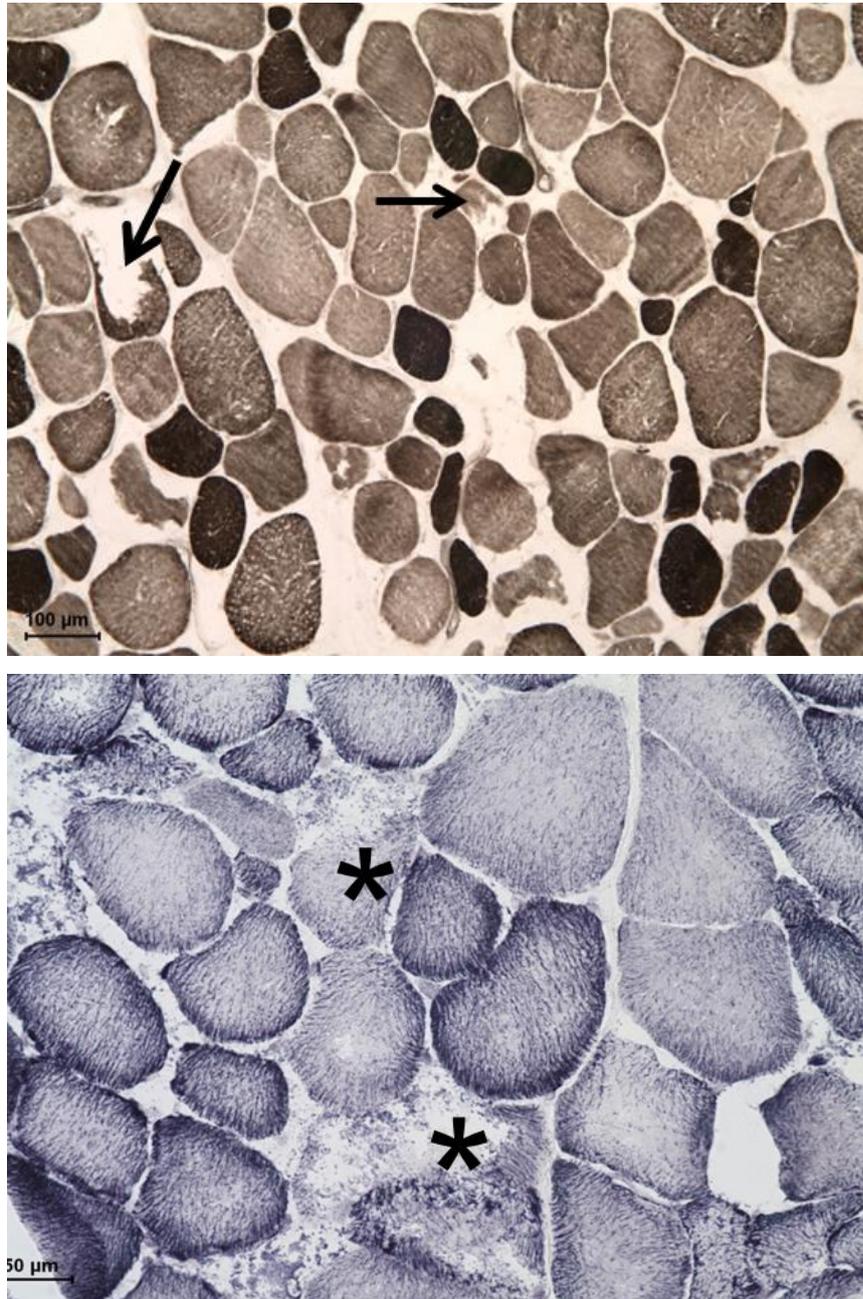


Figura 25. La rotura fibrilar y pérdida de sarcoplasma se hace evidente con la técnica mATPasa pH 4,6 (imagen superior) y la NADH-TR (imagen inferior). Las fibras más afectadas (flechas y asteriscos) se corresponden a tipo II

Además de las lesiones anteriormente descritas, hemos detectado otras, aunque de menos evidente, referidas a procesos de necrosis (fibras “licuadas”) y fibras con presencia de vacuolas en el interior del sarcoplasma. La mayoría de estas lesiones recayeron sobre las fibras tipo II, aunque en el caso de las fibras hipercontraídas fue difícil diferenciar el tipo de fibra involucrado al estar incrementada la tinción.

La técnica oxidativa (NADH-TR) confirma la existencia de estas alteraciones que afectan, en mayor o menor medida, al sarcoplasma. Así, identificamos alteraciones mitocondriales (Figura 26) que interesaban total (incremento de la actividad NADH-TR) o parcialmente (agregados mitocondriales subsarcolémicos).

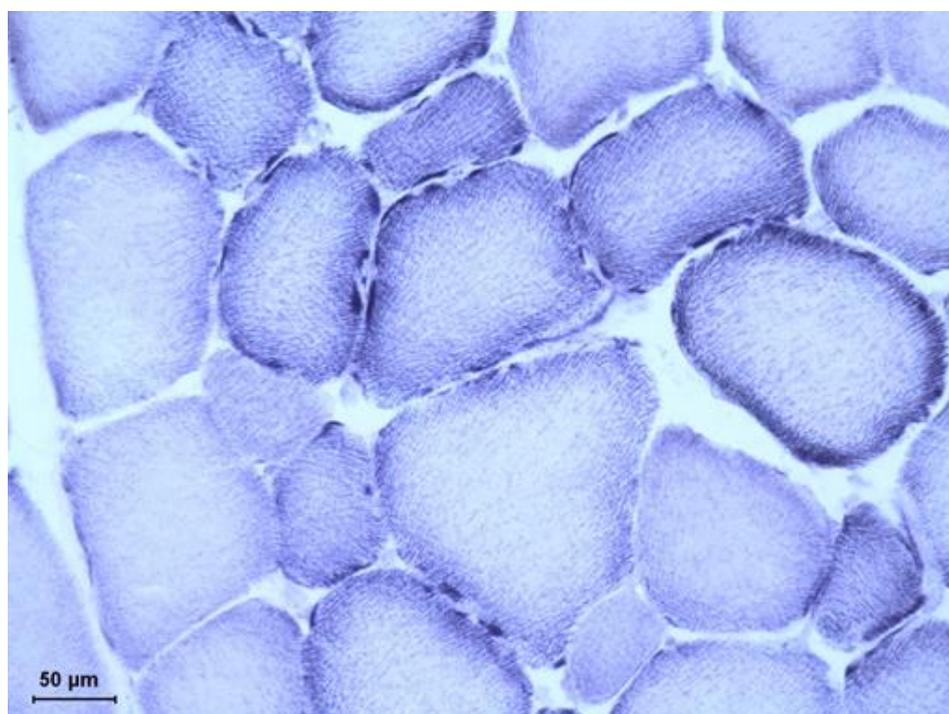
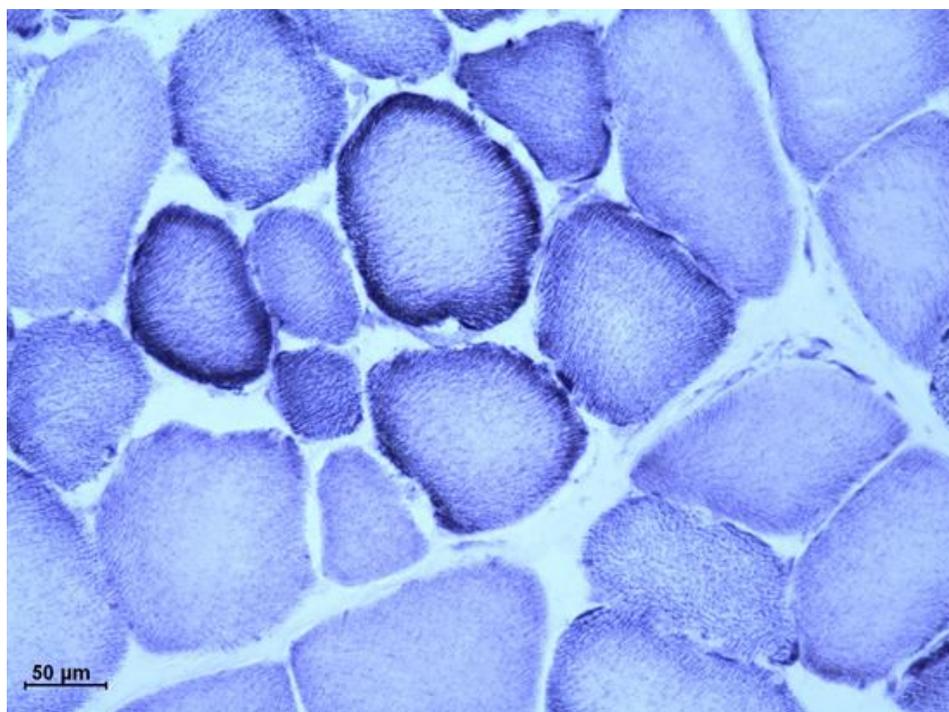


Figura 26. Secciones transversales del M. triceps braquial. Técnica NADH-TR. Existencia de agregados mitocondriales subsarcolemmicos con aumento de la actividad oxidativa en la periferia del sarcoplasma.

Destacar también la presencia de algunas fibras con escasa o nula actividad oxidativa en el centro del sarcoplasma y con actividad moderada en la periferia (Figura 27).

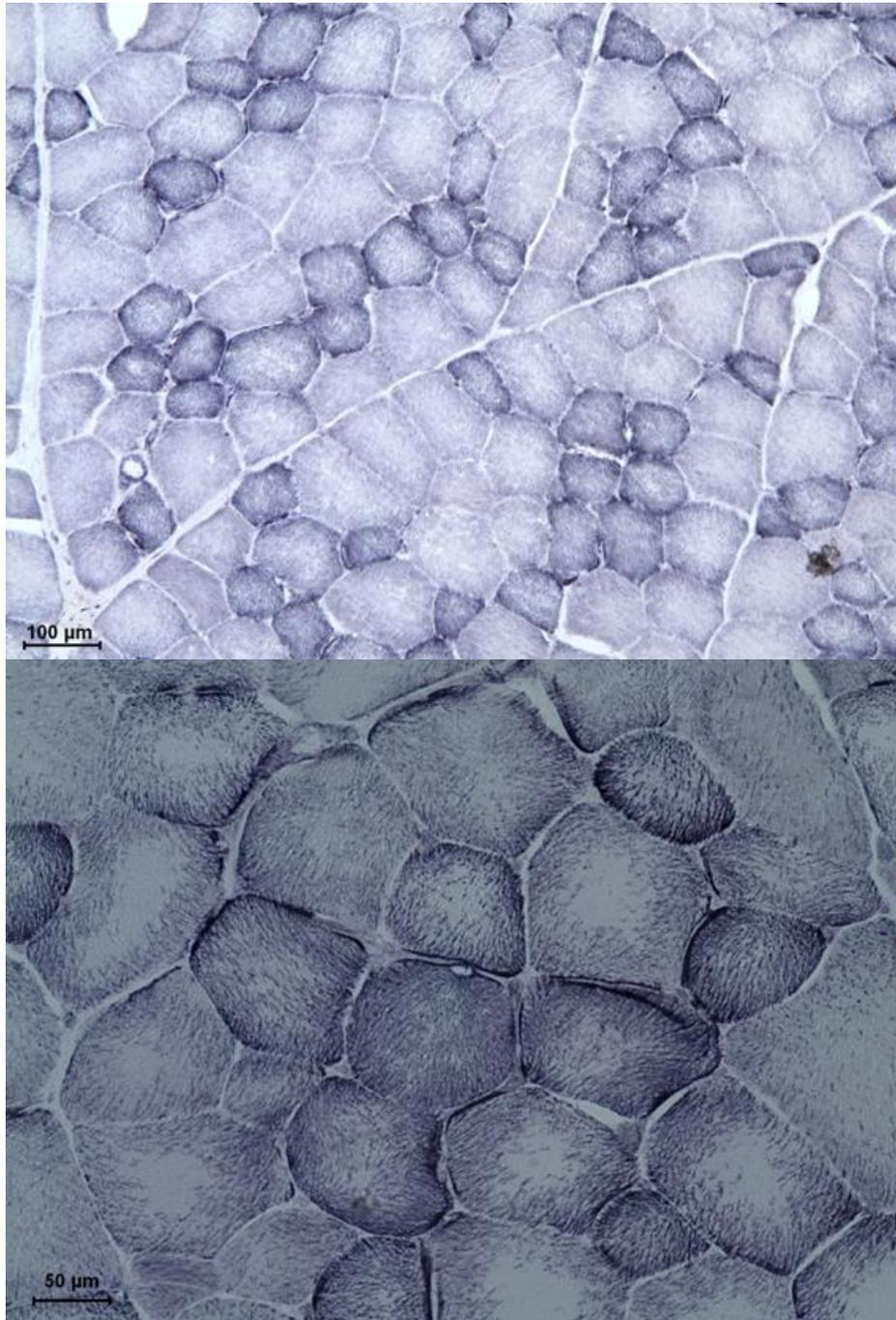


Figura 27. Secciones musculares que muestran fibras con escasa o nula actividad oxidativa en el centro del sarcoplasma. Técnica NADH-TR.

En uno de los novillos de la temporada 2007 y en otros dos de la de 2008 pudimos observar además presencia de fibras anguladas de escaso tamaño en las muestras del músculo semitendinoso (Figura 28).

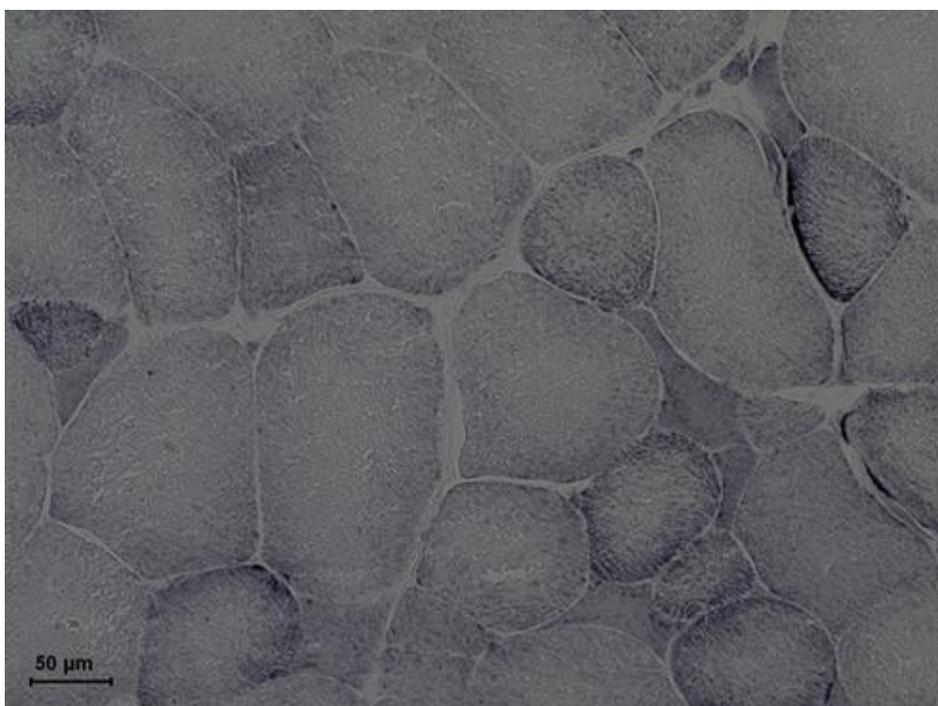
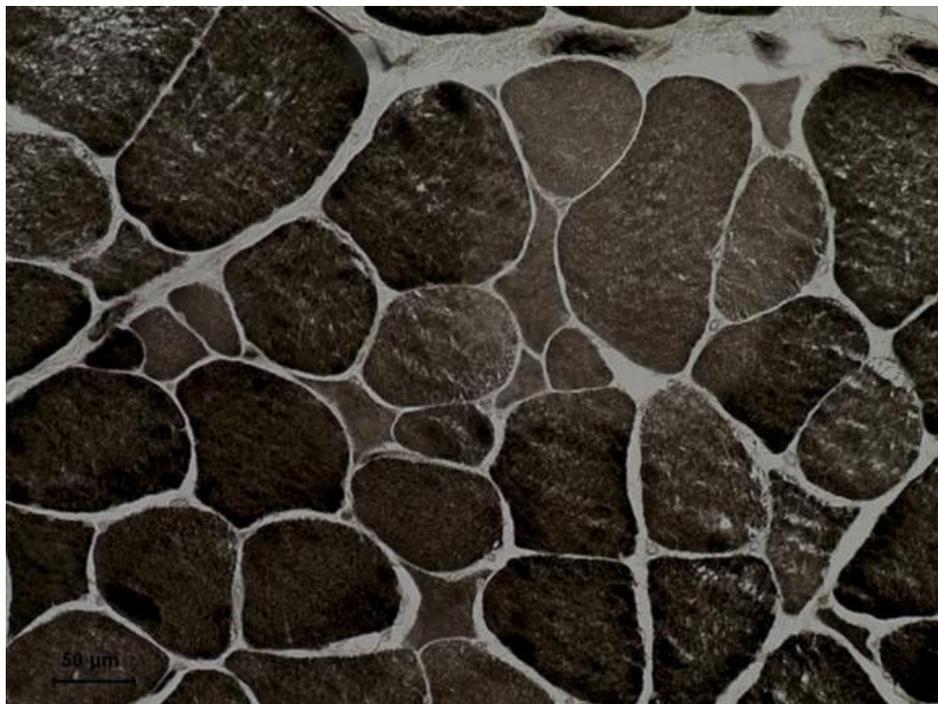


Figura 28. Secciones transversales del M. semitendinoso. Presencia de fibras con perfiles angulados y de reducido tamaño (atróficas). Técnica mATPasa preincubación alcalina (imagen superior) y NADH-TR (imagen inferior).

Además de estas lesiones en 4 de los novillos de la temporada 2007 y 2 más de la 2008 encontramos signos de parasitación muscular, con presencia de algunos quistes encapsulados intramusculares de *Sarcocystis* spp. Dichos quistes se localizan en el interior de las fibras, y en todas las muestras analizadas siempre parasitaban a las fibras tipo II. Respecto a este hallazgo, referir también que no encontramos más de uno o dos quistes por campo histológico analizado (Figura 29).

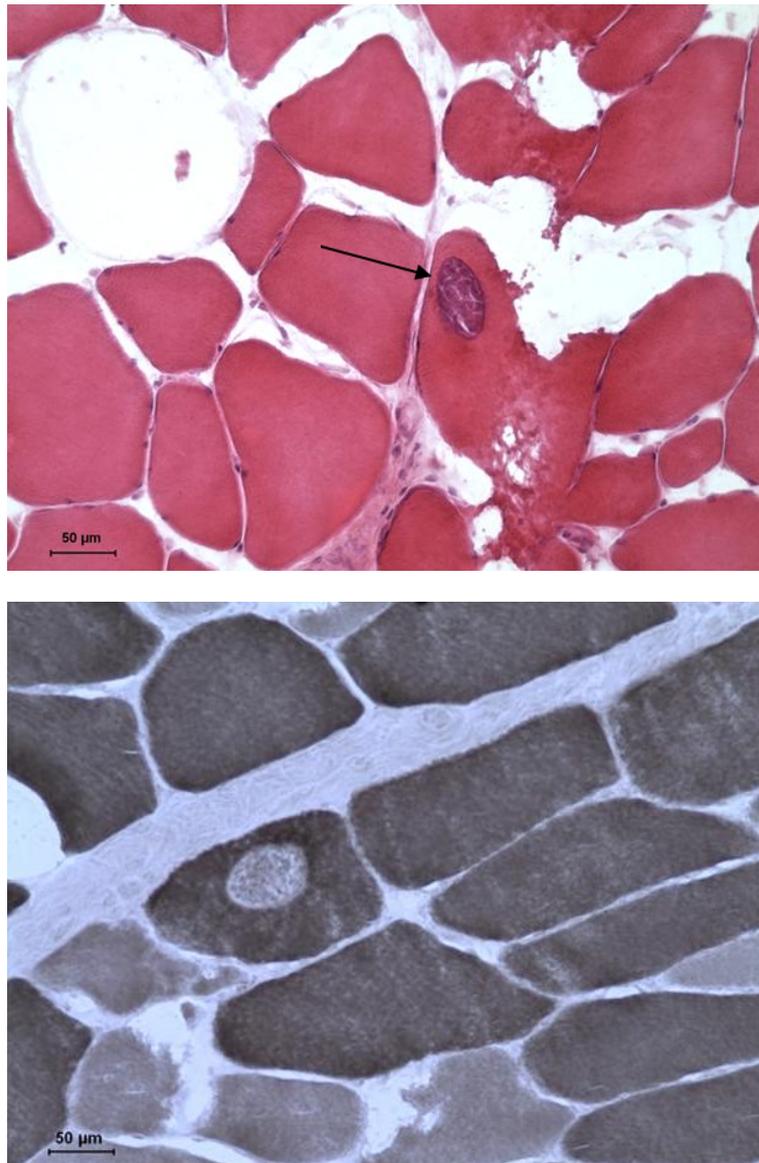


Figura 29. Presencia de un quiste encapsulado de *Sarcocystis* en el interior de los miocitos. Técnica H&E (imagen superior). La técnica mATPasa (preincubación alcalina) revela que las fibras afectadas corresponden a tipo II.

V.3. RESULTADOS DEL ANÁLISIS PRACTICADO A LAS MUESTRAS DE SANGRE.

Los valores obtenidos tras el análisis practicado quedan reflejados en las tablas IX (perfil muscular), X (perfil renal) y XI (perfil hepático).

Respecto al perfil muscular el primer dato que se observa es el escaso número de animales con alteraciones de los valores en la LDH, la CK y GOT. Así se aprecia que solamente los animales número 4, 11 y 22 presentan elevaciones de la CK, siendo únicamente detectadas alteraciones de la GOT en los animales número 7 y 19, observando además elevaciones en la LDH presentes en las muestras de los animales 4, 7, 11,19 y 22. Es importante recalcar que en ninguno de los animales que presentaron alteraciones de los tres valores estudiados, éstas aparecieron simultáneamente.

Todas las alteraciones de los valores, en los pocos animales que las presentan, son siempre por elevación de los mismos. Los tres animales que tienen elevaciones de la CK (animales 4,11 y 22) presentan a su vez valores elevados de LDH. Los dos animales que presentan elevaciones de la GOT (animales 7 y 19) también presentan elevaciones de la LDH. Respecto a los tres animales que presentan alteraciones de la CK y la LDH (animales 4, 11 y 22), cabe decir que los incrementos de dichos valores son proporcionales entre sí en todos los casos.

RESULTADOS ENZIMAS FATIGA MUSCULAR			
TORO	GOT (45-125)	LDH (250-750)	CK (50-180)
1	100	341	102
2	56	413	102
3	89	512	105
4	90	829	214
5	114	406	115
6	78	311	166
7	145	784	162
8	87	284	105
9	112	501	122
10	100	388	77
11	87	986	324
12	121	708	149
13	115	457	122
14	99	512	133
15	66	374	115
16	78	422	133
17	99	400	166
18	66	289	114
19	146	814	142
20	98	297	154
21	67	433	102
22	101	780	194
23	82	477	105

Tabla IX. Resultados perfil de fatiga muscular

En cuanto a los resultados obtenidos para el perfil renal se observa que únicamente un animal de los veintitrés (el número 3) presenta variaciones en algún valor, reflejando una elevación en los valores de la urea así como un leve descenso en los niveles de proteínas totales. No se detectaron alteraciones en la creatinina en ninguno de los novillos estudiados.

RESULTADOS ENZIMAS PERFIL RENAL			
TORO	UREA (8-25)	CREATININA (0,60-1,80)	P.TOT (65-85)
1	22	1,25	70
2	12	0,88	69
3	29	1,76	64
4	20	0,89	77
5	16	0,85	73
6	18	0,95	74
7	9	0,71	78
8	23	1,24	72
9	20	1,11	69
10	18	0,99	70
11	23	1,42	77
12	11	0,74	67
13	21	1,01	80
14	24	1,07	71
15	10	0,69	74
16	21	1,41	69
17	18	0,99	70
18	22	0,96	74
19	10	0,71	74
20	14	0,82	71
21	21	0,93	70
22	19	1	77
23	20	0,99	70

Tabla X. Resultados perfil renal

Por último, estudiados los valores en los parámetros indicativos de daño hepático tales como GOT, GPT, GGT y FA, únicamente se han detectado alteraciones simultáneamente en las enzimas GOT, GPT y de la FA en los novillos número 7 y 19, siendo elevaciones leves sobre los valores considerados normales. Así mismo, se han detectado en el novillo número 12 alteraciones en los valores de la GGT y la FA.

RESULTADOS ENZIMAS PERFIL HEPÁTICO				
TORO	GOT (45-125)	GPT (8-32)	GGT (5-23)	FA (50-175)
1	100	18	19	101
2	56	9	7	112
3	89	17	21	102
4	90	21	15	141
5	114	27	11	122
6	78	20	16	107
7	145	39	14	229
8	87	19	14	99
9	112	17	21	124
10	100	21	16	108
11	87	24	17	99
12	121	29	26	214
13	115	24	17	88
14	99	27	14	99
15	66	11	16	74
16	78	19	14	105
17	99	14	7	79
18	66	21	8	104
19	146	35	13	186
20	98	21	17	108
21	67	22	15	171
22	101	28	16	166
23	82	12	19	144

Tabla XI. Resultados perfil hepático

V.4. RESULTADOS RELATIVOS AL COMPORTAMIENTO DE LOS NOVILLOS DURANTE LA LIDIA

El comportamiento de los novillos se observó *in situ* en la plaza tanto en la temporada 2007 como en la 2008, poniendo especial atención en la respuesta de estos en los diferentes tercios de la lidia, no apreciándose en ninguno de los animales que participaron en los festejos algún indicio de debilidad,

claudicaciones intermitentes, ataxia de tercio posterior o arrastre de miembros, presentando todos ellos un excelente comportamiento en todos los tercios. Posteriormente se procedió al estudio pormenorizado del comportamiento de cada novillo mediante el visionado de las grabaciones realizadas en dicha plaza (Figura 30). En este visionado se analizó con detalle el comportamiento dividiendo el análisis en tres periodos diferenciados; el primero de estos periodos comienza desde la salida del novillo por la puerta de chiqueros hasta la finalización del tercio de varas, el segundo desde aquí hasta el final del tercio de banderillas y el tercero, desde abarcaría desde este punto hasta el final de la lidia. Nuevamente, se pudo comprobar el buen comportamiento de cada uno de los novillos objeto de estudio.



Figura 30. Comportamiento del novillo en el ruedo.

VI. DISCUSIÓN

La identificación de los tipos de fibras en el músculo esquelético de los novillos estudiados la hemos basado en el sistema de clasificación propuesto por Dubowitz y Brooke (1973) para la especie humana, y posteriormente modificado por diferentes autores (Snow et al., 1982; Staron et al., 1983; Staron y Pette, 1986; Latorre et al., 1993) en distintos mamíferos, incluido el toro de lidia (Martínez Gomariz et al., 1998; Martínez Gomariz, 2001 y Picard et al. 2005). Dicho sistema se fundamenta en el empleo de técnicas que detectan la actividad de la enzima ATPasa miosínica (mATPasa), al objeto de catalogar a las fibras en función de sus características contráctiles. De forma paralela y sobre otras secciones transversales seriadas, aplicamos la técnica NADH-TR que detecta una enzima relacionada con el metabolismo oxidativo, lo que nos ha permitido asignar un determinado perfil metabólico a cada una de las fibras identificadas con la técnica mATPasa y poder catalogarlas, siguiendo la clasificación establecida en mamíferos por Peter et al. (1972), como fibras SO (lentas oxidativas), FOG (rápidas oxidativas-glicolíticas) y FG (rápidas glicolíticas). Aunque hoy en día es más recomendable el uso de técnicas inmunohistoquímicas capaces de identificar el tipo de fibra en función del tipo de miosina que contienen, su empleo está limitado por la inexistencia en los mercados convencionales de los anticuerpos necesarios (Gollnick et al., 1983) y porque no era objetivo de esta tesis doctoral. Por todo ello, las técnicas de mATPasa siguen siendo muy útiles, pues aunque se trata de técnicas histoquímicas semicualitativas, resultan muy sensibles al contenido de cadenas pesadas de miosina (Staron y Pette, 1986). La nomenclatura que hemos utilizado se corresponde con la inicialmente propuesta por Brooke y Kaiser (1970), es decir, tres tipos principales de fibras denominados I, IIA y IIB. Sin embargo, en nuestro trabajo hemos optado por catalogar a las fibras tipo IIB como IIX. Para ello nos basamos en estudios previos realizados en grandes mamíferos (Rivero et al., 1996; Talmadge et al., 1996; Tanabe et al., 1998; Lefaucheur et al., 1998; Gil et al., 2001; Toniolo et al., 2004; Jiménez, 2009) incluido el propio toro de lidia (Picard et al., 2005) que refieren que muchas de las fibras que habían sido catalogadas como IIB, en realidad serían fibras IIX en virtud de su contenido en miosina. Tres tipos principales de fibras fueron descritos también en la especie bovina por Hunt y Hedrick (1977), May et al. (1977) y

Salomon y Dunn (1988); si bien, los últimos autores aplican la catalogación propuesta por Ashmore y Doerr (1971), es decir, fibras αR , βR y αW .

Por otro lado, la clasificación fibrilar establecida se ve enriquecida si a ello sumamos las características que aportan las técnicas histotoquímicas metabólicas. Al analizar las secciones seriadas teñidas con la técnica metabólica -NADH-TR-, hemos observado que todas las fibras tipos I presentaron alta capacidad oxidativa, mientras que en las tipo IIA dicha actividad fue más variable (moderada y alta) y baja o nula en las fibras tipo IIX. Estos resultados están en concordancia con los reseñados para la especie bovina (toros rojos noruegos) por Totland y Kryvi (1991) quienes también encuentran variaciones en cuanto a la capacidad oxidativa de las fibras tipo I, IIA y IIB (denominadas por nosotros IIX). Estos mismos autores indican además, que la capacidad oxidativa depende del músculo estudiado y que los porcentajes fibrilares varían considerablemente según se trate de músculos del miembro torácico o músculos del miembro pelviano, ya que los músculos implicados en el mantenimiento de la verticalidad y posición son particularmente ricos en fibras tipo I, circunstancia que hemos apreciado para el músculo tríceps braquial. Sin embargo discrepamos con los resultados obtenidos para este músculo por Picard et al. (2015), pues afirman que el tríceps braquial del toro bravo presenta un metabolismo muy oxidativo y poco glicolítico al poseer escasas fibras tipo IIX. Esta discrepancia podría estar relacionada con el lugar de toma de muestras elegido en ese estudio. Por otra parte, la distribución en modelo mosaico con predominio de fibras tipo II, es otro hecho que también ha sido observado por los autores que han trabajado con diferentes músculos de esta raza (Martínez Gomariz et al., 1998).

Aunque estamos de acuerdo con las teorías que establecen que el síndrome relativo a la falta de fuerza y caída del toro bravo durante la lidia debe entenderse como un problema de etiología multifactorial donde están implicados distintos sistemas orgánicos (García Belenguer, 1995; Ariola, 1998; Jiménez Chamorro, 2000), nuestro estudio complementa otros, que señalan al músculo esquelético como parte importante y fundamental en dicho síndrome. En este sentido, diversos autores señalan la caída como un problema de debilidad

muscular o de falta de acondicionamiento físico (García Belenguer, 1995; Fernández Mardomingo, 1998; Alonso de la Varga, 1998; Ariola, 1998; Martínez Gomariz, 2001; Picard et al., 2005). Sin embargo, aunque nuestros resultados indican que los músculos esqueléticos de los novillos analizados presentan una gran proporción de fibras tipo II (IIA y IIX), de contracción rápida y con menor resistencia a la fatiga, ello no condujo a falta de fuerza y caída durante su lidia, circunstancia que sí ha sido observada en toros de cuatro años lidiados en Murcia (Martínez Gomariz, 2001) y Francia (Picard et al., 2005). Estos últimos autores observaron que un mayor predominio de fibras tipo IIX (de contracción rápida, fatigables) estaba asociado con los toros que sufrieron más caídas durante la lidia.

En este sentido, García-Belenguer et al. (1995) señalan que la lidia supone la realización de un gran esfuerzo para el animal, el cual queda sometido a un ejercicio intenso, de unos 15 minutos de duración, que provoca importantes cambios metabólicos. Asimismo, Aceña (1993) indica que la totalidad de las suertes que constituyen la lidia, sumado al ambiente de la corrida, constituyen una situación estresante tanto física como psicológica que afecta profundamente a la fisiología del toro bravo. No es de extrañar por tanto, que muchas de las fibras tipo II agoten sus reservas de glucógeno rápidamente y se lesionen con facilidad (Purroy et al., 1992), hecho que explicaría el incremento de los valores en sangre de las enzimas LDH y CK. De esta forma, valores elevados de estas y otras enzimas han sido apreciados por distintos autores en toros de cuatro años (Purroy y González, 1984; García-Belenguer, 1991; Aceña, 1993; Picard et al., 2005; Salamanca, 2005). Se ha sugerido que las enzimas LDH y CK son liberadas al torrente sanguíneo por alteración de la membrana (sarcolema) de las células musculares y que sus valores están en función de las miopatías generadas por el esfuerzo de los encierros y la lidia (Picard et al., 2005). En nuestro caso, de los 23 novillos analizados solo 5 reflejaron valores de LDH ligeramente superiores a los normales, de los cuales tres de ellos presentan elevación de CK y los otros dos de GOT. Hemos podido comprobar que no existe relación directa entre valores elevados de enzimas musculares (LDH, CK) y lesión muscular, hecho que no concuerda con lo reflejado por Purroy y González (1984), quienes observan una

relación directa entre elevación de actividad enzimática, falta de fuerza durante la lidia y existencia de lesiones musculares (Purroy et al., 1992). Ello nos induce a pensar que los novillos estudiados presentaban un músculo mejor preparado para afrontar el enorme esfuerzo que supone la lidia en comparación con lo que sucede con toros de cuatro años (Martínez Gomariz, 2001). En este sentido destacar una vez más que todos los novillos lidiados en 2007 y 2008 en la plaza de toros de Calasparra (Murcia), mostraron un buen comportamiento en todos los tercios de la lidia. Esto explicaría que el número de miocitos afectados por lesiones de diversa índole es mucho menor que el reflejado en toros de 4 años lidiados en la plaza de toros de Murcia (Martínez Gomariz et al., 1999; 2003). La lesión que con más frecuencia hemos observado se correspondía a fibras redondeadas, hipercontraídas, que habían perdido su típico contorno poligonal, seguida por fibras con rotura del sarcolema y subsecuente pérdida de sarcoplasma. Este tipo de lesión aguda y degenerativa, junto con los casos de fibras licuadas (necróticas) y fibras con presencia de vacuolas podría ser una consecuencia del esfuerzo muscular resultado de la lidia, lesiones que no fueron suficientes para incrementar significativamente los valores de las enzimas LDH y CK. Según Dubowitz (1985) las vacuolas en el músculo esquelético representan una alteración común, que se pueden encontrar en desórdenes variados no relacionados entre sí.

Muchas de estas lesiones fueron observadas en las fibras tipo II. Recordar que buena parte de estas fibras son de contracción rápida y metabolismo predominantemente glicolítico. Es sabido que las fibras glicolíticas tienen el glucógeno como sustrato energético principal y funcionalmente se encargan de los movimientos rápidos y vigorosos de escasa duración. Como la lidia supone un esfuerzo físico de considerable magnitud, se ha sugerido que estas fibras agotan rápidamente sus reservas de glucógeno y se lesionan con mayor facilidad (Aceña, 1993), lo que explicaría que hayamos observado dichas lesiones en fibras tipo II y nunca en las fibras tipo I de contracción lenta y metabolismo oxidativo. Reseñar que todas estas lesiones afectaron a un pequeño número de miocitos, sin comprometer a fascículos enteros o a toda la sección muscular, hecho que

también fue descrito por Martínez Gomariz (2001) en toros lidiados en la plaza de Murcia.

Por otra parte, el análisis de sangre que hemos realizado también ha tratado de averiguar el posible daño renal (valores de urea y creatinina) y el daño hepático (enzimas hepáticas) que la lidia del novillo podría ocasionar. Un estudio similar fue realizado en 2005 por Picard et al. en ejemplares utrerros y cuatreños lidiados en diferentes condiciones. Según estos autores, el ejercicio y el estrés del encierro favorece una ligera mejoría en la respuesta renal a la avalancha de urea producida por la degradación proteínica en el hígado. Asimismo señalan que la creatinina plasmática producida por la degradación de la creatina, podría significar una alta fuente de energía celular por su transformación en ATP. Respecto al perfil hepático, los incrementos de la fosfatasa alcalina y las transaminasas GOT y GPT que encuentran en algunos de los toros estudiados, serían un claro indicador de problemas hepáticos y sobre todo, las dos últimas enzimas serían exponentes del daño celular existente. En nuestro caso, ninguno de los 23 novillos analizados presentó valores que indicaran daño renal o hepático tras la lidia.

Por otro lado, en tres de los 42 novillos estudiados pudimos observar también la presencia de fibras anguladas con notable incremento de la actividad para la enzima NADH. Siempre fueron observadas en el músculo semitendinoso y en número muy escaso. Podría tratarse de una lesión crónica, también observada por García-Belenguer (1991) en toros de cuatro años. Según este autor, las lesiones crónicas, es decir previas a la lidia, estaban estrechamente relacionadas con la deficiencias de vitamina E y selenio, así como con una escasa actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px), lo que en su opinión podrían ayudar al desarrollo de miopatías durante la lidia o tiente.

Finalmente, reseñar que en 6 de los 42 novillos donde se realizó el estudio muscular, encontramos fibras con quistes encapsulados de *Sarcocystis*. Un hallazgo similar ya fue descrito por Martínez Gomariz et al. (2002) en toros de cuatro años. Los quistes ocupan una zona central del sarcoplasma de la fibra y no se aprecia alteración en ninguno de los componentes citoplasmáticos,

conservándose las estructuras contráctiles y respetándose la integridad del sarcolema. Dichos quistes, muy escasos en número, se localizan en el interior del miocito, afectando siempre a las fibras de tipo II, hecho también observado por Martínez Gomariz et al. (2002).

Sanz (1998) considera que el agente etiológico de estos quistes es el parásito protozoo *Sarcocystis miescheriana* que se caracteriza por realizar una parasitación intramuscular, localizada fundamentalmente en la musculatura cardíaca y en el tejido muscular de los miembros, además del esófago, laringe y otras musculaturas, así como en células endoteliales (Jiménez Chamorro. 2000). Sin embargo, el número de quistes observados en nuestro trabajo es infinitamente menor a lo señalado por este autor, quien además describe lesiones inflamatorias, degenerativas y necróticas, sobre todo en el músculo cardíaco. En ningún caso pensamos que la presencia de estos quistes en los novillos lidiados representara algún problema para la correcta función de sus músculos esqueléticos.

VII. CONCLUSIONES

- 1^a. Las técnicas histoquímicas utilizadas nos han permitido reconocer tres tipos de fibras musculares en los músculos tríceps braquial (cabeza larga) y semitendinoso de los novillos analizados. Desde el punto de vista de la actividad de la enzima mATPasa dichas fibras han sido denominadas como tipos I, IIA y IIX. Sin embargo, para su correcta identificación ha sido necesario utilizar un amplio rango de pH (10,2-10,6) en las preincubaciones alcalinas y diferentes tiempos (de 2 a 5 minutos) en las preincubaciones ácidas a pH 4,6.
- 2^a. En base a la intensidad de tinción que ofrecen las fibras ante la técnica NADH-TR, estas han podido ser clasificadas en fibras tipo SO (lentas oxidativas), FOG (rápidas oxidativas-glicolíticas) y FG (rápidas glicolíticas), que de manera general se corresponden con los tipos I, IIA y IIX, respectivamente.
- 3^a. El porcentaje de fibras oxidativas (SO + FOG) es más elevado en la cabeza larga del músculo tríceps braquial, mientras que el músculo semitendinoso presenta una mayor proporción de fibras glicolíticas (FG).
- 4^a. El estudio histológico del músculo esquelético revela que tras la lidia algunas fibras musculares sufren lesiones agudas de tipo degenerativo. Estas lesiones se presentan de forma aislada, afectando a las fibras de tipo II, sin que se vea comprometida la integridad funcional de los fascículos musculares.
- 5^a. En un porcentaje reducido de animales hemos observado lesiones crónicas relacionadas con la presencia de fibras anguladas atróficas y existencia de quistes de *Sarcocystis spp.* Dichas lesiones, que afectaron a un número muy reducido de fibras musculares no representan un problema a la hora de limitar la actividad funcional del músculo.
- 6^a. Los valores de enzimas estudiados en sangre demuestran que en la mayoría de los 23 novillos evaluados la lidia no produjo daño renal, hepático, ni muscular. Tan solo 5 ejemplares presentaron niveles algo más elevados de lo normal en las enzimas LDH, CK y GOT que no se correspondieron con un mayor grado de lesión muscular.

7^a. A raíz de los resultados obtenidos creemos que el músculo esquelético de los novillos se encuentra muy bien preparado para afrontar el enorme esfuerzo que supone la lidia.

VIII. RESUMEN

Muestras de músculo esquelético y sangre fueron tomadas a 48 toros bravos (novillos) lidiados en la plaza de toros de Calasparra (Murcia). Los músculos seleccionados, cabeza larga del tríceps braquial y semitendinoso, fueron analizados desde el punto de vista histológico, con el fin de estudiar las características morfológicas e histoquímicas de los distintos tipos de miocitos y las posibles alteraciones consecuencia de la lidia. Las técnicas histoquímicas han posibilitado reconocer tres tipos de fibras musculares, denominadas I (SO), IIA (FOG) y IIX (FG). El músculo tríceps braquial presentó un porcentaje mayor de fibras oxidativas (SO + FOG) en comparación con el músculo semitendinoso donde predominaron las fibras glicolíticas (FG). El estudio histológico del músculo esquelético reveló además que tras la lidia algunas fibras musculares sufrieron lesiones agudas de tipo degenerativo. Estas lesiones se presentaron de forma aislada, afectando a las fibras de tipo II, sin que se viera comprometida la integridad funcional de los fascículos musculares. En un porcentaje reducido de animales se observaron lesiones crónicas relacionadas con la presencia de fibras anguladas atroficas y quistes de *Sarcocystis* spp. Las muestras de sangre fueron procesadas con objeto de valorar diversas enzimas indicativas del posible daño renal, hepático y muscular consecuencia de la lidia. Los valores de enzimas estudiados en sangre demuestran que en la mayoría de los novillos la lidia no produjo daño renal, ni hepático, ni muscular. Tan solo 5 ejemplares presentaron niveles algo más elevados de lo normal en las enzimas LDH y CK que no se correspondieron con un mayor grado de lesión muscular. Este trabajo demuestra que el músculo esquelético de los novillos estudiados se encontraba bien preparado para afrontar el esfuerzo que supone la lidia.

SUMMARY

The samples were taken from blood and skeletal muscle in 48 fighting bulls at bullring in Calasparra (Murcia). Selected muscles, long head of the triceps brachial and semitendinosus were analyzed histologically, in order to study morphological and histochemical characteristics of different types of myocytes and their possible alterations as consequence of the fighting. Three types of muscle fibers, called I (SO), IIA (FOG) and IIX (FG) were identified from histochemical techniques. The triceps brachii muscle presented a higher percentage of oxidative fibers (SO + FOG) when comparing with semitendinosus where glycolytic fibers (FG) were highest. Histological examination of skeletal muscle also revealed that after fighting some muscle fibers suffered acute degenerative injuries. These injuries were scarce, such that these only affected to the type II fibers, without affecting the functional integrity of the muscle bundles. A small percentage of animals showed chronic injuries corresponding with atrophic angulated fibers and cysts of *Sarcocystis* spp. Blood samples were processed in order to assess several enzymes indicative of kidney damage, liver damage and muscle damage as result of the fight. The enzymes values in blood showed that the fight did not cause damages in kidney, liver, and muscle in the most of the bulls. Only 5 bulls showed levels of LDH and CK enzymes higher than the normal levels without observing positive correlation with the degree of muscle injury. This work shows that the skeletal muscle of the bulls was well prepared to face the effort involved in the fight.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ACEÑA M.C., 1993. *Estudio de la respuesta de estrés en el toro bravo y su relación con la fuerza y la adaptación muscular al ejercicio durante la lidia*. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- AIGNER S., GOHLSCH B., HÄMÄLÄINEN N., STARON R.S., UBER A., WEHRLE U. & D. PETTE, 1993. *Fast myosin heavy chain diversity in skeletal muscles of the rabbit: heavy chain IId, not IIb predominates*. Eur. J. Biochem., 211: 367.
- ALONSO DE LA VARGA M.E., 1998. *Genética: Metodología y evaluación*. Ponencia a las III Jornadas Técnicas de A.V.E.T., Marbella (Málaga).
- ANDERSEN P. & J. HERIKSON, 1977. *Training induced changes in skeletal subgroups of human type II skeletal muscle fibers*. Acta Physiol. Scand., 99: 123-125.
- ARIOLA J., 1998. *Causas asociadas en la falta de fuerza y caída del toro de lidia*. Ponencia III Jornadas Técnicas de A.V.E.T., Marbella (Málaga).
- ASHMORE C.R & L. DOERR, 1971. *Comparative aspects of muscle fiber types in different species*. Exp. Neurol., 31: 408-418.
- ASKANAS V. & W.K. ENGEL, 1975. *Distinct subtypes of type I fibers of human skeletal muscle*. Neurology, 25: 58-67.
- BÄR A & D. PETTE, 1988. *Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle*. FEBS Lett., 235: 153-155.
- BÁRÁNY M., 1967. *ATPase activity of miosin correlated with speed of muscle shortening*. J. Gen. Phisiol., 50: 197-216.
- BÁRÁNY M., BÁRÁNY K., RECKARD T., & A. VOLPE, 1965. *Myosin of fast and slow muscles of the rabbit*. Arch. Biochem. Biophys., 109: 185-191.

- BILLETER R., HEIZAM G.W., HOWALD H. & E. JENNY, 1981. *Analysis of miosin ligth and heavy chain types in human skeletal muscles*. Eur. J. Biochem., 116: 437-442.
- BIRAL D., BETTO R., DANIELI-BETTO D. & G. SALVIATI, 1988. *Myosin heavy chain composition of single fibers from normal human muscle*. Biochem. J., 250: 307-308.
- BOTTINELLI R., BETTO R., SCHIAFFINO S. & C. REGGIANI, 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: 413-19.
- BRAUND K.G., 1989. *Skeletal muscle biopsy*. Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small animal), 4: 108-115.
- BROOKE M.H. & K.K. KAISER, 1970. *Muscle fiber types: How many and what kind*. Arch. Neurol., 23: 369-379.
- BROOKE M.H., WILLIAMSON E. & K.K. KAISER, 1971. *The behavior of four fiber types in developing and reinnervated muscle*. Archives of Neurology, 25: 360-366.
- BRUMBACK R.A. & R.W. LEECH, 1984. *Color Atlas of Muscle Histochemistry*. PSG, Massachusetts.
- BUÑO W. & N.I. GERMINO, 1958. *Distribution of succinic dehydrogenase in the organs of the adult albino rats*. Acta Anat. (Basel), 33: 161.
- BURKE R.E., LEVINE D.N., ZAJAK F.E. & P. TSAIRIS, 1973. *Physiological types and histochemicals profiles in motor units of the cat gastrocnemius*. J. Physiol., 234: 723-748.

- BURKE R.E., LEVINE D.N., SALCMAN M. & P. TSAIRIS, 1974. *Motor units in cat soleus muscle: physiological, histochemical and morphological characteristics*. J. Physiol., 238: 505-514.
- BURKE R.E., LEVINE D.N., ZAJAK F.E., TSAIRIS P. & W.K. ENGEL, 1971. *Mammalian motor units. Physiological-Histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius*. Science, 174: 709-712.
- CARCELLER H., 1997. *Gimnástica funcional del toro de lidia*. Rev. Bovis, 78: 31-39.
- DANIELI-BETTO D., ZERBATO E. & R. BETTO, 1986. *Type 1, 2A, and 2B myosin heavy chain electrophoretic analysis of rat muscle fibers*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 138:981-987.
- DEKLEVA A. & A. SIRCA, 1978. *Histochemical type I fibres in the soleus muscle of the rat*. J. Anat., 127: 595-601.
- DELLMANN H.D., 1994. *Histología veterinaria*. Ed. Acribia, Zaragoza.
- DELLMANN H.D. & E.M. BROWN, 1980. *Histología veterinaria*. Ed. Acribia, Zaragoza.
- DUBOWITZ V., 1985. *Muscle biopsy: a practical approach*. Ed. Bailliere Tindal. London.
- DUBOWITZ V. & M.H. BROOKE, 1973. *Muscle biopsy: a modern approach*. W.B. Saunders. London.
- DUBOWITZ V. & A.G. PEARSE, 1960. *A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle*. Histochemie, 2: 105-117.

- ENGEL W.K., 1962. *The essentiality of histo and cytochemical studies of skeletal muscle investigation of neuromuscular disease*. Neurol. (Minneapolis), 12: 778-784.
- ENGEL A.G. & B.Q. BANKER, 1986. *Myology. Basic and clinical*. McGraw-Hill. New York.
- ENGEL W.K. & M.H. BROOKE, 1966. *Muscle biopsy as a clinical diagnostic aid*. In: W.S. Fields (Ed). Neurological Diagnostic Technique, p. 90. Charles C. Thomas, Springfield. I. L.
- FERNÁNDEZ MARDOMINGO B., 1998. *Compendio etiológico y evolución histórica de la caída del toro de lidia*. Ponencia a las III Jornadas Técnicas de A.V.E.T., Marbella (Málaga).
- GARCÍA-BELENQUER S., 1991. *Estudio de degeneraciones musculares en ganado bravo y su relación con la fuerza exhibida por los animales durante la lidia*. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- GARCIA-BELENQUER S., ACEÑA S., SÁNCHEZ J.M. y A. PURROY, 1995. *La fuerza y las caídas del toro de lidia*. Rev. Bovis, 62: 65-74.
- GARCÍA-BELENQUER S., GASCÓN M., PURROY A. y M.C. ACEÑA, 1992. *Distrofia muscular nutricional por deficiencia de selenio y/o vitamina E en rumiantes*. Méd. Vét., 9: 84-92.
- GARCIA-BELENQUER S., PURROY A., GASCON M., BARBERAN M., GONZALEZ J.M., ACEÑA M.C. y J. ALTARRIBA, 1992. *Relation entre les concentrations sériques en selenium et en vitamine E, la pathologie musculaire et le comportement des taureaux de combat pendant la corrida*. Rec. Méd. Vét., 168: 105-110.

- GARCÍA-BELENGUER S., PURROY A., GONZÁLEZ J.M. y M. GASCÓN, 1991. *Efecto de la complementación con selenio y vitamina E en vacas bravas sometidas a diferentes prácticas de manejo*. Arch. Zootec., 40: 251-260.
- GAUTHIER G.F. & F. PADYKULA, 1966. *Cytological studies of fiber types in skeletal muscles. A comparative study of the mammalian diaphragm*. Journal of Cell Biol., Vol. 28.
- GAUTHIER G.F., 1969. *On the relationship of ultraestructural and citochemical features to colour in mammals skeletal muscle*. Z. Zellforsch., 95: 462-465.
- GIL F., LÓPEZ-ALBORS O., VAZQUEZ J.M., LATORRE R., RAMÍREZ-ZARZOSA G. & F. MORENO, 2001a. *The histochemical profiles of fibre types in porcine skeletal muscle*. Histology and Histopathology, 16: 439-442.
- GIL CANO, F., LÓPEZ-ALBORS O., RAMÍREZ-ZARZOSA, G., LATORRE-REVIRIEGO, R., MARTÍNEZ-GOMARIZ, F. y J.M. VÁZQUEZ, 2001b. *Estudio histoquímico del músculo cuádriceps del muslo (vasto medial) en cerdos Landrace e Ibérico*. Rev. Anaporc, 1: 2-8.
- GREEN H.J., REICHMANN H. & D. PETTE, 1982. *A comparison of two ATPase based schemes for histochemical muscle fibre typing in various mammals*. Histochemistry, 76: 21-31.
- GOLLNICK P.D. & H. MATOBA, 1984. *Identification of fiber types in rat skeletal muscle based on the sensivity of myofibrillar actomyosin ATPase to coper*. Histochemistry, 81: 379-383.
- GOLLNICK P.D., PARSONS D. & C.R. OAKLEY, 1983. *Enzyme activity and fiber composition in skeletal muscle from the secuential inactivation of myofibrillar actomyosin ATPase during acid preincubation*. Histochemistry, 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.
- GUTH L. & F.J. SAMAHA, 1969. *Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle*. Exp. Neurol., 25: 138-152.
- HÄMÄLÄINEN N. & D. PETTE, 1993. *The histochemical profiles of fast fiber IIB, IID, and IIA in skeletal muscle of mouse, rat, and rabbit*. J. Histochem. Cytochem., 38: 257-265.
- HOH J., McGRATH P.A. & R.I. WHITE, 1976. *Electroforetic analysis of multiple forms of myosin in fast-twitch and slow-twitch muscle of the chick*. Biochem. J., 157: 87-95.
- HUNT M.C. & H.B. HEDRICK, 1977. *Profile of fiber types and related properties of five bovine muscles*. J. Food Sci., 42: 513-517.
- INGJER F., 1978. *Maximal aerobic power related to the capillary supply of cuadriceps muscle in man*. Acta Physiol. Scand., 104: 238-240.
- JANSON E., SJÖDIN B. & P. TESCH, 1978. *Changes in muscle fiber type distribution in man after physical training. A sing of fiber type transformation ?*. Acta Physiol. Scand., 104: 235-236.
- JENNEKENS F.G.I., MELIER A.E.F.H., BETHLEM J. & G. VAN WINGAARDEN, 1974. *Fibre hybrids in type groups*. J. Neurol. Sci., 23: 337-352.
- JIMÉNEZ CHAMORRO J.M., 2000. *Factores patológicos en la caída del toro de lidia*. Rev. Macracantorrinco. Consejo Regional de Colegios Veterinarios de Extremadura. Cáceres.

- KAKULAS B.A. & R.D. ADAMS, 1985. *"Diseases of Muscle"*. Harper and Row. Philadelphia.
- KARLSSON A., 1993. *Porcine muscle fibres. Biochemical and histochemical properties in relation to meat quality*. Thesis Univ. Uppsala. Sweden.
- KARPATI G., EISEN A. & S. CARPENTER, 1975. *Subtypes of the histochemical type I muscle fibers*. J. Histochem. Cytochem., 8: 1-48.
- KHAN M.A., 1978. *Histoenzymatic characterization of subtypes of types I fibres in fast muscles of rats*. Histochemistry, 55: 129-138.
- KHAN M.A., PAPADIMITRIU J.M., HOLT P.G. & B.A. KAKULAS, 1972. *A calcium-citro-phosphate technique for the histochemical localization of myosin ATPase*. Stain Technol., 47: 277-281.
- KHAN M.A., PAPADIMITRIOU J.M. & B.A. KAKULAS, 1974. *The effect of temperature on the pH stability of myosin ATPase as demonstrated histochemically*. Histochemistry, 38: 181-194.
- KUGELBERG E. & L. EDSTRÖM, 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 & S. SCHIAFFINO, 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-C101.
- LATORRE R., GIL F., VAZQUEZ J.M., MORENO F., MASCARELLO F. & G. RAMIREZ, 1993. *Skeletal muscle fibre types in the dog*. J. Anat., 182: 329-337.

- LEFAUCHEUR L., HOFFMAN R.K., GERRARD D.E., OKAMURA C.S., RUBINSTEIN N. & A. KELLY, 1998. *Evidence for three adult fast myosin heavy chain isoforms in type skeletal muscle fibers in pigs*. J. Anim. Sci., 76: 1584-1593.
- LÓPEZ-RIVERO J.L., TALMADGE R.J. & V. REGGIE-EDGERTON, 1998. *Fibre size and metabolic properties of myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle*. J. Muscle Res. & Cell Motil., 19: 733-742.
- LOWELY S. & D. RYSBY, 1971. *Light chains from fast and slow muscle myosins*. Nature (Lond.), 234: 81-85.
- MABUCHI K. & F.A. SRETER, 1980. *Actomyosin ATPase. II. Fiber typing by histochemical ATPase reaction*. Muscle Nerve, 3: 233-239.
- MALLIET M., 1980. *Histología e histofisiología humanas. Tejido muscular*. Ed. AC, Madrid.
- MARTÍNEZ GOMARIZ, F. 2001. *Tipos de fibras en el músculo esquelético del toro bravo (Bos taurus Ibericus): Su relación con la caída durante la lidia*. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- MARTÍNEZ GOMARIZ F., J.M. VÁZQUEZ, F. MORENO, F. GIL, G. RAMÍREZ, R, LATORRE y O. LÓPEZ. 1998. *Tipos de fibras en el músculo esquelético del toro de lidia (Bos taurus Ibericus). Estudio histoquímico y morfométrico*. Anales de Veterinaria (Murcia), 13-14: 35-44.
- MARTÍNEZ GOMARIZ F., J.M. VÁZQUEZ, F. MORENO, F. GIL, G. RAMÍREZ, R, LATORRE, O. LÓPEZ-ALBORS y F. MORENO. 1999. *Lesiones musculares en el toro bravo (Bos taurus Ibericus) después de la lidia*. Anales de Veterinaria (Murcia), 15: 17-24.

- MARTÍNEZ GOMARIZ, F., GIL F., RAMÍREZ-ZARZOSA G., LATORRE R., LÓPEZ-ALBORS O., SÁNCHEZ C y J.M. VÁZQUEZ. 2002. Presencia de *Sarcocystis* en músculo esquelético del toro de lidia. *Nuestra Cabaña*, 316: 6-10.
- MARTÍNEZ-GOMARIZ F., F. GIL, J.M. VÁZQUEZ, G. RAMÍREZ, R. LATORRE, O. LÓPEZ-ALBORS, C. SÁNCHEZ COLLADO, M.D. AYALA y F. MORENO. 2003. Types de fibres du muscle squelettique du taureau de combat (*Bos taurus Ibericus*). *Revue de Médecine Veterinaire*. En prensa.
- MASCARELLO F., SCAPOLO P.A. & R. ROWLERSON, 1986 *Functional adaptation of the fibre type composition of skeletal muscle in mammals*. *Bas. Appl. Histochem.*, 30: 279-283.
- MATOKA H. & P.D. GOLLNICK, 1984. *Influence of ionic composition, buffering agent, and pH on the histochemical demonstration of myofibrillar actomyosin ATPase*. *Histochemistry*, 80: 609-614.
- MAY M.L., DIKEMAN M.E. & R. SCHALLES, 1977. *Longissimus muscle histological characteristics of Simmental X Angus, Hereford X Angus and Limousin X Angus crossbred steers as related to carcass composition and meat palatability traits*. *J. Anim. Sci.*, 44: 571-580.
- MEIJER A.E.F.H., 1970. *Histochemical method for the demonstration of myosin adenosine triphosphatase in muscle tissues*. *Histochemie*, 22:51-58.
- MÜNTENER M., 1979. *Variable pH dependence of the myosin-ATPase in different muscles of the rat*. *Histochemistry*, 62: 2299-304.
- NACHMIAS V.T. & H.A. PADYKULA, 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. & A.M. KELLY, 1987. *Slow myosin in developing rat skeletal muscle*. J. Cell. Biol., 104: 447-459.
- NEMETH P., HOFER H.W. & D. PETTE, 1979. *Metabolic heterogeneity of muscle fibres classified by myosin ATPase*. Histochemistry, 63: 191-201.
- NEMETH P. & D. PETTE, 1980. *The intrerrelationship of two systems of fiber classification in rat EDL muscle*. J. Histochem. Cytochem., 28: 193.
- NEMETH P. & D. PETTE, 1981. *The limited correlation of myosin-based and metabolism based classification of skeletal muscle fibers*. J. Histochem. Cytochem., 29: 89-90.
- OGATA T., 1958. *A histochemical study of the red and white muscle fibers*. Parts I, II and III. Acta Med. Okayama, 12: 216-236.
- PADIKULA H. A. & E. HERMAN, 1955. *Factors affecting the activity of adenosine triphosphatase and other phosphatase as measured by histochemical techniques*. J. Histochem. Cytochem., 3: 170-195.
- PADYKULA H.A., 1952. *The localization of succinic dehydrogenase in tissue sections of the rat*. Am. J. Anat., 91: 107-145.
- PANIAGUA J., 1998. *Condicionantes y análisis de la fuerza del toro de lidia*. Ponencia III Jornadas Técnicas de A.V.E.T., Marbella (Málaga).
- PEARSE A.G.E., 1961. *Direct relationship of phosphorylase and mitochondrial glicerophosphatase dehydrogenase activity in skeletal muscle*. Nature, 19:504.

- PETER J.B., BARNARD V.R., EDGERTON C.A., GILLIESPIE & K.E. STEMPEL, 1972. *Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinean pig and rabbits*. *Biochemistry.*, 11: 2627-2633.
- PETTE D. & R.S. STARON, 1988. *Molecular basis of the phenotypic characteristics of mammalian muscle fibres*. In: Evered D, Whelan J (eds) *Plasticity of the neuromuscular system*. Ciba Foundation symposium 138. Wiley, Chichester, pp 22-34.
- PICARD. ET AL, 2005. Identificación de los factores responsables de la fatiga muscular del toro de lidia.
- PIEROBON-BORMIOLI S., SARTORE S., VITADELLO M., DALLA-LIBERA L. & S. SCHIAFFINO, 1980. *Slow myosin in vertebrate skeletal muscle. An immunofluorescence study*. *J. Cell. Biol.*, 85: 672-681.
- PURROY A. y J.M. GONZÁLEZ, 1984. *Etude des enzymes plasmatiques des taureaux de combat tués en corridas*. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 25: 599-603.
- PURROY A., GARCÍA-BELENGUER S., GONZÁLEZ J.M., GASCÓN M. y M. BARBERÁN, 1992. *Lesions musculaires et activités enzymatiques chez les bovins de combat*. *Ann. Rech. Vét.*, 23: 59-62.
- RODERO FRANGANILLO A., 1998. *Genética y caídas*. Ponencia a las III Jornadas Técnicas de A.V.E.T., Marbella (Málaga).
- RODRÍGUEZ MONTESINOS A., 1991. *Entre campos y ruedas*. Ed. Consej. Gen. Col. Vet. de España. Madrid.
- ROMAGOSA VILA J.A., 1977. *Las caídas del toro durante la lidia*. Edit. Pons. Madrid.

- ROMANUL F.C., 1964. *Enzimes in muscle. I. Histochemical studies of enzimes in individual muscle fibers*. Arch. Neurol., 12: 497-507.
- RUSBROOK J.I. & A. STRACHER, 1979. *Comparisson of adult, embryonic and dystrophic myosin heavy chains from chicken muscle by sodium dodecilsulphate polycrilamide gel electrophoresis and peptide mapping*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 76: 4331-4334.
- SAMAHA F.J., GUTH L. & R.W. ALBERS, 1970. *Phenotypic differences between the actomyosin ATPase of the three fibers types of mammalian skeletal muscles*. Exp. Neurol., 26: 120-125.
- SANDOVAL J., 1994. *Tratado de Anatomía Veterinaria Tomo II: Aparato locomotor*. Imprenta Sorles. León.
- SANZ MÉNDEZ M., 1998. *Caídas del toro de lidia. Su patología. Posibles causas etiológicas y su control*. Ponencia a las III Jornadas Técnicas de A.V.E.T., Marbella (Málaga).
- SARNAT H.B., 1983. *Muscle pathology and histochemistry*. American Society of Clinical Pathologist Press. Chicago.
- SARTORE S., MASCARELLO F., ROWLERSON A., GORZA L., AUSONI S., VIANELLO M. & S. SCHIAFFINO, 1987. *Fibre types in extraocular muscles: a new myosin isoform in the fast fibres*. J. Muscle Res. Cell. Motil., 8: 161-172.
- SCHIAFFINO S., GORZA L., SARTORE L., SAGGIN L., AUSONI M., GUNDERSEN K. & T. LOMO, 1989. *Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres*. J. Muscle Res. Cell. Motil., 10: 197-205.
- SCHIAFFINO S., HANZLÍKOVÁ V. & S. PIEROBON, 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. & L GORZA, 1986. *Muscle fiber types identified by monoclonal antibodies to myosin heavy chains*. In Benzi, G., Packer, L., Siliprandi, N. Eds. *Biochemical aspects of physical exercise*. Amsterdam, New York: Elsevier Science: 27.
- 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.
- SELIGMAN A.M. & A.M. RUTENBURG, 1951. *Histochemical demonstration of succinic dehidrogenase*. Science, 113: 317-321.
- SMERDU V., KARSH-MIZRACHI I., CAMPIONE M., LEINWARD L. & S. SCHIAFFINO, 1994. *Type IIX myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibers of human skeletal muscle*. Am. J. Physiol. 267 (Cell. Physiol 36), 1723-1728.
- SMITH A., CARTER N. & S. JEFFERY, 1987 *Increased ATPase acid stability in type I fibers of rats soleus*. J. Histochem. Cytochem., 35: 699-701.
- SERRANO A.L., PETRIE J.L., LOPEZ RIVERO J.L. & J.W. HERMANSON, 1996. *Myosin isoforms and muscle fiber characteristics in equine gluteus medius muscle*. Anat. Rec., 244: 444-451.
- SEVA J., PALLARÉS F.J., RODRÍGUEZ F.A., GÓMEZ M.A. y A. BERNABÉ, 2001. *Valoración histoquímica del glucógeno hepático en el toro de lidia*. An. Vet. De Murcia, Vol. 15-16. (En prensa).
- SNOW D., BILLETTER F., MASCARELLO F., CARPENE E. & E. JENNY, 1982. *No classical IIB fibers in dog skeletal muscle*. Histochemistry., 75: 53-65.

- SOLOMON M.B. & M.C. DUNN, 1988. *Simultaneous histochemical determination of three fiber types in single sections of ovine, bovine and porcine skeletal muscle*. J. Anim. Sci., 66: 255-264.
- SRÉTER F.A., SEIDEL J.C. & J. GERGELY, 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. & D. PETTE, 1986. *Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in rabbit muscle fibers*. Histochem., 86: 19-25.
- STARON R.S. & D. PETTE, 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. & D. PETTE, 1987b. *The multiplicity of myosin light and heavy chain combinations in histochemically typed single fibres. Rabbit soleus muscle*. Biochem. J., 243:695-699.
- STARON R.S., IKIDA R.S. & F.C. HAGERMAN, 1983. *Reevaluation of human muscle fast-twitch subtypes: Evidence for a continuum*. Histochemistry., 78: 33-39.
- STEIN J.M. & H.A. PADYKULA, 1962. *Histochemical classification of individual skeletal muscle fibers of the rat*. Am. J. Anat., 110-123.
- TERMIN A., STARON R.S. & D. PETTE, 1989. *Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle*. Histochemistry, 92: 453-457.
- TOTLAND G.K. & H. KRIVY, 1991. *Distribution patterns of muscle fibre types in major muscle of the bull (Bos taurus)*. Anat. Embryol., 1984: 441-450.

- TOTLAND G.K., KRYVI H. & E. SLINDE, 1988. *Composition of muscle fibre types and connective tissue in bovine m. Semitendinosus and its relation to tenderness*. Meat Science, 23: 303-315.
- WACHTEIN M. & E. MEISEL, 1955. *The distribution of histochemically demonstrable succínico dehidrogenase and of mitochondria in tongue and skeletal muscles*. J. Biophys. Biochem. Citol., 1: 483-489.
- WEEDS A.G. & K. BURRIDGE, 1975. *Myosin from cross reinnervated cat muscles. Evidence for reciprocal transformation of heavy chains*. F.E.B.S. Lett. 57: 203-208.
- WEEDS A.G., 1980. *Myosin ligth chains, polimorphism and fiber types in skeletal muscle*. In: Plasticity of muscle. Pette, D. Walter de Gruile, Berlín, New York. 55-68.
- WHALEN R.G., SELL S.M., BUTLER-BROWNE G.S., SCHWARTZ K., BOUVERET P. & PINSET-HARSTROM. 1981. *Three myosin heavy-chain isozymes appear sequentially in rat muscle development*. Nature (Lond.). 295: 805-809.
- WIECZOREK D.F., PERIASAMY M., BUTLER-BROWNE G.S., WHALEN R.G. & B. NADAL-GINARD, 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.
- ZARAZAGA I., 1984. *Estudios sobre el toro de lidia*. Gráficos Litos. Zaragoza.